

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА *Juniperus communis* var. *oblonga* Hort. ex Loudon. В КАВКАЗСКОМ РЕГИОНЕ РОССИИ, ОСНОВАННАЯ НА nSSR-МАРКЕРАХ

© 2024 г. Е. В. Хантемирова*

Институт экологии растений и животных Уральского отделения Российской академии наук,
Екатеринбург, 620144 Россия

*e-mail: hantemirova@ipae.uran.ru

Поступила в редакцию 02.04.2024 г.

После доработки 24.04.2024 г.

Принята к публикации 03.05.2024 г.

Десять популяций кавказского можжевельника *J. communis* var. *oblonga* были проанализированы с помощью семи ядерных микросателлитных локусов (nSSR), чтобы сделать выводы о путях миграции и генетических связях с популяциями северной части ареала. Эти новые данные были объединены с ранее полученными из основного евроазиатского ареала. Результаты анализа nSSR подтверждают данные по структуре хпДНК *J. communis* var. *oblonga* о существовании глубокого расхождения между популяциями восточной части Большого Кавказа и популяциями основного ареала, что, вероятно, связано с длительной изоляцией можжевельника в этой части Кавказа. В то же время результаты свидетельствуют о существовании у можжевельника генного потока из основного ареала в сторону Западного Кавказа, который был интенсивнее с семенами. Установившиеся в межледниковые периоды маршруты миграций перелетных птиц способствовали расселению семян на большие расстояния и контактам можжевельника основной части ареала с можжевельником западной части Кавказа, что отразилось на структуре изменчивости ядерной ДНК.

Ключевые слова: *J. communis* var. *oblonga*, ядерная ДНК, nSSR, генетическое разнообразие, Большой Кавказ.

DOI: 10.31857/S0016675824090062 EDN: AEBYZM

Разные виды древесных растений в Евразии по-разному реагировали на климатические изменения плейстоцена и голоцена. В период четвертичных оледенений ареалы широколиственных лесных видов Северной Евразии периодически сокращались с отступанием на юг и последующей реколонизацией в межледниковье [1, 2]. Эти миграции оставляли четкий генетический след в структуре изменчивости хлоропластного, митохондриального и ядерного геномов. Однако более холодостойкие таежные виды (береза, ива, ель, сосна), по-видимому, не полностью отступали в южные районы в неблагоприятные периоды и, возможно, сохраняли довольно обширные популяции вблизи ледниковых щитов [3–8]. Эти популяции могли расширять свои ареалы во время теплых стадий и обладать значительным потоком генов. Четкая филогеографическая структура у них отсутствует или имеет более комплексный и трудно интерпретируемый характер, относясь к эпохам более ранним, чем последний ледниковый максимум. Такие виды, как, например, *Pinus sylvestris* L., на большом протяжении своего ареала могут

иметь однородную генетическую структуру с низкой межпопуляционной изменчивостью [9].

Среди всех хвойных видов выделяется один уникальный вид, способный успешно справляться с климатическими изменениями благодаря разнообразию жизненных форм и ряду других свойств, выработавшихся в процессе эволюции.

Это можжевельник обыкновенный (*Juniperus communis* L.) – самый молодой вид из семейства Cupressaceae, сформировавшийся в условиях прогрессивного похолодания планеты [10]. В отличие от своих теплолюбивых родственников, занимающих небольшие ареалы в семиаридных экотопах, этот вид смог широко расселиться по планете. Южная граница современного ареала можжевельника в Северной Евразии совпадает с границей ареала сосны обыкновенной, однако на север ареал можжевельника простирается значительно дальше сосны, вплоть до 70-й параллели, где он широко расселяется в тундрах, горах и на каменистых склонах. В благоприятных условиях он растет в виде прямо стоячего кустарника или даже деревца, на бедных

почвах и в суровых температурных условиях — в виде слаганика, зимующего под снегом.

Вероятно, у *J. communis* не совсем отрегулированы гены апикального доминирования, он не запрограммирован четко на верхушечный рост так, как другие хвойные деревья. И хотя он не в силах конкурировать с другими быстро растущими хвойными и не способен образовывать столько же биомассы, как они, его способность к переходу в стелющую форму может играть отличную роль при климатических флуктуациях.

Помимо широкой экологической амплитуды и высокой морфологической пластичности можжевельник обладает также и эффективным способом рассеивания семян с помощью птиц и мелких млекопитающих, что позволяло ему не только переживать ледниковые периоды во множестве микро-рефугиумов, но и быстро расселяться в периоды потеплений.

Анализ изменчивости хлоропластной ДНК (хпДНК) *J. communis* в Евразии показал наличие одной большой однородной генетической группы на территории Европы, Урала и Сибири и двух изолированных групп в горах Центральной Азии и на Дальнем Востоке России [11]. Слабая подразделенность популяций можжевельника на основной части ареала косвенно указывает на значительный поток генов между этими популяциями и их общее происхождение из одного источника (возможно, это были Альпы) еще до последнего ледникового максимума. То есть лишь несколько гаплотипов были широко распространены в этой большой группе, в то время как чрезвычайно большое количество гаплотипов было ограничено отдельными популяциями. Это позволяет предположить существование микро-рефугиумов этого вида во время четвертичных оледенений. Этот факт вместе с необычно высоким внутривидовым разнообразием в северных популяциях можжевельника свидетельствуют о том, что в последний ледниковый максимум можжевельник выживал и, вероятно, даже процветал в высоких широтах в многочисленных перигляциальных микро-рефугиумах (cryptic refugium), которые являлись вторичными центрами реколонизации. Четвертичные колебания климата неоднократно приводили к возникновению обширных перигляциальных ландшафтов с высокой долей ксерофитной и арктоальпийской растительности, где, судя по пыльцевым остаткам, можжевельник играл не последнюю роль [12].

С помощью молекулярных маркеров не удалось обнаружить генетических отличий у разновидностей можжевельника, выделяемых по форме роста: прямостоячей *J. communis* L. var. *communis* (common juniper в англоязычной литературе) и слагниковой *J. communis* var. *saxatilis* Pall. (dwarf juniper там же), но при этом обнаружены статистически

значимые отличия по ряду морфологических и анатомических параметров хвои и преобладающей жизненной форме [13]. Видимо, обладая высокой полиморфностью, можжевельник обыкновенный существует одновременно в виде нескольких жизненных форм. Под действием отбора в разных экологических условиях начинает преобладать одна из них, в то же время постоянно существующий обмен генами между популяциями поддерживает генетическое единообразие на обширном ареале.

В то же время с помощью хлоропластных маркеров выявилась генетическая дифференциация горных популяций *J. communis*, локализованных на южной периферии ареала (горные системы Гималаев, Тибета, Тянь-Шаня, Алтай, Саян и Большого Кавказа). Все они, за исключением наиболее западных кавказских популяций, имели низкие показатели внутривидового разнообразия. Вероятно, популяции можжевельника в этой части ареала представляют собой древние дивергированные генетические линии, не вносившие вклад в реколонизацию Северной Евразии. Тем не менее их длительная историческая стабильность позволила им сохранить уникальный запас генетической изменчивости, изучение которой могло бы дать ответы на многие вопросы происхождения и расселения этого вида на евразийском континенте.

В европейской части Евразии особый интерес в этом отношении представляет территория Большого Кавказа, которая является самым южным форпостом для *J. communis*. Здесь он уже начинает замещаться другими более теплолюбивыми и засухоустойчивыми видами можжевельников, например *Juniperus deltoids* R.P. Adams. Систематика кавказского можжевельника очень запутана, он имеет множество синонимов в качестве вида, подвида и разновидности: *J. oblonga* M.-Bieb (= *J. albanica* Penzes, *J. communis* var. *caucasica* Endl., *J. communis* var. *oblonga* hort. ex Loudon., *J. communis* var. *saxatilis* Pall.) [14–16]. Н. Имханицкая [17] считает этот можжевельник подвидом обыкновенного: *J. communis* subsp. *oblonga* (Bieb) Galushko и выделяет еще два подвида по форме роста: низкий кустарник *J. communis* subsp. *hemisphaerica* C. Presl) Nym. и слагник *J. communis* subsp. *pygmaea* (C. Koch) Imch. А. Фарджун [18] не признает выделения этого можжевельника даже в качестве разновидности. Р. Адамс, применив молекулярные методы (RAPD), также не внес ясности. Сначала он придает ему статус отдельного вида *J. oblonga* [19, 20], но в более поздних работах не обнаруживает дифференциации [21, 22]. В дальнейшем, используя другие методы, он все-таки находит основания для отграничения *J. communis* var. *oblonga* [23].

Наши исследования с помощью ядерных (аллозимы) и хлоропластных маркеров также подтвердили выделение этой разновидности [11, 24]. Эти выводы были далее дополнены с помощью

морфологического анализа [13]. У кавказского можжевельника обнаружено достоверное увеличение ширины и длины хвои, более длинный кончик хвои, две устьичные полоски, развитый проводящий пучок с большим количеством обкладочных клеток.

Однако эти методы выявили также значительную дифференциацию между популяциями этой разновидности на Кавказе. В то время как популяции восточной части Северного Кавказа были сильно дивергированы от остальных популяций *J. communis* по всем маркерам, популяции из западной части обнаруживали некоторые связи с можжевельником из основного европейского ареала. Например, наиболее западная в нашем исследовании популяция из района Сочи по ряду морфологических и генетических параметров оказалась близка к альпийским растениям. Остались неясными происхождение этих западных популяций и история их расселений. Ответить на эти вопросы нам не позволило, в частности, отсутствие выборки на большом географическом промежутке между Кавказом и Альпами.

В настоящем исследовании мы восполнили этот недостаток, собрав выборку *J. communis* с Балканского полуострова и дополнительные выборки с Кавказа. Мы сконцентрировались здесь на филогеографии *J. communis* var. *oblonga* на Северном Кавказе, этом уникальном географическом регионе, который благодаря своей геологической истории, климатическим особенностям и топографии, вероятно, с конца миоцена играл важную роль в сохранении и возникновении биологического разнообразия видов. Для изучения истории можжевельника обыкновенного на Северном Кавказе в десяти популяциях *J. communis* var. *oblonga* с помощью анализа семи ядерных микросателлитных локусов оценены уровень генетического разнообразия и дифференциации, сделаны выводы о путях его миграции и генетических связях с популяциями можжевельника северной части ареала. Эти новые данные были объединены с данными анализа nSSR по 24 популяциям *J. communis*, ранее полученными из основного евроазиатского ареала [25], и с данными по изменчивости хпДНК [11].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал для ДНК-анализа

В настоящей работе для мультилокусного генетического анализа с помощью ядерных микросателлитов использовалась ДНК 149 образцов из десяти популяций *J. communis* var. *oblonga* из Северного Кавказа: три популяции из западной части, одна из центральной и семь из восточной части (табл. 1). Также исследовано девять образцов из

балканской популяции (Болгария). Каждый набор образцов содержал в среднем 16 случайно отобранных растений. Стратегия отбора выборок растений была разработана таким образом, чтобы избежать сбора особей, расположенных ближе 15 м друг от друга, что минимизировало сбор растений клонового происхождения. Собранную хвою сушили в бумажных конвертах или хранили в силикагеле до выделения ДНК. Для некоторых видов анализа эти выборки объединялись с 363 образцами из 24 популяций *J. communis*, использованных в предыдущем исследовании [25].

Выделение ДНК и анализ nSSR-маркеров

Геномную ДНК выделяли из высушенной хвои методом СТАВ согласно M. Devey et al. [26]. Качество и количество ДНК измеряли с помощью спектрофотометра.

В нашей предыдущей работе [25] для *J. communis* были отобраны семь nSSR, которые обеспечивали воспроизводимые фрагменты ожидаемых размеров с достаточным количеством полиморфизмов: *Jc16*, *Jc031*, *Jc032*, *Jc035*, *Jce01*, *Jce10* и *Jce13* [27, 28]. Из этих локусов был составлен мультиплекс с учетом температуры отжига праймеров, сочетания флуоресцентного красителя и длины продукта амплификации [25]. Этот же мультиплекс мы использовали и в настоящей работе для кавказского можжевельника. Условия ПЦР описаны в предыдущей работе. Электрофорез фрагментов проводили на капиллярном секвенаторе НАНОФОР 05 (ИАП РАН, Россия). Размеры аллелей определяли с помощью программы GENEMAPPER 1.95 (Soft Genetics, State College, Pennsylvania, США) сначала автоматически, а затем проверяли вручную.

Анализ данных

Для каждой популяции с помощью программы GenAlex v 6.5 были посчитаны следующие параметры разнообразия: среднее число аллелей на локус (N_a), индекс Шеннона (H), наблюдаемая гетерозиготность (H_o) и ожидаемая гетерозиготность (H_e), коэффициент инбридинга (F). Для изучения дифференциации популяций и филогеографической структуры использовали статистические программы, описанные в нашей предыдущей работе [25].

РЕЗУЛЬТАТЫ

*Дифференциация популяций *J. communis* в Евразии и Северной Америке по результатам анализа nSSR*

Для анализа генетической структуры всех 35 популяций можжевельника обыкновенного (24

Таблица 1. Показатели генетического разнообразия в 35 популяциях *J. communis* по результатам изменчивости nSSR-маркеров

№	Популяция	Широта/долгота	Высота над ур. моря, м	<i>N</i>	<i>N_a</i>	<i>I</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	<i>F</i>
<i>J. communis</i> var. <i>communis</i> , var. <i>saxatilis</i>									
1	Беларусь	N 54°46'/E 26°49'	170	16	7.14	1.56	0.453	0.737	0.319
2	Эстония	N 57°27'/E 24°52'	22	16	8.43	1.73	0.480	0.779	0.388
3	Упсала	N 59°53'/E 17°36'	21	16	8.43	1.67	0.507	0.756	0.310
4	Удмуртия	N 57°31'/E 52°32'	150	16	7.57	1.58	0.472	0.708	0.270
5	Полевской	N 56°25'/E 60°11'	403	10	5.88	1.45	0.440	0.723	0.307
6	Полярный Урал	N 66°51'/E 65°20'	547	16	8.27	1.76	0.534	0.796	0.313
7	П-ов Ямал	N 67°11'/E 71°15'	3	16	8.71	1.80	0.532	0.807	0.337
8	Мезень	N 65°18'/E 43°56'	22	17	8.86	1.75	0.423	0.760	0.467
9	Ергаки	N 53°08'/E 92°56'	1750	15	6.0	1.44	0.332	0.710	0.523
10	Зюраткуль, Южный Урал	N 54°56'/E 59°11'	943	16	7.14	1.54	0.606	0.716	0.114
11	Алтай, оз. Телецкое	N 51°46'/E 87°17'	790	16	6.14	1.39	0.428	0.691	0.311
12	Тянь-Шань, Киргизия	N 42°35'/E 74°29'	2000	16	5.57	1.26	0.440	0.628	0.306
13	Тура	N 64°17'/E 100°17'	353	17	6.57	1.51	0.316	0.730	0.563
14	Северо-Байкальск	N 55°42'/E 109°04'	536	16	5.71	1.32	0.414	0.640	0.322
15	Северный Тироль, Альпы	N 46°30'/E 14°45'	1759	14	8.71	1.75	0.519	0.790	0.319
16	Болгария, Балканы	N 42°02'/E 24°42'	607	9	3.71	1.01	0.254	0.593	0.515
17	Горная Шория	N 52°55'/E 88°00'	1570	16	5.14	1.33	0.459	0.693	0.314
18	Гималаи	N 31°06'/E 77°10'	3300	15	4.29	1.01	0.332	0.537	0.324
19	Колыма	N 63°26'/E 140°38'	1025	11	7.14	1.68	0.560	0.794	0.294
20	Магадан	N 59°34'/E 151°7'	30	16	6.57	1.50	0.360	0.724	0.480
21	Камчатка	N 56°01'/E 161°11'	50	16	5.00	1.16	0.328	0.600	0.419

Таблица 1. Окончание

№	Популяция	Широта/долгота	Высота над ур. моря, м	<i>N</i>	<i>N_a</i>	<i>I</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	<i>F</i>
22	Палево, о-в Сахалин	N 50°34'/E 142°42'	189	16	6.57	1.52	0.341	0.751	0.523
23	Невельск, о-в Сахалин	N 46°40'/E 141°51'	6	8	5.86	1.48	0.551	0.751	0.195
24	Сихотэ-Алинь	N 45°48'/E 136°36'	1392	16	6.7	1.37	0.387	0.676	0.471
	Среднее				6.7	1.48	0.435	0.683	0.364
<i>J. communis</i> var. <i>depressa</i>									
25	Аляска, Сев. Америка	N 64°50'/E 147°40'	135	16	4.43	0.98	0.369	0.523	0.286
<i>J. communis</i> var. <i>oblonga</i>									
26	Сочи, гора Ачишко	N 43°42'/E 40°10'	1000	16	5.71	1.43	0.467	0.737	0.352
27	Архыз, Карачаево-Черкесия	N 43°34'/E 41°16'	2034	12	4.71	1.23	0.363	0.628	0.437
28	Теберда, Карачаево-Черкесия	N 43°22'/E 41°43'	1700	6	4.0	1.19	0.424	0.712	0.364
29	Нальчик, Северная Осетия	N 43°08'/E 43°29'	1470	20	4.86	1.10	0.403	0.583	0.248
30	Ногайская степь, Дагестан	N 44°04'/E 45°35'	60	16	4.29	1.00	0.325	0.547	0.483
31	Талги, Дагестан	N 42°62'/E 47°26'	458	16	5.71	1.23	0.442	0.609	0.252
32	Губден-Леваши, Дагестан	N42°32'/E 47°26'	870	16	5.86	1.15	0.406	0.557	0.243
33	Куппинский перевал, Дагестан	N42°26'/E 47°01'	950	16	5.86	1.22	0.508	0.601	0.119
34	Цудахар, Дагестан	N42°19'/E 47°09'	1200	15	5.86	1.36	0.431	0.686	0.366
35	Гуниб, Дагестан	N 42°24'/E 46°54'	1850	16	6.00	1.33	0.301	0.631	0.423
	Среднее				5.28	1.22	0.407	0.632	0.329

Примечание. *N* – общее число образцов; *N_a* – среднее число аллелей на локус; *I* – индекс Шеннона, *H_o* – наблюдаемая гетерозиготность, *H_e* – ожидаемая гетерозиготность; *F* – коэффициент инбридинга.

популяции со всего ареала из предыдущего исследования, 10 кавказских популяций и одна Балканская) мы использовали программу STRUCTURE 2.3.4. [29]. Наиболее вероятное число кластеров с наибольшим значением дельта K обнаружено при $K = 2$ и 3 (рис. 1, а, б). Это означает, что оптимальное число генетических групп равно двум и трем. Наиболее дифференцирована кавказская разновидность *J. communis* var. *oblonga* ($K = 2$). Затем ($K = 3$) отделяются популяции можжевельника восточного края ареала в Евразии вместе с популяцией *J. communis* var. *depressa* из Аляски, что уже было нами показано ранее [25]. Следует отметить, что состав генотипов в популяциях можжевельника из Альп (№ 15), Болгарии (№ 16), Сочи (№ 26) и Архыза (№ 27) имеет смешанный характер.

Кластеризация популяций с помощью анализа главных координат на основе матрицы парных генетических дистанций D [30] показывает

похожую картину (рис. 1, в). Одна группа объединяет все кавказские популяции *J. communis* var. *oblonga*, в другую входят все дальневосточные популяции *J. communis* var. *saxatilis* вместе с популяцией *J. communis* var. *depressa* из Аляски (№ 25). Третья – это большая группа популяций *J. communis* var. *saxatilis* и *J. communis* var. *communis* из Северной Европы, Урала, Сибири и Центральной Азии. Удивительно, что болгарская популяция можжевельника (№ 16) находится в одной группе с кавказской разновидностью. А кавказская популяция из Сочи (№ 26), наоборот, выпадает из этой группы.

Генетическая изменчивость и дифференциация популяций J. communis на Северном Кавказе, Альпах и Балканах по результатам анализа nSSR и хпДНК

Изменчивость nSSR. В 10 популяциях кавказско-го можжевельника *J. communis* var. *oblonga* в семи

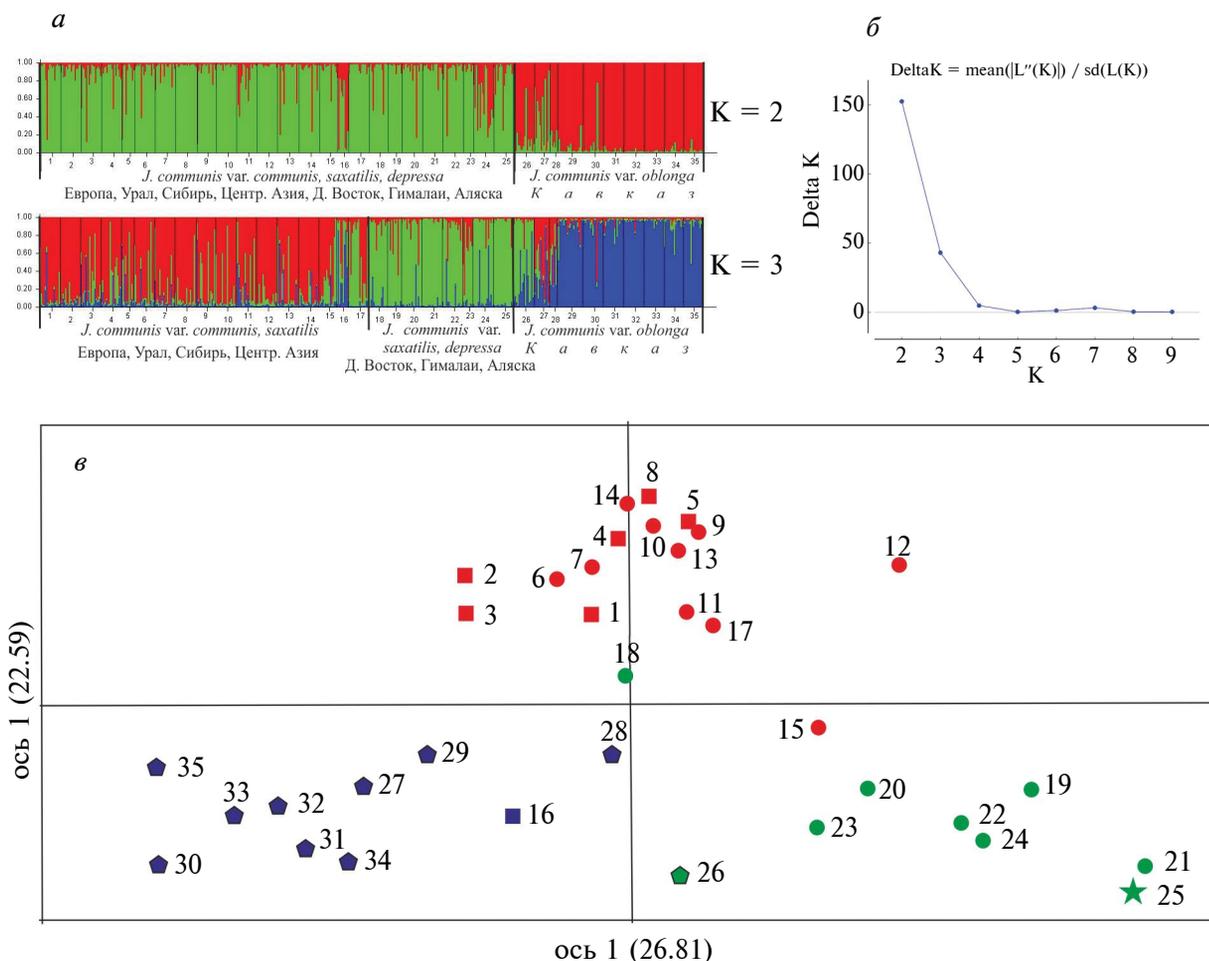


Рис. 1. Распределение генотипов и ординация популяций на основе полиморфизма nSSR в 35 популяциях *J. communis*. а — Диаграмма распределения генотипов в соответствии с кластеризацией в STRUCTURE ($K = 2$ и $K = 3$); б — оценка оптимального количества кластеров (K) на основе дельта K ; в — анализ главных координат (PCoA) *J. communis* на основе парных значений D . Цвета соответствуют генетическим кластерам согласно STRUCTURE ($K = 3$). Кружок — *J. communis* var. *saxatilis*, квадрат — var. *communis*, звезда — var. *depressa*, многоугольник — var. *oblonga*. Номера популяций соответствуют табл. 1.

анализируемых локусах обнаружены 84 аллеля, из них 19 уникальных, которые в основном присутствуют в популяциях Сочи и Архыза. Генетическое разнообразие, оцененное с помощью *He*, в среднем для всех кавказских популяций составляет 0.632 и варьирует от 0.547 в Ногайской популяции до 0.737 в популяции Сочи. Все кавказские популяции, за исключением популяции из Сочи, имеют несколько сниженные показатели внутривидовой генетической изменчивости по сравнению с популяциями можжевельника из основного ареала (табл. 1). Но степень межпопуляционной дифференциации между ними при этом выше ($F_{st} = 18.4\%$), чем между остальными популяциями ($F_{st} = 9.8\%$).

В результате анализа филогеографической структуры кавказских популяций (с добавлением альпийской и болгарской популяций) с помощью STRUCTURE все шесть восточных дагестанских популяций группируются вместе (рис. 2, а,

б). Популяция из Нальчика формирует отдельный кластер. Три популяции из западной части Северного Кавказа (Сочи, Архыз, Теберда) образуют одну группу с популяциями из Болгарии и Альп. При учете географических дистанций (при использовании SAMOVA) число групп увеличивается до семи: I – Альпы, II – Болгария, III – Сочи, IV – Архыз с Тебердой, V – Нальчик, VI – полупустынная популяция из Ногайской степи, VII – все остальные горные дагестанские популяции. По результатам анализа главных координат все популяции по первой оси координат (35.2%) делятся на популяции восточной части Северного Кавказа (все дагестанские популяции) и популяции западной части кавказского ареала (рис. 2, в). При этом восточная часть генетически более однородна, чем западная, где между Сочи, Архызом, Тебердой и Нальчиком наблюдаются большие генетические дистанции. Согласно тесту Мантелы генетические расстояния между всеми изученными

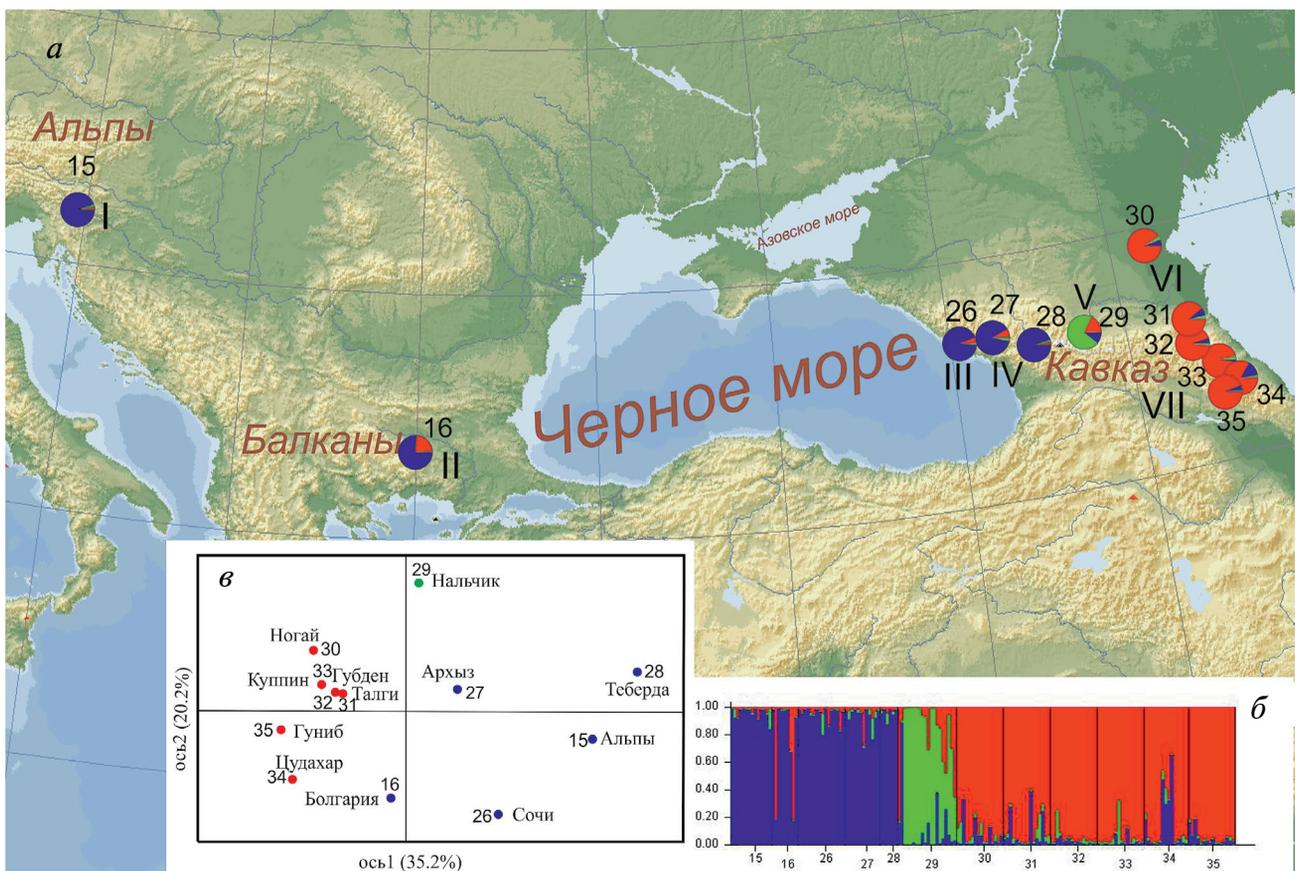


Рис. 2. Карта района исследований с указанием мест отбора проб в 12 популяциях *J. communis*, распределение генотипов и ординация популяций на основе полиморфизма nSSR. а — карта расположения популяций *J. communis* с диаграммами распределения кластеров в STRUCTURE ($K = 3$). Каждая популяция обозначена кружком, разделенным на сегменты пропорционально принадлежности количества ее особей к данному кластеру. Римскими цифрами обозначены группы, выделенные с помощью SAMOVA; б — диаграмма распределения генотипов в соответствии с кластеризацией в STRUCTURE ($K = 3$); в — анализ главных координат (PCoA) на основе парных значений D_{ST} . Цвета кружков соответствуют генетическим группам согласно STRUCTURE ($K = 3$).

популяциями *J. communis*, основанные на частотах nSSR-маркеров, достоверно коррелировали с географическими расстояниями между выборками ($r = 0.507$, $p = 0.02$).

Изменчивость хпДНК. Изменчивость хпДНК в кавказских популяциях находится на уровне средних значений, за исключением западных популяций (Сочи, Архыз, Теберда), где эти значения высоки и приближаются к максимальным, обнаруженным в альпийских популяциях (табл. 2). В десяти образцах можжевельника из Архыза, например, было выявлено семь разных гаплотипов, из них четыре редких. В популяции из Сочи шесть гаплотипов, из них три редких, причем один из них (H10) общий с альпийской популяцией из Северного Тироля. Все остальные кавказские гаплотипы 51, 52, 72–92 встречаются только на Кавказе.

Что касается болгарской популяции, то в отличие от результатов nSSR-анализа, по хлоропластным фрагментам она не имеет общих гаплотипов с кавказскими популяциями. Два гаплотипа 26 и 66, которые обнаружили здесь, встречаются также только в северных и восточных Альпах.

Уровень дифференциации по хлоропластным маркерам между кавказскими популяциями достаточно высок ($F_{st} = 43\%$) и почти в 2 раза выше, чем между остальными европейскими популяциями можжевельника ($F_{st} = 22\%$). Байесовский филогенетический анализ изменчивости хпДНК был проведен отдельно для кавказских популяций с добавлением популяции из Болгарии и альпийских популяций. Анализ с высокой бутстреп-поддержкой подтвердил дифференциацию популяций восточной части Северного Кавказа (рис. 3). Три хлоропластных гаплотипа 76, 77, 78 встречаются только здесь с большой частотой. В остальных кавказских популяциях они встречаются в качестве редких, в Нальчике не встречаются совсем. Также с высокой бутстреп-поддержкой выделяются некоторые альпийские гаплотипы (H62, 64–66). Все остальные гаплотипы формируют одну обширную группу, характерная черта которой – наличие большого повтора в хлоропластном фрагменте *16s-trnA*. В этом высокоизменчивом фрагменте у *J. communis* есть несколько больших tandemных повторов, один из которых длиной 146 пн характерен для всей большой группы гаплотипов, объединяющей популяции Европы, Урала и Сибири. Этого повтора нет в анцестральной гималайской популяции, популяциях Центральной Азии, популяциях северо-востока и Дальнего Востока России, Аляски. Нет его и в доминирующих гаплотипах (76, 77, 78) можжевельника восточной части Северного Кавказа. В альпийских популяциях присутствуют оба типа гаплотипов. В болгарской популяции гаплотип 26 с повтором, 66 – без него.

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, дифференциация кавказского можжевельника от можжевельника основного ареала, ранее выявленная с помощью хлоропластных, аллозимных и морфологических маркеров, была подтверждена в данной работе с помощью ядерных микросателлитов. Кавказский хребет служил биогеографическим барьером для многих видов растений и животных, способствуя внутривидовой и внутривидовой дивергенции. Например, у той же сосны обыкновенной результаты анализа nSSR показали глубокую дифференциацию между популяциями всего Восточного Причерноморья и популяциями основного ареала, включая Балканы [31]. Наблюдаемый уровень генетической дивергенции между кавказскими популяциями лесной сони *Dryomys nitedula* (Pallas) и популяциями этого вида с Русской равнины позволяет предположить, что имела место длительная изоляция ареалов Европы и Кавказа *D. nitedula* на протяжении всего плейстоцена [32].

Между кавказскими популяциями сосны по трем типам маркеров (nSSR, мтДНК и cpSSR) выявлен более высокий уровень межпопуляционной дифференциации по сравнению с популяциями основного ареала, что свидетельствует о сниженном генетическом потоке и может объясняться особыми физико-географическими условиями данного региона [33]. Подобная дифференциация отмечена и для видов древесных растений, растущих в горных системах Средиземноморья. Например, разрозненные популяции *Frangulus alnus*, сохранившиеся на горных хребтах Средиземноморья, по-видимому, испытывали небольшой поток генов и поэтому накопили высокую степень дифференциации даже на небольшом удалении [34].

Эта же закономерность характерна и для *J. communis* var. *oblonga*. По результатам AMOVA дифференциация популяций по nSSR-маркерам на основном ареале составляет 9.8%, в то время как на Кавказе она почти в 2 раза больше (18.4%). Дифференциация по хлоропластным маркерам также в 2 раза больше – 22 и 43% соответственно.

По результатам анализа nSSR все популяции *J. communis* var. *oblonga* в настоящей работе разделились на три группы, соответствующие трем географическим регионам Большого Кавказа: западному, центральному и восточному. Похожая дифференциация свойственна и некоторым другим древесным видам. Например, присутствие двух главных генетических линий – восточной и западной – обнаружено на Кавказе у разных видов дубов [35], сосны обыкновенной [31, 36]. Предполагают, что у сосны эта фрагментация ареала произошла в период, предшествующий последнему ледниковому максимуму, 149 тыс. л. н., что примерно соответствует микулинскому межледниковью.

Таблица 2. Показатели генетического разнообразия в популяциях *J. communis* по результатам изменчивости хпДНК-маркеров

№	Популяция	Широта / долгота	Высота над ур. моря	<i>N</i>	<i>N_H</i>	<i>N_{PH}</i>	Гаплотипы (частота, %)	<i>h</i>	<i>π</i>
<i>J. communis</i> var. <i>communis</i> / <i>saxatilis</i>									
15	Северный Тироль, Альпы	N 47°11' / E 12°0'	1700	26	13	7	H10(4), 16(4), 26(19) , 31(4), 32(8), 35(11) , 36(8), 9(4), 60(15) , 62(4), 64(4), 65(4), 66(12)	0.93	0.070
16	Болгария, Балканы	N 42°02' / E 24°42'	607	9	2	0	H26(89) , 66(11)	0.22	0.027
<i>J. communis</i> var. <i>oblonga</i>									
26	Сочи, гора Ачишко	N 43°42' / E 40°10'	1000	15	6	3	H10(7), 78(7), 85(27) , 86(40) , 87(13), 88(7)	0.79	0.057
27	Архыз, Карачаво- Черкесия	N 43°34' / E 41°16'	2034	10	7	4	H76(10), 77(10), 88(30) , 89(20), 90(10), 91(10), 92(10)	0.91	0.076
28	Теберда, Карачаво- Черкесия	N 43°22' / E 41°43'	1700	11	5	0	H51(55) , 72(9), 7 3(18), 75(9), 78(9)	0.71	0.058
29	Нальчик, Северная Осетия	N 43°08' / E 43°29'	1470	17	5	2	H40(12), 51(64) , 52(12), 72(6), 75(6)	0.58	0.028
30	Ногайская степь, Дагестан	N 44°04' / E 45°35'	60	23	3	0	H72(57) , 77(30) , 78(13)	0.60	0.070
31	Талги, Дагестан	N 42°62' / E 47°26'	458	21	4	0	H72(5), 76(5), 77(81) , 78(9)	0.35	0.020
32	Губден, Дагестан	N 42°32' / E 47°26'	870	20	3	0	H74(5), 77(80) , 78(15)	0.35	0.018
33	Куппин, Дагестан	N 42°26' / E 47°01'	950	19	4	0	H51(16), 72(16), 76(5), 77(63)	0.59	0.061
34	Цудахар, Дагестан	N 42°19' / E 47°09'	1200	22	3	0	H74(4), 77(92) , 78(4)	0.18	0.009
35	Гуниб, Дагестан	N 42°24' / E 46°54'	1850	22	6	0	H51(4), 72(4), 73(4), 76(9), 77(69) , 78(9)	0.42	0.038

Примечание. *N* – число образцов, *N_H* – число гаплотипов, *N_{PH}* – число уникальных гаплотипов, *h* – гаплотипическое разнообразие, *π* – нуклеотидное разнообразие. Жирным шрифтом выделены гаплотипы, наиболее распространенные в популяции.

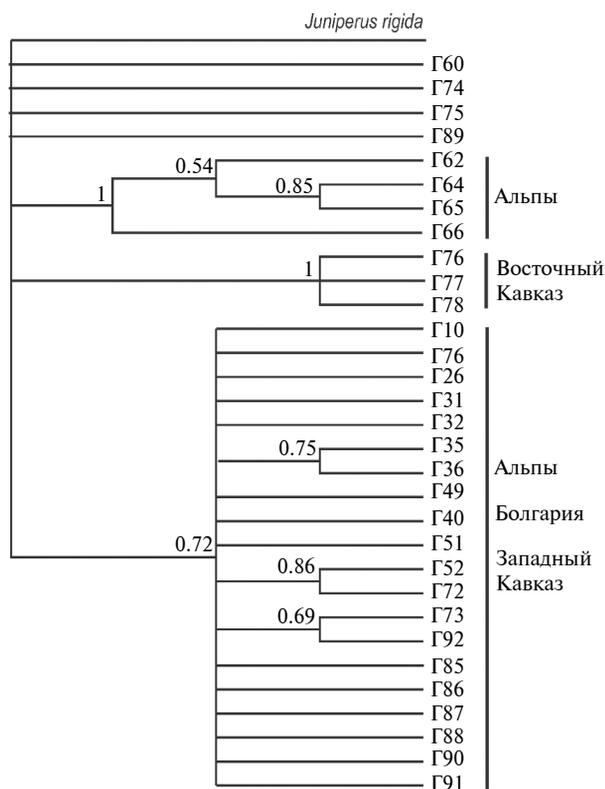


Рис. 3. Байесовское дерево, основанное на гаплотипах хпДНК *J. communis* с *J. rigida* в качестве внешней группы.

У можжевельника одну большую однородную группу образуют все популяции восточной части Большого Кавказа (Дагестан). Возможно, восточная часть является изолированным древним рефугиумом, который не имел вторичных контактов с европейскими популяциями. Есть молекулярные данные, свидетельствующие об изолированном длительном произрастании в рефугиумах восточной части Кавказа другого древесного вида — ольхи черной [37].

В отдельную группу выделилась популяция из Центрального Кавказа (Нальчик). Возможно, эта популяция была изолирована от остальных кавказских популяций высокими хребтами или в этой части можжевельник расселился из отдельного ледникового рефугиума и испытал генетический дрейф.

Что касается западной части кавказского ареала можжевельника, то и хлоропластные, и ядерные маркеры указывают на возможные контакты с можжевельником из основного ареала.

Близость хлоропластных гаплотипов можжевельника из западной и центральной частей Большого Кавказа к гаплотипам основного ареала может свидетельствовать о существовании предковых филогенетических связей этой более гумидной

части Кавказа с другими европейскими горными системами, например с Балканами и Альпами. Интересно, что в популяции из окрестностей Сочи, которая является крайней западной точкой на Кавказе в нашей работе, обнаружен редкий хлоропластный гаплотип № 10, встречающийся также только в популяции из Северных Альп. По некоторым морфологическим параметрам популяция из Сочи занимает промежуточное положение между кавказской и евросибирской группами. А по такому показателю, как число устьичных полосок, эта популяция вообще не вошла в кавказскую группу [13].

Большой tandemный повтор в хлоропластном фрагменте *16s-trnA* у *J. communis* сформировался, возможно, в Альпах и распространился на север, вплоть до Арктики, и по горным системам на Балканы и на Западный Кавказ. На Кавказе в условиях изоляции гаплотипы с таким повтором эволюционировали и накопили отличия от гаплотипов основного ареала. В восточной части Кавказа сохранились предковые гаплотипы, без этой мутации.

В структуре изменчивости ядерной ДНК связь западных кавказских популяций с популяциями основного ареала выражена еще отчетливее, что свидетельствует о лучшем генном потоке ядерной ДНК по сравнению с хлоропластной. ХпДНК у можжевельника распространяется по отцовской линии, т. е. с пыльцой, а ядерная ДНК — по материнской линии с семенами. Теоретически пыльца летит гораздо дальше, чем семена, большая часть которых опадает и прорастает вблизи дерева. Однако на самом деле та часть семян, которую съедают птицы, к тому же птицы перелетные, движущиеся каждую осень по одному и тому же маршруту, может распространиться очень далеко.

Характерная черта, отделяющая род *Juniperus* от других родов семейства кипарисовых, — образование в процессе эволюции ягодоподобной шишки с сочной мякотью, что явилось прогрессивным признаком и обеспечило семенам распространение птицами на дальние расстояния. В межледниковые периоды в плейстоцене рассеивание семян птицами обеспечивало виду не только очень быструю постгляциальную экспансию, но и постоянный обмен генами между популяциями на обширном ареале в Евразии.

Известно, что современные маршруты миграций птиц с севера на юг проходят каждой осенью по определенным путям. В это время созревают шишкоягоды можжевельника. В некоторых местах эти миграции возникают скопления птиц из-за «эффекта бутылочного горлышка». Одним из таких узких мест являются окрестности Красной Поляны (Сочи). Кавказский хребет для птиц — серьезное препятствие из-за высоких горных вершин. Птицы преодолевают его через перевалы, придерживаясь

долин горных рек. Аибга — это хребет, который окружает Красную Поляну с юго-восточной стороны и разделяет среднюю часть долины Мзымты и верховья Псоу. Именно эти участки являются традиционными маршрутами для миграции птиц. Другой известный маршрут миграций птиц проходит через черноморское побережье Болгарии, так называемая Виа Понтика [38].

Учитывая направление этих миграций, наверное, не случайно, что nSSR генотипы можжевельника из районов Сочи, Архыза и Теберды находятся в одном STRUCTURE-кластере с болгарской и альпийской популяциями. Из всех кавказских популяций эти три популяции имеют самые высокие показатели внутривидового разнообразия по хлоропластным маркерам, близкие к показателям можжевельника из основного ареала. По ядерным маркерам самые высокие показатели разнообразия из всех кавказских популяций имеет популяция из района Сочи. Это может свидетельствовать о существовании генного потока с севера с семенами к популяциям западной части Кавказа и о наличии гибридизации. Сосна обыкновенная, например, не обладает столь эффективным способом рассеивания семян, как можжевельник, и все ее кавказские популяции имеют пониженную генетическую изменчивость по сравнению с популяциями основного ареала [36].

Миграции птиц, проходящие вдоль западной части черноморского побережья, могли способствовать гибридизации можжевельника из основного ареала и Западного Кавказа. Восточная часть Кавказа осталась генетически более изолированной по сравнению с западной. Пример такого проникновения с севера Русской равнины на Западный Кавказ, приведшего к гибридизации и образованию рекомбинантного гаплотипа мтДНК, доказан у сосны обыкновенной [33]. И в соответствии с оценкой, полученной с помощью ABC-моделирования, эти контакты, скорее всего, имели место в начале голоцена (19.4 тыс. л. н.). При этом, в отличие от можжевельника, ядерные и хлоропластные маркеры не обнаружили у сосны такой связи.

Таким образом, можно предположить, что когда-то популяции можжевельника на Кавказе и в других европейских горных системах (Балканах, Альпах) были связаны непрерывным ареалом вида, который затем был разорван в результате климатических изменений в плейстоцене, вследствие чего можжевельник оказался изолированным в рефугиумах Кавказа. Поток пыльцы мог прекращаться, что отразилось в структуре изменчивости хлоропластной ДНК. Установившиеся в межледниковые периоды маршруты миграций перелетных птиц способствовали расселению семян можжевельника на большие расстояния и контактам этого вида с основной частью евразийского ареала с западной частью Кавказа, что отразилось на структуре

изменчивости ядерной ДНК. Можжевельник, растущий в более изолированной восточной части Северного Кавказа, хотя и имеет меньшие показатели разнообразия по сравнению с западной частью, тем не менее его длительное стабильное существование способствовало накоплению уникального запаса генетической изменчивости.

Если говорить о можжевельнике обыкновенном в целом, то в итоге можно прийти к выводу, что не ледниковые циклы, а географическая изоляция является основным фактором, влияющим на генетическую структуру популяций этого вида, обладающего набором уникальных качеств, таких как морфологическая пластичность, холодостойкость и эффективный способ рассеивания семян.

Выражаю благодарность Б. Хейнцу за сбор образцов можжевельника в Альпах, Ц. Радуковой за сбор образцов на Балканах, В.Л. Семерикову за сбор образцов в Краснодарском крае и Карачаево-Черкесии, Л.А. Горлановой за сбор образцов в Северной Осетии и А.М. Мусаеву за помощь в сборе образцов в Дагестане.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Института экологии растений и животных УрО РАН № 122021000090-5.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Автор заявляет, что у него нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Petit R.J., Aguinagalde I., de Beaulieu J.L. et al.* Glacial refugia: Hotspots but not melting pots of genetic diversity // *Science*. 2003. V. 300. P. 1563–1565. doi:10.1126/science.1083264
2. *Tribsh A., Stuessy T.* Evolution and phylogeography of arctic and alpine plants in Europe: Introduction // *Taxon*. 2003. V. 52. P. 415–416. doi:10.2307/3647443
3. *Tarasov P.E., Volkova V.S., Webb T. et al.* Last glacial maximum biomes reconstructed from pollen and plant macrofossil data from northern Eurasia // *J. Biogeogr.* 2000. V. 27. P. 609–620. doi:10.1046/j.1365-2699.2000.00429.x
4. *Maliouchenko O., Palme A.E., Buonamici A. et al.* Comparative phylogeography of two European birch species, *Betula pendula* and *B. pubescens*, with high level of haplotype sharing // *J. Biogeogr.* 2007. V. 34. P. 1601–1610. doi: 10.1111/j.1365-2699.2007.01729.x

5. *Palme A.E., Su Q., Rautenberg A. et al.* Postglacial recolonization and cpDNA variation of silver birch, *Betula pendula* // *Mol. Ecol.* 2003. V. 12. P. 201–212.
6. *Semerikov V.L., Semerikova S.A., Polezhaeva M.A. et al.* Southern montane populations did not contribute to the recolonization of West Siberian Plain by Siberian larch (*Larix sibirica*): A range-wide analysis of cytoplasmic markers // *Mol. Ecol.* 2013. V. 22. P. 4958–4971.
7. *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.
8. *Prost S., Guralnick R.P., Waltari E. et al.* Losing ground: Past history and future fate of Arctic small mammals in a changing climate // *Glob. Change Biol.* 2013. V. 19. P. 1854–1864.
9. *Bruhaux J., Zhao W., Hall D. et al.* Scots pine – panmixia and the elusive signal of genetic adaptation // *New Phytol.* 2024. В печати. <https://doi.org/10.1111/nph.19563>
10. *Mao K., Hao G., Liu J. et al.* Diversification and biogeography of *Juniperus* (Cupressaceae): Variable diversification rates and multiple intercontinental dispersals // *New Phytol.* 2010. V. 188. P. 254–272.
11. *Hantemirova E.V., Heinze B., Knyazeva S.G. et al.* A new Eurasian phylogeographical paradigm? Limited contribution of southern populations of the recolonization of high latitude populations in *Juniperus communis* L. (Cupressaceae) // *J. Biogeogr.* 2017. V. 44. I. 2. P. 271–282. doi: 10.1111/jbi. 12867.
12. *Willis K.J., Van Andel T.H.* Trees or not trees? The environments of central and eastern Europe during the Last Glaciation // *Quaternary Sci. Rev.* 2004. V. 23. P. 2269–2287.
13. *Князева С.Г., Хантемирова Е.В.* Сравнительный анализ генетической и морфолого-анатомической изменчивости можжевельника обыкновенного (*Juniperus communis* L.) // *Генетика.* 2020. Т. 56. № 1. С. 55–66.
14. *Галушко А.И.* Флора Северного Кавказа. Ростов-на-Дону: Изд-во Рост. ун-та, 1978. 318 с.
15. *Джанаева В.М.* Определитель семейства можжевельниковых. Фрунзе: Илим, 1969. 93 с.
16. *Черепанов С.К.* Сосудистые растения России и сопредельных государств. СПб: Мир и семья, 1995. 990 с.
17. *Имханицкая Н.Н.* Критическая заметка о кавказских видах секции *Juniperus* рода *Juniperus* L. (Cupressaceae) // *Новости систематики высших растений.* Л.: Наука, 1990. Т. 27. С. 5–16.
18. *Farjon A.* World Checklist and Bibliography of Conifers. England: The Royal Bot. Gardens, 2001. 309 p.
19. *Adams R.P.* Systematics of *Juniperus* section *Juniperus* based on leaf essential oils and RAPD DNA fingerprinting // *Biochem. Syst. Ecol.* 2000. V. 28. P. 515–528.
20. *Adams R.P., Demeke T.* Systematic relationships in *Juniperus* based on random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) // *Taxon.* 1993. V. 42. P. 553–572.
21. *Adams R.P., Hsieh C., Murata J., Pandey R.N.* Systematics of *Juniperus* from eastern Asia based on Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs) // *Biochem. Syst. Ecol.* 2002. V. 30. P. 231–241.
22. *Adams R.P., Pandey R.N.* Analysis of *Juniperus communis* and its varieties based on DNA fingerprinting // *Biochem. Syst. Ecol.* 2003. V. 31. P. 1271–1278.
23. *Adams R.P., Murata J., Takahashi H., Schwarzbach A.E.* Taxonomy and evolution of *Juniperus communis*: Insight from DNA sequencing and SNPs // *Phytologia.* 2011. V. 93. I. 2. P. 185–196.
24. *Хантемирова Е.В., Беркутенко А.Н., Семериков В.Л.* Систематика и геогеография *Juniperus communis* L. по данным изоферментного анализа // *Генетика.* 2012. Т. 48. № 9. С. 1077–1084.
25. *Хантемирова Е.В., Бессонова В.А.* Генетическое разнообразие можжевельника обыкновенного (*Juniperus communis* L.) в Евразии и на Аляске по данным анализа ядерных микросателлитов // *Генетика.* 2023. Т. 59. № 3. С. 316–326.
26. *Devey M.E., Bell J.S., 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. P. 673–679.
27. *Michalczyk I.M., Sebastiani I.F., Buonamici A. et al.* Characterization of highly polymorphic nuclear microsatellite loci in *Juniperus communis* L. // *Mol. Ecol. Notes.* 2006. V. 6. P. 346–348. doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01227.x
28. *Rumeu B., Sosa P.A., Nogales M., Gonzalez-Perez M.A.* Development and characterization of 13 SSR markers for an endangered insular juniper (*Juniperus cedrus* Webb & Berth.) // *Conserv. Genet. Resources.* 2013. V. 5. P. 457–459. doi: 10.1007/s12686-012-9827-y
29. *Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P.* Inference of population structure using multilocus genotype data // *Genetics.* 2000. V. 155. P. 945–959. doi:10.1093/genetics/155.2.945
30. *Nei M.* Genetic distance between populations // *Am. Nat.* 1972. V. 106. P. 283–292. <http://dx.doi.org/10.1086/282771>
31. *Семериков Н.В., Петрова И.В.* Демографическая история сосны обыкновенной в плейстоцене в Северной Евразии и Кавказском регионе на основе анализа ядерных микросателлитных локусов // *Сиб. экол. журн.* 2023. Т. 5. С. 573–590.
32. *Grigoryeva O., Krivonogov D., Balakirev A. et al.* Phylogeography of the forest dormouse *Dryomys nitedula* (Gliridae, Rodentia) in Russian Plain and the Caucasus // *Folia Zool.* 2015. V. 64. № 4. P. 361–364.

33. Semerikov N.V., Petrova I.V., Sannikov S.N. et al. Cytoplasmic DNA variation does not support a recent contribution of *Pinus sylvestris* L. from the Caucasus to the main range // Tree Genet. Genomes. 2020. V. 16. P. 59.
<https://doi.org/10.1007/s11295-020-01458-8>
34. Hampe A., Arroyo J., Jordano P., Petit R.J. Rangewide phylogeography of a bird-dispersed Eurasian shrub: Contrasting Mediterranean and temperate glacial refugia // Mol. Ecol. 2003. V. 12. P. 3415–3426.
35. Ekhvaia J., Simeone M.K., Silakadze N., Abdaladze O. Morphological diversity and phylogeography of the Georgian durmast oak (*Q. petraea* subsp. *iberica*) and related Caucasian oak species in Georgia (South caucasus) // Tree Genet. Genomes. 2018. V. 14. P. 17.
36. Petrova I.V., Sannikov S.N., Tembotova F.I. et al. Genogeography of *Pinus sylvestris* L. populations in the Greater Caucasus and Crimea // Russ. J. Ecol. 2017. V. 48. P. 524–531.
<https://doi.org/10.1134/s106741361706008x>
37. Roy M., Pozzi A.C., Gareil R. et al. Alder and the Golden Fleece: High diversity of Frankia and ectomycorrhizal fungi revealed from *Alnus glutinosa* subsp. *barbata* roots close to a Tertiary and glacial refugium // PeerJ. 2017. V. 18.
<https://doi.org/10.7717/peerj.3479>
38. Michev T.M., Profirov L.A., Karaivanov N.P., Michev B.T. Migration of soaring birds over Bulgaria // Acta Zool. Bulg. 2012. V. 64. I. 1. P. 33–41.

Genetic Evaluation of *Juniperus Communis* var. *oblonga* (Cupressaceae) in Caucasus Regions of Russia Based on nSSR Markers

E. V. Hantemirova*

Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Division of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, 620144 Russia

*e-mail: hantemirova@ipae.uran.ru

Ten populations of Caucasian juniper *J. communis* var. *oblonga* were analyzed using seven microsatellite nSSR loci to draw conclusions about migration routes and genetic relationships with populations in the northern part of their range. These new data were combined with data previously obtained from the main Eurasian range. The results of nSSR analysis confirm the data on the cpDNA structure of *J. communis* var. *oblonga* about the existence of a deep divergence between the populations of the eastern part of the Greater Caucasus and the populations of the main range, which is likely due to the long-term isolation of juniper in this part of the Caucasus. At the same time, the results indicate the existence of a juniper gene flow from the main range towards the Western Caucasus, which was more intense with seeds. The migration routes of birds established during interglacial periods contributed to the dispersal of seeds over long distances and contacts of juniper from the main part of its range with juniper in the western part of the Caucasus, which was reflected in the structure of nuclear DNA.

Keywords: *J. communis* var. *oblonga*, nuclear DNA, nSSR, genetic diversity, Greater Caucasus.