

УДК 575.174.015.3+582.475

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ *cp*SSR МАРКЕРОВ В РОДЕ *LARIX* НА ДАЛЬНЕМ ВОСТОКЕ

М. А. Полежаева<sup>1,2</sup>, В. Л. Семериков<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт биологических проблем Севера ДВО РАН, г. Магадан  
E-mail: polezhaevam@mail.ru

<sup>2</sup>Институт экологии растений и животных УрО РАН, г. Екатеринбург  
E-mail:semerikov@ipae.uran.ru

Изменчивость 5 микросателлитных локусов хлоропластной ДНК была изучена в 49 популяциях *Larix* на территории Восточной Сибири и Дальнего Востока. Обнаружено 114 гаплотипов. Географическая структура генетической изменчивости содержит филогенетический сигнал:  $R_{ST}$  (значение)  $>$   $G_{ST}$  (значение) ( $p < 0,0001$ ). Ординация популяций на основе парных  $R_{ST}$  выявила несколько географически обособленных групп генетически близких популяций: 1) район г. Магадана; 2) Магаданская область, Чукотка и одна выборка из Якутии; 3) Камчатка, частично Магаданская область, Хабаровский край, Забайкалье, север Красноярского края, Якутия; 4) Хабаровский край и Приморье; 5) о. Сахалин, Курильские острова и Корея. Отдельно расположилась выборка из Японии. Дальнейший анализ частот некоторых гаплотипов позволяет обнаружить структуру в группе № 3: их распространение разделяет выборки по Верхоянскому хребту, отражая самостоятельную историю популяций лиственниц по разные стороны от него.

**Ключевые слова:** хлоропластные микросателлиты, *cp*SSR, биогеография, *Larix*, Северо-Восток Азии.

### ВВЕДЕНИЕ

Лиственница, являясь наиболее распространенной древесной породой Дальнего Востока, занимает обширный ареал от Кореи и Японии на юге до северного предела распространения древесной растительности – 71°с. ш. (Усенко, 1966). На этой территории род представлен несколькими видами, точное количество которых до настоящего времени не установлено. Все они имеют сходные морфологические признаки и склонны к интрогрессивной гибридизации (Бобров, 1978), вследствие чего сложно определить их таксономический статус.

Известно, что современное распространение и генетическая структура видов, особенно древесных, во многом зависит от исторических событий, таких, например, как плейстоценовые оледенения. История последнего ледникового максимума (18–20 тыс. л. н.) на Дальнем Востоке имела ряд особенностей: покровные оледенения отсутствовали, но на большей части региона господствовал криоаридный климат с низкими годовы-

ми температурами (Спаская и др., 1993). Подобные условия способствовали значительному сокращению древесной растительности, которая могла сохраняться лишь в небольших рефугиумах, расселяясь из них при улучшении климата. По имеющимся палинологическим данным, лесная растительность могла сохраняться во время последнего ледникового максимума на северном побережье Охотского моря (Grubaker et al., 2005; Ложкин, 2005). В настоящее время наряду с традиционными методами палеореконокструкций все более широко для биогеографических выводов используются молекулярные методы, основанные на анализе генетической структуры видов, сложившейся в ходе динамики их численности под действием крупных климатических флуктуаций.

В последние годы было проведено немало исследований, посвященных изучению изменчивости ядерных и цитоплазматических генетических маркеров как отдельных видов лиственниц Дальнего Востока, так и рода в целом на данной территории (Semerikov et al., 1999, 2003; Козыренко и др., 2004; Яхнева, 2004; и др.). В частности, предыдущие исследования митохондриальной ДНК

в 32 выборках из Восточной Сибири и Дальнего Востока позволили выявить несколько географических районов, имеющих специфический набор гаплотипов, отразив общие тренды в биогеографии рода на данной территории (Семериков, Полежаева, 2007). Однако для уточнения картины потребовались дальнейшие исследования с привлечением другого типа маркера и нового материала с территории крайнего Северо-Востока Азии.

В настоящей работе в качестве генетического маркера использовались хлоропластные микросателлиты, или простые нуклеотидные повторы (cpSSRs – chloroplast simple sequence repeats). В сем. Pinaceae хлоропласты наследуются только по отцовской линии и поток генов хпДНК в основном происходит за счет распространения пыльцы. Унипарентальный тип наследования обуславливает в 2 раза меньший эффективный размер популяции для хлоропластных генов по сравнению с ядерными (Neale et al., 1989), что делает их более чувствительными к генетическому дрейфу и, как следствие, к изменению размера популяции в ходе исторических событий. В ряде работ этот метод успешно использовался для биогеографических выводов (Provan et al., 2001; Семерикова, Семериков, 2007).

В данном исследовании были поставлены следующие цели:

описать внутри- и межпопуляционную генетическую изменчивость хлоропластной ДНК (хпДНК) лиственниц Дальнего Востока, изучить ее географическое распределение;

выявить районы возможного сохранения древесной растительности на территории Дальнего Востока в позднем плейстоцене.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

*Растительный материал и экстракция ДНК.* Всего проанализировано 49 выборок из естественных популяций лиственницы на Дальнем Востоке (см. таблицу, рис.1). Объем выборок составил 8–31 особь (некоторые географически близкие малочисленные выборки были объединены, так что в среднем на выборку приходилось около 20 особей). В части образцов для анализа хлоропластной изменчивости ранее анализировали изменчивость нескольких митохондриальных маркеров (Semerikov, Lascoux, 2003; Семериков, Полежаева, 2007). Экстракцию ДНК согласно протоколу Дивея (Devey, 1996) осуществляли из хвои зимних веток, полученной посредством выгонки, или из хвои, высушенной в силикагеле, или из семян.

*Хлоропластные маркеры (cpSSR).* Анализ проводили методом полимеразной цепной реакции с использованием 5 пар праймеров для хлоропластных микросателлитов: 1) Pt26081-1: CCC GTA TCC AGA TAT ACT TCCA, Pt26081-2: TGG TTT GAT TCA TTC GTT CAT, разработанных на основе полного сиквенса номер NC\_001631 (www.ncbi.

nlm.nih.gov) хлоропластного генома *Pinus thunbergii* (Vendramin et al., 1996); 2) Pt30204-2: CGG ATT GAT CCT AAC CAT ACC (Vendramin et al., 1996), Pt 30L: TCG ATC CTA ACC ATA TCA GGT G (получен на основе сиквенса хлоропластного фрагмента *Larix gmelinii*, соответствующего позиции 30340 *P. thunbergii*); 3) trnLV-2: TTG ACA TGG TGG AAG TCA TCA (Parducci, Szmidt, 1999), trnLV': AAA TAC CAC GGG CCT CCT A (на основе сиквенса данного фрагмента у *L. gmelinii*); 4) Pt9393-1: GAC GTA GAT GCT ATG GGT ACG (соответствует позиции 9348 хлоропластного генома *P. thunbergii*), Pt9393-2: GAG AGC GGT ATG AGG GAA GA (пара праймеров, разработанная вместо пары Pt9383 (Vendramin et al., 1996) (соответствует позиции хлоропластного генома *P. thunbergii* 9237) и 5) Pt9891: GAC GAT GGA CGC TCT TTC TC (соответствует позиции 9719 *P. thunbergii*), Pt9833: GAT CGG GCG GGA TAA TGT A (соответствует позиции 9653 *P. thunbergii*), также модифицированных на основе сиквенсов соответствующих участков хлоропластной ДНК *L. gmelinii*.

ПЦР проводили в объеме 10 мкл, содержащем около 10 нг/мкл геномной ДНК, 1× ПЦР буфер (75мМ трис-HCl, 20мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1% твин-20), 2,5мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1 мкМ dNTPs, по 0,2 мкМ прямого и обратного праймера, 0,016 U/мкл *Taq*-полимеразы («Fermentas» или «Сибэнзим») в ПЦР машине GeneAmp PCR system 2700 (Applied biosystems). Использованный температурный профиль состоял из первоначальной денатурации при температуре 94°C в течение 5 мин и 35 циклов амплификации: 94°C – 30 с, 55°C – 45 с, 72°C – 30 с; далее следовала финальная элонгация в течение 7 мин. Продукты ПЦР подвергались электрофорезу в 6%-ном полиакриламидном денатурирующем геле с последующим серебряным окрашиванием. Изменчивость микросателлитов определяли наличием нескольких аллелей (вариантов размеров амплификации), самому короткому из которых условно присваивали номер 1, фрагменту на один нуклеотид длиннее – 2 и т. д. Комбинация аллелей 5 локусов определялась как гаплотип. Для сравнения гелей в каждый старт наносились образцы известной длины из предыдущих гелей.

*Анализ данных.* Для каждой выборки были подсчитаны следующие параметры изменчивости: общее число гаплотипов ( $N_o$ ), эффективное число гаплотипов ( $N_e$ ), рассчитанное по формуле:

$$N_e = 1 / \sum_{i=1}^n p_i^2;$$

параметр популяционной изменчивости гаплотипов

$$H_e = \frac{n}{n-1} \left( 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right),$$

где  $n$  – размер выборки,  $k$  – число гаплотипов,  $p_i$  – частота  $i$ -го гаплотипа в выборке (Nei, 1987).

**Изученные выборки *Larix* по 5 cpSSR-локусам, размер выборки ( $n$ ), число гаплотипов в выборке ( $N_0$ ), эффективное число гаплотипов ( $N_e$ ), параметр внутривидовой изменчивости ( $H_e$ )**

**The populations of *Larix* species examined by 5 cpSSR loci: a sample size ( $n$ ); the number of haplotypes in a sample ( $N_0$ ); the effective haplotype number ( $N_e$ ); and the intrapopulation variety parameter ( $H_e$ )**

№ п. п.	Места сбора выборок	Координаты с. ш./в. д.	Размер выборки	$N_0$	$N_e$	$H_e$
1	2	3	4	5	6	7
Камчатка						
1	Анавгай	56°10'/159°00'	20	5	1,92	0,504
2	Эссо	56°00'/158°00'	20	5	1,72	0,441
Чукотский АО						
3	Чуванское	65°00'/168°00'	16	6	5,1	0,885
4	Ламутское	65°30'/169°00'	16	8	1,7	0,782
5	Ламутское (2)	66°30'/168°00'	24	5	2,2	0,563
Магаданская обл.						
6	Магадан	59°30'/151°00'	24	6	1,9	0,498
7	Яма	60°50'/154°50'	18	11	7,0	0,910
8	Яма (2)	59°50'/154°00'	29	8	2,2	0,566
9	Кони	59°20'/152°13'	31	12	4,6	0,806
10	Сеймчан	63°15'/151°54'	24	7	4,1	0,787
11	Мяунджа	63°02'/147°11'	17	12	10,0	0,954
12	Холодный	62°43'/147°57'	24	6	4,9	0,827
13	Сусуман	62°47'/148°10'	12	9	8,0	0,654
14	Мадаун	60°32'/150°33'	18	7	3,8	0,779
15	Оротукан	62°16'/151°42'	21	9	5,4	0,857
16	Омсукчан	62°51'/155°76'	20	9	5,3	0,851
17	Дегдекан	61°59'/147°01'	19	10	6,1	0,883
18	Заповедник	60°00'/148°00'	14	11	9,8	0,970
Хабаровский край						
19	Охотск	60°75'/142°35'	14	6	5,4	0,882
20	Аян	56°26'/136°07'	29	18	12,2	0,951
21	Чумикан	54°43'/135°18'	29	13	5,4	0,845
22	Николаевск-на-Амуре	53°08'/140°43'	30	15	4,5	0,807
23	Ургал	51°05'/132°45'	17	7	3,6	0,765
24	Облучье	49°00'/131°05'	19	11	9,8	0,948
25	Хабаровск	48°30'/135°03'	16	9	6,1	0,892
Якутия						
26	Усть-Нера	64°34'/143°12'	20	9	5,7	0,866
27	Себян-Куель	64°00'/130°18'	14	3	2,4	0,628
28	Сентачан	65°10'/139°30'	25	9	6,0	0,865
29	Чурапча	61°58'/132°24'	23	10	4,9	0,834
30	Якутск	62°01'/129°43'	18	11	9,0	0,941
31	Мирный	62°32'/113°59'	12	7	5,1	0,878
о. Сахалин						
32	Оха	53°35'/142°50'	20	10	4,9	0,835
33	Ноглики	51°50'/143°00'	20	11	5,7	0,866
34	Тымовское	50°50'/142°30'	20	12	6,9	0,898
35	Озерский	46°40'/143°10'	20	11	7,7	0,914
36	Охотское	46°50'/143°10'	20	10	8,3	0,924

Окончание таблицы

1	2	3	4	5	6	7
Курильские острова						
37	Итуруп	44°54'/147°30'	25	11	5,4	0,849
38	Шикотан	43°48'/146°45'	25	6	2,3	0,582
Амурская обл.						
39	<b>Объед. выборка</b>		29	10	5,4	0,842
	Джелтулак	54°47'/124°34'	.			
	Мазаново	51°38'/128°49'	.			
	Зея	53°45'/127°17'	.			
Приморский край						
40	Кавалерово	44°15'/135°03'	13	10	8,9	0,961
41	<b>Объед. выборка</b>		22	13	5,9	0,870
	Ольга	43°30'/135°15'				
	Уссурийск	43°26'/131°20'				
Красноярский край						
42	Котуй	71°55'/102°85'	16	8	3,5	0,759
43	<b>Объед. выборка</b>		19	14	12,4	0,971
	Пугорана	65°50'/94°30'				
	Котуйкан	67°00'/100°00'				
44	<b>Объед. выборка</b>		18	12	7,7	0,922
	Ары Мас	72°30'/101°00'				
	Хатанга	71°59'/102°28'				
Читинская обл.						
45	<b>Объед. выборка</b>		29	13	5,1	0,833
	Тунгокоченский	55°10'/116°45'				
	Чара	56°54'/118°16'				
46	<b>Объед. выборка</b>		27	13	4,4	0,800
	Чернышевск	52°32'/117°00'				
	Могоча	53°45'/119°44'				
Бурятия						
47	Муякан	56°11'/113°35'	22	10	4,7	0,827
48	Корея	33°30'/126°30'	12	4	4,2	0,833
49	Япония	35°41'/139°46'	8	7	2,9	0,750

Генетические дистанции между гаплотипами вычисляли по формуле:

$$D_{sh}^2(i, j) = K^{-1} \left[ \sum |a_{ik} - a_{jk}| \right]^2,$$

где  $K$  – количество проанализированных микросателлитных локусов;  $a_{ik}$  и  $a_{jk}$  – длина  $k$ -го микросателлита  $i$ -го и  $j$ -го гаплотипов.

Генетическую изменчивость внутри выборок, между ними и между группами выборок оценивали с помощью анализа молекулярной вариации AMOVA с использованием программы Arlequine 2.000. Вычислялись статистики:  $G_{ST}$  (на основе частот гаплотипов в выборках без учета информации о степени их сходства) и  $R_{ST}$  (аналога, вычисленного с учетом генетических дистанций ( $D_{sh}$ ) между гаплотипами). Сравнение  $G_{ST}$  и  $R_{ST}$  проводили с помощью программы Permut CPSSR ([www. Pierroton.intra.fr/genetics/labo/Software/](http://www.Pierroton.intra.fr/genetics/labo/Software/)).

На основе значений индексов  $G_{ST}$  и  $R_{ST}$  в программе NTSYS-рс осуществляли ординацию выборок методом главных координат (Rohlf, 1988). Для анализа корреляции между парными  $R_{ST}$  и географическими расстояниями между выборками использовали тест Мантела (Mantel, 1967).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

*Воспроизводимость универсальных праймеров.* Ранее была оценена возможность амплификации хлоропластных микросателлитов посредством универсальных пар праймеров, разработанных Г. Вендрамином с соавторами (Vendramin et al., 1996) на основе секвенированной последовательности сосны Тунберга. Из 13 использованных праймеров полиморфными и хорошо амплифицируемыми оказались три: Pt9383, Pt26081, Pt30204 (Semerikov et al., 2003). Однако в настоящем исследовании стабильный результат был получен

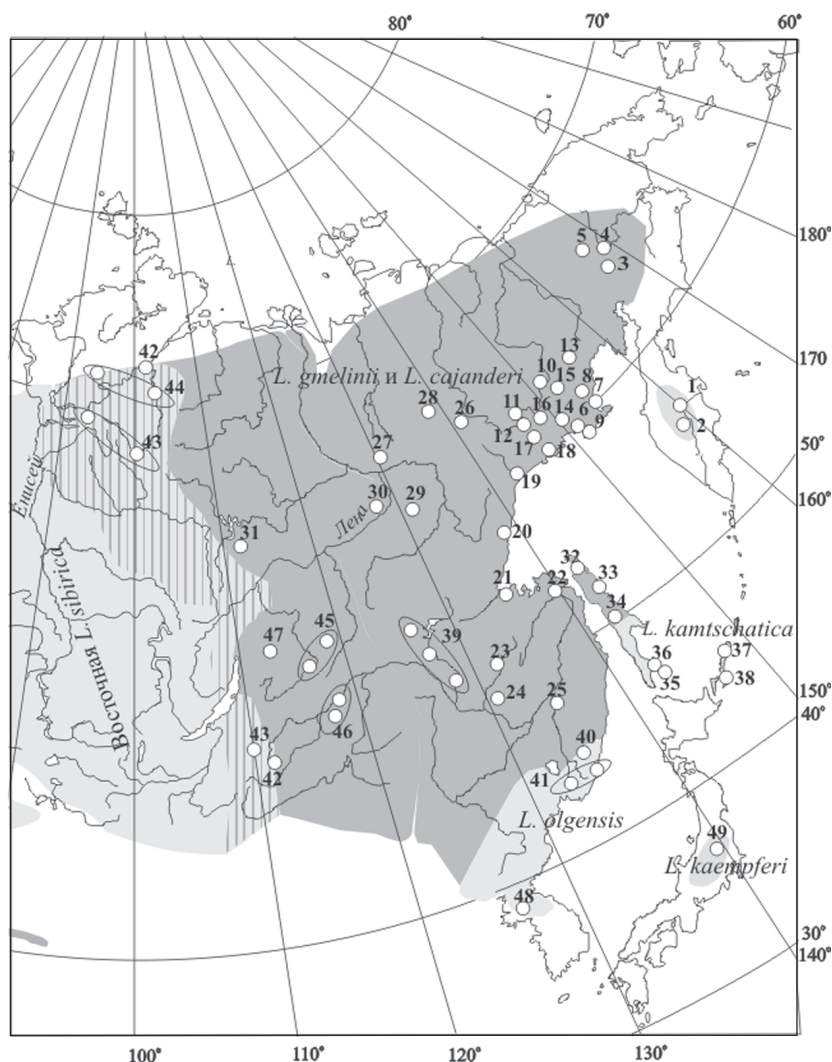


Рис. 1. Ареалы изученных видов *Larix*, расположение исследованных популяций

Fig. 1. The *Larix* species study areas and their distribution

только с Pt26081, что потребовало разработки для двух оставшихся фрагментов новых праймеров на основе секвенирования соответствующих участков хлоропластной ДНК у *L. gmelinii*. Таким же образом была модифицирована пара праймеров TrnLV (Parducci, Szmidt, 1999) и создана новая – Pt9891 – Pt9833 (см. выше).

**Полиморфизм cpSSRs и генетическая изменчивость внутри популяций.** Обнаружено 8 размерных вариантов длины микросателлитных фрагментов (аллелей), всего 24 аллеля в 5 локусах. По сочетанию аллелей в исследованных локусах у 1020 деревьев выявили 114 гаплотипов. Таким образом, уровень полиморфизма хлоропластных микросателлитов у *Larix* схож с таковым у других хвойных. Так, например, при анализе 162 особей *Cedrus atlantica* по 6 локусам cpSSR было обнаружено 25 аллелей, давших 66 гаплотипов (Terrab et al., 2006). У 235 деревьев *Pinus maritima* в 6 локусах выявлены 21 аллель и 32 гаплотипа (Ribeiro et al., 2001). Причем большое число га-

лотипов, выявленных в нашем исследовании, обусловлено значительным объемом проанализированного материала.

Параметры внутривидовой генетической изменчивости отражены в таблице. Количество гаплотипов в выборке ( $N_0$ ) варьировало от 5 до 18, показатель внутривидовой изменчивости ( $H_0$ ) – от 0,441 до 0,970, эффективное число гаплотипов ( $N_e$ ) – от 1,7 до 12,4. Данные оценки сравнимы с таковыми у других широко ареальных хвойных. Так, у *Abies sibirica*  $N_0$  варьировало от 7 до 21,  $H_0$  – от 0,75 до 1,  $N_e$  – от 3,7 до 15,7 (Семерикова, Семериков, 2007). У *Cedrus atlantica*  $N_0$  – 12–21,  $H_0$  – 0,88–1,  $N_e$  – 6,4–16,7 (Terrab et al., 2006).

Наименьшие показатели изменчивости характерны для выборки «Магадан», выборки с Камчатки («Эссо» и «Анавгай»), а также для о. Шикотан и одной из выборок с Чукотки («Ламутское (2)»), что, вероятно, объясняется дрейфом генов в результате длительной изоляции в небольших популяциях (Камчатка и о. Шикотан), а также резким сокращением численности вида в истории, повлекшим за собой потерю генетической изменчивости (в выборке из окрестностей г. Магадана из 6 обнаруженных гаплотипов один достигает частоты 70,8%).

В остальных выборках показатели достаточно высокие, варьируют незначительно. В некоторых выборках уровень разнообразия обеспечивается наличием уникальных гаплотипов (из 114 сочетаний 55 оказались уникальными, т. е. каждый встретился только в одной из 49 выборок). Обнаруженная высокая генетическая изменчивость хорошо согласуется с морфологической варибельностью распространенных здесь видов лиственницы.

**Географическая структурированность гаплотипов, возможное расположение плейстоценовых рефугиумов.** Характер географического распределения некоторых гаплотипов в первом приближении выявляет генетическую структурированность изученного материала (рис. 2).

Общего для всех выборок гаплотипа выявлено не было. Наиболее часто встречается гаплотип № 2 (в 39 из 49 популяций). Он, таким образом, является типично «даурским» в широком смысле

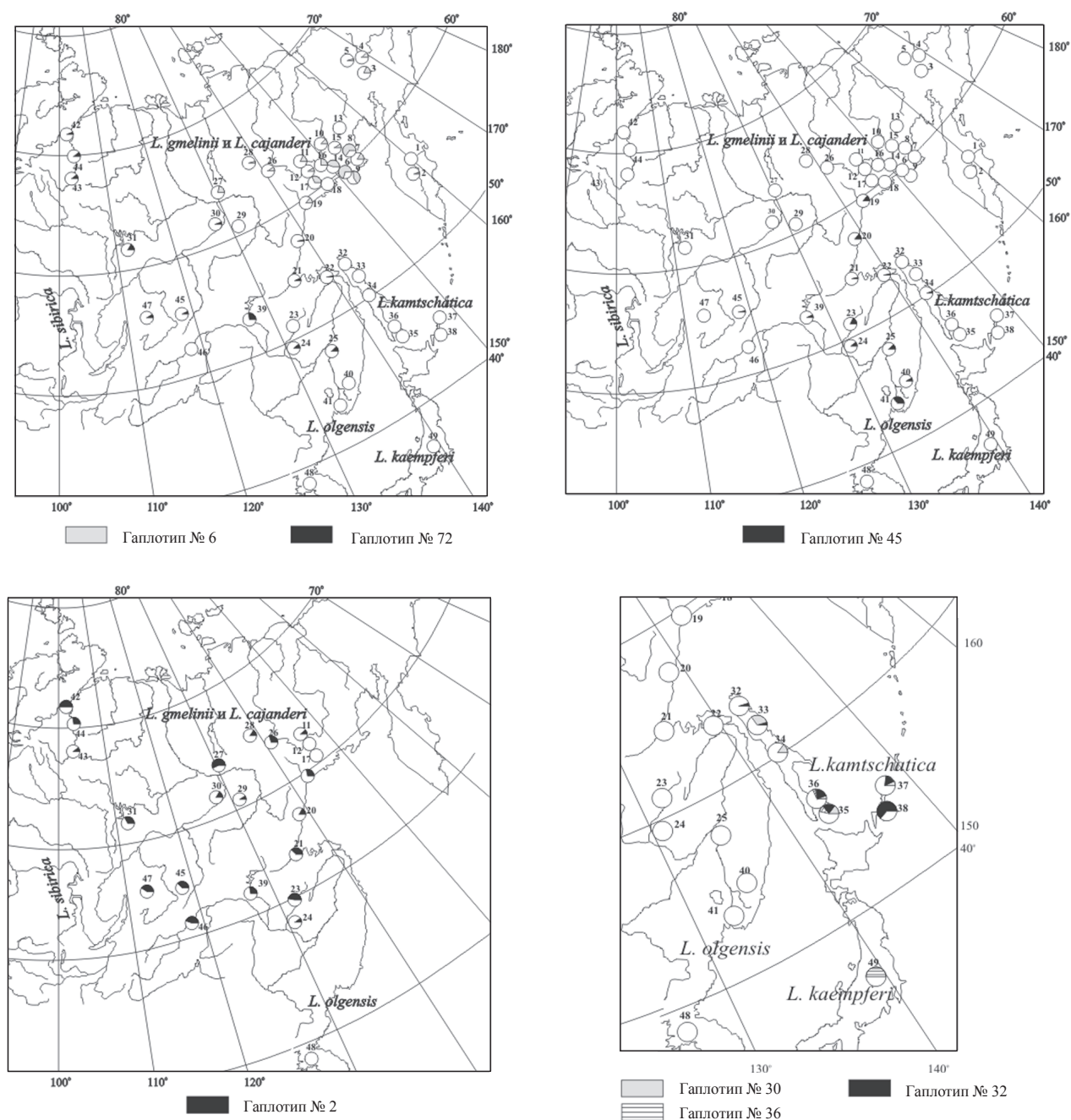


Рис. 2. Распределение частот маркирующих гаплотипов

Fig. 2. Marking haplotype frequency distribution

слова, характерным для лиственниц Восточной Сибири и Дальнего Востока, отражая общность их происхождения и отличие от *L. sibirica*. Это согласуется с полученными ранее данными по изменчивости аллозимных маркеров (Semerikov et al., 1999), митохондриальной, хлоропластной и ядерной ДНК (Козыренко и др., 2004; Semerikov et al., 2003; Семериков, Полежаева, 2007).

Гаплотип № 6 является характерным для выборок с Камчатки, из Магаданской области и части выборок из Якутии, расположенных к востоку от Верхоянского хребта. В то же время гаплотип № 72 объединяет оставшиеся выборки из Якутии,

Хабаровского края, южного Забайкалья и с севера Красноярского края. Подобная картина географического распределения гаплотипов отражает самостоятельное историческое развитие лиственниц по разные стороны от Верхоянского хребта, покрытого во время последнего ледникового максимума ледниками (Спаская и др., 1993) и выступавшего в качестве мощного барьера для потока генов. Факт наличия специфического гаплотипа на крайнем Северо-Востоке Азии поддерживает генетическую обособленность *L. cajanderi*.

В южном Забайкалье, Хабаровском крае (включая западное побережье Охотского моря), Примор-

рье и в одной выборке с Сахалина («Тымовское») распространен гаплотип № 45, отражающий общую историю в заселении данной территории. Для Сахалина и Курильских островов характерны уникальные гаплотипы № 30 и 32. Один из японских гаплотипов (№ 36) также встречается на юге Сахалина (выборки «Озерский» и «Охотское»), что может как отражать генетическую близость лиственницы юга Сахалина и Хонсю, так и быть следствием лесокультурной деятельности. В то же время морфологические, палеогеографические данные (Бобров, 1978; Grichuk, 1984; Короткий и др., 1996), данные изменчивости мтДНК (Семериков, Полежаева, 2007) подтверждают генетические связи японской *L. kaempferi* с сахалинской *L. kamtschatica*, которые возникали в результате сближения их ареалов во время падения уровня Мирового океана и возникновения сухопутных мостов между островами в доледниковое время.

В качестве второго ключевого параметра изменчивости лиственниц Дальнего Востока оценивали степень их популяционной дифференциации.

Средняя генетическая дифференциация среди популяций высокая, значения  $R_{ST}$  и  $G_{ST}$  равны 0,4017 и 0,1393. Тест на филогеографическую структуру выявил достоверные отличия  $R_{ST}$  от  $G_{ST}$  ( $R_{ST} > G_{ST}$ ,  $p < 0,001$ ), следовательно, родственные гаплотипы имеют тенденцию сосуществовать в одной выборке и часть гаплотипов возникла уже после образования основных групп популяций. Тест Мантела выявил статистически значимую положительную корреляцию ( $r = 0,35$  с  $p = 0,002$ ) между парными  $R_{ST}$  и географическими дистанциями. При ординации выборки распределились неравномерно. Четко обособилось несколько групп. Группу № 1 образуют: выборка «Мадаун», выборка из окрестностей г. Магадана и три выборки к востоку от него с побережья Охотского моря, поддерживая тем самым гипотезу существования на этой территории рефугиума лесной растительности в период последнего ледникового максимума. Во-первых, это подтверждается сниженным генетическим разнообразием магаданской выборки, указывающим на событие «бутылочного горлышка» в ее истории. Во-вторых, в районе р. Яма располагаются так называемые еловые острова из *Picea obovata*, оторванные более чем на 1000 км от основного ареала (Мочалова, 1996) и считающиеся реликтами последней ледниковой эпохи (к сожалению, материалов, чтобы судить о времени образования и изоляции островных местонахождений ели, недостаточно). Также существуют палеогеографические данные, свидетельствующие, что один из рефугиумов, в котором сохранялись такие представители древесной растительности, как *Larix dahurica* s.l., *Betula fruticosa*, *B. middendorffii*, *Populus suaveolens* и др., в течение ледниковых интервалов позднего плейстоцена мог располагаться на полосе суши вдоль

северного побережья Охотского моря (Ложкин, 2002).

В группу № 2 вошли выборки с Чукотки, часть выборки из Магаданской области и одна выборка из Якутии. В целом эта группа родственна первой и, вероятно, отражает пути расселения лиственницы из рефугиума на побережье, хотя не исключено ее автономное сохранение в наиболее благоприятных местообитаниях по всей территории Магаданской области, так как в целом для данных выборок характерно довольно высокое генетическое разнообразие. Чукотка связана общими гаплотипами с остальными выборками группы, но разнообразие в ней снижено, что также указывает на резкое сокращение численности.

Третья группа (№ 3) самая многочисленная и слабо дифференцированная, ее составляют оставшиеся выборки из Магаданской области, выборки с западного побережья Охотского моря (Хабаровский край), из Якутии, Забайкалья, Красноярского края и с Камчатки. Подобное смешение может объясняться несколькими причинами. Во-первых, общностью происхождения, так как все современные виды дальневосточных лиственниц являются дериватами общего предка (Semerikov et al., 2003), во-вторых – интенсивными потоками генов, распространяющихся с пылью, и процессами гибридизации. Однако, как обсуждалось ранее, если учитывать частоту определенных гаплотипов, то обнаруживается четкое разделение выборок по Верхоянскому хребту. Таким образом, одной из причин слабой дифференциации группы № 3, помимо краткости временного интервала, прошедшего со времени изоляции популяций лиственницы Верхоянским хребтом, может быть недостаток использованного метода представления результатов, не способного четко разграничить выборки из-за большого количества уникальных гаплотипов.

В группу № 4 выделились выборки из Приморья и Хабаровского края, что согласуется с палеоботаническими данными о наличии в устье Амура и на юге Приморья (Боярская, 1989) ледниковых рефугиумов, из которых в послеледниковые происходила экспансия лиственницы по южной территории Дальнего Востока. Пятая группа (№ 5) объединяет о. Сахалин, Курильские острова и Корею. Для о. Сахалин и Курильских островов во время последнего сартанского оледенения реконструируются сохранение редкостойных лиственничников (Крестов и др., 2004). Наличие уникальных гаплотипов также свидетельствует в пользу этого. Близость «Кореи» к этим выборкам несколько выбивается из общей картины, но необходимо отметить ее генетическое сходство также и с географически близкими к ней выборками «Уссурийск», «Ольга» и «Кавалерово». Отдельно от всех располагается выборка из Японии. Несмотря на наличие общего гаплотипа с южным Сахалином, японская лиственница имеет ряд уникальных гап-

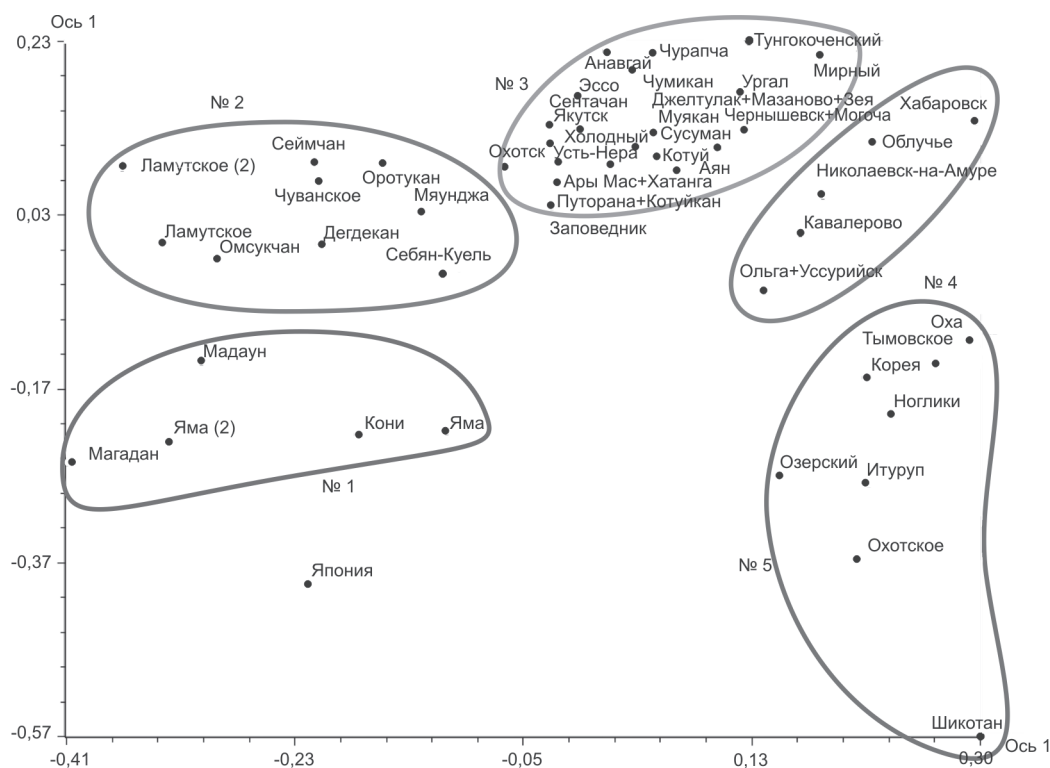


Рис. 3. Ординация изученных популяций видов *Larix* с помощью анализа главных координат, построенная на основании генетических дистанций  $R_{ST}$

Fig. 3. The scatter plot of the *Larix* populations based on  $R_{ST}$  genetic distances and analysis of principal coordinates

лотипов, возникших в результате длительной изоляции и резкого сокращения ареала (в настоящее время он ограничен центральной горной областью о. Хонсю на высоте 500–2300 м н. у. м.).

Отдельного упоминания заслуживает Камчатка. По результатам исследования в выборках с Камчатки отсутствуют уникальные гаплотипы, они имеют лишь повышенную частоту общераспространенного гаплотипа № 2, а в выборке «Эссо» один раз встретился гаплотип № 6, распространенный на крайнем Северо-Востоке. При ординации данные выборки сгруппировались вместе с типично «даурскими» (рис. 3, группа № 3). Это не совсем согласуется с полученными ранее данными по изменчивости мтДНК (Семериков, Полежаева, 2007), по которым лиственница на Камчатке имеет единственный митохондриальный гаплотип, встречающийся на юге Хабаровского края, в Приморье и на о. Сахалин, указывая на ее заселение из этих областей, а не с Севера-Востока. Вероятно, хлоропластные гаплотипы, свойственные северо-востоку Азии, проникли на Камчатку уже после ее заселения лиственницей и это проникновение не сопровождалось распространением там и митохондриального гаплотипа, свойственного ныне Чукотке и Магаданской области. Для прояснения этой ситуации необходимы дополнительные исследования мтДНК на территории Магаданской области и Чукотки.

Работы были поддержаны грантом ДВО РАН 07-III-Д-06-057, грантом губернатора Магаданской области.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Бобров Е. Г. Лесообразующие хвойные СССР. – Л.: Наука, 1978. – 189с.
- Боярская Т. Д. Сопоставление амплитуды изменчивости палеоклиматов позднего плейстоцена и голоцена различных районов СССР // Палеоклиматы позднеледниковья и голоцена. – М.: Наука, 1989. – С. 85–90.
- Козыренко М. М., Артюкова Е. В., Реунова Г. Д. и др. Генетическая изменчивость и взаимоотношения лиственниц Сибири и Дальнего Востока по данным RAPD-анализа // Генетика. – 2004. – Т. 40, № 4. – С. 506–515.
- Короткий А. М., Гребенникова Т. А., Пушкарёв В. С. и др. Климатические смены на территории юга Дальнего Востока в позднем кайнозое (миоцен – плейстоцен). – Владивосток: ДВГУ, 1996. – 58 с.
- Крестов П. В., Баркалов В. Ю., Таран А. А. Ботанико-географическое районирование острова Сахалин // Растительный и животный мир острова Сахалин. – Владивосток: Дальнаука, 2004. – Ч. 1. – С. 67–92. – (Материалы междунар. Сахалин. проекта).
- Ложкин А. В. Современный пыльцевой дождь в арктических районах Берингии и реконструкция растительности ледниковых интервалов плейстоцена // Четвертичная палеогеография Берингии. – Магадан: СВКНИИ ДВО РАН, 2002. – С. 13–27.
- Мочалова О. А. О новом местонахождении ели сибирской (*Picea obovata* Ledeb.) на Крайнем Северо-Вос-



- токе Азии // Ботан. журн. – 1996. – Т. 81, № 12. – С. 127–133.
- Семериков В. Л., Полежаева М. А. Структура изменчивости митохондриальной ДНК лиственниц Восточной Сибири и Дальнего Востока // Генетика. – 2007. – Т. 43, № 6. – С. 782–789.
- Семерикова С. А., Семериков В. Л. Изменчивость хлоропластных микросателлитных локусов у пихты сибирской (*Abies sibirica* Ledeb.) и двух дальневосточных видов пихт *A. nephrolepis* (Trautv.) Maxim. и *A. sachalinensis* Fr. Schmidt // Генетика. – 2007. – Т. 43, № 12. – С. 1637–1646.
- Спаская И. И., Астахов В. И., Глушкова О. Ю. и др. Развитие ландшафтов и климата Северной Евразии. – М.: Наука, 1993. – Вып. 1. – 172 с.
- Усенко Н. В. Хвойные деревья и кустарники Дальнего Востока. – Хабаровск: ДальНИИЛХ, Хабаровское кн. изд-во, 1966. – 96 с.
- Яхнева Н. В. Генетико-таксономический анализ популяций лиственницы Гмелина (*Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr.): автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Красноярск, 2004. – 16 с.
- Brubaker L. B., Anderson P. M., Edwards M. E., Lozhkin A. V. Beringia as a glacial refugium for boreal trees and shrubs: new perspectives from mapped pollen data // J. Biogeogr. – 2005. – Vol. 32. – P. 833–848.
- 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. – Vol. 92. – P. 673–679.
- Grichuk V. P. Late Pleistocene vegetation history // Late Quaternary environments of the Soviet Union. – Minneapolis: Univ. of Minnesota Press, 1984. – P. 155–178.
- Mantel N. A. The detection of disease clustering and a generalized regression approach // Cancer Res. – 1967. – Vol. 27. – P. 209–220.
- Neale D. B., Sederoff R. R. Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in loblolly pine // Theor. Appl. Genet. – 1989. – Vol. 77. – P. 212–216.
- Nei M. Molecular Evolutionary Genetics. – N. Y.: Columbia Univ. Press, 1987. – 512 p.
- Parducci L., Szmidt A. E. PCR-RFLP analysis of cpDNA in the genus *Abies* // Theor. Appl. Genet. – 1999. – Vol. 98. – P. 802–808.
- Provan J., Powell W., Hollingsworth P. M. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution // Trends in Ecology and Evolution. – 2001. – Vol. 16. – P. 142–147.
- Ribeiro M. M., Mariette S., Vendramin G. G. et al. Comparison of genetic diversity estimates within and among populations of maritime pine using chloroplast simple-sequence repeat and amplified fragment length polymorphism data // Mol. Ecol. – 2002. – Vol. 11. – P. 869–877.
- Rohlf E. J. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Ver 2.02. – N. Y.: Exeter. Publ. NTSYS-ps: [Computer progr.]. Ltd, 1988. – P. 85.
- Semerikov V. L., Lascoux M. Nuclear and cytoplasmic variation within and between Eurasian *Larix* (Pinaceae) species // Am. J. Botany. – 2003. – 90(8). – P. 1113–1123.
- Semerikov V. L., Semerikov L. F., Lascoux M. Intra- and interspecific allozyme variability in Eurasian *Larix* Mill. Species // Heredity. – 1999. – Vol. 82. – P. 193–204.
- Semerikov V. L., Zhang H., Sun M., Lascoux M. Conflicting phylogenies of *Larix* (Pinaceae) cytoplasmic and nuclear DNA // Molecular genetics and Evolution. – 2003. – 27. – P. 173–184.
- Terrab A., Paun O., Talavera S. et al. Genetic diversity and population structure in natural populations of Moroccan Atlas cedar (*Cedrus atlantica*; Pinaceae) determined with cpSSR markers // Am. J. Botany. – 2006. – Vol. 93, No. 9. – P. 1274–1280.
- Vendramin G. G., Lelli L., Rossi P., Morgante M. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae // Mol. Ecol. – 1996. – Vol. 5. – P. 111–114.

Поступила в редакцию 06.08.2008 г.

## GENETIC DIVERSITY OF cpSSR LOCI IN *LARIX* GENUS OVER THE FAR EAST AREAS

M. A. Polezhaeva, V. L. Semerikov

The diversity of 5 cpSSR loci of chloroplast DNA was investigated in 49 *Larix* populations across Eastern Siberia and Far East; as a result, 114 haplotypes were reported. The genetic variety has its phylogenetic signal expressed geographically:  $R_{ST}$  (value) >  $G_{ST}$  (value),  $p < 0.0001$ . The pairwise  $R_{ST}$  distance-based ordination of the examined populations testifies to a number of genetically related populations typical of certain geographic areas as follows: 1) the city of Magadan area; 2) Magadan Region, Chukotka and one population from the territory of Yakutia; 3) Kamchatka, a part of the territory of Magadan Region, Khabarovsk Area, Baikal Lake area, the northern part of Krasnoyarsk Area and Yakutia; 4) Khabarovsk Area and Primorje; and 5) Sakhalin Island, the Kurils and Korea. The Japanese population is peculiar. A subsequent study of some haplotype frequencies revealed a further differentiation in the third group caused by the Verkhoyansky Range and representing the individual histories of larch populations over its both sides.

**Key words:** chloroplast microsatellites, cpSSR, biogeography, *Larix*, northeast Asia.