

**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПОПУЛЯЦИЙ ЛИСТВЕННИЦЫ СИБИРСКОЙ  
(*LARIX SIBIRICA* LEDEB.) ПО МИКРОСАТЕЛЛИТНЫМ ЛОКУСАМ\***

*Авторами статьи впервые исследована и применена на практике методика использования ядерных микросателлитных маркеров в анализе генетической изменчивости и уровня дифференциации лиственницы сибирской.*

**Ключевые слова:** лиственница сибирская, микросателлитные локусы, генетическое разнообразие и дифференциация, сохранение генофонда.

*N.V. Oreshkova, M.M. Belokon*

**GENETIC DIFFERENTIATION IN SIBERIAN LARCH (*LARIX SIBIRICA* LEDEB.) POPULATIONS  
BY MICROSATELLITE LOCI**

*The technique of the nuclear microsatellite marker use in the analysis of genetic variability and differentiation level of the Siberian larch is researched and put into practice by the authors of the article for the first time.*

**Key words:** Siberian larch, microsatellite loci, genetic diversity and differentiation, gene pool conservation.

**Введение.** Виды рода *Larix* Mill. являются важнейшими компонентами бореальных лесов северного полушария. Один из наиболее распространенных представителей этого рода – лиственница сибирская (*Larix sibirica* Ledeb.). Основные ее массивы приурочены к континентальным районам Южной Сибири, юго-западной окраине Средне-Сибирского плоскогорья и лесотундры Западной Сибири, а также к северной части Монголии [Ирошников, 2004].

Ранее проблемы генетического разнообразия и дифференциации вида решались лишь с помощью изоферментных маркеров [Аллозимный полиморфизм..., 1989; Семериков, Матвеев, 1995; Semerikov, 1999; Ларионова, Яхнева (Орешкова), Кузьмина, 2003; Орешкова, Ларионова, 2006, 2007; Орешкова, 2010; Орешкова, Барченков, 2010; Биоразнообразие лиственниц..., 2010 и др.]. Однако для адекватной количественной оценки генетического разнообразия этих данных не хватает, поскольку из-за специфики данного класса маркеров ускользает основная часть генома, а полученные показатели генетической изменчивости существенно занижены [Сулимова, 2004].

В последние годы для исследований генетического полиморфизма хвойных начали активно использовать представителей нового поколения ДНК-маркеров – микросателлиты (варьирующие участки ДНК, состоящие из повторяющихся фрагментов длиной от 1 до 6 пар оснований), которые обладают высоким уровнем полиморфизма, большой частотой встречаются в геноме и достаточно равномерным распределением по длине генома.

**Цель исследований.** Используя ядерные молекулярные маркеры нового поколения, получить качественно новую информацию генетической изменчивости и уровня дифференциации лиственницы сибирской.

**Объекты и методы исследований.** В качестве объектов исследований взяты выборки из шести популяций лиственницы сибирской, произрастающие на территории Таймырского муниципального района Красноярского края и в Республиках Алтай и Тывы. Названия популяций и их местоположение представлены в табл. 1.

\* Работа выполнена в рамках проектов РФФИ (№ 10-04-00786-а; № 11-04-00478-а; №11-04-92112-ЯФ\_а) Интеграционного проекта СО РАН № 76 и ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (направление 1.1, Госконтракты 02.740.11.0281, 14.740.11.0164, 14.740.12.0826).

Географическое расположение и характеристика исследованных популяций лиственницы сибирской

| Популяция                                  | Численность | Район расположения  | Географические координаты | Высота над у.м., м |
|--|-------------|---|---------------------------|--------------------|
| <i>Республика Алтай</i>                    |             |   |                           |                    |
| Черга                                      | 32          | Шебалинский район Республики Алтай, окр. с. Черга                       | 51°29'с.ш.<br>85°32'в.д.  | 600–650            |
| Перевал                                    | 33          | Шебалинский район Республики Алтай, окр. автодор. на Кукуйском перевале | 51°27'с.ш.<br>85°15'в.д.  | 930-1200           |
| <i>Республика Тыва</i>                     |             |   |                           |                    |
| Улар-1                                     | 30          | Эрзинский район Республики Тыва, на север 32 км от с. Эрзин             | 50°27'с.ш.<br>95°30'в.д.  | 1873               |
| Улар-2                                     | 30          | Эрзинский район Республики Тыва, в 16–19 км севернее п. Морен           | 50°31'с.ш.<br>95°27'в.д.  | 2181               |
| <i>Таймырский район Красноярского края</i> |             |   |                           |                    |
| Боганидское                                | 30          | Таймырский район Красноярского края, 26 км от г. Дудинка                | 69°20'с.ш.<br>86°52'в.д.  | 53                 |
| Талнах                                     | 30          | Таймырский район Красноярского края, окр. п. Талнах                     | 69°28'с.ш.<br>88°30'в.д.  | 70                 |

Для выделения ДНК использовали хвою. Выделения проводили по стандартному протоколу для растительных тканей с применением цетилтриметиламмонийбромида (СТАВ).

Полное отсутствие экспериментальных данных по изменчивости ядерных микросателлитных локусов у лиственницы сибирской явилось основной трудностью при подборе праймеров. Последовательности использованных в работе праймеров были взяты из литературных данных, где они использовались для анализа других видов рода *Larix*: лиственницы японской (*L. kaempferi* Sarg.) – группа bcLK [Isoda, Watanabe, 2006], лиственниц альпийской (*L. lyallii* Parl.) и западной (*L. occidentalis* Nutt.) группы UAKLY [Isolation, characterization..., 2000; Contrasting microsatellite variation..., 2006] и UBCLX [Development and characterization of microsatellite, 2009]. Для проведения ПЦР использовали готовые реакционные смеси производства ООО «Лаборатория Изоген».

Характеристики микросателлитных локусов и условия ПЦР-амплификации приведены в табл. 2.

Характеристика микросателлитных локусов, отобранных для анализа генетической изменчивости лиственницы сибирской

| Локус                | Мотив  | t°C отжига           | Число аллелей | Размер фрагмента | Источник литературы         |
|----------------------|--|----------------------|---------------|------------------|-----------------------------|
| <i>bcLK056</i>       | (AG) <sub>20</sub>                                       | Touchdown<br>63–53°C | 21            | 142–196          | Isoda,<br>Watanabe,<br>2006 |
| <i>bcLK066</i>       | (TG) <sub>12</sub>                                       |                      | 8             | 143–157          |                             |
| <i>bcLK189</i>       | (AG) <sub>17</sub> AT(AG) <sub>6</sub>                   |                      | 23            | 158–202          |                             |
| <i>bcLK224</i>       | (AG) <sub>17</sub>                                       |                      | 8             | 128–148          |                             |
| <i>bcLK225</i>       | (GA) <sub>20</sub>                                       |                      | 28            | 160–224          |                             |
| <i>bcLK232</i>       | (AG) <sub>19</sub>                                       |                      | 8             | 133–149          |                             |
| <i>bcLK260</i>       | (TG) <sub>14</sub> (AG) <sub>9</sub>                     |                      | 9             | 94–110           |                             |
| <i>bcLK235</i>       | (TC) <sub>9</sub> (AC) <sub>2</sub> AG(AC) <sub>14</sub> |                      | 21            | 172–220          |                             |
| <i>UBCLXtet_1-22</i> | (TATC) <sub>9</sub> (TA) <sub>12</sub>                   | 58°C                 | 6             | 176–186          | Chen et al.,<br>2009        |
| <i>UAKLY6</i>        | (GT) <sub>17</sub>                                       |                      | 23            | 214–262          | Khasa et al.,<br>2000, 2006 |

Продукты амплификации разделяли путем электрофореза в 6 %-м полиакриламидном геле с использованием Трис-EDTA-боратного электродного буфера. Гели окрашивали в растворе бромистого этидия и визуализировали с помощью системы гель-документации «Kodak». Молекулярный вес фрагментов определяли путем сопоставления со стандартными маркерами в программе Photo-Capt. Обработку полученных данных производили в программе GenAIEx 6.2 [Peakall, Smouse, 2006]. Для анализа связи между географическими и генетическими расстояниями использовали тест Мантела [Mantel, 1967].

**Результаты исследований и их обсуждение.** Из 10 проанализированных ядерных микросателлитных локусов у лиственницы сибирской все оказались полиморфными. Причем наиболее высокополиморфными оказались локусы *bcLK056*, *bcLK189*, *bcLK225*, *bcLK235* и *UAKLly6*, у которых наблюдалось от 21 до 28 аллелей. У остальных локусов (*bcLK066*, *bcLK224*, *bcLK232*, *bcLK260*, *UBCLXtet\_1-22*) выявленный полиморфизм был сравнительно ниже. У них обнаружено от 6 до 9 аллельных варианта (табл. 2). В исследовании, включившем 185 проанализированных особей, по перечисленным локусам нуль-аллели выявлены не были. Всего при анализе шести популяций лиственницы сибирской было выявлено 155 аллельных варианта, из них около 22 % оказались уникальными, встречающиеся только в какой-либо одной из популяций.

При анализе показателей генетической изменчивости исследованных популяций лиственницы (табл. 3) выявили, что популяции из Республики Тыва в среднем характеризовались наиболее высоким аллельным разнообразием и уровнем наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности ( $N_a=9,6$ ;  $H_o=0,488\pm 0,046$ ;  $H_e=0,673\pm 0,054$ ) по сравнению с алтайскими ( $N_a=9,0$ ;  $H_o=0,409\pm 0,054$ ;  $H_e=0,655\pm 0,062$ ) и таймырскими ( $N_a=7,8$ ;  $H_o=0,478\pm 0,035$ ;  $H_e=0,628\pm 0,041$ ).

Таблица 3

**Показатели генетической изменчивости лиственницы сибирской, рассчитанные по результатам микросателлитного анализа**

| Популяции                                | N  | $N_a$         | $N_e$           | $H_o$           | $H_e$           | F               |
|--|----|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <i>Черга</i>                             | 32 | 9,2           | 5,310           | 0,416±0,073     | 0,663±0,088     | 0,347           |
| <i>Перевал</i>                           | 33 | 8,8           | 4,938           | 0,401±0,083     | 0,646±0,091     | 0,342           |
| <i>В среднем для района</i>              |    | 9,0           | 5,124           | 0,409±0,054     | 0,655±0,062     | 0,344           |
| <i>Улар-1</i>                            | 30 | 9,6           | 4,788           | 0,510±0,058     | 0,695±0,061     | 0,261           |
| <i>Улар-2</i>                            | 30 | 9,6           | 5,341           | 0,467±0,074     | 0,651±0,093     | 0,239           |
| <i>В среднем для района</i>              |    | 9,6           | 5,064           | 0,488±0,046     | 0,673±0,054     | 0,250           |
| <i>Боганидское</i>                       | 30 | 7,7           | 3,777           | 0,493±0,066     | 0,618±0,068     | 0,209           |
| <i>Талнах</i>                            | 30 | 7,9           | 3,459           | 0,463±0,051     | 0,639±0,052     | 0,262           |
| <i>В среднем для района</i>              |    | 7,8           | 3,618           | 0,478±0,035     | 0,628±0,041     | 0,236           |
| <i>В среднем для изученных популяций</i> |    | 8,8<br>±0,599 | 4,602<br>±0,393 | 0,458<br>±0,026 | 0,652<br>±0,030 | 0,277<br>±0,026 |

*Примечание:*  $N_a$  – среднее число аллелей на локус;  $N_e$  – эффективное число аллелей на локус;  $H_o$  – наблюдаемая гетерозиготность;  $H_e$  – ожидаемая гетерозиготность; F – индекс фиксации.

Установленные значения основных показателей генетического полиморфизма свидетельствуют о достаточно высоком уровне генетического разнообразия лиственницы сибирской в исследованных регионах (табл. 3) и находятся в пределах значений аналогичных показателей, рассчитанных для лиственниц японской, альпийской и западной [Contrasting microsatellite variation..., 2006; Isoda, Watanabe, 2006; Development and characterization..., 2009].

Сопоставление наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности показало, что во всех популяциях наблюдался дефицит гетерозиготных генотипов по большинству изученных микросателлитных локусов. Наиболее высокие значения индекса фиксации Райта (F) (табл. 3) были выявлены у популяций из Республики Алтай (F=0,344), а наименьшие у популяций из Таймыра (F=0,236). Это, по-видимому, можно объяснить большой фрагментированностью и низкой численностью популяций, а также самоопылением, приводящим к высокой степени инбридинга.

Исследование популяционной структуры с помощью F-статистик Райта [Wright, 1965; Guries, Ledig, 1982] показало, что каждое дерево в изученных популяциях лиственницы сибирской обнаруживает в среднем 29 %-й дефицит гетерозиготных генотипов ( $F_{is}=0,293$ ) относительно популяции и почти 36 % дефицит гетерозигот ( $F_{it}=0,358$ ) относительно вида (табл. 4).

Таблица 4

**Значения показателей F-статистик Райта**

| Локус                | $F_{is}$    | $F_{it}$    | $F_{ST}$    |
|----------------------|-------------|-------------|-------------|
| <i>bcLK232</i>       | 0,372       | 0,408       | 0,058       |
| <i>bcLK056</i>       | 0,240       | 0,303       | 0,083       |
| <i>bcLK224</i>       | 0,405       | 0,424       | 0,033       |
| <i>bcLK225</i>       | 0,324       | 0,370       | 0,068       |
| <i>bcLK066</i>       | 0,150       | 0,183       | 0,039       |
| <i>bcLK189</i>       | 0,378       | 0,401       | 0,037       |
| <i>bcLK260</i>       | 0,311       | 0,395       | 0,122       |
| <i>bcLK235</i>       | 0,187       | 0,237       | 0,061       |
| <i>UBCLXtet_1-22</i> | 0,257       | 0,487       | 0,310       |
| <i>UAKLly6</i>       | 0,304       | 0,371       | 0,097       |
| Среднее              | 0,293±0,026 | 0,358±0,029 | 0,091±0,026 |

Чуть более 9 % всей наблюдаемой изменчивости приходится на межпопуляционную ( $F_{ST}=0,091$ ). Внутри популяций сосредоточено 90,9 % всего генетического разнообразия. Максимально популяции дифференцированы по локусам *UBCLXtet\_1-22*, *bcLK260*, *UAKLly6* и *bcLK056*.

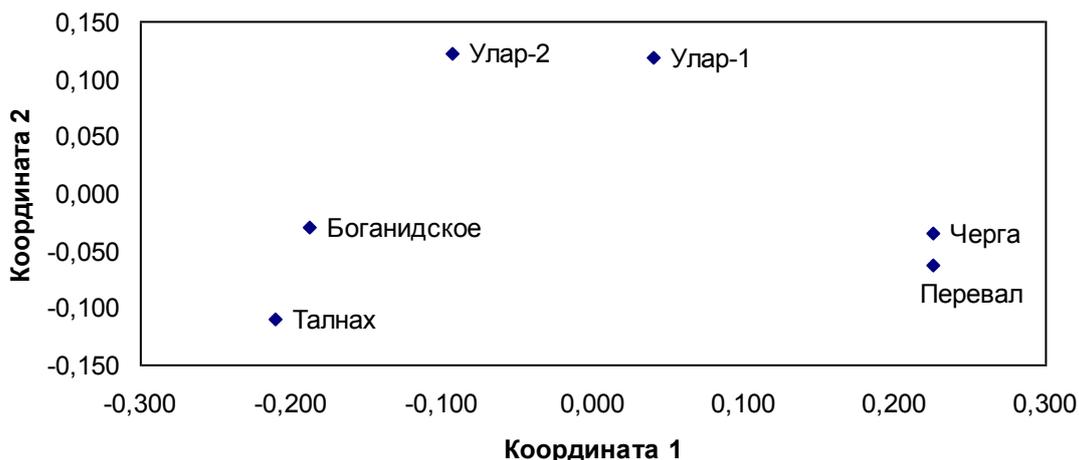
На основании частот аллелей выявленных ядерных микросателлитных локусов проанализирована межпопуляционная дифференциация исследованных популяций лиственницы сибирской. В табл. 5 приведены показатели стандартных генетических расстояний М. Нея [Nei, 1972]. Генетическое расстояние D между популяциями колеблется от 0,067 до 0,469, составляя в среднем 0,254. Значения D слабо коррелировали с географическими расстояниями согласно тесту Мантела ( $r=0,552$ ,  $P=0,07$ ).

Таблица 5

**Генетические расстояния D между изученными популяциями лиственницы сибирской**

| Черга | Перевал | Улар-1 | Улар-2 | Боганидское |             |
|-------|---------|--------|--------|-------------|-------------|
| 0,072 | ***     |        |        |             | Перевал     |
| 0,189 | 0,184   | ***    |        |             | Улар-1      |
| 0,311 | 0,336   | 0,115  | ***    |             | Улар-2      |
| 0,414 | 0,422   | 0,201  | 0,124  | ***         | Боганидское |
| 0,469 | 0,454   | 0,280  | 0,176  | 0,067       | Талнах      |

Генетическая дифференциация исследованных популяций соответствует их географической удаленности друг от друга. Наименьшие генетические отличия установлены внутри каждого района исследований: между популяциями из Таймырского района ( $F_{ST}=0,019$ ;  $D=0,067$ ), Республик Алтай ( $F_{ST}=0,016$ ;  $D=0,072$ ) и Тыва ( $F_{ST}=0,028$ ;  $D=0,115$ ). Наибольшая дифференциация выявлена между популяциями из разных районов: таймырские и алтайские выборки ( $F_{ST}=0,095$ ;  $D=0,439$ ), таймырские и тувинские ( $F_{ST}=0,043$ ;  $D=0,195$ ), а также алтайские и тувинские ( $F_{ST}=0,058$ ;  $D=0,255$ ). Анализ генетических дистанций с помощью многомерного шкалирования (РСА) хорошо иллюстрирует это (рис.).



Проекция изученных популяций лиственницы сибирской на плоскости двух координат по данным PCA-анализа (компьютерная программа GenAlEx V.6.2) матрицы генетических расстояний М. Нея

Таким образом, анализ генетических расстояний между популяциями показал отсутствие тесной взаимосвязи между географическим положением выборок и степенью их генетической дифференциации. Это объясняется тем, что лиственница сибирская произрастает в различных географических зонах с разнообразными экологическими условиями, образуя большое количество разновидностей, экотипов и климатипов. Влияние же экологических факторов перекрывает показатели генетической дифференциации. Подобные выводы были сделаны и по результатам изоферментного анализа [Орешкова, 2010; Орешкова, Барченков, 2010].

**Заключение.** В результате проведенных исследований с использованием десяти ядерных микросателлитных локусов нами впервые были получены оценки уровня генетического разнообразия и дифференциации лиственницы сибирской из разных районов ее распространения по данным маркерам. Представленные данные являются лишь начальным этапом огромной работы по изучению генетического разнообразия не только вида, но и рода в целом, выявления диагностических локусов, маркирующих выборки, выделения генетических резерватов, изучения межвидовой гибридизации лиственниц.

*Благодарности.* Авторы выражают огромную благодарность научному сотруднику лаборатории техногенных лесных экосистем ИЛ СО РАН, канд. биол. наук Д.Н. Орешкову за предоставленный материал из Республики Тыва и Таймырского района Красноярского края.

### Литература

1. Биоразнообразие лиственниц Азиатской России / А.П. Абаимов, И.Ю. Адрианова, Е.В. Артюкова [и др.]. – Новосибирск: ГЕО, 2010. – 160 с.
2. Ирошников А.И. Лиственницы России. Биоразнообразие и селекция. – М.: ВНИИЛМ, 2004. – 182 с.
3. Ларионова А.Я., Яхнева Н.В. (Орешкова), Кузьмина Н.А. Генетическая изменчивость лиственницы сибирской в Нижнем Приангарье // Лесоведение. – 2003. – № 4. – С. 17–22.
4. Орешкова Н.В., Ларионова А.Я. Аллозимный полиморфизм лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) // Лесные экосистемы Северо-Восточной Азии и их динамика: мат-лы междунар. конф. – Владивосток, 2006. – С. 220–223.
5. Орешкова Н.В., Ларионова А.Я. Генетическое разнообразие лиственницы сибирской в Ужурской лесостепи (Красноярский край) // Вестн. СВНЦ ДВО РАН. – 2007. – № 3. – С. 50–55.
6. Орешкова Н.В. Генетическая дифференциация лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) в Средней Сибири // Хвойные бореальной зоны. – 2010. – № 1–2. – С. 147–153.
7. Орешкова Н.В., Барченков А.П. Генетические особенности и морфологическая изменчивость лиственницы сибирской в Алтае-Саянской горной области // Вестн. КрасГАУ. – 2010. – № 10. – С. 59–64.
8. Семериков В.Л., Матвеев А.В. Изучение генетической изменчивости лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ldb.) по изоферментным локусам // Генетика. – 1995. – Т. 31. – № 8. – С. 1107–1113.
9. Сулимова Г.Е. ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и области применения // Успехи современной биологии. – 2004. – Т. 124. – № 3. – С. 260–271.

10. Аллозимный полиморфизм лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) / А.В. Шурхал, А.В. Подогас, В.Л. Семериков [и др.] // Генетика. – 1989. – Т. 25. – № 10. – С. 1899–1901.
11. Development and characterization of microsatellite loci in western larch (*Larix occidentalis* Nutt.) / C. Chen, C. Liewlaksaneeyanawin, T. Funda [at el.] // Molecular Ecology Resources. – 2009. – Vol. 9. – P. 843–845.
12. A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD, and microsatellite markers / M.E. Devey, J.C. Bell, D.N. Smith [at el.] // Theor. Appl. Genet. – 1996. – Vol. 92. – № 6. – P. 673–679.
13. Guries R.P., Ledig F.T. Gene diversity and population structure in pitch pine (*Pinus rigida* Mill.) // Evolution. – 1982. – Vol. 36. – P. 387–402.
14. Isoda K., Watanabe A. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Larix kaempferi* // Molecular Ecology. – 2006. – Vol. 6. – P. 664–666.
15. Isolation, characterization, and inheritance of microsatellite loci in alpine larch and western larch / D.P. Khassa, C.H. Newton, M.H. Rahman [at el.] // Genome. – 2000. – № 43 (3). – P. 439–448.
16. Contrasting microsatellite variation between subalpine and western larch, two closely related species with different distribution patterns / D.P. Khassa, J.P. Jaramillo-Correa, B. Jaquish [at el.] // Molecular Ecology. – 2006. – Vol. 15. – P. 3907–3918.
17. Mantel N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach // Cancer Research. – 1967. – № 27. – P. 209–220.
18. Nei M. Genetic distance between populations // Amer. Natur. – 1972. – Vol. 106. – P. 283–291.
19. Peakall R., Smouse P.E. GenA1Ex V6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // Molecular Ecology Notes. – 2006. – Vol. 6. – № 1. – P. 288–295.
20. 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.
21. Wright S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating // Evolution. – 1965. – Vol. 19. – P. 355–420.



УДК 630.907.1

Е.М. Рунова, В.А. Савченкова, О.И. Гринько

### ОСОБЕННОСТИ СОСТОЯНИЯ ОСНОВНЫХ ЛЕСООБРАЗУЮЩИХ ДРЕВЕСНЫХ ПОРОД В ПЕРИОД СМЫКАНИЯ КРОН

*В статье рассмотрена зависимость, показывающая динамику численности молодняка на вырубках разного возраста, выживаемость молодняков основных лесобразующих древесных пород в зависимости от возраста. Построены модели, позволяющие ее прогнозировать.*

**Ключевые слова:** *молодняк лесобразующих древесных пород, сомкнутость крон, тип рубок.*

Е.М. Runova, V.A. Savchenkova, O.I. Grinko

### PECULIARITIES OF THE BASIC FOREST FORMING TREE SPECIES CONDITION IN THE CROWN CLOSURE PERIOD

*The dependence which shows the young growth number dynamics on the cuttings of different age, young growth survival rate of the basic forest forming tree species, depending on age is considered in the article. The models which allow to forecast it are constructed.*

**Key words:** *young growth of the forest forming tree species, crown closure, type of cuttings.*

---

**Введение.** Наиболее экономичным способом, позволяющим полнее использовать производительные силы природы, предотвратить нежелательную смену древесных пород и ускорить процесс выращивания леса на территории Приангарья, является содействие естественному возобновлению леса путем сохранения в процессе рубки леса подроста и молодняка (тонкомера). Но полностью избежать трудоемкого процесса