

УДК 575.174: 58.084.2

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ЛИСТВЕННИЦ КАМЧАТКИ, САХАЛИНА И КУРИЛ

© 2014 г. И. Ю. Адрианова

Биолого-почвенный институт ДВО РАН

690022, Владивосток, просп. 100-летия Владивостока, 159

E-mail: adrianova@biosoil.ru

Поступила в редакцию 31.07.2014 г.

Методом RAPD исследованы генетическая изменчивость и дифференциация 10 популяций лиственниц Камчатки, Сахалина и Курил. На основе анализа 319 RAPD локусов, полученных с использованием девяти произвольных праймеров, показано, что камчатские выборки характеризуются более высокими показателями генетической изменчивости ($H_e = 0.172$, $P_{95} = 43.0\%$) по сравнению с сахалинскими и итурупскими выборками ($H_e = 0.142$, $P_{95} = 39.5\%$ и $H_e = 0.143$, $P_{95} = 41.1\%$ соответственно). Выявлена значительная генетическая подразделенность популяций лиственниц Сахалина ($G_{ST} = 0.24$) и Камчатки ($G_{ST} = 0.25$). Обнаружена достоверная корреляция генетических и географических дистанций между выборками ($r = 0.68$, $p < 0.005$).

Ключевые слова: лиственница (*Larix*), RAPD-анализ, генетическая изменчивость, дифференциация, AMOVA, Камчатка, Сахалин, Курильские острова.

Лиственница является важнейшей лесообразующей породой на российском Дальнем Востоке (РДВ), имеющей важное экологическое и экономическое значение в данном регионе. Непрерывность ареалов, отсутствие репродуктивных барьеров и интенсивные процессы интрогрессивной гибридизации, протекающие между соседними видами, затрудняют изучение лиственниц РДВ на основе морфологических критериев. Поэтому актуальными являются популяционно-генетические исследования лиственниц этого региона, что важно в филогенетическом и таксономическом смысле, а также необходимо для разработки охранных мероприятий с целью восстановления и рационального использования генетических ресурсов ценных пород хвойных.

Существует несколько точек зрения относительно таксономического статуса лиственниц Камчатки и Сахалина. Одни авторы полагают, что на полуострове растет *Larix cajanderi* Mayr (Бобров, 1972; Коропачинский, Встовская, 2002), другие исследователи относят камчатские лиственницы к *L. gmelinii* var. *gmelinii* (Farjon, 1990), третьи – к *L. kamtschatica* (Rupr.) Carr. (Ирошников, 2004) или

L. kurilensis ssp. *glabra* Dylis (Дылис, 1961). По данным разных авторов, на юге Сахалина распространена *L. kamtschatica* (Дылис, 1961) или *L. gmelinii* var. *japonica* (Maxim ex Regel) Pilg. (Farjon, 1990), ареал этого вида захватывает также острова Итуруп и Шикотан Курильского архипелага, а в северной части острова встречается *L. ochotensis* Kolesn., относящаяся к гибриду *L. gmelinii* и *L. kamtschatica* (Бобров, 1972).

В последние годы дальневосточные лиственницы активно изучаются с применением как аллозимов (Потенко, Разумов, 1996; Гончаренко, Силин, 1997; Semerikov et al., 1999), так и маркеров ДНК (Козыренко и др., 2004; Левина и др., 2008; Орешкова, Белоконь, Жамъянсурен, 2013; Semerikov, Lascoux, 2003; Vasyutkina et al., 2007; Polezhaeva et al., 2010). В популяционно-генетических исследованиях растений, в том числе хвойных, широкое применение получили маркеры, оценивающие изменчивость всего ядерного генома, к их числу относятся и RAPD-маркеры (random amplified polymorphic DNA – случайно амплифицированная полиморфная ДНК) (Nkongo, 1999; Lee, Ledig, Johnson, 2002; Kisanuki et al., 2002; Zhang et al., 2013). Мы

использовали эти маркеры для изучения генетической изменчивости популяций лиственниц из разных географических районов Сибири и Дальнего Востока (Козыренко и др., 2004; Левина и др., 2008; Vasyutkina et al., 2007). Однако этими исследованиями не были охвачены лиственницы островной и полуостровной части РДВ.

Цель данной работы – изучение генетической изменчивости и дифференциации популяций лиственниц Камчатки, Сахалина и Итурупа с использованием RAPD-маркеров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали 10 выборок лиственниц из естественных насаждений Камчатки, Сахалина и Итурупа, местоположение и описание которых представлены на рис. 1 и в табл. 1.

Геномную ДНК выделяли из 300–500 мг свежей хвои по методике (Isabel, Beaulieu, Bousquet, 1995). Полимеразную цепную реакцию с девятью десятичными произвольными праймерами (ОРА-01, ОРА-02, ОРА-04, ОРА-07, ОРА-11, ОРА-12, ОРА-19, ОРВ-10, ОРС-06; «Синтол», Россия) проводили, используя реакционную смесь и температурный режим, описанные ранее (Козыренко и др., 2001). Каждую реакцию повторяли несколько раз. При анализе учитывали только четко видимые и воспроизводимые в повторных экспериментах фрагменты. Продукты амплификации разделяли методом электрофореза в 1.6%-м агарозном геле в присутствии бромистого этидия. В качестве маркеров молекулярных масс использовали EcoRI + HindIII-рестрикты ДНК фага лямбда («Fermentas», Литва).



Рис. 1. Местоположение исследованных выборок лиственниц. Выборки: 1 – УЧ 1, 2 – УЧ 2, 3 – УЧ 3, 4 – УЧ 4, 5 – УЧ 5, 6 – ОХА, 7 – ТЫМ, 8 – АНИ, 9 – КАС, 10 – ХВО. Код выборок см. в табл. 1.

Таблица 1. Географическое положение исследованных выборок лиственниц

Код выборки	Местоположение	Координаты с. ш./ в. д.	Число деревьев
УЧ 1	Камчатка, окрестности с. Эссо, северо-западный склон	55°57.0' / 158°42.1'	14
УЧ 2	Камчатка, окрестности с. Эссо, юго-восточный склон	55°56.3' / 158°43.3'	13
УЧ 3	Камчатка, вулкан, склон сопки Плоской	55°51.8' / 160°12.8'	15
УЧ 4	Камчатка, вулкан, подножие сопки Плоской	55°52.4' / 160°4.7'	13
УЧ 5	Камчатка, 60 км севернее с. Мильково	55°10.6' / 159°0.9'	13
ОХА	Сахалин, залив Уркта, окрест. г. Оха	53°33.9' / 142°58.3'	10
ТЫМ	Сахалин, окрест. пос. Тымовское	50°51.9' / 142°40.1'	10
АНИ	Сахалин, окрест. пос. Анива, 200 м юго-западнее побережья	46°42.8' / 142°31.9'	9
КАС	Итуруп, оз. Касатка	45°1.3' / 147°49.0'	8
ХВО	Итуруп, мыс Евгения, устье ручья Хвойный	45°11.1' / 148°13.8'	17

Для оценки генетических параметров популяций и построения дендрограммы методом невзвешенного попарного среднего (метод UPGMA) на основе генетических дистанций Нея использовали пакеты компьютерных программ TFGA (Miller, 1997) и POPGENE (Yeh., Boyle, 1997). Для иерархического распределения генетической изменчивости применяли анализ молекулярных вариаций (AMOVA) в программе Arlequin 2.000 (Schneider, Roessli, Excoffier, 2000). Для выявления корреляции между генетическими и географическими дистанциями выборок использовали тест Мантела (Mantel, 1967).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ популяций лиственниц методом RAPD с использованием девяти праймеров, отобранных из числа эффективных (Сазонова и др., 2001), выявил 319 фрагментов ДНК, количество которых в индивидуальных RAPD-спектрах в зависимости от праймера варьировало от 24 до 41. Полиморфными во всех выборках оказались 303 (96 %) локуса. Выборки различались по числу, составу и частотам встречаемости большинства фрагментов ДНК, однако видоспецифичных ло-

кусов не обнаружено. Значения показателей генетической изменчивости, рассчитанные на основе полученных фрагментов, представлены в табл. 2.

В среднем более изменчивыми оказались камчатские выборки, а лиственницы Итуруп и Сахалина характеризовались меньшим генетическим разнообразием, что, скорее всего, связано с их островной изоляцией и значительным антропогенным воздействием. Из камчатских выборок наименьшие генетические показатели имела выборка УЧ 2 (см. табл. 2), что, по-видимому, может объясняться особенностями ее местопроизрастания. Снижение генетического разнообразия в камчатских популяциях лиственницы отмечено также в работах с использованием ядерных и хлоропластных микросателлитов (Орешкова, Белоконь, Жамьянсурен, 2013; Polezhaeva, Lascoux, Semerikov, 2010). Примечательно, что доля полиморфных локусов при 99%-м критерии, полученная нами для большинства исследованных выборок, прежде всего всех камчатских, превышала этот показатель, рассчитанный при 95%-м критерии (см. табл. 2), что может свидетельствовать о наличии в данных выборках редких локусов. Присутствие редких локусов в популяции может обеспечивать ее жизнеспособ-

Таблица 2. Значения генетических показателей в исследованных выборках лиственниц

Выборка	A	H_e	P_{95}	P_{99}	G_{ST}	N_m
			%			
Камчатка						
УЧ 1	1.50	0.184	47.0	49.8	0.25	1.5
УЧ 2	1.38	0.134	31.4	37.9		
УЧ 3	1.44	0.159	40.8	43.6		
УЧ 4	1.51	0.201	47.3	50.5		
УЧ 5	1.53	0.182	48.3	53.3		
Среднее	1.47	0.172	43.0	47.0		
Сахалин						
ОХА	1.41	0.128	40.8	40.8	0.24	1.6
ТЫМ	1.42	0.138	35.1	42.0		
АНИ	1.43	0.161	42.6	42.6		
Среднее	1.42	0.142	39.5	41.8		
Курилы, Итуруп						
КАС	1.39	0.134	38.9	38.9	0.09	5.1
ХВО	1.51	0.151	43.3	50.5		
Среднее	1.45	0.143	41.1	44.7		

Примечание. A – среднее число аллелей на локус, H_e – средняя ожидаемая гетерозиготность по всем локусам, P_{95} и P_{99} – доли полиморфных локусов при 95 и 99%-м критериях соответственно, G_{ST} – мера дифференциации популяций, N_m – поток генов. Код выборки см. в табл. 1.

способность, но в то же время такие локусы легко элиминируются вследствие случайных процессов, и вероятность таких событий вызывает необходимость разработки охранных мероприятий для таких популяций.

В целом исследованные выборки имеют весьма высокие показатели генетической изменчивости (см. табл. 2), сопоставимые с характеристиками, полученными на основе RAPD-маркеров для такого широко распространенного континентального вида, как *L. sibirica* Ledeb. ($H_e = 0.170$, $P_{95} = 45\%$) (Абаимов и др., 2004).

Анализ величин G_{ST} (см. табл. 2), характеризующих структуру исследованных популяций, выявил значительную подразделенность камчатских и сахалинских лиственниц, имеющих близкие значения этого показателя, существенно превышающие G_{ST} для выборок с о-ва Итуруп. Результаты AMOVA, представленные в табл. 3, подтвердили значительную дифференциацию лиственниц Камчатки и Сахалина. На внутривидовой популяционной составляющей приходится чуть более 65% выявленной генетической изменчивости, в то время как на Итурупе более 90% изменчивости сосредоточено внутри популяций. Оставшаяся часть генетического разнообразия камчатских и сахалинских лиственниц по-разному распределилась по иерархическим уровням. На Камчатке большая часть оставшейся генетической изменчивости приходится на межпопуляционную составляющую, а на Сахалине – на межгруппо-

вую (см. табл. 3). При этом на Камчатке выборки распределены в группы по их географической близости, и таких групп выделено 3, а на Сахалине выборки разделены на 2 группы согласно таксономической принадлежности. Таким образом, учитывая полученные результаты, мы предположили, что выявленная значительная дифференциация лиственниц Камчатки и Сахалина вызвана разными причинами. На Камчатке такой уровень подразделенности лиственниц, скорее всего, определяется природно-климатическими особенностями их местообитания, а для Сахалина важную роль в высокой дифференциации играет произрастание на острове разных видов лиственниц – *L. kamtschatica* и *L. ochotensis*.

Кластерный анализ методом UPGMA, проведенный на основе генетических дистанций Нея, с высокой степенью поддержки сгруппировал все популяции согласно их географическому положению (рис. 2). Основной кластер образовали два подкластера, один из которых сформирован сахалинскими выборками, а второй – выборками Камчатки. Лиственницы о-ва Итуруп оказались удаленными от представителей основного кластера. Интересен тот факт, что южно-сахалинская выборка АНИ отделена от двух других сахалинских выборок, хотя и находится с ними в одном подкластере, и в то же время значительно дистанцирована от группы курильских выборок, которые так же, как и выборка АНИ, относятся к лиственнице камчатской.

Таблица 3. Анализ AMOVA исследованных популяций лиственниц на основе 319 RAPD локусов

Источник вариации	Компонента вариации	Доля вариации, %
Камчатка		
Между группами	2.84	6.9
Между популяциями внутри групп	10.77	26.0
Внутри популяций	27.73	67.1
Сахалин		
Между группами	8.36	21.4
Между популяциями внутри групп	4.61	11.8
Внутри популяций	26.16	66.8
Итуруп, Курилы		
Между популяциями	2.40	8.2
Внутри популяций	27.02	91.8

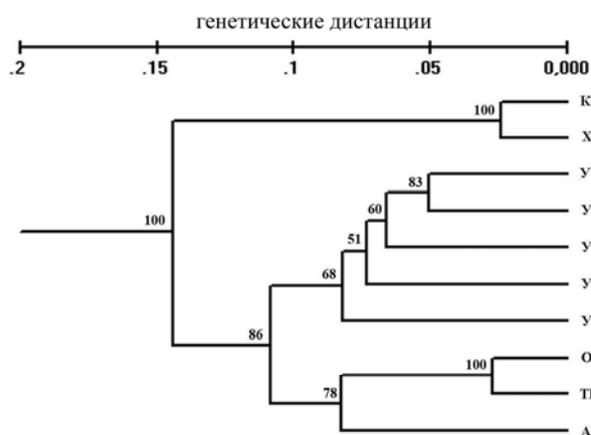


Рис. 2. UPGMA-дендрограмма генетических связей между выборками лиственниц на основе генетических дистанций Нея. Цифрами указаны величины достоверности кластеризации (индексы бутстрэпа).

Такой характер кластеризации в совокупности со значительной подразделенностью сахалинских выборок может свидетельствовать о существовании генетической неоднородности лиственниц Сахалина, выявленной ранее на морфологическом уровне путем описания на одном острове двух видов лиственниц (Толмачев, 1959; Бобров, 1972).

Тест Мантела выявил значимую положительную корреляцию между географическими и генетическими дистанциями ($r = 0.68$, $p < 0.005$), что предполагает наличие между исследуемыми выборками изоляции состоянием.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе анализа 319 RAPD-фрагментов получены основные генетические показатели, позволяющие охарактеризовать генетическую изменчивость и популяционную структуру лиственниц, произрастающих на Камчатке, Сахалине и Итуруп. Выявлено, что камчатские выборки лиственницы более изменчивы по сравнению с лиственницами Сахалина и Итурупа, меньшее генетическое разнообразие которых можно объяснить дрейфом генов в условиях островной изоляции. Кроме того, показано, что обнаруженная значительная генетическая дифференциация лиственниц Камчатки и Сахалина определяется, скорее всего, природно-климатическими условиями местообитания на Камчатке и разной видовой принадлежностью выборок на Сахалине.

Автор благодарит за помощь в сборе растительного материала д-ра биол. наук А. Н. Беркутенко (Институт биологических проблем Севера ДВО РАН, г. Магадан), И. Л. Кац (Биолого-почвенный институт ДВО РАН, г. Владивосток) и канд. биол. наук А. В. Копанину (Институт морской геологии и геофизики ДВО РАН, г. Южно-Сахалинск).

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы Президиума РАН (проект № 12-И-П30-02), Программы интеграционных исследований Дальневосточного отделения РАН и Сибирского отделения РАН (проект № 09-И-СО-06-003).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Абаимов А. П., Журавлев Ю. Н., Муратова Е. Н. и др.* Популяционно-генетический анализ лиственниц Сибири и Дальнего Востока // Структурно-функциональная организация и динамика лесов: мат-лы Всерос. конф. Красноярск, 2004. С. 294–296.
- Бобров Е. Г.* История и систематика лиственниц // Комаровские чтения. Т. XXV. Л.: Наука. Ленингр. отд-ние, 1972. 95 с.
- Гончаренко Г. Г., Силин А. Е.* К вопросу о генетической изменчивости и дифференциации лиственницы курильской (*Larix kurilensis* Mayer) и лиственницы японской (*Larix kaempferi* Sarg.) // ДАН. 1997. Т. 354. № 6. С. 835–838.
- Дылис Н. В.* Лиственница Восточной Сибири и Дальнего Востока. М.: Изд-во АН СССР, 1961. 209 с.
- Ирошников А. И.* Лиственницы России. Биоразнообразие и селекция. М.: ВНИИЛМ, 2004. 182 с.
- Козыренко М. М., Артюкова Е. В., Лауве Л. С. и др.* Генетическая изменчивость каллусных линий женьшеня *Panax ginseng* // Биотехнология. 2001. № 1. С. 19–26.
- 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.
- Коропачинский И. Ю., Встовская Т. Н.* Древесные растения Азиатской России. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2002. 707 с.
- Левина Е. А., Адрианова И. Ю., Реунова Г. Д., Журавлев Ю. Н.* Изучение генетической изменчивости и дифференциации популяций лиственницы в пределах ареала *Larix olgensis* А. Ненгу в Приморском крае // Генетика. 2008. Т. 44. № 3. С. 374–380.
- Орешкова Н. В., Белоконь М. М., Жамъянсурен С.* Генетическое разнообразие, популяционная структура и дифференциация лиственниц сибирской, Гмелина и Каяндера по данным SSR-маркеров // Генетика. 2013. Т. 49. № 2. С. 204–213.
- Потенко В. В., Разумов П. Н.* Генетическая изменчивость и популяционная структура лиственницы даурской на территории Ха-

- баровского края // Лесоведение. 1996. № 5. С. 11–18.
- Сазонова И. Ю., Козыренко М. М., Артюкова Е. В. и др. ДНК из разных органов дальневосточных лиственниц и ее пригодность для RAPD-анализа // Изв. РАН. Сер. биол. 2001. № 2. С. 243–248.
- Толмачев А. И. О флоре острова Сахалин // Комаровские чтения. Т. 12. М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1959. 102 с.
- Farjon A. Pinaceae: drawing and descriptions of the genera *Abies*, *Cedrus*, *Pseudolarix*, *Keteleeria*, *Nothotsuga*, *Tsuga*, *Cathaya*, *Pseudotsuga*, *Larix* and *Picea* // Koeltz Scientific Books. Koenigstein. Germany, 1990. 340 p.
- Isabel N., Beaulieu J., Bousquet J. Complete congruence between gene diversity estimates derived from genotypic data at enzyme and random amplified polymorphic DNA loci in black spruce // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 6369–6373.
- Kisanuki H., Ide Y., Isoda K., Shiraishi S. Molecular analysis of taxa in the genus *Larix* using randomly amplified polymorphic DNA In: Improvement of larch (*Larix* sp.) for better growth, stem form and wood quality // Proc. Intern. Symp. Gap. 2002. P. 475–484.
- Lee S-W., Ledig F. T., Johnson D. R. Genetic variation at allozyme and RAPD markers in *Pinus longaeva* (Pinaceae) of the White Mountains, California // Am. J. Bot. 2002. V. 89. P. 566–577.
- Mantel N. A. The detection of disease clustering and a generalized regression approach // Cancer Res. 1967. V. 27. P. 209–220.
- Miller M. P. Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author. 1997.
- Nkongolo K. K. RAPD and cytological analyses of *Picea* spp. from different provenances: genomic relationships among taxa // Hereditas. 1999. V. 130. P. 137–144.
- 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.
- Schneider S., Roessli D., Excoffier L. Arlequin ver. 2.000: A software for population genetic data analysis // Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland. 2000.
- Semerikov V. L., Semerikov L. F., Lascoux M. Intra- and interspecific allozyme variability in Eurasian *Larix* Mill. species // Hereditas. 1999. V. 82. P. 193–204.
- Semerikov V. L., Lascoux M. Nuclear and cytoplasmic variation within and between Eurasian *Larix* (Pinaceae) species // Am. J. Bot. 2003. V. 90. N. 8. P. 1113–1123.
- Vasyutkina E. A., Adrianova I. Yu., Kozыrenko M. M. et al. Genetic differentiation of larch populations from the *Larix olgensis* range and their relationships with larches from Siberia and Russian Far East // For. Sci. Technol. 2007. V. 3. N. 2. P. 132–138.
- Yeh F. C., Boyle T. J. B. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits // Belgian J. Bot. 1997. V. 129. P. 157.
- Zhang Z., Zhang H., Du J., Zhang L. RAPD and SSR analysis of genetic diversity of natural *Larix gmelinii* populations // Biodiversity and Ecosystems Eq. 2013. V. 27. N. 4. P. 3959–3965.

Genetic Variability and Differentiation of the Kamchatka, Sakhalin and Kuril Islands' Larches

I. Yu. Adrianova

*Institute of Biology and Soil Science, Russian Academy of Sciences, Far Eastern Branch
Prospekt Stoletiya Vladivostoka, 159, Vladivostok, 690022 Russian Federation*

E-mail: adrianova@biosoil.ru

The genetic variability and differentiation of the 10 larch populations from Kamchatka, Sakhalin and Iturup Island (Kuril archipelago) were investigated by RAPD method. On the basis of analysis of 319 RAPD loci identified by means of nine random primers it was indicated that the samples from Kamchatka have higher parameters of genetic variability ($H_e = 0.172$, $P_{95} = 43.0\%$) as compared with the samples from Sakhalin and Iturup ($H_e = 0.142$, $P_{95} = 39.5\%$ and $H_e = 0.143$, $P_{95} = 41.1\%$, correspondingly). Significant genetic differentiation for the samples from Sakhalin ($G_{ST} = 0.24$) and Kamchatka ($G_{ST} = 0.25$) was revealed. Reliable correlation between genetic and geographic distances between samples was found ($r = 0.68$, $p < 0.005$).

Keywords: *larch (Larix), RAPD analysis, genetic variability, genetic differentiation, AMOVA, Kamchatka, Sakhalin, Kuril Islands.*