

УДК 575.174.015.3

ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПОПУЛЯЦИЙ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ В ЛЕНТОЧНЫХ БОРАХ АЛТАЙСКОГО КРАЯ, ВЫЯВЛЕННАЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ МАРКЕРОВ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ

К. Г. Зацепина¹, В. В. Тараканов^{1,2}, Л. И. Кальченко^{1,3}, А. К. Экарт⁴, А. Я. Ларионова⁴

¹ Западно-Сибирский филиал Института леса им. В. Н. Сукачева СО РАН
630082, Новосибирск, а/я 45

² Новосибирский государственный аграрный университет
630039, Новосибирск, ул. Добролюбова, 160

³ Филиал ФБУ «Рослесозащита» Центр защиты леса Алтайского края
656056, Барнаул, ул. Пролетарская, 61

⁴ Институт леса им. В. Н. Сукачева СО РАН
660036, Красноярск, Академгородок, 50/28

E-mail: kseniya-zacepina@yandex.ru, tarh012@mail.ru, altay-lss@yandex.ru, ekart@pochta.ru, alyalarion@yandex.ru

Поступила в редакцию 15.11.2015 г.

В степной части Обь-Иртышского междуречья изучена дифференциация популяций ленточных боров сосны обыкновенной с использованием различных маркеров – аллозимных, фенетических и морфометрических. В ленточных борах выделены 2 лесосеменных района, граница между которыми практически совпадает с границей между сибирским и кулундинским подвидами сосны по классификации Л. Ф. Правдина. Аллозимный анализ не выявил четкой дифференциации насаждений, за исключением редких различий между некоторыми из них и слабо выраженного тренда в виде снижения эффективного числа аллелей в направлении от более северных к более южным популяциям. Анализ молекулярной варiances (AMOVA) также свидетельствует об отсутствии дифференциации популяций из разных лесосеменных районов. Дифференциация по фенам (окраска семян, тип развития апофиза) и высоконаследуемым морфометрическим признакам (индекс формы шишек и масса семян) оказалась более результативной при сравнениях популяций как на уровне лесосеменных районов, так и внутри их. Это позволило выявить достоверные различия между популяциями почти в 82 % случаев от общего числа сравниваемых пар популяций, при этом степень дифференциации при использовании аллозимных маркеров почти в 3 раза ниже. Оценка популяционной структуры сосны в ленточных борах Алтайского края, осуществленная с применением комплекса маркеров, указывает на ее популяционно-генетическую неоднородность в этой части ареала. Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности комплексных исследований популяционной структуры лесобразующих видов и необходимости уточнения лесосеменного районирования сосны на изучаемой территории.

Ключевые слова: сосна обыкновенная, дифференциация популяций, аллозимные и фенетические маркеры, Обь-Иртышское междуречье, Алтайский край.

DOI: 10.15372/SJFS20160502

ВВЕДЕНИЕ

Сосна обыкновенная *Pinus sylvestris* L. в Алтайском крае – наиболее ценная лесобразующая порода. Для решения фундаментальных задач популяционной биологии данного вида, характеризующегося очень обширным ареалом,

а также для повышения эффективности мероприятий по искусственному лесовосстановлению и селекционному семеноводству сосны значительный интерес представляют данные о ее популяционной структуре (Семериков и др., 2014), особенно в степной части ареала, на которой произрастают уникальные ленточные

боры (Милютин и др., 2013). Эти боры особенно интересны тем, что, согласно Л. Ф. Правдину (1964), сложены насаждениями двух подвидов – сибирского (*P. sylvestris* L. ssp. *sibirica* Ledebour) и кулундинского (*P. sylvestris* ssp. *kulundensis* Sukaczew), что нашло отражение в выделении Бурла-Касмалинского и Прииртышско-Кулундинского лесосеменных районов соответственно (Лесосеменное районирование..., 1982). К сожалению, до наших исследований данные о популяционной структуре ленточных боров были основаны исключительно на материалах анализа изменчивости фенотипических признаков (Урусов, Алексеев, 1987) и лесосеменном районировании.

В связи с этим, а также с целесообразностью комплексного поэтапного изучения генетической структуры популяций (Тимофеев-Ресовский и др., 1973; Глотов, 1983; Семериков, 1986) ранее нами проведены двухэтапные исследования ленточных боров, основные результаты которых вошли в две кандидатские диссертации (Кальченко, 2013; Зацепина, 2014). На первом этапе оценивали изменчивость высоконаследуемых морфологических признаков и частот фенотипических признаков, на втором осуществляли анализ генетической изменчивости с использованием аллозимных и ДНК-маркеров (хлоропластных микросателлитных локусов cpSSR).

Основная цель настоящей работы заключается в обобщении результатов этих исследований для более полной характеристики особенностей популяционной структуры сосны в ленточных борах Алтая.

При этом ставились задачи сравнения полученных результатов с данными лесосеменного районирования и сопоставления разных маркеров по эффективности их использования для дифференциации близкорасположенных ареальных совокупностей сосны обыкновенной.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Анализ изменчивости фенотипических признаков сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* L. осуществляли по методу А. И. Видякина (2004, 2007, 2010). Учитывали встречаемость фенотипических признаков окрасочных слоев семян: «1-й окрасочный слой коричневый» (ОС1), «2-й окрасочный слой равномерный» (ОС2), «3-й окрасочный слой есть» (ОС3), а также фенотипический признак – «передний тип развития апофиза» (ПТРА). Соответствие указанных признаков

всем критериям фенотипических признаков сосны в Алтайском крае подтверждено в ходе специального эксперимента на клоновых плантациях (Видякин, Тараканов, 2009). Кроме частот фенотипических признаков оценивали изменчивость индекса формы шишек (отношение ширина/длина) (ИФШ). Фены ОС1, ОС3 и ПТРА (Видякин, 2004, 2010), а также ИФШ (Видякин, 2014) имеют «популяционный ранг», т. е. эффективно дифференцируют ареальные совокупности сосны на уровне популяций. В специальном эксперименте с применением ДНК-анализа подтверждены статистически значимые различия в генетической структуре популяций, выделенных с помощью указанных «морфофенотипических» маркеров (Видякин, 2014).

Наряду с рассмотренными маркерами использовали данные Центра защиты леса Алтайского края по массе 1000 шт. семян, полученных в урожайные 1994, 2000 и 2004 гг. для отдельных лесничеств. Оценка этого признака осуществлялась в соответствии с ГОСТ 13056.4–67 (Семена..., 1967). Основанием для включения в анализ данного признака послужили литературные данные.

На двухвершинность кривой распределения массы 1000 семян при сравнительном анализе ленточных боров Алтая указывал еще Л. Ф. Правдин (1964). Повышенную массу семян сосны кулундинского генезиса отмечали В. М. Урусов и Ю. Б. Алексеев (1987). Существенный перепад в массе 1000 семян из различных участков ленточных боров Алтая обнаружил А. Н. Стрелковский (2005). Высокая межклоновая (генотипическая) изменчивость массы 1000 семян приобской сосны отмечена в работе В. В. Тараканова и др. (2001). В совокупности эти данные подтверждают правомерность использования этого признака для характеристики популяционной структуры сосны обыкновенной в данной части ее ареала.

Для характеристики генетической изменчивости сосны на территории ленточных боров ранее нами осуществлен анализ хлоропластных микросателлитных маркеров (cpSSR). Однако по результатам этой работы не выявлено географической структуры популяций (Семериков и др., 2014; Зацепина, 2014). Поэтому использован также метод электрофоретического анализа аллозимов, который, несмотря на относительно низкую эффективность дифференциации близкорасположенных популяций, относится к одному из наиболее точных и удобных для изучения гене-

тического разнообразия и внутривидовой дифференциации хвойных (Санников и др., 2012).

Аллозимный анализ осуществляли по 16-поллиморфным локусам: *Mdh-2*, *Mdh-3*, *Mdh-4*, *Got-1*, *Got-2*, *Got-3*, *Skdh-1*, *Skdh-2*, *6-Pgd-2*, *Fdh*, *Pgm-1*, *Gdh*, *Fe-2*, *Adh-1*, *Adh-2*, *Lap-2*. Для выявления изоферментных маркеров проводили фракционирование белков, содержащихся в экстрактах тканей, методом электрофореза в поддерживающей среде (13%-й крахмальный гель) с последующей гистохимической окраской. Материалом для исследования послужили вегетативные почки, собранные с отдельных деревьев. Гомогенизацию почек осуществляли в 1–2 каплях экстрагирующего буфера 0.05 М *трис*-HCl pH 7.7, содержащего поливинилпирролидон (3 %), дитиотрейтол (0.06 %), трилон Б (0.02 %) и β -меркаптоэтанол (0.05 %). Разделение экстрактов проводили методом горизонтального электрофореза в трех буферных системах: I – морфолин-цитратной, pH 7.0 (Clayton, Tretiak, 1972), II – *трис*-цитратной, pH 8.5/гидроокись лития-боратной, pH 8.1 (Ridgway et al., 1970), III – *трис*-ЭДТА-боратной, pH 8.6 (Markert, Faulhaber, 1965). Составы гелевых и электродных буферов не отличались от рекомендуемых. Условия разделения экстрактов во всех буферных системах были одинаковыми: 6 ч при силе тока 40 мА и напряжении 170 В.

Гистохимическое окрашивание ферментов после электрофореза осуществляли по стандартным прописям (Brewer, 1970; Vallejos, 1983; Гончаренко, Падутов, 1988; Manchenko, 1994 и др.) с некоторыми модификациями. Для каждой популяции вычислены следующие показатели изменчивости: процент полиморфных локусов (P), среднее число аллелей на локус (N_a), эффективное число аллелей (N_e), наблюдаемая гетерозиготность (H_o), ожидаемая гетерозиготность (H_e). Степень генетической близости между популяциями определяли с помощью генетического расстояния, предложенного М. Nei (1972). Для вычисления показателей генетической изменчивости использовали программу GenAlex 6 (Peakall, Smouse, 2006).

Изучение популяционной структуры сосны с помощью рассмотренных выше маркеров проводилось в пределах ленточных боров, произрастающих в степной части Обь-Иртышского междуречья. Здесь выделены 2 лесосеменных района (подрайона) сосны обыкновенной: Бурла-Касмалинский (69б) и Прииртышско-Кулундинский (82) (Лесосеменное районирование...

1982). Граница между этими районами совпадает с границей между сибирским и кулундинским подвидами сосны по классификации Л. Ф. Правдина (1964) (рис. 1, табл. 1).

Сбор семян со случайных деревьев в естественных насаждениях требует больших материальных затрат. Поэтому для анализа фенотипа семян использовали коллекции семян плюсовых деревьев и их клонов, хранящиеся в Центре защиты леса Алтайского края. Анализ частот фенотипов окраски семян осуществляли на выборке из 91 плюс-дерева из различных лесничеств. При этом полагали, что, поскольку, во-первых, данные о фенетических особенностях деревьев при отборе не принимались во внимание (Указания..., 2000), во-вторых, генетические корреляции между фенетическими особенностями и селективируемыми признаками (высотой и диаметром ствола) плюс-деревьев отсутствуют (Тараканов, Кальченко, 2015), то различия между выборками плюс-деревьев из различных лесничеств (лесосеменных районов) отражают различия в фенетической структуре соответствующих естественных насаждений.

Для оценки частоты фена ПТРА и анализа изменчивости аллометрического индекса ИФШ в 12 насаждениях сосны осуществлен сбор шишек урожая 2011 г. Согласно методике (Видякин, 2004), сбор шишек осуществляли из расчета по одной типичной шишке на дерево и 100 шишек на точку сбора (ценопопуляцию, которую далее для экономии места будем называть популяцией). Сбор образцов осуществляли в типичных по таксационным показателям насаждениях сосны III–V классов возраста, типов леса «сухой бор пологих всхолмлений», «свежий бор» и «травяной бор» (Парамонов и др., 1997). Названия популяциям даны по названиям ближайших населенных пунктов. Измерения шишек осуществляли в лабораторных условиях. Подробности методик рассмотрены в работе (Тараканов, Кальченко, 2015).

Сбор однолетних побегов с почками для аллозимного анализа осуществляли в тех же популяциях, в которых собирали шишки, а также еще в трех других (см. рис. 1). Но из-за недостаточной четкости электрофореграмм некоторых ферментов пригодными для анализа оказались только 7 насаждений: четыре из лесосеменного района 69б (сибирский подвид по классификации Л. Ф. Правдина) и три из 82-го (кулундинский подвид) (см. табл. 1 и рис. 1). Сбор побегов с почками осуществляли с помощью 6-метрового секатора из расчета 30 деревьев на попу-

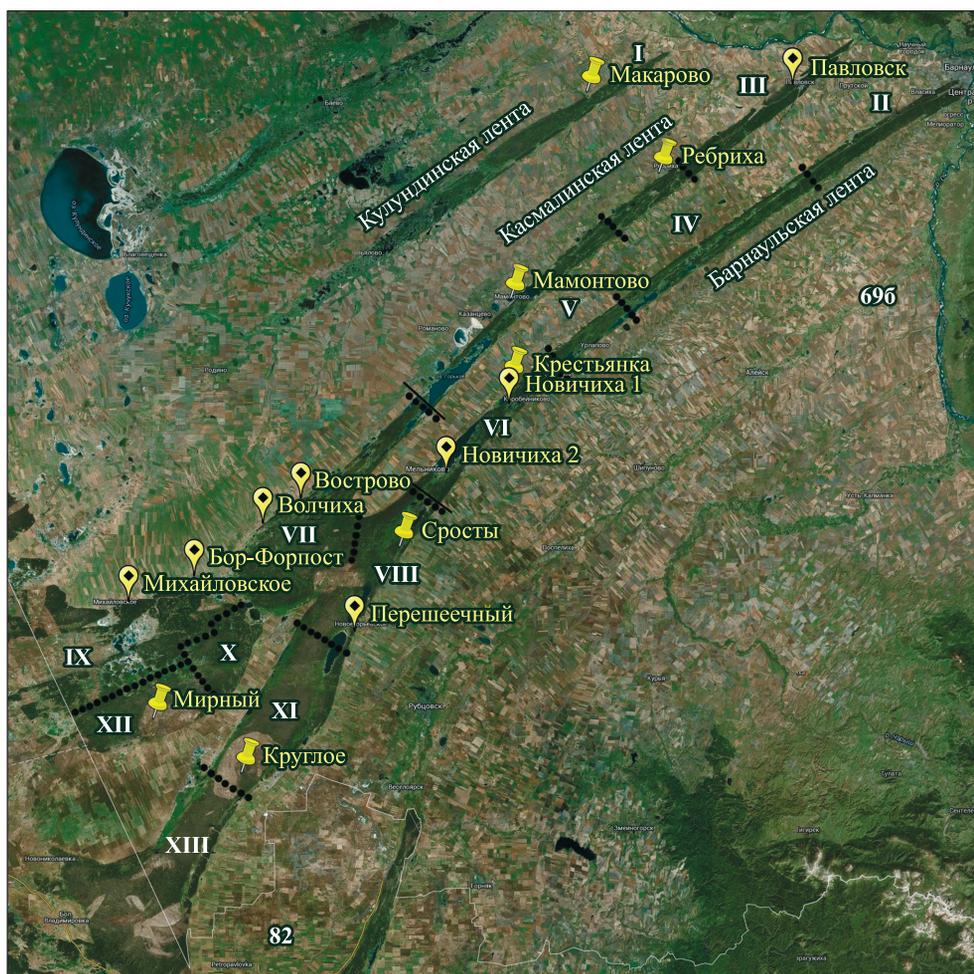


Рис. 1. Схема расположения исследованных популяций на карте Алтайского края. Сплошными линиями показана граница между лесосеменными районами, пунктирными – между лесничествами; арабскими цифрами отмечены номера лесосеменных районов, римскими – номера лесничеств в соответствии с табл. 1; значком «кнопка» выделены точки сбора материала для анализа аллозимной изменчивости.

ляцию. Образцы помещали в автомобильный холодильник и доставляли в лабораторию для последующего анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ частот фенотипов окраски семян возможен на относительно небольшой выборке плюс-деревьев ($n = 91$, см. табл. 1). Сопоставление отдельных выборок с достаточно большим представителем деревьев, допускающим применение метода χ^2 (значение теоретически ожидаемых частот ≥ 4 , Глотов и др., 1982), позволяет сравнить Волчихинское и Ракитовское лесничества, расположенные в пределах лесосеменного района 82, но относящиеся к разным лентам (см. табл. 1). Они не отличаются по фенотипам 2-го и 3-го окрасочных слоев (ОС2 и ОС3), но частота фенотипа ОС1 в первой из популя-

ций оказывается в 2 раза выше, чем во второй – 66 и 33 % соответственно ($\chi^2_{\text{экс}} = 6.12$; $\nu = 1$; $P < 0.025$) (Тараканов, Кальченко, 2015). Различия между лесосеменными районами, вычисленные по объединенным данным, не обнаруживаются ни по одному из фенотипов семян.

Частота редко встречающегося фенотипа «передний тип развития апофиза» шишек (ПТРА) оценена в выборках случайных деревьев из 12 насаждений Барнаульской и Касмалинской лент. Она существенно варьирует по выборкам (рис. 2) и имеет нечетко выраженную, но достоверную тенденцию к постепенному повышению в направлении от р. Обь к границе с Казахстаном от 0–6 до 7–11 % ($r = 0.59$; $\nu = 10$; $P < 0.05$).

Закономерное изменение значений признаков в зависимости от широты обнаружено и для двух других признаков – аллометрического индекса шишек и массы семян (рис. 3). При этом,

Таблица 1. Структура и объем проанализированного материала

Боровая «лента»*	Лесничество (условный номер)	Популяция	Координаты (градусы)		Число деревьев, учтенных при анализе различных маркеров:			Оценка массы 1000 семян***
			с. ш.	в. д.	аллозимов	фенов окраски семян**	фенов и ИФС	
<i>Лесосеменной район 69б</i>								
КУЛ	Кулундинское (I)	Макарово	53.2	82.0	30	4	–	–
БАР	Барнаульское (II)	–	–	–	–	5	–	+
КАС	Павловское (III)	Павловск	53.3	83.0	–	6	100	+
КАС	Ребрихинское (IV)	Ребриха	53.1	82.3	30	3	100	+
КАС	Мамонтовское (V)	Мамонтово	52.7	81.6	30	6	–	+
КАС	Новичихинское (VI)	Крестьянка	52.5	81.6	30	–	100	+
КАС		Новичиха-1	52.4	81.4	–	2	100	
КАС		Новичиха-2	52.2	81.3	–	–	100	
<i>Лесосеменной район 82</i>								
КАС	Волчихинское (VII)	Волчиха	52.1	80.4	–	27	100	+
КАС		Вострово	52.1	80.6	–	–	100	
БАР	Лебяжинское (VIII)	Сросты	51.6	81.1	30	–	–	+
БАР		Перешеечный	51.8	80.8	–	–	100	
КАС	Ст. Михайловское (IX)	Бор-Форпост	51.9	80.1	–	9	100	+
КАС		Михайловка	51.8	79.8	–	–	100	
КАС	Оз. Кузнецовское (X)	Мирный	51.5	79.9	30	5	100	+
БАР	Ракитовское (XI)	Круглое	51.3	80.4	30	18	100	+
КАС	Партизанское (XII)	–	–	–	–	6	–	+
КАС	Тополинское (XIII)	–	–	–	–	–	–	+
Итого		–	–	–	210	91	1200	–

Примечание. * – БАР, КАС, КУЛ – Барнаульская, Касмалинская и Кулундинская ленты соответственно; ** – анализ осуществлялся по плюсовым деревьям (см. текст); *** – по данным массового производственного сбора семян на территории лесничеств за 3 урожаяных года (см. текст); «+» – наличие данных, «–» – их отсутствие.

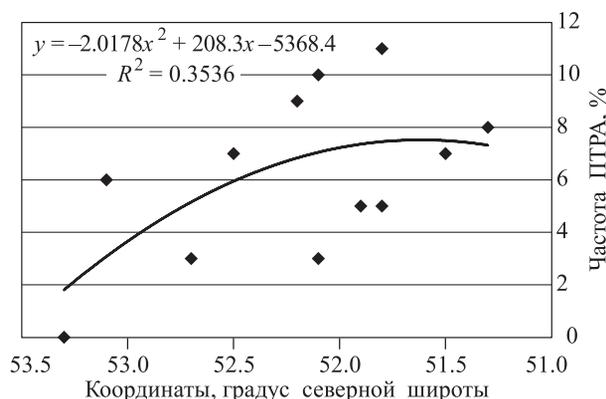


Рис. 2. Зависимость частоты фена ПТРА от расположения популяций.

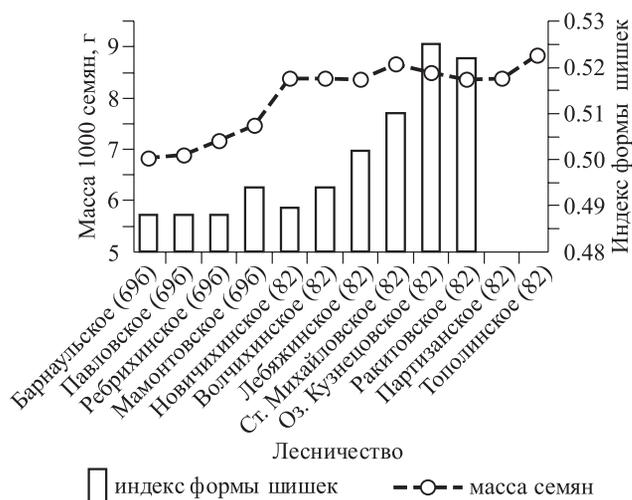


Рис. 3. Значения морфометрических признаков в насаждениях из различных лесничеств (по усредненным данным). По двум последним лесничествам данных по ИФС нет.

Таблица 2. Генетическое разнообразие сосны в Алтайском крае

Лесосеменной район	Популяция	P , %	N_a	N_e	H_o	H_e	F
696	Макарово	60	2.25	1.40	0.216	0.226	0.044
	Ребриха	75	2.35	1.39	0.216	0.232	0.046
	Мамонтово	75	2.20	1.37	0.228	0.215	-0.049
	Крестьянка	75	2.25	1.37	0.227	0.222	-0.015
82	Сросты	75	2.40	1.36	0.221	0.224	0.019
	Мирный	70	2.30	1.34	0.212	0.203	-0.029
	Круглое	75	2.25	1.37	0.218	0.215	-0.018
Среднее		72.14±2.143	2.29±0.107	1.37±0.032	0.220±0.017	0.220±0.016	-0.001±0.014

Примечание. P – полиморфность (доля полиморфных локусов, %); N_a – среднее число аллелей на локус; N_e – среднее эффективное число аллелей на локус; H_o – средняя наблюдаемая гетерозиготность; H_e – средняя ожидаемая гетерозиготность; F – индекс фиксации (коэффициент инбридинга).

несмотря на отличие в методиках отбора проб, прослеживается определенная синхронность в пространственной динамике обоих признаков ($r = 0.59$; $\nu = 8$; $P < 0.05$), в том числе по локализации «области перегиба» кривых приблизительно в районе между Мамонтовским и Новичихинским лесничествами. Анализ пространственных координат показывает, что эта область включает границу между лесосеменными районами (подвидами) сосны (около 52° с. ш.). Вследствие указанной закономерности различия между средними значениями признаков, рассчитанными на лесосеменной район, оказываются существенными: по ИФШ средние и их ошибки составляют 0.493 ± 0.0028 и 0.508 ± 0.0049 для районов 696 и 82 соответственно ($t = 2.72$; $P < 0.025$; $\nu = 10$); по массе 1000 семян – 7.35 ± 0.187 и 8.51 ± 0.137 ($t = 5.37$; $P < 0.001$).

Наряду с отмеченными закономерностями существенные различия между популяциями по рассматриваемым признакам наблюдаются и внутри лесосеменных районов. По индексу формы они сильнее выражены в Прииртышско-Кулундинском (82) районе, в котором среднепопуляционные значения этого признака варьируют от 0.489 ± 0.0036 до 0.525 ± 0.0041 ; по массе 1000 семян – в Бурла-Касмалинском (696) при вариации от 6.83 ± 0.11 до 8.39 ± 0.08 . При этом из общей тенденции пространственного тренда «выбивается» популяция Крестьянка, которая располагается в западном «отростке» барнаульской ленты и отличается от других выборок района 696 более массивными шишками и семенами, а также, как будет показано ниже, относительно высокой гетерозиготностью ($H_o = 0.227$, $H_e = 0.222$).

Анализ основных параметров аллозимной изменчивости выявил, что произрастающая в

ленточных борах Алтайского края сосна обыкновенная характеризуется средним уровнем генетического разнообразия ($P = 72.14$ %; $N_a = 2.29$; $N_e = 1.37$; $H_o = 0.220$; $H_e = 0.220$) (табл. 2). Среди изученных популяций максимальные значения гетерозиготности найдены в популяциях Крестьянка и Мамонтово ($H_o = 0.227$ – 0.228), минимальные – в популяции Мирный ($H_o = 0.212$).

Каких-либо выраженных географических закономерностей в распределении показателей генетической изменчивости по обследованной территории не наблюдается, за исключением N_e (эффективного числа аллелей). Популяции в табл. 2 ранжированы по координатам северной широты, и можно видеть тенденцию уменьшения N_e от 1.39–1.40 в северных насаждениях до 1.34–1.37 – в южных. Коэффициент корреляции между значениями N_e и широтой $r = 0.800$ ($\nu = 5$; $P < 0.05$). Вследствие этого средние значения эффективного числа аллелей в лесосеменном районе 696 выше, чем в районе 82, и составляют 1.383 ± 0.0075 и 1.357 ± 0.0088 соответственно. Но при данных объемах выборок это различие не достигает достоверного уровня ($t = 2.262$; $\nu = 5$; $P = 0.075$).

Генетическое расстояние между популяциями D (Nei, 1972) варьирует от 0.003 до 0.011 (табл. 3), не достигая уровня локальных популяций по классификации С. Н. Санникова и др. (2012). При многомерном шкалировании матрицы генетических расстояний М. Nei (рис. 4) ни по одной из координат не прослеживается четкого расположения популяций в зависимости от их принадлежности к тому или иному лесосеменному району. Наиболее обособленной оказалась популяция Макарово, относящаяся к западной системе «коротких лент», которая достоверно дифференцирована почти от всех других попу-

Таблица 3. Генетические расстояния *D* между популяциями сосны обыкновенной (Nei, 1972)

Популяция	Макарово	Ребриха	Мамонтово	Крестьянка	Сросты	Круглое	Мирный
Макарово	0.000	–	–	–	–	–	–
Ребриха	0.010	0.000	–	–	–	–	–
Мамонтово	0.006	0.004	0.000	–	–	–	–
Крестьянка	0.007	0.007	0.003	0.000	–	–	–
Сросты	0.008	0.011	0.006	0.004	0.000	–	–
Круглое	0.007	0.008	0.003	0.003	0.005	0.000	–
Мирный	0.007	0.007	0.006	0.007	0.006	0.005	0.000

Примечание. Достоверные различия между популяциями по частотам аллелей (по критерию χ^2) выделены жирным шрифтом.

ляций, кроме Мамонтово (см. табл. 3), и характеризуется пониженным уровнем полиморфности (60 % против 70–75 % у других популяций). Кроме этого, дифференцируются популяции Ребриха и Сросты, относящиеся к разным лесосеменным районам и «лентам». Можно предположить (и это нуждается в специальной проверке), что аллозимные маркеры в большей мере дифференцируют пространственно разобщенные «западные» и «восточные» системы ленточных боров, нежели популяции внутри этих боров, гипотетически принадлежащие к разным подвидам (лесосеменным районам).

Об отсутствии дифференциации популяций из разных лесосеменных районов свидетельствует также анализ молекулярной варiances (AMOVA): различия между лесосеменными районами – 0 %, между популяциями – 2 %, внутрипопуляционная изменчивость – 98 %.



Рис. 4. Проекция изученных популяций сосны обыкновенной на плоскости двух координат по данным PCA-анализа матрицы генетических расстояний М. Nei (Nei, 1972).

Повышение эффективности дифференциации популяций возможно посредством выявления и последующего применения «диагностических» локусов, которые вносят наибольший вклад в дифференциацию изученных популяций. В наших экспериментах ими оказались локусы *Mdh-4* (2.9 %), *Lap-2* (2.8 %), *Adh-2* (2.5 %) и *6-Pgd-2* (2.5 %). По каждому из них проведен анализ AMOVA, который показал следующие результаты, %: по локусу *Adh-2* различия между лесосеменными районами – 0, между популяциями – 5, по локусу *6-Pgd-2* различия между лесосеменными районами – 1, между популяциями – 1, локусы *Mdh-4* и *Lap-2* показали одинаковый результат: различия между лесосеменными районами – 0, между популяциями – 2. Таким образом, применение локусов с наибольшим вкладом в дифференциацию популяций не меняет общую картину отсутствия дифференциации между лесосеменными районами и очень слабой изменчивости между популяциями внутри лесосеменных районов.

На заключительном (обобщающем) этапе анализа были посчитаны доли статистически достоверных межпопуляционных различий, выявленные при использовании различных маркеров, на уровне между и внутри лесосеменных районов (табл. 4). Применение фенотипических признаков позволило обнаружить достоверные различия между популяциями почти в 82 % случаев от общего числа сравниваемых пар популяций. Степень дифференциации популяций при использовании аллозимных маркеров почти в 3 раза ниже (около 29 %).

Таким образом, наиболее важные результаты проведенных исследований сводятся к следующему:

1) эффективность дифференциации близкорасположенных популяций сосны по морфофе-

Таблица 4. Доли межпопуляционных различий (%), выявленные при использовании различных маркеров

Сравнение популяций	Всего сравнений	Достоверных отличий	
		шт.	%
<i>Аллозимы</i>			
Из различных районов	12	4	33.3
Внутри: района 696	6	2	33.3
» 82	3	0	0.0
<i>Итого</i>	<i>21</i>	<i>6</i>	<i>28.6</i>
<i>Фены и морфометрические признаки семян и шишек</i>			
Из различных районов	35	30	85.7
Внутри: района 696	10	7	70.0
» 82	21	17	81.0
<i>Итого</i>	<i>66</i>	<i>54</i>	<i>81.8</i>

нотипическим маркерам значительно выше, чем по аллозимным;

2) в изменчивости маркеров ПТРА, ИФС, массы семян, а также по показателю генетической изменчивости «эффективное число аллелей» прослеживается пространственный тренд (клинальная изменчивость);

3) между насаждениями сосны, относимыми к различным подвидам в понимании Л. Ф. Правдина (1964) и лесосеменным районам, обнаруживаются статистически значимые различия в средних значениях ИФС и массы 1000 семян;

4) внутри лесосеменных районов также имеет место дифференциация изученных популяций, выявляемая в 70–80 % сравнений по морфофенотипическим маркерам и в 0–33 % по аллозимным; при этом в последнем случае различия создаются в основном за счет популяции Макарово, относящейся к Кулундинской ленте, территориально удаленной от основного объекта исследований – Барнаульской и Касмалинской лент.

Для того чтобы понять причины столь сложной картины дифференциации, следует учесть, что использованные маркеры, очевидно, отличаются по их селективным особенностям. Принято считать, что гены, ответственные за морфологические признаки, находятся под более сильным давлением отбора, чем аллозимные. Поэтому последние более информативны для анализа дрейфа генов и миграционных процессов. Вероятно, именно этим объясняется весьма низкий уровень межпопуляционной изменчивости (обычно 2–5 %), выявляемый этим методом у видов с большими слабо изолированными популяциями, к которым относится сосна обык-

новенная. Тем не менее анализ изменчивости аллозимных маркеров, особенно если он осуществляется на больших участках ареала, дает ценную информацию о генетической структуре популяций, в том числе в плане выявления предковых популяций и путей миграции при расселении из рефугиумов, зависимости показателей генетической изменчивости от размеров и других особенностей популяций (Санников и др., 2012).

С учетом того, что ленточные боры располагаются на песчаных отложениях древних водотоков, а также принимая во внимание роль гидрохорных механизмов в расселении этого вида (Санников и др., 2012), отсутствие существенных различий по аллозимным маркерам между северо-восточными и юго-западными частями близкорасположенных Барнаульской и Касмалинской лент не удивительно. В то же время существенное отличие популяции Макарово, происходящей из относительно удаленной системы коротких западных лент, изолированной степными пространствами от большинства популяций Барнаульской и Касмалинской лент, может быть обусловлено или отличием в их происхождении, или же дрейфом. Для выбора между этими гипотезами необходимы дальнейшие исследования. Однако в связи с тем, что степень обнаруженной дифференциации не выходит за уровень различий между субпопуляциями по классификации (Санников и др., 2012), а также учитывая сниженный уровень полиморфности популяции Макарово (см. табл. 3), более вероятной причиной в этом случае является дрейф генов, обусловленный относительно небольшим размером Кулундинской ленты.

Отсутствие существенных различий по аллозимным маркерам между ареальными совокупностями сосны внутри Барнаульской и Касмалинской лент свидетельствует в пользу общности их происхождения и достаточно большой численности составляющих их популяций, нивелирующей влияние дрейфа генов. Тем не менее это не исключает возможности их дифференциации по генам, испытывающим давление отбора. В этой связи отметим, что среднегодовое количество осадков в приобских массивах этих лент составляет около 450–480 мм, а в приказахстанских – 280–300 мм. Это сказывается на продуктивности, степени разновозрастности, полноте и других таксационных параметрах древостоев (Парамонов и др., 1997). Неудивительно, что столь сильный перепад в гидротермиче-

ских условиях приводит к эффекту клинальной изменчивости по меньшей мере по трем морфофенотипическим маркерам. Как показали наши эксперименты (Тараканов, Кальченко, 2015), оба количественных показателя – ИФС и масса 1000 семян – в условиях клоновых плантаций лесостепной зоны Западной Сибири отличаются довольно высокими коэффициентами наследуемости в широком смысле слова на уровне $H^2 \approx 47\%$, что подтверждает целесообразность их использования для дифференциации ареальных совокупностей сосны. При этом индекс формы шишек «ширина/длина» в более поздних работах А. И. Видякина (2010, 2014) признан одним из самых простых и информативных для характеристики пространственной популяционной структуры.

Вероятно, в условиях ленточных боров Алтая формируется своеобразная популяционная структура, в которой благодаря фенологическим различиям и преобладающим юго-западным ветрам осуществляется «эстафетная» миграция генов преимущественно в направлении от южных к северным массивам. Но при этом благодаря отбору (действующему на фоне закономерного изменения гидротермических условий и мозаичности эдафических условий, обусловленных холмисто-грядовым рельефом) и частичной фенологической и даже механической изоляции сохраняется определенный уровень дифференциации ареальных совокупностей на популяции и их группы. Последнее особенно наглядно отражается в виде резкого перепада массы семян почти на границе лесосеменных районов, приуроченной к крупному озеру Горькое, прерывающему Барнаульскую ленту, и изолинии 250 мм осадков в летний период (Мальшева, 2010).

Значимые различия между лесосеменными районами по ИФС и массе семян несомненно подтверждают правомерность их выделения (Лесосеменное районирование..., 1982). Однако различия между популяциями внутри районов, выявленные в том числе по фенам генеративных органов, имеющим, согласно исследованиям (Видякин, 2004, 2010, 2014), популяционный ранг (ОС1 и ПТРА), свидетельствуют о целесообразности расчленения этих лесосеменных районов на более однородные ареальные совокупности.

Завершая обсуждение, отметим, что в 2014 г. А. И. Видякиным были обобщены результаты совместного применения морфофенотипических, аллозимных и ДНК-маркеров для целей диффе-

ренциации популяций сосны. На основании этих исследований он заключил, что выделенные им «...морфофенотипические признаки генеративных органов являются высокоинформативными маркерами пространственной дифференциации генетической структуры вида. ...Применение их при изучении популяционно-хорологической дифференциации... *P. sylvestris* представляется весьма перспективным и даже более предпочтительным по сравнению с очень дорогостоящими и трудоемкими методами молекулярно-генетического анализа» (Видякин, 2014, с. 31).

В наших исследованиях также продемонстрирована более высокая эффективность морфофенотипического подхода в сравнении с методом аллозимного анализа для дифференциации ареальных совокупностей сосны. Соглашаясь с автором цитируемой статьи в части высокой эффективности применения морфофенотипических маркеров, мы тем не менее полагаем, что изучение пространственной популяционной структуры сосны и любого другого вида целесообразно осуществлять комплексно и поэтапно, как это предлагалось для оценки генетической гетерогенности популяций в масштабе ареала вида (Глотов, 1983). На начальных этапах исследований рационально применять относительно простой в исполнении морфофенотипический подход, а на заключительных «детализирующих» этапах – дорогостоящий молекулярно-генетический. Использование аллозимных и ДНК-маркеров представляет несомненный интерес для описания генетических особенностей выделенных на первом этапе «типичных» и наиболее интересных с фундаментальной и прикладной точек зрения ареальных совокупностей различного ранга, а также для уточнения их статуса в «спорных» ситуациях (Крутовский, 2006).

При этом нельзя ожидать, что фены и аллометрические индексы генеративных органов, хорошо дифференцирующие популяции сосны таежной зоны из европейской части России, будут столь же хорошо дифференцировать популяции и их группы из остепненных боров юга Сибири. Логично полагать, что для различных участков ареала будут отобраны свои наборы маркеров, наилучшим образом диагностирующие ареальные совокупности различного ранга. Наглядным примером этого является маркер «масса 1000 семян», на диагностическую ценность которого для изучения популяций сосны в ленточных борах Алтая обратил внимание еще Л. Ф. Правдин (1964).

ВЫВОДЫ

1. Комплексное изучение пространственной популяционной структуры сосны обыкновенной на территории ленточных боров Алтайского края выявило более высокую популяционно-дифференцирующую способность морфофенотипических маркеров генеративных органов в сравнении с аллозимными. В связи с этим, а также с учетом различий в стоимости и трудоемкости методов морфофенотипические маркеры целесообразно применять на начальном этапе исследований, в ходе которого осуществляется массовый анализ большого числа популяционных выборок с целью построения карты популяционно-хорологической структуры видов. Дорогостоящие аллозимные и ДНК-маркеры целесообразно использовать на заключительном этапе исследований для описания генетических особенностей выделенных ареальных совокупностей различного ранга, а также для уточнения их статуса в спорных ситуациях.

2. В изменчивости трех морфофенотипических маркеров (ПТРА, ИФШ, массы 1000 семян) а также по показателю генетической изменчивости «эффективное число аллелей» на территории ленточных боров прослеживается пространственный тренд, обусловленный изменением гидротермических условий.

3. Между насаждениями сосны, относимыми к различным лесосеменным районам 69б и 82, обнаруживаются статистически значимые различия в средних значениях индекса популяционного ранга «ИФШ» и массы 1000 семян. При этом изменение высоконаследуемого признака «масса 1000 семян» в месте прохождения границы имеет скачкообразный характер. Это подтверждает правомерность выделения данной границы.

4. Внутри лесосеменных районов также имеет место дифференциация изученных популяций, выявляемая в 70–80 % сравнений по морфофенотипическим маркерам и в 0–33 % – по аллозимным. Это свидетельствует о целесообразности уточнения популяционных границ и приведения существующего районирования в более полное соответствие с картой пространственной популяционной структуры сосны на исследуемой территории.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 11-04-92226-Монг_а и 13-04-00495_а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Видякин А. И. Методические рекомендации по выделению фенотипов лесных древесных растений (на примере сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* L.). Воронеж: НИИЛГиС, 2004. 17 с.
- Видякин А. И. Фенетика, популяционная структура и сохранение генетического фонда сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* L. // Хвойные бореальной зоны. 2007. XXIV. № 2–3. С. 159–166.
- Видякин А. И., Тараканов В. В. Оценка наследуемости и точности идентификации фенотипов окрашки семян у сосны обыкновенной // Аграрн. вестн. Урала. 2009. № 10. С. 98–100.
- Видякин А. И. Методические основы выделения фенотипов лесных древесных растений (на примере сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* L.) // Новые научные методики и информационные технологии. Сыктывкар: Коми научный центр УрО РАН, 2010. Вып. 65. 28 с.
- Видякин А. И. Применение результатов феногеографических исследований в практике лесного хозяйства России // Сиб. лесн. журн. 2014. № 4. С. 29–34.
- Глотов Н. В. Оценка генетической гетерогенности природных популяций: количественные признаки // Экология. 1983. № 1. С. 3–10.
- Глотов Н. В., Животовский Л. А., Хованов Н. В., Хромов-Борисов Н. Н. Биометрия. Л.: ЛГУ, 1982. 264 с.
- Гончаренко Г. Г., Падутов В. Е. Руководство по исследованию древесных видов методом электрофоретического анализа изоферментов. Гомель: БелНИИЛХ, 1988. 66 с.
- Зацепина К. Г. Дифференциация популяций и клонов сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* L. в южной части азиатского ареала: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.01. Красноярск: Ин-т леса им. В. Н. Сукачева СО РАН, 2014. 19 с.
- Кальченко Л. И. Анализ изменчивости клонов плюсовых деревьев и естественных насаждений сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* L. в Алтайском крае с использованием методов фенетики: автореф. дис. ... канд. с.-х наук: 06.03.01. Йошкар-Ола: Поволжск. гос. технол. ун-т, 2013. 18 с.
- Крутовский К. В. От популяционной генетики к популяционной геномике лесных древесных видов: интегрированный популяционно-геномный подход // Генетика. 2006. Т. 42. № 10. С. 1304–1318.
- Лесосеменное районирование основных лесобразующих пород в СССР. М.: Лесн. пром-сть, 1982. 366 с.

- Малышева Н. В. Дендроиндикационные исследования ленточных боров Алтайского края: автореф. дис. ... канд. геогр. наук: 25.00.25. М.: Ин-т географии РАН, 2010. 22 с.
- Милютин Л. И., Новикова Т. Н., Тараканов В. В., Тихонова И. В. Сосна степных и лесостепных боров Сибири. Новосибирск: Акад. изд-во «Гео», 2013. 127 с.
- Парамонов Е. Г., Менжулин И. Д., Ишутин Я. Н. Лесное хозяйство Алтая. Барнаул, 1997. 372 с.
- Правдин Л. Ф. Сосна обыкновенная. М.: Наука, 1964. 190 с.
- Санников С. Н., Санникова Н. С., Петрова И. В. Очерки по теории лесной популяционной биологии. Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2012. 271 с.
- Семена деревьев и кустарников. Методы определения веса 1000 семян. ГОСТ 13056.4-67, 1967. 3 с.
- Семерилов В. Л., Семерилова С. А., Дымяшкова О. С., Зацепина К. Г., Экарт А. К., Тараканов В. В., Тихонова И. В., Видякин А. И., Жамьянсурен С., Роговцев Р. В., Кальченко Л. И. Полиморфизм микросателлитных локусов хлоропластной ДНК сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* L. в Азии и Восточной Европе // Генетика. 2014. Т. 50. № 6. С. 660–669.
- Семерилов Л. Ф. Популяционная структура древесных растений. М.: Наука, 1986. 140 с.
- Стрелковский А. Н. Экологические и морфологические особенности сосны обыкновенной на юге Западной Сибири: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.16, 03.00.05. Новосибирск, 2005. 19 с.
- Тараканов В. В., Демиденко В. П., Ишутин Я. Н., Бушков Н. Т. Селекционное семеноводство сосны обыкновенной в Сибири. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 2001. 230 с.
- Тараканов В. В., Кальченко Л. И. Фенетический анализ клоновых и естественных популяций сосны в Алтайском крае. Новосибирск: Акад. изд-во «Гео», 2015. 107 с.
- Тимофеев-Ресовский Н. В., Яблоков А. В., Глотов Н. В. Очерк учения о популяции. М.: Наука, 1973. 277 с.
- Указания по лесному семеноводству в Российской Федерации. М.: ВНИИЦлесресурс, 2000. 198 с.
- Урусов В. М., Алексеев Ю. Б. Генетическое резервирование лесообразующих пород Сибири и Дальнего Востока как основа селекции. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1987. 30 с.
- Brewer G. J. Introduction to isozyme techniques. N.Y.; L.: Acad. Press, 1970. 186 p.
- Clayton J. W., Tretiak D. N. Amino-citrate buffers for pH control in starch gel electrophoresis // J. Fish. Res. Board Can. 1972. V. 29. P. 1169–1172.
- Manchenko G. P. Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels. CRC Press, Ins., 1994. 574 p.
- Markert C. L., Faulhaber I. Lactate dehydrogenase isozyme patterns in fish // J. Exp. Zool. 1965. V. 159. N. 2. P. 319–332.
- Nei M. Genetic distance between populations // Amer. Naturalist. 1972. V. 106. P. 283–292.
- Peakall R., Smouse P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // Mol. Ecol. Notes. 2006. N. 6. P. 288–295.
- Ridgway G. J., Sherburne S. W., Lewis R. D. Polymorphism in the esterases of Atlantic herring // Trans. Am. Fish. Soc. 1970. V. 99. P. 147–151.
- Vallejos C. E. Enzyme activity staining // Isozymes in plant genetics and breeding / S. D. Tanksley, T. J. Orton (Eds.). Amsterdam: Elsevier Sci. Publ., 1983. P. 469–516.

DIFFERENTIATION OF SCOTS PINE POPULATIONS IN THE BELT PINE FORESTS OF ALTAI KRAI DISCOVERED WITH MARKERS OF VARIOUS NATURE

K. G. Zatsepina¹, V. V. Tarakanov^{1,2}, L. I. Kalchenko³, A. K. Ekart⁴, A. Ya. Larionova⁴

¹ West-Siberian Branch of V. N. Sukachev Institute of Forest, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch
Novosibirsk, Post Box 45, 630082 Russian Federation

² Novosibirsk State Agricultural University
Dobrolyubov str., 160, Novosibirsk, 630039 Russian Federation

³ Branch of the Russian Centre for Forest Protection Center for Forest Protection of Altai Krai
Proletarskaya str., 61, Barnaul, 656056 Russian Federation

⁴ V. N. Sukachev Institute of Forest, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch
Akademgorodok, 50/28, Krasnoyarsk, 660036 Russian Federation

E-mail: kseniya-zacepina@yandex.ru, tarh012@mail.ru, altay-lss@yandex.ru, ekart@pochta.ru, alya-larion@yandex.ru

In the territory of steppe zone of Ob'-Irtys' interfluvium it was studied the differentiation of scots pine populations of belt forests with use of allozyme's, phene's and morphometric markers. Here allocated 2 forest-seed zoning and border between them practically coincides with border between Siberian and Kulunda pine subspecies on L. F. Pravdin's classification. Allozyme's analysis didn't reveal significant differentiation of stands, except for rare differences between some of them and a slight trend for decrease in effective number of alleles in the more southern populations. The analysis of a molecular variance (AMOVA) also shows absence of differentiation of populations from different forest-seed zoning. Differentiation of populations by using phenes (coloring of seeds, type of cone's apophysis) and high-inherited morphometric characters (index form of cones and weight of 1000 seeds) was more effective at comparing populations on both levels – between and within forest-seed zoning. It allowed revealing of reliable distinctions between populations in almost 82 % of cases of total number of the compared couples of populations, thus extent of differentiation using the allozyme's markers is almost three times lower. The assessment of population structure of pine in tape forest of Altai region, which is carried out with application of a complex of markers, indicates between-populations heterogeneity in this part of area. The received results confirm the expediency of complex researches of population structure of forest-forming species and the necessity of more precise definition of forest-seed zoning of a scots pine in the studied territory.

Keywords: Scots pine, differentiation of populations, allozyme's and phene's markers, Ob'-Irtys' interfluvium, Altai Krai.

How to cite: Zatsepina K. G., Tarakanov V. V., Kalchenko L. I., Ekart A. K., Larionova A. Ya. Differentiation of Scots pine populations in the belt pine forests of Altai Krai discovered with markers of various nature // *Sibirskij Lesnoj Zhurnal* (Siberian Journal of Forest Science). 2016. N. 5: 21–32 (in Russian with English abstract).