

© К.В. Захарова, К.С. Сейц

ФГБУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург

Для выявления степени влияния экологических факторов на дифференциацию популяций *Picea abies* было исследовано 20 ценопопуляций из четырех географических точек. В работе показано, что экологические условия влияют на генотипический состав популяций сильнее, чем географическое расстояние. Структура внутривидовой генетической изменчивости *Picea abies* определяется в большей степени эффектом «экологической изоляции», чем эффектом «изоляции расстоянием».

✿ **Ключевые слова:** популяционная дифференциация; микросателлитный анализ; *Picea abies*; ельники; экологическая изоляция.

## РОЛЬ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В ФОРМИРОВАНИИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ПОПУЛЯЦИЙ *P. ABIES* (L.) KARST

### ВВЕДЕНИЕ

Ель европейская (*Picea abies* (L.) Karst.) занимает обширные пространства в континентальной Европе. Этот вид имеет большое средообразующее и хозяйственно-экономическое значение. Ель является одной из главных лесообразующих пород природных комплексов лесной зоны умеренного пояса Северного полушария планеты [1]. Популяции хвойных, как и многих других древесных растений с непрерывным ареалом распространения, характеризуются высоким уровнем внутривидовой генетической изменчивости по сравнению с уровнем межвидовых различий [2]. Это связано с большим эффективным размером популяций и высоким генным обменом, обусловленным перекрестным опылением, эффективными механизмами распространения пыльцы и семян и продолжительным жизненным циклом [3, 4]. Как правило, более 90 % всей генетической изменчивости древесных растений приходится на долю внутривидовой изменчивости. При этом считается, что основная часть межвидовых различий возникает вследствие автогенетических процессов, приводящих к эффекту так называемой изоляции расстоянием [5]. Роль других факторов, которые потенциально способны обеспечить дифференциацию популяций, остается недооцененной [6]. Одним из таких важнейших факторов являются различия в экологических условиях местообитания локальных популяций одного и того же вида. Последнее время для разных видов растений появляется все больше указаний на определяющую роль экологической гетерогенности среды обитания в структуре их генетической дифференциации по сравнению с классическим эффектом «изоляции расстоянием» [6–8].

Целью данной работы является определение влияния экологических факторов на дифференциацию популяций *P. abies* в сравнении с влиянием географического положения. В задачи работы входило: 1) определить генетическое разнообразие природных популяций ели с помощью SSR-маркеров; 2) установить влияние географического расстояния на генетическую дифференциацию *P. abies*; 3) установить влияние экологических условий произрастания на генетическую дифференциацию *P. abies*.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом для исследования послужили 20 ценопопуляций *P. abies* из четырех удаленных друг от друга географических районов (табл. 1): 1 — район Ослофьерда (Норвегия); 2 — заповедник «Брянский лес» (Брянская область); 3 — среднее течение реки Луга (западная часть Ленинградской области); 4 — резерват «Вепский лес» (восточная часть Ленинградской области). В дальнейшем данные локальные популяции будут обозначаться соответственно «Норвегия», «Брянск», «Луга» и «Вепский лес».

В пределах локальной популяции каждого из четырех географических районов было выделено и описано по несколько ценопопуляций *P. abies*, произрастающих в различных экологических условиях. Основным экологическим фактором, по которому проводилось разделение ценопопуляций на группы, был выбран фактор почвенно-гидрологического режима местообитания, поскольку именно он определяет режимы действия других экологических

Поступила в редакцию 06.02.2017  
Принята к публикации 26.05.2017

Таблица 1

Географические координаты исследованных локальных популяций *P. abies* и кратчайшие попарные расстояния между ними

Geographical coordinates of the *P. abies* local populations and the shortest pairwise distances between them

Популяция	Широта (с. ш.)	Долгота (в. д.)	Расстояние, км		
			«Брянск»	«Норвегия»	«Луга»
«Брянск»	52°25'46''	33°48'30''	–	–	–
«Норвегия»	59°19'28''	10°35'46''	1627	–	–
«Луга»	58°56'37''	29°47'52''	767	1093	–
«Вепский лес»	60°15'35''	34°48'53''	873	1352	318

факторов на рост и развитие деревьев *P. abies*. Так, в условиях хорошей дренированности местообитания (вследствие как высокой водопроницаемости почв, так и перераспределения рельефом поверхностного водного стока) формируются ельники кисличные и чернично-зеленомошные, отличающиеся относительно высоким богатством почв и флористического состава, а также высокой плотностью и сомкнутостью древостоя. В таких фитоценозах нет застоя влаги в верхних почвенных горизонтах, быстро происходит гумификация опада и общий круговорот вещества, а особи *P. abies* характеризуются относительно высокими величинами прироста как в высоту, так и по диаметру ствола [9, 10]. На другом конце экологического ряда типов елового леса по условиям увлажнения располагаются ельники сфагновые, характеризующиеся избыточным увлажнением. Это выражается в доминировании в напочвенном растительном покрове сфагновых мхов, в формировании торфяных обводненных бедных почв и в создании максимально неблагоприятных для роста и развития *P. abies* условий [11]. Сомкнутость и высота древесного яруса в ельниках сфагновых наименьшая из всех типов елового леса, а особи характеризуются наиболее низким приростом по высоте и диаметру ствола.

Совокупность деревьев одного вида на участке леса с однородным характером ведущих экологических факторов, формирующих условия конкретного местообитания, определяется как ценопопуляция. В каждой локальной популяции (географической точке) выбиралось несколько пар (2–7) контрастных по условиям экотопа ценопопуляций, непосредственно граничащих между собой. В пределах каждой такой пары расстояние между деревьями экологически контрастных ценопопуляций было всегда меньше 600 метров, т. е. ценопопуляции свободно могут обмениваться как пыльцой, так и семенами. В каждом географическом районе расстояние между смежными парами экологически контрастных ценопопуляций никогда не превышало 3 км. В каждой ценопопуляции для анализа отбирали образцы хвои с 20–30 взрослых деревьев. Всего было исследовано 284 дерева.

Исследование генотипической изменчивости внутри различных ценопопуляций осуществляли с использованием анализа полиморфизма ядерных SSR-маркеров (single sequence repeats), рекомендованных для *P. abies* в качестве высокополиморфных и стабильно амплифицирующихся кодоминантных молекулярных маркеров: SpAC1F7, EAC2C08, EATC1B02, EATC2B02, EATC1E03, EATC2G05, WS0092.A19, WS0073.H08, WS0022.B15, WS00716.F13, WS0016.O09, Pa\_28 (12–16). Экстракцию ДНК из засушенной хвои проводили с помощью набора DNeasy 96 Plant Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Для амплификации выбранных локусов использовали набор Type-it Microsatellite PCR Kit (Qiagen) и пары праймеров, последовательность которых была опубликована ранее [12–16]. Для предотвращения образования неспецифических продуктов и праймер-димеров применяли ПЦП-программу Touchdown. ПЦП проводили согласно следующему протоколу: 1 цикл 95 °C 10 мин; 7 циклов touch down [95 °C 30 с, (Ta + 7 °C) 30 с, Δ↓1,0 °C, 72 °C 30 с]; 28 циклов амплификации (95 °C 45 с, Ta 45 с, 72 °C 45 с); 1 цикл: 72 °C 10 мин [15]. Продукты реакции ПЦП метили флуоресцентными красителями: FAM, HEX, TAMRA. Анализ полученных фрагментов проводили с помощью капиллярного электрофореза на системе MegaBACE1000 (GE Healthcare), используя маркер молекулярного веса size standard MegaBACE ET400 (GE Healthcare). Анализ высоты пиков и длин фрагментов осуществляли с помощью программного обеспечения MegaBACE FRAGMENT PROFILER software version 1.2 (GE Healthcare) и проверяли вручную.

Расчеты показателей внутри- и межпопуляционной изменчивости, генетических расстояний и построение на их основании схем межпопуляционной дифференциации по SSR-локусам проводились в программном пакете GenAlEx 6.5.03 [17]. Для выяснения генетической структуры популяций использовали программу Structure 2.3.4 [18], которая основана на кластеризации по методу Байеса с применением анализа марковских цепей (*Markov Chain Monte Carlo* (MCMC)). Анализ позволяет разбить весь массив данных на группы (кластеры K) на основании частот аллелей таким

образом, что в пределах каждой группы отклонение от равновесия Харди – Вайнберга оказывается минимальным. Анализ проводится много раз (количество пермутаций 1 000 000) и определяется вероятность принадлежности каждого индивида к определенному кластеру (*Q*-матрица). Достоверность полученных в Structure кластеров проверяли по результатам анализа пермутаций в программе CLUMPP 1.1.2 [19]. Для визуализации кластеров использовали программу DISTRUCT [20].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Общая характеристика SSR-маркеров

С помощью анализа частот встречаемости аллелей 12 локусов (табл. 2) была проведена оценка генетического разнообразия всей совокупности исследованных деревьев *P. abies*. Все локусы были полиморфными. Среднее число аллелей на локус по всем популяциям составило 16 и варьировало в диапазоне от 8 (WS0073.H08 и WS0016.O09) до 29 аллелей (WS00716.F13)

(см. табл. 2). Всего было обнаружено 195 разных аллелей. Коэффициент инбридинга *Fst* варьирует от 0,008 до 0,133 для разных локусов и указывает на незначительную межпопуляционную дифференциацию. Для 10 из 12 локусов наблюдается недостаток гетерозигот. Большая часть генетической изменчивости приходится на внутривидовые различия и только 2 % — на межпопуляционные (табл. 3). Небольшие межпопуляционные различия и высокая внутривидовая изменчивость для *P. abies* отмечается разными авторами [21, 22].

### Анализ генетических различий между четырьмя локальными географическими популяциями

Данный анализ проводился на основе объединения всех исследуемых деревьев каждого географического района в одну общую группу, т. е. без учета различий в экологических условиях местообитания отдельных ценопопуляций. Таким образом, вся генетическая изменчивость каждой из четырех локальных географических популяций рассматривалась как единое целое. Результаты

Таблица 2

Список локусов, использованных в исследовании, и их характеристика  
Characteristics of the microsatellite loci in *P. abies* used in this study

Локус	Размер аллелей, п. н.	Число обнаруженных аллелей	<i>Fis</i>	<i>Fit</i>	<i>Fst</i>
SpAC1F7	99–127	17	0,560	0,619	0,133
EAC2C08	121–199	27	0,090	0,105	0,016
EATC1B02	194–224	11	0,373	0,378	0,008
EATC2B02	180–243	23	0,249	0,265	0,022
EATC1E 03	118–146	11	0,292	0,301	0,013
EATC2G05	190–250	17	0,025	0,038	0,014
WS0022.B15	182–215	18	0,046	0,061	0,016
WS0092.A19	186–236	17	0,081	0,101	0,022
WS0073.H08	197–216	8	–0,087	–0,057	0,028
WS00716.F13	209–259	29	0,134	0,152	0,020
WS0016.O09	393–407	8	0,093	0,127	0,037
Pa 28	153–172	9	–0,084	–0,061	0,021
Среднее		16	0,148 ± 0,055	0,169 ± 0,056	0,029 ± 0,010

Таблица 3

Анализ молекулярной изменчивости (AMOVA) на основе 12 SSR-локусов  
Analysis of molecular variance (AMOVA) at 12 nSSR loci

Коэффициенты инбридинга	Значение	Доля генетических различий (%)
<i>Fst</i>	0,016 ± 0,001	2
<i>Fis</i>	0,151 ± 0,001	15
<i>Fit</i>	0,164 ± 0,001	84

Таблица 4

Аллельное разнообразие *P. abies* в четырех локальных географических популяциях  
Allelic Patterns for 4 local populations *P. abies*

Популяция	Среднее число аллелей по 12 локусам	Среднее число аллелей с частотой встречаемости более 5 %	Среднее число уникальных аллелей	Эффективное число аллелей
«Брянск»	9,00 ± 1,36	5,00 ± 0,52	0,25 ± 0,18	4,92 ± 0,86
«Норвегия»	9,92 ± 1,42	5,33 ± 0,62	0,50 ± 0,23	6,16 ± 1,19
«Луга»	13,00 ± 1,67	5,58 ± 0,66	0,67 ± 0,36	6,43 ± 1,27
«Вепсский лес»	14,67 ± 1,70	6,08 ± 0,70	1,75 ± 0,37	6,65 ± 1,44

Таблица 5

Характеристики экологических условий и показатели генетического разнообразия локальных географических популяций (*H<sub>o</sub>* — наблюдаемая гетерозиготность, *H<sub>e</sub>* — ожидаемая гетерозиготность, *F* — индекс фиксации)  
The environmental conditions and the measure of the genetic differentiation among 4 local populations  
(*H<sub>o</sub>* – Observed Heterozygosity, *H<sub>e</sub>* – Expected Heterozygosity, *F* – Fixation Index)

Популяция	Число особей/ценопопуляций	Природноклиматические условия (зональные типы растительности)	Экологические условия произрастания	<i>H<sub>o</sub></i>	<i>H<sub>e</sub></i>	<i>F</i>
«Брянск»	25/2	Зона смешанных хвойно-широколиственных лесов	Ельники богатые, кислично-чернично-зеленомошные	0,628 ± 0,053	0,710 ± 0,049	0,113 ± 0,059
«Норвегия»	31/2	Средняя тайга	Ельники зеленомошные, средние по трофности и видовому богатству	0,731 ± 0,082	0,743 ± 0,057	0,125 ± 0,059
«Луга»	78/7	Южная тайга	Ельники, как сфагновые, так и кислично-зеленомошные	0,757 ± 0,047	0,762 ± 0,047	0,189 ± 0,056
«Вепсский лес»	150/9	Средняя тайга	Ельники, как сфагновые, так и кислично-зеленомошные	0,750 ± 0,046	0,753 ± 0,046	0,157 ± 0,066

оценки аллельного разнообразия в 4 локальных популяциях *P. abies* представлены в таблице 4.

Локальная популяция «Вепсский лес» отличается наибольшим числом выявленных аллелей, в том числе и уникальных, что связано с заповедным режимом и отсутствием мероприятий лесопользования на данной территории в прошлом. Резерват «Вепсский лес» был выделен именно как эталон девственных высоковозрастных (до 400 лет) ельников [23].

Уровень генетического разнообразия анализировался по показателю ожидаемой гетерозиготности, который является вероятностной оценкой дифференцированности аллелей в популяции. Среднее значение ожидаемой гетерозиготности оказалось высоким ( $H_e = 0,746 \pm 0,025$ ), что указывает на высокий уровень полиморфизма анализируемых маркеров. Все популяции характеризуются некоторым дефицитом гетерозиготности ( $H_o < H_e$ ), что показано ранее [21, 22] (табл. 5). Дефицит гетерозиготности в локальной популяции может возникать вследствие наличия как нуль-аллелей исследуемых локусов, так и ин-

бридинга или эффекта Валунда. Инбридинг может быть причиной недостатка гетерозиготности, однако содержание понятия «инбридинг» в отношении такого строго перекрестноопыляемого вида, как ель европейская, следует понимать в том смысле, что «инбридинг» означает результат скрещивания рядом расположенных особей в пределах обособленных на местности групп деревьев, возникающего вследствие действия каких-то изолирующих группы деревьев факторов. Эта изоляция групп особей в пределах одной локальной популяции может приводить и к возникновению неоднородности популяции относительно частот встречаемости аллелей, т. е. к проявлению эффекта Валунда. Все популяции характеризуются широким разнообразием экологических условий и низкой межпопуляционной дифференциацией (табл. 3 и 5).

Попарные межпопуляционные сравнения проводились с помощью AMOVA. Анализ *F<sub>st</sub>* не выявил значительную генетическую обособленность популяций «Луга» и «Вепсский лес»,  $F_{st} = 0,006$  ( $p = 0,001$ ). Наибольшие различия наблюдаются между наиболее удаленны-

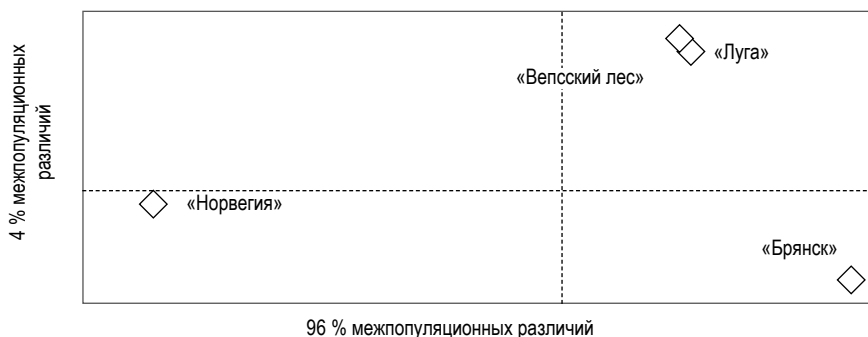


Рис. 1. Схема межпопуляционных генетических различий четырех локальных популяций *P. abies* без учета экотопических условий ценопопуляций на основе многомерного анализа главных координат

Fig. 1. The PCoA scheme of the interpopulational genetic distances of four local *P. abies* populations. The local environment conditions of each spruce cenopopulations are not taking into account

Таблица 6

**Характеристики экологических условий и показатели генетического разнообразия ценопопуляций ( $H_o$  — наблюдаемая гетерозиготность,  $H_e$  — ожидаемая гетерозиготность,  $F$  — индекс фиксации)**  
**The environmental conditions and the measure of the genetic differentiation among cenopopulations ( $H_o$  – Observed Heterozygosity,  $H_e$  – Expected Heterozygosity,  $F$  – Fixation Index)**

Популяция	Тип леса	Число особей/число ценопопуляций	Экологические условия произрастания (трофность/гидрологический режим)	$H_o$	$H_e$	$F$
«Брянск»	Кислично-зелено-мошные ельники	25/2	Богатые/хорошо дренированные	$0,628 \pm 0,053$	$0,710 \pm 0,049$	$0,113 \pm 0,059$
«Норвегия»	Зеленомошные ельники	31/2	Средние по богатству/гидрологическому режиму	$0,731 \pm 0,082$	$0,743 \pm 0,057$	$0,125 \pm 0,059$
«Луга_Ельники сфагновые»	Сфагновые ельники	22/2	Бедные/заболоченные	$0,555 \pm 0,077$	$0,715 \pm 0,053$	$0,249 \pm 0,070$
«Луга_Ельники кислично-зелено-мошные»	Кислично-зелено-мошные ельники	56/5	Богатые/хорошо дренированные	$0,648 \pm 0,069$	$0,739 \pm 0,048$	$0,141 \pm 0,069$
«Вепсский лес_Ельники кислично-зелено-мошные»	Кислично-зелено-мошные ельники	82/6	Богатые/хорошо дренированные	$0,662 \pm 0,072$	$0,742 \pm 0,046$	$0,128 \pm 0,068$
«Вепсский лес_Ельники сфагновые»	Сфагновые ельники	68/3	Бедные/заболоченные	$0,618 \pm 0,067$	$0,721 \pm 0,050$	$0,163 \pm 0,057$

ми популяциями «Брянск» и «Норвегия»,  $F_{st} = 0,043$  ( $p = 0,001$ ).

Результаты анализа главных координат (PCoA), основанного на генетических расстояниях  $D_{Ne}$  [24], представлены в виде схемы на рис. 1. Этот показатель вычисляется как отрицательный логарифм величины генетического сходства популяций по частотам аллелей (I) и был выбран как наиболее подходящий к структуре данных.

Первые две дискриминантные функции совместно несут почти 100 % различий, причем большей информативностью обладает первая ось (OX). Анализ выявил практически полное отсутствие генетических различий между локальными популяциями ели на территории Ленинградской области. Генетические различия между локальными популяциями проявляются, таким образом,

только на географических расстояниях, превышающих 700–800 км (см. рис. 1).

Анализ связи генетических различий между популяциями и географическим расстоянием с помощью теста Мантелля [25] показал наличие эффекта изоляции расстоянием. Это означает, что влияние физической удаленности на генетическую дифференциацию популяций ели европейской имеет существенное значение в популяционной структуре данного вида (коэффициент корреляции  $R = 0,919$ ;  $p = 0,040$ ).

*Анализ генетических различий между локальными географическими популяциями с учетом экологических условий местообитания*

Популяции «Луга» и «Вепсский лес» были разделены на ценопопуляции по типам леса с контрастными экотопи-

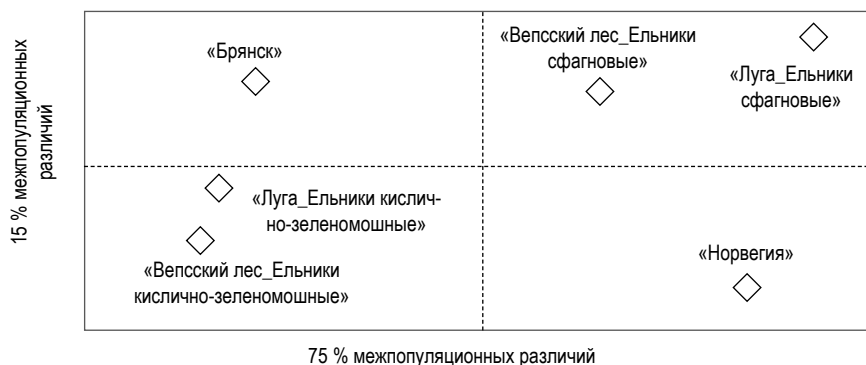


Рис. 2. Схема межпопуляционных различий шести ценопопуляций *P. abies*, выделенных с учетом экотопа, на основе многомерного анализа главных координат

Fig. 2. The PCoA scheme of the interpopulational genetic distances of four local *P. abies* populations

ческими условиями (табл. 6) и анализировались отдельно: «Луга\_Ельники кислично-зеленомошные» и «Луга\_Ельники сфагновые», «Вепский лес\_Ельники кислично-зеленомошные» и «Вепский лес\_Ельники сфагновые».

При учете экотопических различий между ценопопуляциями в пределах одной географической точки результат классификации тех же популяций по степени генетических различий резко изменяется (рис. 2). Результаты анализа главных координат (PCoA), основанного на генетических расстояниях *D* Нея [24], представлены в виде схемы на рис. 2. Первые две дискриминантные функции совместно несут 90 % различий, причем 75 % межпопуляционной изменчивости приходится на экотопические различия (*OX*), а 15 % — на географические различия (*OY*). На рисунке видно, что генетические расстояния между сфагновыми ценопопуляциями ели резервата «Вепский лес» и среднего течения реки Луга, удаленными на 300 км друг от друга, в 2 раза меньше, чем между ценопопуляциями только, например, резервата «Вепский лес», которые отличаются контрастными экотопическими условиями и удалены друг от друга на расстояние не более 3 км. Несоответствие генетических различий и географического расстояния для экологически контрастных ценопопуляций еще более выражительно для ельников кислично-зеленомошного типа. Здесь генетические различия между географически удаленными на 300 км кислично-зеленомошными ельниками резервата «Вепский лес» и среднего течения реки Луга в 9 раз меньше, чем между сфагновыми и кислично-зеленомошными ельниками среднего течения реки Луга, физическое расстояние между которыми не превышает 3 км. То есть генетическое сходство между ценопопуляциями ели европейской на территории Ленинградской области в 2 раза (для сфагновых ельников) и 9 раз (для кислично-зеленомошных ельников) сильнее определяется сходством экологических условий местообитания нежели географическим расстоянием между ними. При этом масштаб соотношения генетических сходств-раз-

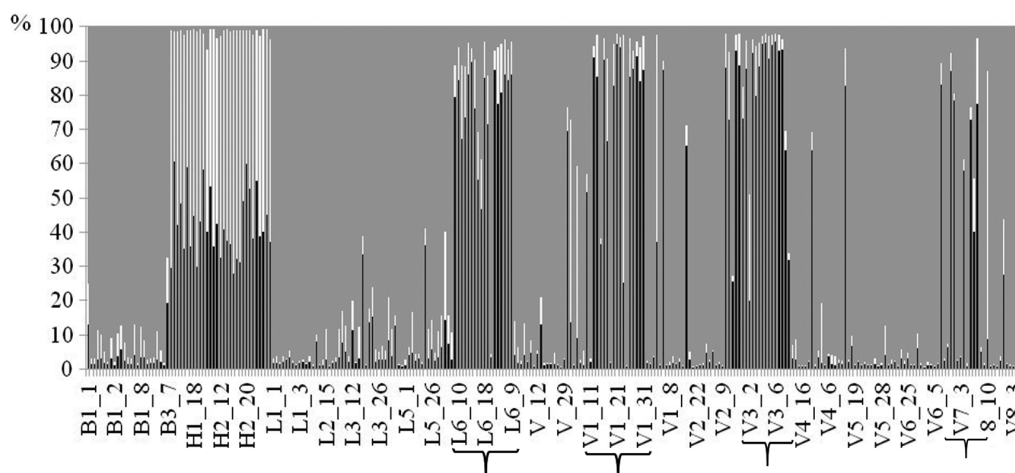
личий, определяемых экологическими условиями, сопоставим с размахом генетического варьирования ели европейской в крайних частях ее ареала (северо-западная — локальная популяция «Норвегия» и юго-западная — локальная популяция «Брянск», см. рис. 2).

#### Иерархический анализ популяционных структур

Иерархический анализ популяционной структуры был проведен с помощью программы STRUCTURE (Structure 2.3.4). Эта программа классифицирует все данные, полученные на основании анализа микросателлитных локусов, на группы (кластеры), в каждой из которых выполняется закон Харди — Вайнберга. Наиболее вероятное число кластеров (*K*) как обособленных генетических групп в изучаемой выборке, определяемое в программе Structure Harvester согласно алгоритму Evanno et al. [26], равнялось трем (*Delta K*). Это означает, что существуют три самостоятельные группы генотипов. К одной группе принадлежат все сфагновые ельники, к другой — все кислично-зеленомошные и к третьей — ельники Норвегии (рис. 3). Таким образом, генетическая структура ценопопуляций *P. abies* из заболоченных местообитаний, из Норвегии и из хорошо дренированных территорий существенно различается.

#### ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ генетической дифференциации локальных популяций *P. abies* без учета различий в экологических условиях местообитания отдельных ценопопуляций в пределах одного географического района показал, что основная доля генетических различий определяется географической удаленностью локальных популяций друг от друга. На долю «географического» фактора приходится 96 % всех генетических различий между локальными популяциями (см. ось *X* на рис. 1), и коэффициент корреляции между матрицами попарных генетического и географического расстояний равен 0,919 ( $p = 0,040$ ). Таким



**Рис. 3.** Структура генетического разнообразия популяций *P. abies*, выявленная с помощью программы STRUCTURE на основе анализа 12 SSR-локусов. B1, B3 — ценопопуляции «Брянск» (Кислично-зеленомошные ельники); H1, H2 — ценопопуляции «Норвегия»; L4/6 — ценопопуляции «Луга\_Ельники сфагновые»; L1/2/3/5/7 — ценопопуляции «Луга\_Ельники кислично-зеленомошные»; V/2/4/5/6/8 — ценопопуляции «Вепский лес\_Ельники кислично-зеленомошные»; V1/3/7 — «Вепский лес\_Ельники сфагновые». Каждый столбик диаграммы показывает на индивидуальную для каждого из 284 деревьев принадлежность к трем кластерам с разной долей вероятности. Кластеры выделены белым, черным и серым цветом. Например, первое дерево, B1\_1 (из популяции «Брянск»), с вероятностью 13 % может быть отнесено к «черному» кластеру, с вероятностью 11 % — к «белому» кластеру и с вероятностью 76 % — к «серому». Скобки объединяют особи, происходившие из бедных заболоченных популяций

**Fig. 3.** Genetic clustering analysis conducted in STRUCTURE. Bar plots of clustering results based on 12 nSSR ( $K = 3$ ). B1, B3 — “Bryansk” cenopopulations (Woodsorrel-green moss spruce forests); H1, H2 — “Norway” cenopopulations; L4/6 — cenopopulations from “Luga\_Sphagnum-spruce forests”; L1/2/3/5/7 — cenopopulations from “Luga\_ Woodsorrel — green moss spruce forests”; V/2/4/5/6/8 — cenopopulations from “Vepsskiy les\_ Woodsorrel — green moss spruce forests”; V1/3/7 — cenopopulations from “Vepsskiy les\_ Sphagnum-spruce forests”. Each bar shows that each tree belongs to one of the 3 clusters with different probability. The white, black and grey colors represent the clusters. For example the first tree, B1\_1 (from “Bryansk”), belongs to the “black” cluster with probability 13%, to the “white” cluster with probability 11% and to the “grey” cluster with probability 76%. The brackets unite the individuals from poor swampy forest populations

образом, сгруппированные (только по географической принадлежности) и проанализированные данные представляют собой классический образец проявления эффекта «изоляции расстоянием» (Isolation by Distance — IBD), когда с ростом географической удаленности локальных популяций друг от друга растет и степень их генетических различий по нейтральным маркерам за счет автогенетических процессов: локальные популяции Северо-Западного региона РФ, находящиеся друг от друга на расстоянии около 300 км, обладают большим сходством, чем удаленные более чем на 1500 км брянская и норвежская популяции.

Однако введение в анализ экологических различий в условиях местообитания отдельных ценопопуляций в пределах одного географического района (путем разделения деревьев по принадлежности к типам леса с разным режимом увлажнения) резко меняет результат классификации тех же популяций по степени генетических различий (см. рис. 2). Для тех же самых данных,

для которых ранее была установлена 96 % зависимость генетических различий от географического расстояния, оказывается, что наибольшим генетическим сходством обладают ценопопуляции из одинаковых типов леса (т. е. произрастающих в одинаковых экологических условиях), а наибольшими генетическими различиями — ценопопуляции из разных типов леса. При этом физическое расстояние между генетически наиболее сходными ценопопуляциями одного типа леса составляет более 300 км, а между генетически наиболее удаленными ценопопуляциями разных типов леса — не более 600 метров. Таким образом, влияние экологических условий на генетическую дифференциацию популяций *P. abies* оказывается намного сильнее, чем влияние изоляции расстоянием. Результаты РСoA показывают, что экологические условия произрастания на 75 % определяют генетическую дифференциацию популяций, тогда как на географический фактор приходится не более 15 % генетических различий (см. рис. 2). При этом важно, что

масштаб влияния экологических условий на генетическую дифференциацию популяций превосходит масштаб эффекта изоляции расстоянием, поскольку на схеме анализа Главных Координат (см. рис. 2) расстояние между точками «Луга\_Ельники\_кислично-зеленомошные» и «Луга\_Сфагновые ельники» больше, чем между точками «Норвегия» и «Брянск». Подобного рода факты, все чаще появляющиеся в публикациях последних лет [6, 7], и определяются в англоязычной литературе как Isolation by Environment, или IBE (по аналогии с IBD).

Программный пакет STRUCTURE был использован нами для методически независимого подтверждения выявленного эффекта IBE. В отличие от анализа PCoA, где посредством группировки деревьев в группы заранее задается направление поиска генетической дифференциации популяций, алгоритм STRUCTURE реализует схему последовательной иерархической классификации индивидуальных объектов по группам «без обучения», т. е. выявляемые им в пределах объединенного массива данных группы деревьев заранее никак не «предрасположены» к такому объединению. Поэтому получение с помощью STRUCTURE сходных с анализом PCoA результатов является существенным аргументом в пользу значимости эффекта IBE (рис. 3). При этом выявление трех независимых кластеров в программе STRUCTURE, один из которых соответствует группе деревьев из Норвегии, не только указывает на некоторую генетическую обособленность норвежской локальной популяции, но и позволяет глубже интерпретировать результаты PCoA: 15 % генетических различий, приходящихся на ось OY на рис. 2, следует объяснять не столько географической удаленностью брянской и норвежской популяций, сколько собственно генетическими особенностями адаптации норвежской и российских локальных популяций к различным условиям увлажнения. Генетическая обособленность норвежской популяции от популяций всего остального ареала *P. abies* и механизм ее возникновения выявлены и описаны ранее [21].

Вероятно, эффект экологической изоляции является весьма широко распространенным явлением в природе, о чем может свидетельствовать ряд косвенных данных. Так, например, в природных популяциях часто наблюдается недостаток гетерозигот как в целом по популяции, так и по отдельным маркерам. Некоторые исследователи объясняют это неоднородностью популяций по частоте встречаемости аллелей, связанной с неоднородностью экологических условий их обитания [27, 28]. Именно это видно на материале исследованных нами популяций *P. abies*.

Концепция экологической изоляции позволяет объяснить пространственное внутривидовое генетическое варьирование в гетерогенных условиях среды, когда изменение экосистемы оказывается достаточно существенным для отбора определенных генотипов и фиксации редких аллелей. Подобная «экологическая изоляция» является начальным этапом адаптивной дифференциации,

которая далее, совместно с адаптацией к климатическим условиям и с генетическими процессами (связанными с миграцией и потоком генов через пыльцу и семена) может привести к видообразованию [7]. Такое развитие эволюционных процессов подразумевает начальное формирование устойчивых экологических рас, т. е. групп генетически не изолированных организмов, которые отличаются небольшим числом существенных наследуемых признаков [29] и распределение которых ограничивается приспособленностью к локальным эдафическим условиям и внутривидовой конкуренцией [30]. В дальнейшем механизм экологического видообразования предполагает эволюцию репродуктивных барьеров в результате дивергентного отбора в различных условиях среды.

Последующее изучение экологической изоляции популяций древесных растений в природе требует поиска адаптивных маркеров, ассоциированных с фенотипическими признаками, и идентификации процессов, которые приводят к экологической изоляции [6].

## ВЫВОДЫ

На основе анализа 12 SSR-локусов для *P. abies* выявлен эффект изоляции экологическими условиями (IBE), при котором генетические различия между географически удаленными (более 300 км), но экологически сходными по условиям произрастания (принадлежащими к одному типу леса) ценопопуляциями гораздо меньше генетических различий между географически очень близко расположенными (менее 1 км), но экологически разнородными (принадлежащими к разным типам елового леса) ценопопуляциями. Влияние эффекта изоляции экологическими условиями на масштаб генетических различий в популяциях *P. abies* существенно больше влияния изоляции расстоянием (IBD).

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят доктора М.М. Tollefsrud, ведущего научного сотрудника Института леса и ландшафта (г. Ос, Норвегия), за курирование экспериментальной части работы; сотрудников кафедры геоботаники и экологии растений СПбГУ, сотрудников заповедника «Брянский лес»: зам. директора по научной работе Е.Ф. Ситникову и научного сотрудника канд. биол. наук О.И. Евстигнеева; сотрудников резервата «Вепсский лес» за помощь в сборе материала.

Работа проведена при финансовой поддержке гранта Yaggdrasil Mobility Programme No 227321/F11.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Попов П.П. Ель на востоке Европы и Западной Сибири. — Новосибирск: Наука, 1999. [Popov P.P.]



- Norway spruce in Eastern Europe and Western Siberia. Novosibirsk: Nauka; 1999. (In Russ.)]
2. Hamrick JL, Godt MJ, Sherman-Broyles SL. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests*. 1992;6:95-124. doi: 10.1007/BF00120641.
  3. Bouillé M, Bousquet J. Trans-species shared polymorphisms at orthologous nuclear gene loci among distant species in the conifer *Picea* (Pinacea): implications for the longterm maintainance of genetic diversity in trees. *Am J Bot*. 2005;92(1):63-73. doi: 10.3732/ajb.92.1.63.
  4. Ratnam W, Rajora OP, Finkeldey R, et al. Genetic effects of forest management practices: global synthesis and perspectives. *For Ecol Manage*. 2014;333:52-65. doi: 10.1016/j.foreco.2014.06.008.
  5. Meirmans PG. The trouble with isolation by distance. *Mol Ecol*. 2012;21:2839-2846. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05578.x.
  6. Wang JJ, Bradburd GS. Isolation by Environment. *Mol Ecol*. 2014;23:5649-5662. doi: 10.1111/mec.12938.
  7. Kremer A, Ronce O, Robledo-Arnuncio JJ, et al. Long-distance gene flow and adaptation of forest trees to rapid climate change. *Ecology letters*. 2012;15:378-392. doi: 10.1111/j.1461-0248.2012.01746.x.
  8. Andrew RL, Ostevik KL, Ebert DP, Rieseberg LH. Adaptation with gene flow across the landscape in a dune sunflower. *Molecular Ecology*. 2012;21:2078-2091. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05454.x.
  9. Василевич В.И., Бибилова Т.В. Сфагновые ельники европейской России // Бот. журн. — 2004. — Т. 89. — № 5. — С. 734–748. [Vasilevich VI, Bibikova TV. Sphagnumspruce forests in European Russia. *Botanicheskyy Journal*. 2004;89(5):734-748. (In Russ.)]
  10. Рысин Л.П., Савельева Л.И. Еловые леса России. — М.: Наука, 2002. [Risn LP, Savelieva LI. Spruce forests of Russia. Moscow: Nauka; 2002. (In Russ.)]
  11. Василевич В.И., Бибилова Т.В. Ельники кисличные европейской России // Бот. журн. — 2004. — Т. 89. — № 10. — С. 1573–1587. [Vasilevich VI, Bibikova TV. Woodsorrel spruce forests in European Russia. *Botanicheskyy Journal*. 2004;89(10):1573-1587. (In Russ.)]
  12. Pfeiffer A, Olivieri AM, Morgante M. Identification and characterization of microsatellites in Norway spruce (*Picea abies* K). *Genome*. 1997;40:411-419. doi: 10.1139/g97-055.
  13. Fluch S, Burg A, Kopecky D, et al. Characterization of variable EST SSR markers for Norway spruce (*Picea abies* L.). *BMC Research notes*. 2011;4:401. doi: 10.1186/1756-0500-4-401.
  14. Rungis D, Bérubé Y, Zhang J, et al. Robust simple sequence repeat markers for spruce (*Picea* spp.) from expressed sequence tags. *Theor Appl Genet*. 2004;109:1283-1294. doi: 10.1007/s00122-004-1742-5.
  15. Scotti I, Paglia GP, Magni F, Morgante M. Efficient development of dinucleotide microsatellite markers in Norway spruce (*Picea abies* Karst.) through dot-blot selection. *Theor Appl Genet*. 2002;104:1035-1041. doi: 10.1007/s00122-001-0843-7.
  16. Scotti I, Magni F, Paglia GP, Morgante M. Trinucleotide microsatellites in Norway spruce (*Picea abies*): their features and the development of molecular markers. *Theor Appl Genet*. 2002;106:40-50. doi: 10.1007/s00122-002-0986-1.
  17. Peakall R, Smouse PE. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*. 2012;28:2537-9. doi: 10.1093/bioinformatics/bts460.
  18. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000;155:945-959.
  19. Jakobsson M, Rosenberg NA. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*. 2007;23:1801-1806. doi: 10.1093/bioinformatics/btm233.
  20. Rosenberg NA. Distruct: a program for the graphical display of population structure. *Mol Ecol*. 2004;4:137-8. doi: 10.1046/j.1471-8286.2003.00566.x.
  21. Tollefsrud MM, Sonstebo JH, Brochmann C, et al. Combined analysis of nuclear and mitochondrial markers provide new insight into the genetic structure of North European *Picea abies*. *Heredity*. 2009;102:549-62. doi: 10.1038/hdy.2009.16.
  22. Потокина Е.К., Орлова Л.В., Вишневецкая М.С., и др. Генетическая дифференциация популяций ели на Северо-Западе России по результатам маркирования микросателлитных локусов // Экол. генет. — 2012. — Т. 10. — № 2. — С. 4049. [Potokina EK, Orlova LV, Vishnevskaya MS, et al. Genetic differentiation of spruce populations in Northwest Russia revealed with microsatellite markers. *Ecological Genetics*. 2012;10(2):40-49. (In Russ.)]
  23. Попова Т.А., Березкина Л.И., Бычкова И.А., и др. Природный парк «Вепский лес». — СПб.: Вести, 2005. [Popova TA, Berezkina LI, Bichkova IA, et al. Natural park “Vepssky forest”. Saint Petersburg: Vesti; 2005. (In Russ.)]
  24. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. 1978;89(3):583-90.
  25. Mantel N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*. 1967;27(2):209-220.
  26. Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol*. 2005;14:2611-2620. doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x.

27. Lagercrantz U, Ryman N. Genetic structure of Norway spruce (*Picea abies*): concordance of morphological and allozyme variation. *Evolution*. 1990;44:38-53. doi: 10.2307/2409523.
28. Androsiuk P, Shiono A, Westin J, et al. Genetic status of Norway spruce (*Picea abies*) breeding populations for northern Sweden. *Silvae Genet*. 2013;62(3):127-136.
29. Попов П.П. Популяционно-расовая дифференциация *Picea abies* и *Picea obovata* (Pinaceae) // Бот. журн. — 2009. — Т. 94. — № 9. — С. 1317–1334. [Popov PP. Population and race differentiation of *Picea abies* and *Picea obovata* (Pinaceae). *Botanicheskyyi Journal*. 2009;94(9):1317-1334. (In Russ.)]
30. Savolainen O, Pyhajarvi T, Knurr T. Gene flow and local adaptation in trees. *Annu Rev Ecol Syst*. 2007;38:595-619. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095646.

#### THE ROLE OF ENVIRONMENTAL FACTORS IN THE FORMATION OF THE GENETIC STRUCTURE OF *P. ABIES* POPULATIONS

K.V. Zakharova, K.S. Seits

For citation: *Ecological genetics*. 2017;15(2):11-20

✿ **SUMMARY: Background.** Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) is one of the main forest forming spruce species in Europe. Their populations are characterized by the genetic heterogeneity between individuals in population. The genetic structure of *P. abies* populations studied supported a hypothesis of an environment impact on the degree of genetic differentiation among populations. **Materials and methods.** Analysis of genetic diversity of natural populations in distinct geographical regions from North-West Russia, South-West Russia, South Norway were done using nuclear microsatellites. The needles were collected from the 20-30 adult trees in each geographical spot taking into account the local environment. The statistical calculations were performed with GenAlEx 6.5.03 and Structure 2.3.4. **Results.** The analysis highlighted the environmental impact on the genetic diversity. The genetic structure of spruce cenopopulations from poor conditions are extremely different from those of cenopopulations growing under rich environmental conditions in one geographic region. The genetic differences between them are comparable with the genetic differences between spatially remote populations. **Conclusion.** The role of the isolation by environment as a pattern in which genetic differentiation increases with environmental differences independent of the geographic distance is essential for genetic structure of spruce populations.

✿ **KEYWORDS:** population differentiation; nuclear microsatellites; *Picea abies*; Isolation by environment.

#### ✿ Информация об авторах

**Ксения Вениаминовна Захарова** — кафедра геоботаники и экологии растений. ФГБУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург. E-mail: ksenven@mail.ru.

**Кирилл Сергеевич Сейц** — кафедра геоботаники и экологии растений. ФГБУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург. E-mail: seits@rambler.ru.

#### ✿ Information about the authors

**Kseniia V. Zakharova** — Geobotany and Plant Ecology Department. Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia. E-mail: ksenven@mail.ru.

**Kirill S. Seits** — Geobotany and Plant Ecology Department. Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia. E-mail: seits@rambler.ru.