

© Е. К. Потокина<sup>1</sup>, Л. В. Орлова<sup>2</sup>,  
М. С. Вишневская<sup>1</sup>, Е. А. Алексеева<sup>1</sup>,  
А. Ф. Потокин<sup>3</sup>, А. А. Егоров<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Всероссийский институт растение-  
водства им. Н. И. Вавилова РАСХН;

<sup>2</sup> Ботанический институт  
им. В. Л. Комарова РАН;

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский государ-  
ственный лесотехнический универси-  
тет имени С. М. Кирова

✿ Анализ генетического разнообразия популяций ели на северо-западе европейской части России с использованием микросателлитных маркеров выявил два относительно обособленных генетических кластера. Один из них составляют деревья, идентифицированные по морфологическим признакам как *P. abies*. Другой кластер объединяет ели, определенные как *P. obovata* и *P. fennica*. Результаты SSR-анализа не поддерживают идею о таксономической самостоятельности гибридного вида *P. fennica*. Частота встречаемости генотипов, отнесенных по результатам микросателлитного маркирования к *P. abies*, достоверно убывает с юга на север.

✿ **Ключевые слова:** популяции; микросателлитный анализ; *Picea*; северо-запад европейской части

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПОПУЛЯЦИЙ ЕЛИ НА СЕВЕРО-ЗАПАДЕ РОССИИ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ МАРКИРОВАНИЯ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ

### ВВЕДЕНИЕ

Информация о генетическом разнообразии и популяционной структуре видов главных лесобразующих пород необходима для организации мероприятий по охране и рациональному использованию биологических ресурсов (Политов, 2007). Одной из основных хвойных пород северо-запада европейской части России является ель (*Picea*), представленная, по мнению большинства отечественных систематиков, двумя самостоятельными видами — елью европейской (*P. abies* (L.) Н. Karst.) и елью сибирской (*P. obovata* Ledeb.). Кроме того, практически по всей территории региона встречаются естественные гибриды этих двух видов ели, которые рассматриваются рядом авторов в качестве самостоятельного вида *P. fennica* (Regel) Kom. (Комаров, 1934; Farjon, 2001). Е. Г. Бобровым (1944) была выдвинута теория интрогрессивной гибридизации, согласно которой переходные формы между *P. abies* и *P. obovata*, «населяющие территорию Восточной Европы, представляют собой результат длительного гибридогенного взаимодействия европейского и сибирского видов» (Бобров, 1944: 16). По мнению автора, ареал *P. fennica* охватывает большую часть Русской равнины между восточной границей расселения *P. abies* и западной — *P. obovata*, а также большую часть Скандинавии (Финляндию, Швецию и Норвегию), кроме ее крайнего севера. Указывается также, что точную границу их распространения провести трудно, поскольку к периферии ареала многие морфологические признаки сглаживаются.

Процессы интрогрессивной гибридизации видов хвойных в настоящее время интенсивно изучаются с использованием методов молекулярного маркирования. Многочисленные исследования базируются на анализе полиморфизма микросателлитных локусов (Scotti et al., 2002; Achere et al., 2004; Rungis et al., 2004), которые рассматриваются в качестве наиболее полиморфной и воспроизводимой системы кодоминантных молекулярных маркеров.

Целью нашего исследования являлся анализ генетического разнообразия природных популяций елей комплекса *P. abies*-*P. obovata*, произрастающих на территории северо-запада европейской части России, на основе маркирования микросателлитных локусов. Задача также заключалась в том, чтобы определить, в какой степени генетическая дифференциация популяций ели, выявляемая с помощью молекулярного маркирования ядерной ДНК, проявляется на морфологическом уровне и реализуется в таксономическом диагнозе.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для выявления надежных диагностических признаков для изучаемых таксонов ели в 2008–2010 гг. было проведено сравнительное морфологическое исследование гербарных экземпляров в гербариях Санкт-Петербурга (LE, LECB, KFTA), Москвы (MW, MHA), Петрозаводска (PZV), Полярно-альпийского ботанического сада (КРАВГ), Новосибирска (NS, NSK) и Томска (ТК). Дополнительно были обследованы географические культуры ели различного происхождения в Лисино (Тосненский р-н Ленинградской обл.), где было собрано и исследовано более 100 образцов шишек и вегетативных побегов различных таксонов *Picea*.

Поступила в редакцию 15.02.2012  
Принята к публикации 12.04.2012

В 2010 г. были предприняты комплексные экспедиционные исследования в Мурманской области, Республике Карелия и Ленинградской области с целью уточнения географического распространения *P. abies*, *P. obovata* и *P. fennica* на Северо-Западе европейской части России. В ходе экспедиции на маршруте протяженностью около 1000 км с севера на юг от 68° до 59° с. ш. были заложены 24 пробные площади, на которых произведены геоботанические и таксационные описания, описания почвенного покрова и собран обширный материал шишек и вегетативных побегов. Морфологические признаки 5–10 растений из каждого обследованного географического пункта были проанализированы, по данным морфологического анализа была установлена видовая принадлежность растения, после чего были собраны образцы хвои для последующего выделения и анализа ДНК.

Для проведения молекулярно-генетического анализа геномная ДНК выделялась из свежей хвои отдельных растений СТАВ-методом по Bousquet et al. (1999). Для амплификации микросателлитных локусов были использованы опубликованные праймеры: WS0092.A1 (5'-TGTGGTTTCTGCTTGGAAA-3'; 5'-CCCATTGACTTTGAAATAAGC-3'), Ws0071.J15 (5'-TTTTTAACCATGGGAATTGG-3', 5'-GGATCGAAGG-GATGTCAAGA-3') (Rungis et al., 2004); PAAC19 (5'-ATGGGCTCAAGGATGAATG-3', 5'-AACTCCAAACGATTGATTTCC-3') (Scotti et al., 2000); EAC7H07 (5'-GGTTCAAACCTCCACCTAC-3', 5'-ACCAACTAAG-CCACAAGTGC-3') (Paglia et al., 1998), а также праймеры для STS-маркера Sb29 (5'-AGCGGCATTGAACAGAGTAAC-3', 5'-ATGGAAATGAAGGCAGACTC-3') (Perry, Bousquet, 1998).

Полимеразно-цепную реакцию (ПЦР) проводили в амплификаторе «БИС» (<http://www.bisn.ru>). Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 1% ПЦР буфера с 1,5 ммоль MgCl<sub>2</sub>, 200 мкмоль каждого dNTPs, 2,5 ммоль каждого из праймеров, одну единицу Taq ДНК полимеразы (Силекс) и 30–60 нг исследуемой ДНК. ПЦР-реакция проводилась при следующем режиме: 2 мин 95 °С, 30 циклов (20 с — 95 °С, 20 с — 53 °С и 30 с — 72 °С), заключительный этап 3 мин 72 °С проводился перед охлаждением пробы до 4 °С.

Анализ размера амплифицированных фрагментов осуществлялся с использованием автоматической станции капиллярного электрофореза высокого разрешения QIAxcel System Capillary Electrophoresis (Qiagen). При использовании QIAxcel длина фрагментов рассчитывалась с помощью внутренних стандартов, в качестве которых использованы маркеры соответствия (QX Alignment Marker 15bp/3kb), устанавливающие верхний (3000 нп) и нижний (15 нп) порог детекции. Одновременно использовался внутренний стандарт — набор фрагментов ДНК известного размера (QX Size Marker 25bp/1,8kb), различающихся по длине на 25 нуклеотидов.

Основные показатели генетической изменчивости популяций определяли с использованием программы GenAlEx 6.2 (Peakall, Smouse, 2006). Дифференциацию частот аллелей среди популяций оценивали, используя AMOVA (Analysis of Molecular Variance); достоверность индекса фиксации Fst при попарных сравнениях генетической обособленности популяций определяли по результатам 999 пермутаций. Бейсовский метод анализа популяционной структуры выполнялся с использованием пакета Structure 2.2 (Pritchard et al., 2000) со следующими параметрами: burn-in period 5000, iterations 50 000, correlated allele frequencies, admixture model.

Геоботанические и таксационные описания были произведены на 24 пробных площадях. Размер пробной площади составлял 20 × 20 м. При оценке древесного яруса на пробной площади учитывали общую сомкнутость яруса в долях единицы, средние и максимальные высоту и диаметр стволов по породам на высоте груди. Проективное покрытие видов кустарникового, травяно-кустарничкового и мхово-лишайникового ярусов оценивали в процентах.

Обработка описаний проводилась с использованием табличного метода, разработанного на кафедре геоботаники СПбГУ (Нешатаев, 1987). При составлении диагностических таблиц встречаемость видов группировали по классам: I — 1–20%, II — 21–40%, III — 41–60%, IV — 61–80%, V — 81–100% описаний; проективное покрытие видов по баллам 1 — <1%, 2 — 1–2,5%, 3 — 2,6–10%, 4 — 11–25%, 5 — 26–50%, 6 — >50%.

В основу классификации растительности положен эколого-фитоценотический метод, разработанный В. Н. Сукачевым (1912, 1934) и А. П. Шенниковым (1938). Названия синтаксонов даны согласно Проекту Всесоюзного кодекса фитоценологической номенклатуры (Нешатаев, 1989).

Оценку местообитаний по влажности и богатству почв проводили с помощью сравнительных экологических таблиц Л. Г. Раменского. Для местообитания каждого сообщества были определены ступени увлажнения и богатства. Для установления ступеней факторов применялась табличная модификация метода ограничений (Раменский и др., 1956).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

### ОТЛИЧИТЕЛЬНЫЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ВЕГЕТАТИВНЫХ И РЕПРОДУКТИВНЫХ ОРГАНОВ ВИДОВ *P. ABIES*, *P. OBOVATA* И *P. FENNICA*

При определении видовой принадлежности собранных растений основное внимание уделялось достаточно устойчивым признакам морфологического строения шишек и их чешуй (Lindquist, 1948; Юркевич, Парфёнов, 1967) в сочетании с признаками хвоинок и вегетативных побегов. Кроме того, в ходе исследования нами были проанализированы некоторые новые диагностические признаки семенных чешуй и вегетативных органов, так-

же показавшие достаточную консервативность. В частности, у семенных чешуй были измерены высота клиновидно суженной верхней части чешуи («язычка»), угол отклонения семенных чешуй в средней части шишки, а также морфология и размеры кроющих чешуй и соотношение размеров семенных и кроющих чешуй. Тщательное изучение вегетативных побегов и хвоинок позволило выявить и проанализировать 14 новых признаков вегетативных органов (Орлова, Егоров, 2011).

В результате, *P. abies* var. *abies* была идентифицирована по слабо опушенным молодым побегам; постепенно заостренным хвоинкам, располагающимся на побеге гребенчато; довольно длинным (0,5–1 мм дл.) прямоугольным или несколько расширенным сверху, часто собранным по 2–4, подушечкам хвоинок; килеватым и голым чешуям и профиллам верхушечных почек. Шишки крупные (10–11 см дл.), узко-обратнойцевидные или обратнойцевидно-цилиндрические, с клиновидным основанием; семенные чешуи по верхнему краю треугольные или клиновидно суженные, на верхушке усеченные (при угле их отклонения от оси шишки 30–60°; высота неприкрытого участка семенной чешуи 10–18 мм; высота «язычка» 3,5–8 (10) мм); кроющие чешуи 5–7 мм дл., 2–3,5 мм шир., ромбические, неправильно ромбические или ланцетные, с острой или туповатой верхушкой.

Ель сибирская (*P. obovata*) отличается от предыдущего вида густо опушенными молодыми побегами с волосками 3–5 типов; внезапно заостренными хвоинками, которые располагаются на побегах более чем двумя рядами, часто щетковидно; более короткими (0,3–0,5 мм дл.), квадратными или заметно расширенными сверху, б. м. равномерно расположенными, подушечками хвоинок, а также густо опушенными чешуями и профиллами почек (чешуи почек не килеватые или слабо килеватые). Шишки до 8 см дл., яйцевидные, б. м. прямые, с закругленным или плоским основанием; семенные чешуи по верхнему краю закругленные или широко закругленные, цельные, отклонены от оси шишки на 70–90° (высота неприкрытого участка семенной чешуи 5–10 мм); кроющие чешуи 3–4 (5) мм дл., 2–3 (4) мм шир., обратнойцевидные с закругленной верхушкой, или треугольные, или ширококоромбические с туповатой верхушкой.

В пределах ареала *P. fennica* встречаются в различном соотношении формы, близкие к *P. abies* и близкие к *P. obovata*. Кроме того, встречается форма, которая по морфологии шишек является промежуточной между двумя основными формами *P. fennica*, а по вегетативным признакам более приближается к форме, близкой к *P. obovata*. Эта форма, по-видимому, и является типичной для формирующегося вида *P. fennica*.

*P. fennica*, близкая к *P. abies*, отличается от типичной *P. abies* сильной вариабельностью в строении верхушки хвоинок (она может быть постепенно или внезапно заостренной), а также более опушенными однолетними и двухлетними побегами (средне опушенные волосками 2–3 ти-

пов: длинными прилегающими, короткими простыми и железистыми отстоящими светлыми); менее крупными (7,5–11 см дл.), часто изогнутыми шишками, семенные чешуи которых по верхнему краю треугольные, острые.

*P. fennica*, близкая к *P. obovata*, отличается от типичной *P. obovata* вытянуто-закругленным, преимущественно неровнозубчатым или вытянутым в середине в небольшой носик верхним краем семенных чешуй, а также отличается от *P. obovata* сильной вариабельностью в строении верхушки хвоинок (часто она может быть как постепенно, так и внезапно заостренной), а от *P. fennica*, близкой к *P. abies*, — расположением хвои (располагается на побегах более чем двумя рядами, часто щетковидно), заметно густо опушенными одно- и двухлетними побегами (волосками 3–4 типов: длинными прилегающими, короткими простыми и железистыми отстоящими светлыми волосками и темными железистыми). Морфология кроющих чешуй у таких шишек очень вариабельна, они 5–6 (7) мм дл. и (1,7) 2–3 мм шир., обратнойцевидные с округлой верхушкой или широколанцетные, или ширококоромбические с туповатой верхушкой.

Типичная форма *P. fennica* отличается от других форм (*P. fennica*, близкой к *P. abies* и *P. fennica*, близкой к *P. obovata*) строением семенных чешуй — треугольных, на верхушке закругленных или вытянуто-закругленных. Семенные чешуи 13–23 мм выс. и 13–22 мм шир., ромбовидно-обратнойцевидные, обратнойцевидные или широко-обратнойцевидные, отклоненные от оси под углом 30–45°. Шишки 6–10,3 см дл., 3,5–4,5 см толщ., обратнойцевидно-цилиндрические, узко-обратнойцевидные или обратнойцевидные, с варьирующей формой основания шишки — от закругленной до клиновидной. Кроющие чешуи 4,8–7,5 (8) мм дл., 1,7–3 мм шир., треугольные, ромбические или широколанцетные, туповатые. По морфологии вегетативных органов напоминает форму *P. fennica*, близкую к *P. obovata*: хвоинки четырехгранные, внезапно заостренные или варьирующие от внезапно до постепенно заостренных; молодые побеги заметно густо или средне опушенные разными типами волосков. Отличается от нее килеватыми, голыми или слабо опушенными чешуями верхушечных почек, а также голыми или слабо опушенными профиллами.

Из 88 деревьев природных популяций елей, собранных в период экспедиционных исследований по Северо-Западу РФ в 2010 г., 26 растений было идентифицировано как *P. abies*, 20 растений — как *P. obovata* и 42 — как *P. fennica*.

#### АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ И ПОПУЛЯЦИОННОЙ СТРУКТУРЫ ЕЛЕЙ С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ

88 деревьев из природных популяций, идентифицированные по морфологическим признакам как *P. abies*, *P. obovata* и *P. fennica*, были проанализированы с по-

мощью маркеров четырех микросателлитных (SSR, Single Sequence Repeats) локусов и одного STS (Sequence-Tagged-Site) локуса. Из 40 STS-маркеров, полиморфных среди видов елей, включенный в анализ маркер SB29 уникален тем, что выявляет нуклеотидный полиморфизм в кодирующей части гена (Регу, Bousquet, 1998). Ген кодирует белок АТАF1, вовлеченный в процессы развития апикальных меристем. Маркер SB29 был картирован на длинном плече хромосомы 9 генетической карты *Picea* (Achere et al., 2004).

Два из четырех проанализированных микросателлитных маркеров WS0092.A19 и WS0071.J15 относятся к классу EST-SSR-маркеров (Rungis et al., 2004). Они были идентифицированы в генах, кодирующих транспортный белок в мембране клеточных вакуолей (suprabrevin-related protein, CN480888) и белок корневой эпидермы (root border cell-specific protein, CN480902)

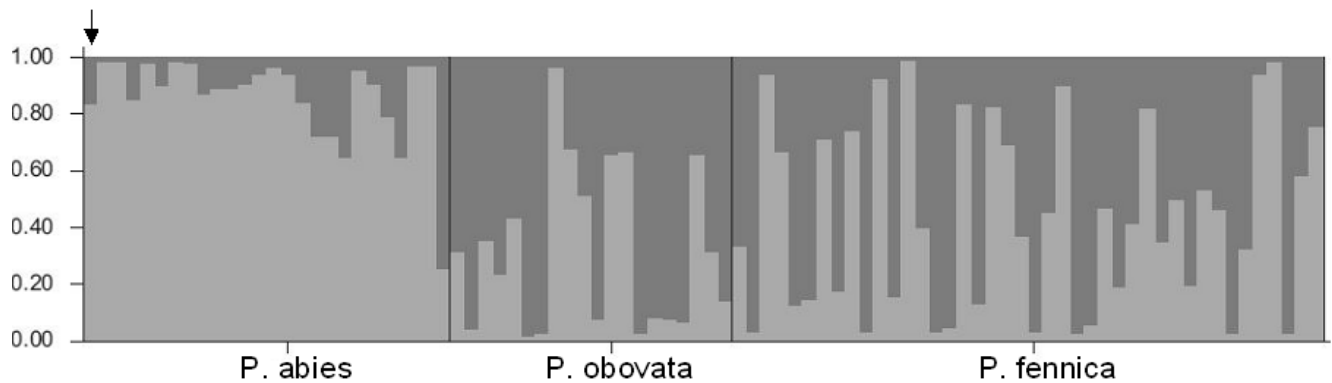
(Rungis et al., 2004). Еще два микросателлитных маркера EAC7H07 и PAAC19 были идентифицированы в некодирующих участках генома (Paglia et al., 1998; Scotti et al., 2000) и локализованы на хромосомах 5 и 12 соответственно (Achere et al., 2004).

Генетическое разнообразие трех видов *Picea* изучалось путем анализа частоты встречаемости аллелей исследованных локусов (табл. 1). Все локусы оказались полиморфными, число аллелей на локус варьировало от 11 до 13 для микросателлитов и равнялось 5 для STS-маркера. Уровень генетической изменчивости в популяции оценивался по показателю ожидаемой гетерозиготности ( $H_e$ ) для локусов, взятых в анализ.  $H_e$  отражает вероятность того, что в единичном локусе любые две аллели, выбранные произвольно в популяции, отличаются друг от друга. Среднее значение  $H_e$  для всех локусов составило  $0,77 \pm 0,031$ , свидетельствуя о высо-

Таблица 1

Характеристика изменчивости четырех SSR- и одного STS-локуса в популяциях *P. abies*, *P. obovata*, *P. fennica* на северо-западе европейской части России

Локус	Таксон	Размер аллелей (нп)	Число аллелей (N)	$H_o$	$H_e$	$F_{is}$	$F_{it}$	$F_{st}$
WS0092.A19	<i>P. abies</i>	230–252	10	0,619	0,827			
	<i>P. obovata</i>		7	0,316	0,651			
	<i>P. fennica</i>		11	0,514	0,849			
<b>Всего</b>			<b>11</b>			<b>0,377</b>	<b>0,427</b>	<b>0,080</b>
WS0071.J15	<i>P. abies</i>	206–256	6	0,471	0,770			
	<i>P. obovata</i>		6	0,375	0,773			
	<i>P. fennica</i>		9	0,515	0,832			
<b>Всего</b>			<b>9</b>			<b>0,427</b>	<b>0,444</b>	<b>0,030</b>
EAC7H07	<i>P. abies</i>	155–197	8	0,294	0,824			
	<i>P. obovata</i>		6	0,077	0,848			
	<i>P. fennica</i>		10	0,148	0,643			
<b>Всего</b>			<b>12</b>			<b>0,788</b>	<b>0,803</b>	<b>0,069</b>
PAAC19	<i>P. abies</i>	113–191	11	0,360	0,862			
	<i>P. obovata</i>		9	0,500	0,869			
	<i>P. fennica</i>		11	0,500	0,884			
<b>Всего</b>			<b>13</b>			<b>0,480</b>	<b>0,496</b>	<b>0,031</b>
SB29	<i>P. abies</i>	555–595	3	0,000	0,430			
	<i>P. obovata</i>		4	0,000	0,658			
	<i>P. fennica</i>		5	0,029	0,742			
<b>Всего</b>			<b>5</b>			<b>0,984</b>	<b>0,986</b>	<b>0,104</b>



**Рис. 1.** Структура генетического разнообразия *Picea* на северо-западе европейской части России, выявленная по результатам SSR-анализа с использованием Structure 2.2. Две генетически обособленные группы (кластеры) обозначены светло- и темно-серым цветом. Для каждого из 88 деревьев определена вероятность его принадлежности к первому или второму генетическому кластеру согласно шкале слева (admixture proportions, Q). Например, первое дерево, отмеченное стрелкой, с вероятностью 83% может быть отнесено к «светло-серому» кластеру и с вероятностью 17% к «темно-серому» кластеру. Черные вертикальные линии разделяют группы растений, морфологически определенных как *P. abies*, *P. obovata* и *P. fennica*

кой степени полиморфизма использованных маркеров. Для всех локусов в популяциях *P. abies*, *P. obovata* и *P. fennica* наблюдался дефицит гетерозигот ( $H_o$ ) по сравнению с ожидаемым значением ( $H_e$ ), что, возможно, объясняется эффектом Валунда (Wahlund effect). Известно, что если популяция неоднородна с точки зрения частоты встречаемости аллелей, то доля гетерозигот в такой популяции будет меньше, а соответственно доля гомозигот будет больше, чем предсказывается соотношением Харди–Вайнберга (Wahlund, 1928). Это может указывать на возможный процесс межвидовой гибридизации, протекающий в популяциях *P. abies*, *P. obovata* и *P. fennica*, вызывающий отклонение от равновесия Харди–Вайнберга.

Для оценки степени генетической дифференциации видов *P. abies*, *P. obovata* и *P. fennica* была использована F-статистика Райта (Wright, 1951), посредством которой можно оценить разные варианты отклонения от равновесия Харди–Вайнберга в объединенной популяции при наличии ее подразделенности на субпопуляции. В качестве объединенной популяции рассматривалась изучаемая выборка из 88 деревьев. Растения, отнесенные к видам *P. abies*, *P. obovata* и *P. fennica* составили три отдельные субпопуляции в общей изучаемой выборке. «Индекс фиксации»  $F_{ST}$ , отражающий степень дифференциации субпопуляций в отношении частот аллелей варьировал от 0,031 до 0,104 для разных локусов, в среднем составив 0,06 (табл. 1). Значение  $F_{ST}$  близкое к единице, означало бы, что для разных субпопуляций в анализе характерны альтернативные аллели (Wright, 1978). Полученные значения  $F_{ST}$  в интервале от 0,05 до 0,15 свидетельствуют о весьма незначительной генетической дифференциации между группами

растений, которые мы диагностировали как таксоны *P. abies*, *P. obovata* и *P. fennica*. Рассчитанные с помощью AMOVA значения  $F_{ST}$  для пар видов *P. abies* — *P. obovata* и *P. abies* — *P. fennica* составили 0,057 и 0,037 соответственно и оказались достоверными ( $p = 0,001$ ). Однако генетическую обособленность групп растений, определенных как *P. obovata* и *P. fennica*, подтвердить не удалось ( $F_{ST} = 0,009$ ,  $p > 0,05$ ).

Популяционная структура разнообразия елей на изучаемой территории была также проанализирована с помощью программы Structure 2.2, основанной на вероятностной модели Бейеса (Bayesian method). Метод позволяет обнаружить генетическую структуру популяции, размещая отдельные индивидуумы в наиболее вероятное число кластеров (K), в пределах которых отклонение от равновесия Харди–Вайнберга было бы минимальным. Вероятность числа кластеров в изучаемой выборке (K) оценивалась в диапазоне от 1 до 5, для каждого значения K выполнялось 10 повторов анализа. Наиболее вероятное число кластеров (K), то есть объективно обособленных генетических групп в изучаемой выборке, определялось согласно алгоритму, предложенному Evanno et al. (2005), и оказалось равным двум. Рисунок 1 демонстрирует так называемые «пропорции смеси» (admixture proportions, Q), рассчитанные для 88 проанализированных генотипов, фактически определяющие, с какой вероятностью каждый из них может быть отнесен к первому или второму генетическому кластеру. Из рисунка 1 также следует, что все ели, диагностированные по морфологическим признакам как *P. abies*, со средней вероятностью в 88% относятся к кластеру, обозначенному на рисунке 1 светло-серым цветом. Генетическую обособленность елей, идентифицированных как *P. obovata* или *P. fennica*, выявить не удается.

Таблица 2

Географическая, экологическая и геоботаническая характеристика 24 пробных площадей на северо-западе европейской части России между 59° и 68° с. ш.

Пробная площадь	Административный район	Доля „abies“ - кластера в генотипах елей	Географическая широта	Степень богатства почв	Степень увлажнения почв	Растительная ассоциация
1	Мурманская	0,258	68,67	4,8	72,9	Ельник кустарничково-зеленомошный
2		0,413	68,57	4,4	72,6	Ельник кустарничково-зеленомошный
3		0,187	68,17	3,5	77,6	Ельник кустарничково-зеленомошный
4		0,464	68,17	5,0	73,2	Ельник кустарничково-зеленомошный
5		0,303	67,15	3,6	76,0	Ельник кустарничково-зеленомошный
6		0,296	67,15	5,7	75,4	Ельник хвощево-зеленомошный
7	Карелия	0,204	66,50	3,1	78,4	Ельник кустарничково-зеленомошный
8		0,541	65,23	4,5	70,1	Ельник кустарничково-зеленомошный
9		0,546	64,40	5,1	70,1	Ельник чернично-зеленомошный
10		0,468	64,38	5,0	73,9	Ельник чернично-зеленомошный
11		0,549	63,30	6,0	75,9	Ельник хвощево-сфагновый
12		0,736	63,80	4,6	70,1	Ельник чернично-зеленомошный
13		0,351	62,85	4,6	70,4	Ельник чернично-зеленомошный
14		0,521	62,77	4,5	70,2	Ельник чернично-зеленомошный
15		0,912	62,60	5,4	72,5	Ельник чернично-зеленомошный
16		0,631	61,60	5,2	74,1	Ельник чернично-сфагновый
17		0,617	61,52	4,6	69,9	Ельник чернично-зеленомошный
18		0,645	60,94	4,2	75,0	Ельник кустарничково-сфагновый
19	Ленинградская	0,650	60,80	4,4	71,0	Ельник чернично-сфагновый
20		0,825	60,32	7,3	76,2	Ельник папоротничковый
21		0,623	59,45	6,4	72,6	Ельник зеленчуково-зеленомошный
22		0,707	59,43	5,5	72,1	Ельник чернично-сфагновый
23		0,176	59,43	5,4	72,6	Ельник чернично-зеленомошный
24		0,967	59,25	5,0	79,2	Ельник кустарничково-сфагновый

Таблица 3

Зависимость среднего значения доли «abies» кластера в генотипах елей от географической широты пробной площади, степени увлажнения и богатства почв местообитаний.

Достоверные значения коэффициентов корреляции Пирсона выделены жирным шрифтом

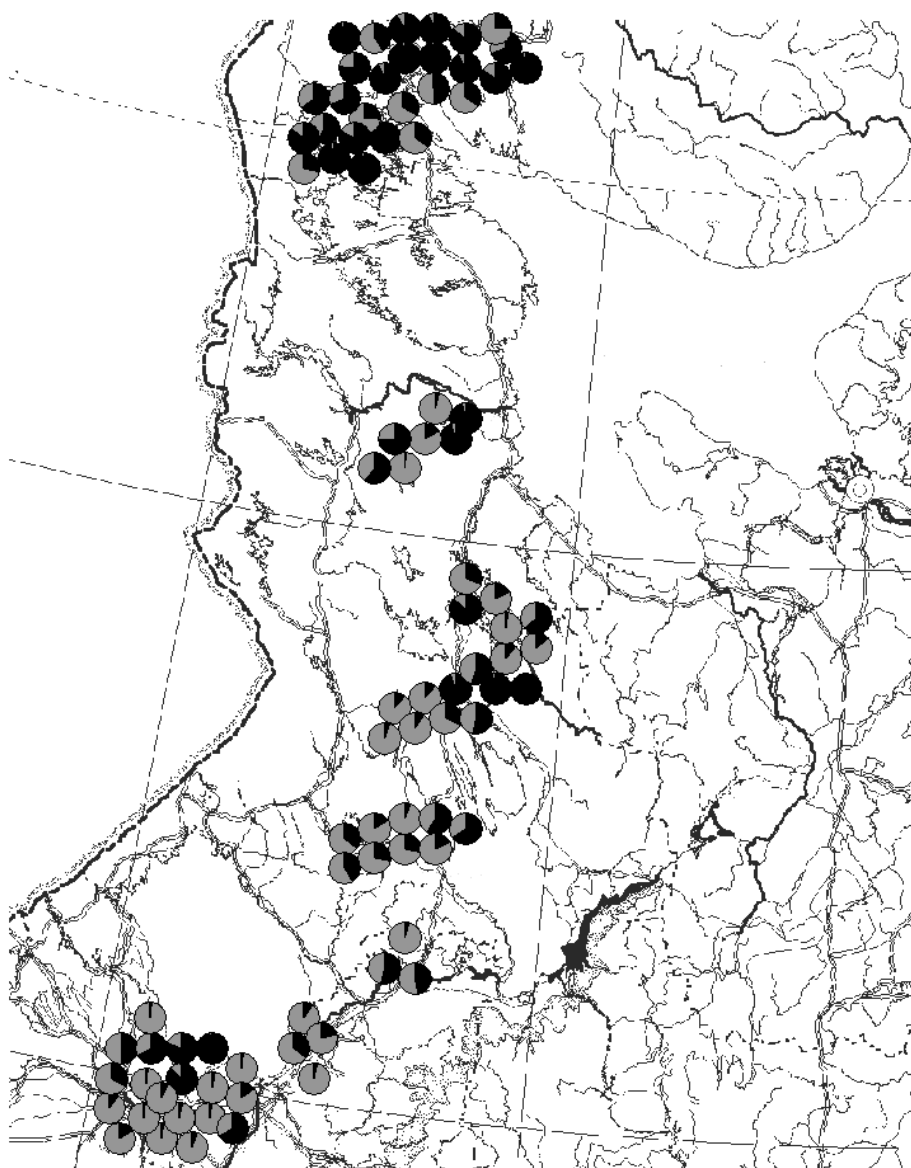
	Доля „abies“ - кластера в генотипах елей	Географическая широта	Степень богатства почв	Степень увлажнения почв
Доля „abies“ — кластера в генотипах елей	1			
Географическая широта	-0,62 <b>p = 0,001</b>	1		
Степень богатства почв	+0,46 <b>p = 0,025</b>	-0,48 <b>p = 0,018</b>	1	
Степень увлажнения почв	-0,10 <b>p = 0,645</b>	0,12 <b>p = 0,566</b>	-0,06 <b>p = 0,765</b>	1

**ЭКОЛОГО-ГЕОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ  
РАСПРОСТРАНЕНИЯ *P. ABIES*  
НА СЕВЕРО-ЗАПАДЕ ЕВРОПЕЙСКОЙ  
ЧАСТИ РОССИИ**

Так как для каждого из 88 деревьев была определена вероятность его принадлежности к двум генетическим кластерам, мы провели эколого-географический анализ распространения генотипов ели, относящихся к кластеру, ассоциированному с *P. abies*, по маршруту экспедиции по северо-западу европейской части России от 68° до 59° с. ш. Для 24 пробных площадей по маршруту экспедиции были составлены геоботанические описания, на основании которых были выделены растительные ассоциации. Для каждого сообщества были определены

степени увлажнения и богатства почв с использованием сравнительных экологических таблиц Л.Г. Раменского (табл. 2).

Для изученных пробных площадей была рассчитана зависимость средней доли «*abies*»-кластера в генотипах елей от географической широты пробной площади, степени увлажнения и богатства почв растительного сообщества (табл. 3). С продвижением на север богатство почв местообитаний ели достоверно понижается ( $r = -0,48$ ,  $p = 0,018$ ), что является ожидаемым фактом. Установлено также, что доля «*abies*»-кластера в генотипах елей достоверно убывает с юга на север; коэффициент корреляции Пирсона ( $r = -0,62$ ) оказался достоверным ( $p = 0,001$ ) (табл. 3). Рисунок 2 демонстрирует выявленный градиент убывания частоты встречаемости *P. abies* с юга на север.



**Рис. 2.** Градиент убывания с юга на север частоты встречаемости генотипов, отнесенных к *P. abies* по результатам микросателлитного анализа с использованием Structure 2.2. Для 88 деревьев *Picea* (круговые диаграммы) определена вероятность их принадлежности к *P. abies* (серым цветом) или к *P. obovata/P. fennica* (черным цветом)

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Процессы интрогрессивной гибридизации елей европейской и сибирской на территории Русской равнины в последние годы интенсивно изучались с использованием как морфометрических, так и молекулярно-биологических методов. Результаты анализа биометрических показателей, характеризующих форму семенных чешуй образцов еловых шишек из 76 пунктов на обширной территории от западной Беларуси до Енисея, позволили предположить, что в районе условной линии Северная Двина — верхнее течение Вятки и Камы в результате процессов интрогрессивной гибридизации елей европейской и сибирской сформировался большой комплекс популяций ели гибридного происхождения, развивающийся как вид *P. fennica* (Попов, 1996, 2000). Возможность интрогрессивной гибридизации в результате переноса пыльцы от ели сибирской к ели европейской была подтверждена исследованиями полиморфизма хлоропластной ДНК, которая у ели имеет отцовское наследование (Tollesfrud et al., 2009). С другой стороны, анализ митохондриальной ДНК, в частности гена *nad1*, наследуемого по материнской линии, позволил выявить различия между *P. abies* и *P. obovata* даже у экземпляров обоих видов, собранных на востоке европейской части России, где ареалы видов перекрываются (Tollesfrud et al., 2008).

Вопрос о межвидовых гибридах мог также возникнуть и вследствие весьма сглаженных морфологических различий между видами *P. abies* и *P. obovata*, отмечаемых, например, Schmidt-Vogt (1977). Krutovskii и Bergmann (1995), изучив генетическую изменчивость 26 изозимных локусов среди «чистых» популяций ели европейской, собранных в Германии, Швеции, Беларуси и Украине, в сравнении с популяциями ели сибирской из Казахстана и Сибири, усомнились в самостоятельности этих двух таксонов, предложив рассматривать их в качестве двух подвидов, или географических рас одного вида. Авторам не удалось обнаружить каких-либо «видоспецифичных» аллелей ни для одного из проанализированных локусов, в связи с чем они пришли к выводу об исключительной близости этих видов с генетической точки зрения.

По мнению многих авторов, своеобразие популяционной структуры елей на северо-западе России, в частности, на территории республики Карелия и Кольском полуострове, определяется интенсивными процессами интрогрессивной гибридизации ели сибирской и ели европейской (Ильинов и др., 2011; Бакшаева, 1971; Щербакова, 1973). В этом регионе отсутствие четких диагностических признаков, определяющих ель финскую, вынуждает систематиков обращаться к более точным, математическим методам исследования. Так, формовая структура и географическая дифференциация популяций ели на северо-западе России анализировалась с помощью дискриминантного анализа морфологических

особенностей шишек относительно «эталонных популяций» ели европейской и сибирской (Попов, 2010). Отметив преобладание во всех проанализированных популяциях особей промежуточного фенотипа, автор пришел к выводу о том, что «все популяции на северо-западе России можно разделить, по крайней мере, на три группы: из них южная ближе к европейской, другая — к ели сибирской».

Проведенный нами анализ генетического разнообразия популяций ели в северо-западном регионе европейской части России с использованием SSR-маркеров также подтвердил относительную генетическую обособленность популяций ели европейской. Все 26 растений в анализе, морфологически идентифицированные как *P. abies*, были отнесены к единому генетически обособленному кластеру на основании микросателлитного анализа. Относительная генетическая обособленность *P. abies* от растений, определенных как *P. fennica* и *P. obovata*, была подтверждена результатами двух независимых методов популяционно-генетического анализа: F-статистики Райта и вероятностным байесовским методом. Наши результаты свидетельствуют о том, что среди комплекса переходных форм, населяющих территорию Восточной Европы и возникших в результате длительного гибридогенного взаимодействия европейского и сибирского видов (Бобров, 1944), *P. abies* в большинстве случаев удается идентифицировать по морфологическим признакам. Результаты микросателлитного анализа не дают оснований для рассмотрения вопроса о самостоятельности гибридогенного вида ели финской. Примечательно, что ранее нами была установлена возможность идентификации *P. abies* с использованием RAPD-маркера OPD14, в то время как подобрать RAPD-маркер, способный идентифицировать генотипы, отнесенные по морфологическим признакам к *P. obovata* или *P. fennica*, также не удалось (Копылова и др., 2011).

Полученные нами данные также подтверждают отмеченную ранее тенденцию усиления влияния *P. abies* в популяциях ели по направлению с северо-запада на юго-восток (Попов, 2010; Ильинов, 2011). Анализ морфологических признаков, проведенный ранее, показал, что в пределах северо-таежных лесов Карелии наблюдается тенденция увеличения *P. abies* в составе елового древостоя: от 10% в северной части региона (Медвежьегорский район) до 45% на юге (Олонецкий район) (Орлова, Егоров, 2011). В южнотаежном регионе в пределах Ленинградской области доля участия *P. abies* var. *abies* в еловых древостоях составляет 60–90%, в то время как участие *P. fennica* и *P. obovata* невелико и составляет 0–10%. Аналогичную картину демонстрируют полученные нами результаты: частота встречаемости генотипов, отнесенных с высокой вероятностью к *P. abies* по результатам микросателлитного анализа, достоверно убывает с юга на север.



Работа выполнена при поддержке Минобрнауки РФ по программе АБЦ «Развитие научного потенциала высшей школы (2009–2011 годы)» по проекту № 2.1.1/1790 (2.1.1/12910) и № 2.1.1/3859 (2.1.1/11545).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бобров Е.Г. 1944. Об особенностях флоры эрратической области (Один из путей формообразования) // Сов. ботаника. № 2. С. 3–20.
2. Комаров В.Л. 1934. *Coniferales* — хвойные // Флора СССР. Т. 1. С. 130–195.
3. Нешатаев Ю. Н. 1987. Методы анализа геоботанических материалов. Ленинград: Изд-во Ленингр. ун-та, 192 с.
4. Нешатаев В. Ю. 1989. Проект Всесоюзного кодекса фитоценологической номенклатуры. Л.: ВБО, 22 с.
5. Орлова Л.В., Егоров А.А. К систематике и географическому распространению ели финской (*Picea fennica* (Regel) Kom., Pinaceae) // Новости систематики высших растений. М.СПб., 2011. Т. 42. С. 5–23.
6. Политов Д.В. Генетика популяций и эволюционные взаимоотношения видов сосновых Северной Евразии: Автореф. дис. ...докт. биол. наук. М., 47 с.
7. Попов П.П. 1996. Гибридная ель на северо-востоке Европы // Лесоведение. № 2. С. 62–72.
8. Попов П.П. 2000. Оценка влияния интрогрессивной гибридизации елей европейской и сибирской на структуру популяций // Проблемы взаимодействия человека и природной среды. Материалы итоговой науч. сессии Ученого совета Ин-та проблем освоения Севера СО РАН. Вып. 1. Тюмень.
9. Попов П.П. 2010. Формовая структура и географическая дифференциация популяций ели на северо-западе России // Экология. № 5. С. 336–343.
10. Раменский Л.Г., Цаценкин И.А., Чижиков О.Н., Антипин Н.А. 1956. Экологическая оценка кормовых угодий по растительному покрову. М.: Государственное издательство сельскохозяйственной литературы, 472 с.
11. Сукачев В.Н. 1912. Растительность верхней части бассейна реки Тунгира Олекминского округа Якутской области // Труды Амурской экспедиции. Вып. 16. 286 с.
12. Сукачев В.Н. 1934. Дендрология с основами лесной геоботаники. Ленинград: Гослестехиздат. 614 с.
13. Шенников А.П. 1938. Луговая растительность СССР // Растительность СССР. Т. 1. М.; Л.: Изд-во АН СССР, С. 429–647.
14. Acheré V., Faivre-Rampant P., Jeandroz S. et al., 2004. A full saturated linkage map of *Picea abies* including AFLP, SSR, ESTP, 5S rDNA and morphological markers // Theor. Appl. Genet. V.108. P. 1602–1613.
15. Bousquet J., Simon L., Lalonde M. 1990. DNA amplification from vegetative and sexual tissues of trees using polymerase chain reaction // Can. J. For. Res. V. 20. P. 254–257.
16. Evanno G., Regnaut S., Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study // Mol. Ecol. Vol. 14. P. 2611–2620.
17. Farjon A. 2001. World checklist and bibliography of conifers. 2nd ed. Kew. 309 p.
18. Krutovskii K.V., Bergmann F. 1995. Introgressive hybridisation and phylogenetic relationships between Norway, *Picea abies* (L.) Karst. and Siberian, *P. obovata* Ledeb., spruce species studied by isozyme loci // Heredity. V. 74. P. 464–480.
19. Paglia G., Morgante M. 1998. PCR-based multiplex DNA fingerprinting techniques for the analysis of conifer genomes // Mol. Breed. V. 4. P. 173–177.
20. Peakall R., Smouse P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // Molecular Ecology Notes. V. 6. P. 288–295.
21. Pritchard J.K. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data // Genetics. V. 155. P. 945–959.
22. Rungis D., Bérubé Y., Zhang J. et al., 2004. Robust simple sequence repeat markers for spruce (*Picea* spp.) from expressed sequence tags // Theor. Appl. Genet. V. 109 (6). P. 1283–1294.
23. Schmidt-Vogt H. 1977. Die Fichte. Verlag Paul Parey. Hamburg, Germany.
24. Scotti I., Magni F., Fink R. et al., 2000. Microsatellite repeats are not randomly distributed within Norway spruce (*Picea abies* K.) expressed sequences // Genome. V. 43. P. 41–46.
25. Tollefsrud M.M., Kissling R., Gugerli F. et al., 2008. Genetic consequences of glacial survival and postglacial colonization in Norway spruce: combined analysis of mitochondrial DNA and fossil pollen // Mol. Ecol. V.17 (18). P. 4134–4150.
26. Tollefsrud M.M., Sønstebo J.H., Brochmann C. et al., 2009. Combined analysis of nuclear and mitochondrial markers provide new insight into the genetic structure of North European *Picea abies* // Heredity. V. 102 (6). P. 549–562.
27. Wahlund S. 1928. Zusammensetzung von Populationen und Korrelationserscheinungen von Standpunkt der Vererbungslehre aus Betrachtet // Hereditas. V. 11. P. 65–106.
28. Wright S. 1951. The genetical structure of populations // Annual Eugenics. V. 15. P. 323–354.
29. Wright S. 1978. Variability within and among natural populations // Evolution and the Genetics of Populations. The University of Chicago Press, Chicago. V. 4.

**GENETIC DIFFERENTIATION OF SPRUCE POPULATIONS IN NORTHWEST RUSSIA REVEALED WITH MICROSATELLITE MARKERS**

*Potokina E. K., Orlova L. V., Vishnevskaya M. S., Alekseeva E. A., Potokin A. F., Egorov A. A.*

✿ **SUMMARY:** Analysis of genetic diversity of spruce populations in northwest Russia using microsatellite markers revealed two moderately distinctive genetic clusters. One of them combined trees that were determined by morphological features as *P. abies*. The other cluster included trees identified as *P. obovata* and *P. fennica*. The SSR analysis does not support taxonomical independence of the hybrid-derived species *P. fennica*. Occurrence of *P. abies* genotypes revealed by SSR analysis significantly decreases from the south to the north.

✿ **KEY WORDS:** Population; microsatellites; Picea; North-West Russia.

✿ Сведения об авторах

**Потокина Елена Кирилловна** — заведующая лабораторией, д. б. н., ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства им. Н. И. Вавилова Российской академии сельскохозяйственных наук, лаборатория мониторинга генетической эрозии. 190000, С.-Петербург, ул. Б. Морская, д. 42-44. E-mail: pln@cnsnb.ru.

**Орлова Лариса Владимировна** — научный сотрудник, к. б. н., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ботанический институт им. В. Л. Комарова Российской академии наук, Гербарий высших растений. 197376, г. Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 2. E-mail: bot\_museum@mail.ru.

**Вишневская Мария Сергеевна** — аспирант, ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства им. Н. И. Вавилова Российской академии сельскохозяйственных наук, лаборатория мониторинга генетической эрозии. 190000, С.-Петербург, ул. Б. Морская, д. 42-44. E-mail: pln@cnsnb.ru.

**Алексева Екатерина Алексеевна** — лаборант-исследователь, ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства им. Н. И. Вавилова Российской академии сельскохозяйственных наук, лаборатория генетической эрозии растительных ресурсов. 190000, С.-Петербург, ул. Б. Морская, д. 42-44. E-mail: pln@cnsnb.ru.

**Потокин Александр Федорович** — доцент, к.б.н., Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный лесотехнический университет имени С. М. Кирова», Лесохозяйственный факультет, кафедра ботаники и дендрологии. 194021, Санкт-Петербург, Институтский пер., д.5. E-mail: public@ftacademy.ru.

**Егоров Александр Анатольевич** — доцент, к.б.н., Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный лесотехнический университет имени С. М. Кирова», Лесохозяйственный факультет, кафедра ботаники и дендрологии. 194021, Санкт-Петербург, Институтский пер., д.5. E-mail: public@ftacademy.ru.

**Potokina Elena Kirillovna** — Head of Laboratory, PhD, Vavilov Institute of Plant Industry (VIR), Laboratory of monitoring genetic erosion. B. Morskaja str., 42-44, Saint-Petersburg, 190000. E-mail: pln@cnsnb.ru.

**Orlova Larisa Vladimirovna** — Scientific researcher, PhD, Federal State Budget Organization of Science Komarov Botanical Institute RAS, Herbarium of Higher Plants. Prof. Popov str., 2, Saint-Petersburg, 197376. E-mail: bot\_museum@mail.ru.

**Vishnevskaya Maria Sergeevna** — PhD student, Vavilov Institute of Plant Industry (VIR), Laboratory of monitoring genetic erosion. B. Morskaja str., 42-44, Saint-Petersburg, 190000. E-mail: pln@cnsnb.ru.

**Alekseeva Ekaterina Alekseevna** — MS student, Vavilov Institute of Plant Industry (VIR), Laboratory of monitoring genetic erosion. B. Morskaja str., 42-44, Saint-Petersburg, 190000. E-mail: pln@cnsnb.ru.

**Potokin Alexander Fedorovich** — associate professor, PhD, Saint Petersburg State Forest Technical University, Faculty of Forestry, Department of Botany and Dendrology. Institutskiy lane, 5, Saint-Petersburg, 194021. E-mail: public@ftacademy.ru.

**Egorov Alexander Anatolyevich** — associate professor, PhD, Saint Petersburg State Forest Technical University, Faculty of Forestry, Department of Botany and Dendrology. Institutskiy lane, 5, Saint-Petersburg, 194021. E-mail: public@ftacademy.ru.