

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА И ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ РЕЛИКТОВЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ЛИПЫ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ИЗМЕНЧИВОСТИ ЯДЕРНЫХ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ

© 2021 г. А. К. Экарт^{1, *}, А. Я. Ларионова¹, А. Н. Кравченко¹, С. А. Семерикова², М. И. Седаева¹¹Институт леса им. В.Н. Сукачева Сибирского отделения
Российской академии наук, Красноярск, 660036 Россия²Институт экологии растений и животных Уральского отделения
Российской академии наук, Екатеринбург, 620144 Россия

*e-mail: aekart@yandex.ru

Поступила в редакцию 28.08.2020 г.

После доработки 24.09.2020 г.

Принята к публикации 10.10.2020 г.

Впервые на основании анализа изменчивости 12 микросателлитных маркеров ядерного генома изучено генетическое разнообразие, структура и дифференциация реликтовых насаждений липы в Красноярском крае, рассматриваемых в качестве отдельного вида *Tilia nasczokinii* Stepanov. Кроме того, в исследование были включены шесть популяций *T. cordata* Mill. из европейской и западно-сибирской частей ее ареала и популяция *T. sibirica* Bayer из Кемеровской области. Обнаружено, что насаждения липы в окрестностях г. Красноярска (Манское займище и Каштак) имеют сходную генетическую структуру и находятся в состоянии, близком к равновесному. Уровень генетической изменчивости *T. nasczokinii* сопоставим с таковым в популяции *T. sibirica*, но оказался значительно ниже, чем в популяциях *T. cordata*. Оценка степени генетической дифференциации популяций липы по межпопуляционным парным значениям F_{st} и генетическим дистанциям Нея (D_{N72}) выявила значительные различия популяций *T. nasczokinii* от популяций *T. cordata* и *T. sibirica*. Анализ генетической дифференциации методом РСрА парных значений F_{st} и индивидуальных генетических дистанций (D), а также кластеризация в STRUCTURE показали разделение изученных популяций на три группы согласно их видовой принадлежности. При этом популяции *T. nasczokinii* генетически удалены от популяций *T. sibirica* в большей степени, чем от *T. cordata*.

Ключевые слова: генетическое разнообразие, структура, дифференциация, *Tilia nasczokinii*, ядерные микросателлитные локусы.

DOI: 10.31857/S0016675821070079

На территории России наибольшее распространение имеют два вида липы: липа мелколистная (*Tilia cordata* Mill.) и липа амурская (*Tilia amurensis* Rupr.). В Сибири, помимо *T. cordata*, крайне восточная часть ареала которой достигает р. Иртыш, липа встречается в Кемеровской области. Самое крупное из известных насаждений липы находится в предгорьях Кузнецкого Алатау вблизи села Кузедеево (Государственный памятник природы “Липовый остров”). Оно достаточно хорошо исследовано несколькими поколениями ботаников [1–6]. Кроме того, в Кемеровской области выявлено и описано несколько десятков более мелких изолированных насаждений липы [6], предположительно сохранившихся на территории области с третичного доледникового периода. Впервые гипотеза о реликтовом происхождении липы в Южной Сибири была выдвинута П.Н. Крыловым [1] и в дальнейшем поддержана другими ис-

следователями [7–9]. Ряд авторов [10–12], указывая на значительные морфологические различия между произрастающей в Кемеровской области липы и *T. cordata*, рассматривают ее в качестве отдельного вида *Tilia sibirica* Bayer. Некоторые исследователи [13] считают, что южно-сибирские популяции липы являются подвидом *T. cordata* subsp. *sibirica* (Fischer ex Bayer) Pigott или формой *T. cordata* var. *sibirica* (Fischer ex Bayer) Maximowicz. Согласно современной международной классификации *T. sibirica* до сих пор остается неопределенным видом [14].

Следует однако отметить, что в последние годы в связи с разработкой ДНК-маркеров ядерного генома, пригодных для популяционно-генетических исследований различных видов липы [15], появились новые данные, подтверждающие видовой статус *T. sibirica*. Сравнительное исследование *T. sibirica* из окрестностей села Кузедеево, где на-

блюдается самая высокая в Южной Сибири концентрация липы этого вида, и *T. cordata* из Австрии, Польши и России (Тюменская область) по 12 ядерным микросателлитным локусам [16] показало значительную генетическую дифференциацию между ними (F_{st} варьировал от 0.151 до 0.303). Обнаружено, что популяции *T. sibirica* имеют более низкое генетическое разнообразие и более высокую частоту вегетативного (клонального) размножения по сравнению с изученными популяциями *T. cordata*. На основании полученных данных [16] о генетических различиях между популяциями *T. sibirica* и *T. cordata* и выявленных ранее другими исследователями различий по морфологическим признакам [12, 13], экологической и географической изоляции *T. sibirica* авторы делают заключение о том, что *T. sibirica* и *T. cordata* являются разными видами.

Небольшие изолированные насаждения липы существуют также в окрестностях г. Красноярск. Впервые сведения о реликтовых насаждениях липы на территории Красноярского края появились еще в XIX в. [17–19]. Большинство исследователей описывали ее как *T. sibirica* [20–22]. Т.Н. Буторина и В.Д. Нащокин [23] отмечая своеобразие липы, произрастающей вблизи Красноярск, предложили для нее ранг подвида *T. sibirica* ssp. *jenisseensis* Butor. На особенности морфологии цветков и плодов красноярской липы указывал в своей работе и Л.М. Черепнин [24]. Он активно поддерживал выделение нового таксона. Однако данный таксон так и остался “nomen nudum” — необнародованным. В качестве нового вида *Tilia nasczokinii* Stepanov sp. nov. = *T. sibirica* ssp. *jenisseensis* красноярскую липу описал Н.В. Степанов [25], основываясь на существенных морфологических отличиях ее от *T. cordata*, *T. amurensis* и *T. sibirica* по признакам завязи, зубцов по краю листа и почечных чешуй. Наиболее значительные различия по морфологическим признакам наблюдаются между красноярской липой и липами мелколистной и сибирской. По отдельным признакам (зубчатость листовой пластинки) красноярская липа имеет сходство с *T. amurensis*, однако для установления степени их родства требуются дополнительные исследования [25]. Достоверные различия между липой из окрестностей Красноярск и липой мелколистной из восточных районов ее ареала (Омская область) были получены также по ряду морфометрических характеристик листовых пластин [26]. По мнению авторов этого исследования *T. nasczokinii* и *T. cordata* являются близкими, но экологически довольно обособленными видами.

Несмотря на географическую удаленность и существенные отличия липы из Красноярского края от *T. cordata* и *T. sibirica* по экологическим условиям обитания, фенологии, морфологическим признакам, видовой статус *T. nasczokinii* до

настоящего времени не получил международного признания и остается неопределенным [14].

На сегодняшний день достоверно известно о двух изолированных местообитаниях липы, расположенных в окрестностях г. Красноярск. Одно из них, впервые описанное Я. Прейном [19], расположено на левом берегу Енисея, в 18 км выше г. Красноярск, на склонах хребта у так называемого Манского займища. Второе, обнаруженное сотрудниками государственного заповедника “Столбы” в 1951 г., находится на правом берегу Енисея у северной границы заповедника, на склоне невысокой гривы, в долине ручья Каштак [23, 25, 27].

Произрастающая вблизи Красноярск липа является единственным представителем широколиственных древесных растений, сохранившихся на территории Красноярского края с третичного доледникового периода, и является ценным объектом для генетических исследований. Однако ни одно из обнаруженных местообитаний липы до настоящего времени в этом отношении не изучалось. Нет данных о состоянии генофонда и репродуктивных возможностях насаждений красноярской липы, о филогенетических связях с популяциями липы из других регионов Сибири. Использование для ее изучения методов молекулярной генетики, основанных на анализе изменчивости ДНК-маркеров, даст возможность получить информацию о генетическом разнообразии, структуре и степени дифференциации реликтовых насаждений красноярской липы от популяций других близких видов, необходимую как для обоснования правомерности выделения липы из окрестностей Красноярск в качестве отдельного вида, так и для выполнения работ по сохранению и воспроизводству этих уникальных реликтовых насаждений.

Цель настоящего исследования — изучение генетического разнообразия, структуры и степени генетической дифференциации *T. nasczokinii* от популяций *T. sibirica* и *T. cordata* на основе анализа изменчивости ядерных микросателлитных локусов (nSSR).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучены две известные в окрестностях г. Красноярск популяции *T. nasczokinii* (Манское займище и Каштак), популяция *T. sibirica* из Кемеровской области (Кузедеево) и шесть популяций *T. cordata* из европейской и западно-сибирской частей ареала этого вида (Калининград, Луга, Плющань, Малиновка, Екатеринбург, Тобольск). Объем выборки варьировал от 19 до 29, составляя в среднем 23.8. Всего было проанализировано 214 особей. Географические координаты включенных в исследование популяций липы приведены в табл. 1.

Таблица 1. Местоположение и основные параметры изменчивости исследованных популяций *T. naseczokinii*, *T. sibirica* и *T. cordata*

Популяция	Координаты с.ш./в.д.	<i>n</i>	<i>P</i> , %	<i>N_a</i>	<i>N_e</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	<i>F</i>
<i>T. naseczokinii</i>								
Манское займище	55°57'51"/92°29'57"	24	75.0	2.92	1.59	0.285	0.312	0.080
Каштак	55°57'26"/92°46'41"	19	91.7	2.50	1.45	0.263	0.253	-0.003
<i>T. sibirica</i>								
Кузедеево	53°19'54"/87°13'59"	23	58.3	2.25	1.41	0.228	0.197	-0.117
<i>T. cordata</i>								
Екатеринбург	56°53'31"/60°19'34"	29	91.7	5.83	2.78	0.500	0.548	0.104
Тобольск	58°18'42"/68°26'54"	25	91.7	4.67	2.50	0.403	0.493	0.204
Малиновка	51°46'45"/56°50'17"	24	91.7	3.92	2.35	0.449	0.485	0.062
Плющань	52°49'00"/38°59'00"	24	91.7	4.92	2.58	0.462	0.532	0.131
Луга	58°52'16"/29°50'56"	26	83.3	4.58	2.63	0.452	0.502	0.095
Калининград	54°56'43"/20°05'15"	20	91.7	4.83	2.92	0.400	0.567	0.316

Примечание. *n* – объем выборки.

Выделение геномной ДНК проводили по стандартному протоколу для растительных тканей с применением СТАВ-метода из высушенных листьев [28]. Выделенную ДНК использовали для проведения ПЦР с 12 парами праймеров для микросателлитных последовательностей, разработанных и апробированных для 23 видов липы [15]. Для ПЦР-амплификации использовали универсальный беспраймерный набор УБП 1–4 ООО “НПФ “Генлаб” (Россия) согласно рекомендациям производителя. Амплификацию отобранных ядерных микросателлитных локусов (Tc4, Tc5, Tc6, Tc7, Tc8, Tc11, Tc915, Tc920, Tc927, Tc937, Tc943, Tc951) проводили при следующем режиме: предварительная денатурация ДНК при 95°C – 5 мин; далее 30 циклов, включающих денатурацию – 30 с при 94°C; отжиг праймеров – 40 с при 60°C и элонгация – 40 с при 72°C. Завершающий цикл элонгации проходил при 72°C в течение 5 мин.

Электрофоретическое разделение амплифицированных фрагментов ДНК проводили в 6%-ном полиакриламидном геле с использованием Трис-ЭДТА-боратной буферной системы, pH 8.3 при напряжении 15 В/1 см геля в течение 2–3 ч с последующей окраской нитратом серебра. Длину фрагментов определяли путем сопоставления со стандартным маркером O’Range Ruler 20 bp DAN Ladder (Thermo Scientific, Литва). Варианты размера фрагмента рассматривали в качестве аллелей данного локуса.

Популяционно-генетический анализ проводили на основании общепринятых в популяционной генетике статистических параметров, описывающих уровень изменчивости и дифференциации популяций. Расчет параметров проводился в

GenAlEx 6.502 [29]. Уровень генетической изменчивости в популяциях липы по 12 микросателлитным локусам определяли по следующим показателям: *P* – процент полиморфных локусов, *N_a* – число выявленных аллелей, *N_e* – эффективное число аллелей, *H_o* – наблюдаемая гетерозиготность, *H_e* – ожидаемая гетерозиготность, *F* – индекс фиксации. Для определения популяционной структуры и дифференциации популяций использовались коэффициенты *F*-статистики [30]. Количественная оценка степени генетических различий (*D_{N72}*) между популяциями проводилась по методу, предложенному М. Неи [31]. Соответствие наблюдаемых в популяциях соотношений генотипов ожидаемым по закону Харди–Вайнберга определялось с помощью критерия χ^2 . Кроме того, с помощью программы GenAlEx 6.502 проведен анализ иерархического распределения генетической изменчивости внутри популяций, между популяциями внутри видов, между видами (AMOVA), а также проведена ординация популяций на плоскости главных координат (Principal Coordinates Analysis, PCoA) на основе матриц межпопуляционных парных значений *F_{st}* и индивидуальных генетических дистанций *D* [32].

Принадлежность особей общей выборки к той или иной группе популяций определяли методом Байесовской кластеризации, реализованным в программе STRUCRURE v2.3.4 [33]. Количество кластеров (*K*) оценивалось в диапазоне от двух до четырех с числом повторов 1000 раз (burnin 10⁴, MCMC 10⁴). Оптимальное число кластеров устанавливалось методом Evanno ΔK [34] в STRUCRURE HARVESTER [35]. Усреднение значений *Q*-матрицы проводилось по алгоритму LargeKGreedy

Таблица 2. Общее число аллелей и число аллелей, выявленных в популяциях *T. nasczokinii*, *T. sibirica* и *T. cordata*, размеры амплифицируемых фрагментов

Локус	Общее число выявленных аллелей	Размер фрагмента, пн	Число выявленных аллелей		
			<i>T. nasczokinii</i>	<i>T. sibirica</i>	<i>T. cordata</i>
Tc4	8	228–244	6	2	8
Tc5	17	150–190	4	3	16
Tc6	14	131–163	5	4	12
Tc7	4	222–240	2	1	4
Tc8	1	144	1	1	1
Tc11	5	136–156	2	1	5
Tc915	16	159–189	4	5	16
Tc920	10	226–244	4	1	10
Tc927	4	147–157	3	1	2
Tc937	9	152–172	4	4	9
Tc943	4	147–159	2	2	4
Tc951	4	159–165	4	2	4
Всего	96		41	27	91

(10⁴ повторов) в CLUMPP v1.1.2 [36]. Визуализация данных осуществлялась в DISTRUCT v1.1 [37].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из 12 включенных в исследование ядерных микросателлитных локусов лишь один локус (Tc8) оказался мономорфным в изученных популяциях липы. Остальные локусы обнаруживают изменчивость. Наиболее высокий уровень полиморфизма наблюдается в локусах Tc5 (17 аллелей), Tc915 (16 аллелей) и Tc6 (14 аллелей). В других полиморфных локусах число выявленных аллелей варьирует от четырех (Tc7, Tc927, Tc943, Tc951) до 10 (Tc920). Всего при анализе 214 индивидов липы из девяти популяций идентифицировано 96 аллелей, 15 из которых являются общими в популяциях трех видов липы (табл. 2). Самое большое аллельное разнообразие обнаружено у *T. cordata*. В разных популяциях этого вида общее число выявленных аллелей колеблется в пределах от 47 (Малиновка) до 70 (Екатеринбург), составляя в среднем 57.5. В популяциях *T. nasczokinii* число выявленных аллелей ниже, чем у *T. cordata*: 35 (Манское займище) и 29 (Каштак). В популяции *T. sibirica* (Кузедеево) обнаружено минимальное среди изученных популяций число аллельных вариантов (27). Большая часть выявленных в локусах аллелей встречается в популяциях с частотой менее 5%. В отдельных популяциях число редких аллелей варьирует от восьми (Каштак, Кузедеево) до 25 (Екатеринбург). Больше всего редких аллелей обнаружено в популяциях *T. cordata*.

Рассчитанные значения основных показателей генетического разнообразия в изученных по-

пуляциях трех видов липы приведены в табл. 1. Из представленных данных видно, что произрастающая в окрестностях г. Красноярска липа (*T. nasczokinii*) имеет более низкие по сравнению с *T. cordata* показатели генетической изменчивости. Доля полиморфных локусов в исследованных популяциях *T. nasczokinii* составляет 75.0 и 91.7%, среднее число аллелей на локус 2.50 и 2.92, эффективное число аллелей 1.45 и 1.59, наблюдаемая гетерозиготность 0.263 и 0.285, ожидаемая гетерозиготность 0.253 и 0.312. В популяциях *T. cordata* значения этих показателей значительно выше и варьируют в диапазоне: 83.3–91.7%, 3.92–5.83, 2.35–2.92, 0.400–0.500 и 0.493–0.567 соответственно. Самый низкий уровень генетического разнообразия среди изученных популяций наблюдается у *T. sibirica* (табл. 1). В проведенном ранее сравнительном исследовании популяций *T. sibirica* и *T. cordata* по аналогичному набору микросателлитных локусов [16] также отмечается низкое генетическое разнообразие *T. sibirica*. В двух популяциях обнаружен избыток (F равен -0.003 и -0.117), а в остальных – недостаток гетерозиготных генотипов (F варьирует от 0.080 до 0.316). Самый большой дефицит гетерозигот по изученным микросателлитным локусам установлен в одной из популяций *T. cordata* (Калининград). В этой популяции достоверные различия между наблюдаемой и ожидаемой в соответствии с законом Харди–Вайнберга гетерозиготностью, установленные по χ^2 -тестам, выявлены у шести из 12 микросателлитных локусов. В популяциях *T. nasczokinii* (Манское займище, Каштак) существенные отклонения наблюдаемых частот генотипов от ожидаемых обнаружены лишь у одного–двух локусов. В целом, по совокупности

Таблица 3. Значения индексов фиксации для проанализированных локусов

Локус	F_{is}	F_{it}	F_{st}
Tc4	0.285	0.400	0.161
Tc5	-0.052	0.058	0.105
Tc6	0.158	0.303	0.172
Tc7	0.293	0.381	0.124
Tc11	0.184	0.306	0.149
Tc915	0.235	0.314	0.103
Tc920	0.002	0.253	0.251
Tc927	0.430	0.480	0.088
Tc937	-0.037	0.218	0.246
Tc943	-0.038	0.315	0.339
Tc951	-0.037	0.333	0.357
В среднем	0.129 ± 0.049	0.306 ± 0.031	0.191 ± 0.027

проанализированных локусов, популяции красной липы находятся в состоянии близком к равновесному.

Исследование популяционной структуры с помощью F -статистик показало, что 19.1% ($F_{st} = 0.191$) выявленной генетической изменчивости приходится на межпопуляционную составляющую. Остальная изменчивость распределяется внутри популяций. Самый большой вклад в дифференциацию популяций вносят четыре локуса: Tc920, Tc937, Tc943 и Tc951 (F_{st} варьирует от 0.246 до 0.357). Значения F_{is} и F_{it} , отражающие соответственно инбридинг особи относительно популяции и инбридинг особи относительно совокупности изученных популяций, равны в среднем 0.129 и 0.306 (табл. 3). Полученные оценки этих показателей указывают на недостаток гетерозиготных генотипов. Как видно из приведенных в таблице данных, наиболее значительный дефицит гетерозигот наблюдается в локусе Tc927 ($F_{is} = 0.430$).

Достаточно высокий уровень генетической дифференциации изученных популяций липы подтверждается результатами анализа иерархической структуры молекулярной изменчивости AMOVA (табл. 4). Доля изменчивости, обеспечивающая

дифференциацию между тремя видами липы, составила 21% от общего генетического разнообразия. Это более чем в 3 раза больше доли изменчивости, распределяемой среди популяций внутри видов (6%). Внутрипопуляционная генетическая изменчивость составляет 73%.

Для оценки степени генетической дифференциации популяций липы использовали межпопуляционные парные значения F_{st} и генетические расстояния D_{N72} (табл. 5). Наиболее высокие значения F_{st} обнаружены между популяциями *T. nasczokinii* и популяцией *T. sibirica*. Значения F_{st} между популяциями этих видов равны 0.514 и 0.586. В меньшей степени популяции *T. nasczokinii* дифференцированы от популяций *T. cordata*. Парные значения F_{st} варьируют от 0.194 до 0.320, составляя в среднем 0.248. Немного выше степень дифференциации популяций *T. cordata* и *T. sibirica*. F_{st} варьирует от 0.280 до 0.386 (среднее значение F_{st} равно 0.313). Сопоставимые значения F_{st} между популяциями *T. sibirica* и *T. cordata* получены ранее [16]. Авторами отмечена высокая генетическая дифференциация между этими таксонами, произошедшая в результате экологической и географической изоляции *T. sibirica* в Южной Сибири в среднем плейстоцене (примерно 447 тыс. лет назад). Самый низкий уровень различий наблюдается между популяциями внутри видов. F_{st} колеблется в пределах от 0.018 до 0.092 со средним значением 0.061 (табл. 5).

Сходные результаты получены при использовании в качестве меры дифференциации генетических расстояний D_{N72} . Среднее генетическое расстояние между популяциями разных видов ($D_{N72} = 0.357$) в несколько раз больше расстояния между популяциями внутри видов ($D_{N72} = 0.073$). Как и в случае с F_{st} , максимальный уровень генетических различий наблюдается между популяциями *T. nasczokinii* и *T. sibirica* ($D_{N72} = 0.511$).

Для визуализации генетических различий между изученными видами липы на основе индивидуальных парных генетических расстояний D [33] был выполнен PCoA. На рис. 1 видно, что исследованные популяции *T. nasczokinii*, *T. sibirica* и *T. cordata* образуют три пространственно разоб-

Таблица 4. Анализ молекулярной изменчивости (AMOVA) изученных популяций *T. nasczokinii*, *T. sibirica* и *T. cordata*

Источник изменчивости	$d.f.$	Сумма квадратов отклонений	Компоненты изменчивости	Доля (%) изменчивости	Значение p
Между видами	2	179.86	89.93	0.776 (21)	0.001
Между популяциями внутри видов	6	74.21	12.37	0.201 (6)	0.001
Внутри популяций	419	1134.4	2.71	2.707 (73)	0.001
Всего	427	1388.5		3.685 (100)	

Таблица 5. Межпопуляционные парные значения F_{st} (ниже диагонали) и генетические дистанции D_{N72} (выше диагонали) между популяциями *T. naszokinii*, *T. sibirica* и *T. cordata*

Вид	<i>T. naszokinii</i>		<i>T. sibirica</i>	<i>T. cordata</i>					
	МЗ	КШ	КЗ	ЕК	ТБ	МЛ	ПЛ	ЛГ	КЛ
МЗ	–	0.048	0.473	0.208	0.261	0.297	0.218	0.202	0.212
КШ	0.085	–	0.549	0.285	0.330	0.361	0.309	0.287	0.222
КЗ	0.514	0.586	–	0.272	0.257	0.407	0.292	0.290	0.244
ЕК	0.194	0.257	0.286	–	0.057	0.126	0.052	0.105	0.120
ТБ	0.245	0.305	0.301	0.031	–	0.113	0.079	0.090	0.119
МЛ	0.265	0.320	0.386	0.082	0.082	–	0.090	0.106	0.152
ПЛ	0.206	0.279	0.309	0.023	0.048	0.057	–	0.042	0.109
ЛГ	0.202	0.276	0.317	0.066	0.061	0.074	0.018	–	0.108
КЛ	0.200	0.224	0.280	0.064	0.073	0.092	0.058	0.066	–

Примечание. МЗ – Манское займище, КШ – Каштак, КЗ – Кузедеево, ЕК – Екатеринбург, ТБ – Тобольск, МЛ – Малиновка, ПЛ – Плющань, ЛГ – Луга, КЛ – Калининград.

шенные группы, что свидетельствует о значительной дифференциации этих видов. Аналогичные результаты получены при РСoA парных значений F_{st} (рис. 2). Наиболее удалены друг от друга популяции *T. naszokinii* и *T. sibirica*, обнаруживающие самый высокий уровень генетической дифференциации среди всех изученных популяций.

Кластеризация проанализированных особей в STRUCTURE подтверждает результаты, полученные при анализе парных значений F_{st} и индивидуальных генетических дистанций. При использовании метода Evanno ΔK изученные деревья липы распределились в трех кластерах в соответствии с их видовой принадлежностью (рис. 3).

Таким образом, в результате исследования, проведенного с помощью 12 ядерных микросателлитных локусов, получены данные о генетическом разнообразии, структуре и дифференциации реликтовых популяций липы из окрестностей г. Красноярска, рассматриваемых Н.В. Степановым [25] в качестве нового вида *T. naszokinii*. Установлено, что изученные популяции *T. naszokinii*: Манское займище и Каштак имеют более низкие параметры генетической изменчивости по сравнению с популяциями *T. cordata* из европейской и западно-сибирской частей ареала этого вида. Самый низкий уровень генетического разнообразия среди изученных популяций наблюдается у *T. sibirica* из Кемеровской области. Включенные в исследование

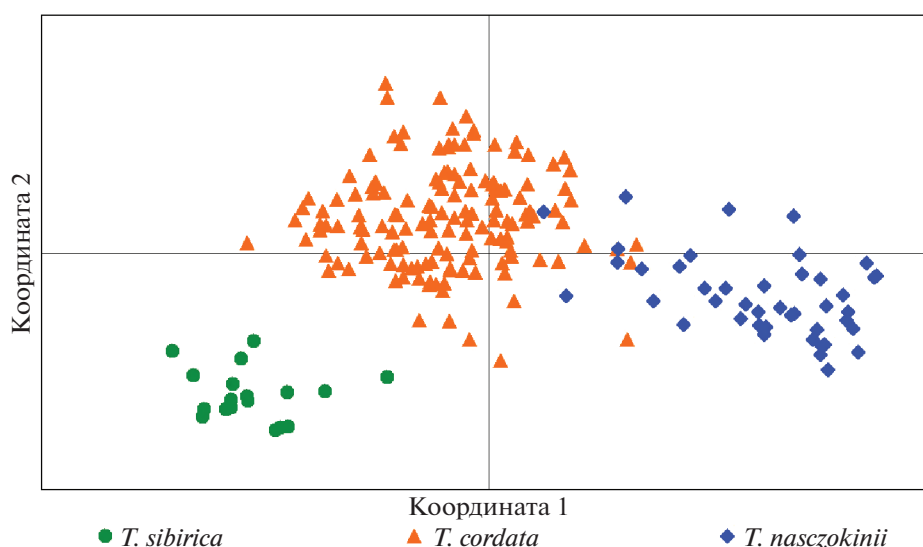


Рис. 1. Дифференциация 214 особей липы на основе РСoA матрицы индивидуальных генетических дистанций (D). Координаты 1 и 2 суммарно представляют 27% генетической изменчивости.

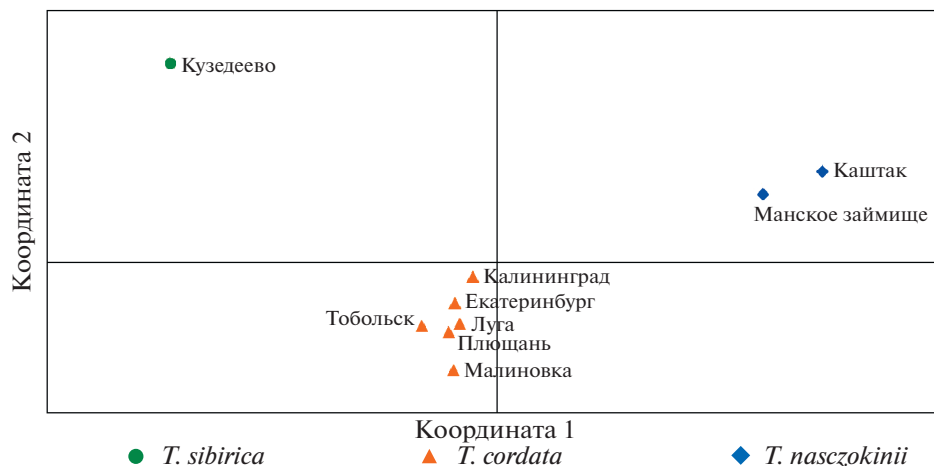


Рис. 2. Дифференциация изученных популяций липы на основе PCoA матрицы парных значений F_{st} . Координаты 1 и 2 суммарно представляют 77% генетической изменчивости.

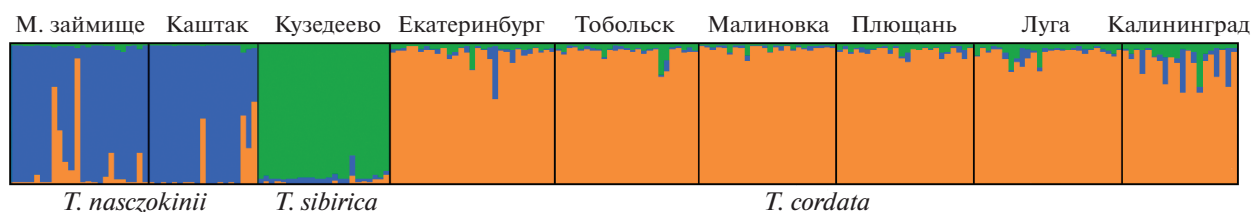


Рис. 3. Распределение 214 изученных особей липы на основе Байесовского кластерного анализа, выполненного в STRUCTURE.

популяции *T. nasczokinii* имеют сходную генетическую структуру и по совокупности проанализированных локусов ни одна из них не обнаруживает существенных отклонений от равновесного состояния по Харди–Вайнбергу.

Анализ генетической дифференциации различными методами показал разделение популяций на три группы. При этом популяции *T. nasczokinii* генетически удалены от популяций *T. sibirica* в большей степени, чем от *T. cordata*. Таким образом, принадлежность красноярских популяций липы к виду *T. sibirica* или к подвиду *T. sibirica* ssp. *jenisseensis* является генетически необоснованной.

Для подтверждения видового статуса красноярской липы необходимы дальнейшие более обширные исследования с привлечением большего числа популяций липы из сибирских регионов, а также популяций дальневосточного вида *T. amurensis*, которая по ряду морфологических признаков обнаруживает сходство с *T. nasczokinii* [25]. Кроме того, представляется целесообразным использование других генетических маркеров, в частности маркеров цитоплазматических геномов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, Правительства Красноярского края и Красноярского краевого фонда науки в рамках

научного проекта № 19-44-240006 p_a, а также при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 18-04-01061a.

Авторы выражают искреннюю благодарность профессору Сибирского федерального университета Н.В. Степанову, сотрудникам Национального парка “Красноярские Столбы” А.А. Кнорре и Д.Ю. Полянской за предоставленную информацию о местонахождении популяций липы в окрестностях Красноярска, а также сотрудникам Института экологии растений и животных УрО РАН В.Л. Семерикову, Е.В. Хантемировой и сотруднику Ботанического сада УрО РАН Е.Г. Филиппову за участие в сборе образцов *T. cordata* и *T. sibirica*.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Крылов П.Н. Леса в прегорьях Кузнецкого Алатау // Изв. Импер. Томского ун-та. Отдел 2. 1891. С. 1–40.

2. *Ревердатто Л.Ф.* К вопросу о судьбе липового острова в Кузнецком Алатау // Изв. Томского ун-та. 1925. Т. 75. С. 277–282.
3. *Крылов П.Н.* Семейство Tiliaceae – Липовые // Флора Западной Сибири: руководство к определению западносибирских растений. Вып. 8: Geraniaceae – Cognaceae. Томск: Наука, 1934. С. 1891–1894.
4. *Грубов В.И.* О современном состоянии липового острова в предгорьях Кузнецкого Алатау // Сов. ботаника. 1940. № 1. С. 84–85.
5. *Хлонов Ю.П.* Леса и липники Западной Сибири. Новосибирск: Наука, 1965. 154 с.
6. *Амелин И.И., Бляхарчук Т.А.* Распространение липы сибирской (*Tilia sibirica* Bayer) в Кемеровской области // Вестник Томского гос. ун-та. Биология. 2016. № 2(34). С. 30–52. <https://doi.org/10.17223/19988591/34/3>
7. *Положий А.В., Крапивкина Э.Д.* Реликты третичных широколиственных лесов во флоре Сибири. Томск: Изд-во ТГУ, 1985. 156 с.
8. *Крапивкина Э.Д.* Неморальные реликты во флоре черновой тайги Горной Шории. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2009. 229 с.
9. *Novák J., Trotsiuk V., Šykora O. et al.* Ecology of *Tilia sibirica* in a continental hemiboreal forest, southern Siberia: An analogue of a glacial refugium of broad-leaved temperate trees? // The Holocene. 2014. V. 24(8). P. 908–918. <https://doi.org/10.1177/0959683614534744>
10. *Васильев И.В.* Сем. 58. Липовые – Tiliaceae Juss. // Деревья и кустарники СССР. М.; Л: Изд-во АН СССР, 1958. Т. 4. С. 659–726.
11. *Хлонов Ю.П.* Липа сибирская – *Tilia sibirica* Bayer // Биологические основы охраны редких и исчезающих растений Сибири. Новосибирск: Наука, 1990. С. 58–80.
12. *Власова Н.В.* Семейство Tiliaceae // Флора Сибири. Новосибирск: Наука, 1996. Т. 10. С. 65–66.
13. *Pigott C.D.* Lime-trees and Basswoods: A Biological Monograph of the Genus *Tilia*. N.Y.: Cambr. Univ. Press, 2012. 395 p.
14. <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Malvaceae/Tilia/>
15. *Phuekvilai P., Wolff K.* Characterization of microsatellite locus in *Tilia platyphyllos* (Malvaceae) and cross-amplification in related species // Appl. Plant Sci. 2013. V. 1(4). <https://doi.org/10.3732/apps.1200386>
16. *Logan S., Chytry M., Wolff K.* Genetic diversity and demographic history of the Siberian lime (*Tilia sibirica*) // Perspectives in Plant Ecol., Evol. and Systematics. 2018. V. 33. P. 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2018.04.005>
17. *Пестов И.С.* Записки об Енисейской губернии Восточной Сибири. М.: Унив. типография, 1833. С. 245.
18. *Степанов А.П.* Енисейская губерния. Т. 1. СПб., 1835. 276 с.
19. *Прейн Я.* Предварительный отчет об исследованиях липы в окрестностях г. Красноярска // Изв. Восточно-Сиб. отделения РГО. Иркутск, 1895. Т. 25. № 4–5. С. 95–127.
20. *Ильин М.М.* О липе в окрестностях Красноярска // Бот. журн. 1934. Т. 19. № 4. С. 34.
21. *Васильев И.В.* Новые данные о липе в окрестностях Красноярска // Бот. журн. 1953. Т. 38. № 5. С. 737–742.
22. *Положий А.В.* Сем. Tiliaceae–Липовые // Флора Красноярского края. Томск: Изд-во Томск. гос. ун-та, 1977. Вып. 7. С. 18.
23. *Буторина Т.Н., Нацокин В.Д.* Липа сибирская в заповеднике “Столбы” // Тр. гос. заповедника “Столбы”. Вып. II. Красноярское кн. изд-во, 1958. С. 152.
24. *Черепнин Л.М.* Флора южной части Красноярского края. Вып. 4 // Уч. зап. Красноярского пед. ин-та. 1963. Т. 24. № 4. С. 3–270.
25. *Степанов Н.В.* *Tilia nasczokinii* (Tiliaceae) – новый вид из окрестностей Красноярска // Бот. журн. 1993. Т. 78. № 3. С. 137–144.
26. *Сорокин А.Д., Григорьев А.И.* Особенности строения листовой пластины *Tilia cordata* Mill. и *Tilia nasczokinii* // Омский науч. вестник. Биологические, сельскохозяйственные и ветеринарные науки. 2006. № 7(43). С. 144–147.
27. *Полянская Д.Ю., Андреева Е.Б., Гончарова Н.В.* Мониторинг *Tilia nasczokinii* Stepanov в заповеднике Столбы // Научные исследования в заповедниках и национальных парках Южной Сибири. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2016. С. 46–49.
28. *Devey M.E., Bell J.C., Smith D.N. et al.* A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD and microsatellite markers // Theor. Appl. Genet. 1996. V. 92. № 6. P. 673–679. <https://doi.org/10.1007/BF00226088>
29. *Peakall R., Smouse P.E.* GENALEX 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update // Bioinformatics (Oxf., Engl.). 2012. V. 28. P. 2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
30. *Weir B.S., Cockerham C.C.* Estimating F-statistic for the analysis of population structure // Evolution. 1984. V. 38. P. 1358–1370.
31. *Nei M.* Genetic distance between populations // Am. Naturalist. 1972. V. 106. P. 283–292.
32. *Smouse P.E., Peakall R.* Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure // Heredity. 1999. V. 82. P. 561–573. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6885180>
33. *Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P.* Inference of population structure using multilocus genotype data // Genetics. 2000. V. 155. № 2. P. 945–959.
34. *Evanno G., Regnaut S., Goudet J.* Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study // Mol. Ecol. 2005. V. 14. № 8. P. 2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
35. *Earl D., vonHoldt B.* STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method // Conserv. Genet. Resour. 2012. V. 4. P. 359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
36. *Jakobsson M., Rosenberg N.A.* CLUMPP: A cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure // Bioinformatics. 2007. V. 23. № 14. P. 1801–1806. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm233>
37. *Rosenberg N.A.* Distruct: A program for the graphical display of population structure // Mol. Ecol. Notes. 2004. V. 4. P. 137–138. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.005>

Genetic Structure and Differentiation of Relicts Lime Populations Based on the Analysis of Variability of Nuclear Microsatellite Loci

A. K. Ekart^{a,*}, A. Ya. Larionova^a, A. N. Kravchenko^a, S. A. Semerikova^b, and M. I. Sedaeva^a

^a*Sukachev Institute of Forest, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, 660036 Russia*

^b*Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, 620144 Russia*

*e-mail: aekart@yandex.ru

The genetic diversity, structure and differentiation of relict lime populations in the Krasnoyarsk Territory, considered as a separate species of *Tilia nasczokinii* Stepanov, were studied for the first time on the basis of the variability of 12 microsatellite markers of the nuclear genome. In addition, the study included six populations of *Tilia cordata* Mill. from the European and West Siberian parts of its range and the population of *Tilia sibirica* Bayer from the Kemerovo region. It was found that *T. nasczokinii* populations in the vicinity of Krasnoyarsk (Manskoye Zaymishche and Kashtak) have a similar genetic structure and are in a state close to equilibrium. The level of genetic variability of *T. nasczokinii* populations is comparable to the level of variability of *T. sibirica* population, but turned out to be significantly lower than in populations of *T. cordata*. Estimation of genetic differentiation degree of lime populations by interpopulation paired F_{st} values and genetic distances Nei (D_{N72}) revealed significant differences in genetic structure between the populations of *T. nasczokinii* and populations of *T. cordata* and *T. sibirica*. Analysis of genetic differentiation by the PCoA method of paired F_{st} values and individual genetic distances (D) and clustering in STRUCTURE, showed the division of the studied populations into three groups according to their species affiliation. Moreover, *T. nasczokinii* populations are genetically more differentiated from *T. sibirica* than from *T. cordata*.

Keywords: genetic diversity, structure, differentiation, *Tilia nasczokinii*, nuclear microsatellite loci.