



УДК 575.174.015.3 (571.5)

Происхождение карликовых форм яблони сибирской на территории Республики Бурятия

Е. В. Кузнецова¹, Т. Е. Перетолчина², Ю. С. Букин²,
Д. Ю. Щербаков^{2,3}, А. В. Рудиковский¹

¹ Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск

² Лимнологический институт СО РАН, Иркутск

³ Иркутский государственный университет, Иркутск

E-mail: elen@nextmail.ru

Аннотация. Исследовали филогенетические связи между четырьмя группами яблони сибирской *Malus baccata* (L.) Borkh, произрастающими на территории Республики Бурятия при помощи шести специфических праймеров к высокополиморфным микросателлитным локусам. Группы выделяли по географическому признаку. С помощью микросателлитных маркеров установлено, что географически близко расположенные группы растений обладают высокой степенью генетической изоляции. Таким образом, возможным механизмом происхождения карликовых форм яблони сибирской может быть адаптация растений к условиям окружающей среды.

Ключевые слова: яблоня сибирская, микросателлитные маркеры, генетический полиморфизм.

Данные о генетических взаимоотношениях видов яблонь рода *Malus* противоречивы, так как до последнего времени популяционные исследования растений основывались на характеристике только морфологических признаков, на проявление которых в разной степени оказывают влияние условия окружающей среды. В настоящее время накоплен большой потенциал молекулярных методов исследования ДНК растительного материала. В связи с чем, стало возможным изучение генетических процессов в популяциях яблонь. Так, в результате исследования видового разнообразия рода *Malus* с помощью методов RAPD [8] и микросателлитных маркеров [11], определены генетические дистанции между некоторыми видами этого рода [7]. Данная информация о генетическом разнообразии яблони и конструкции праймеров может быть использована для дальнейших исследований филогенетических связей между представителями рода *Malus*.

Были найдены карликовые формы яблони сибирской, которые произрастают рядом с высокорослыми формами и резко отличаются от них морфологически [5]. Поэтому целью данной работы было проведение молекулярно-генетического анализа популяций карликовой и высокорослой формы яблони сибирской с помощью микросателлитных маркеров.

Материал и методы

Сбор материала проводился на территории Республики Бурятия. Во время летней экспедиции 2007 г. листья были собраны из четырех районов, всего в анализе участвовало 130 деревьев (рис. 1, А).

ДНК экстрагировали из листьев по модифицированной методике Дойла и Диксона [6].

Для анализа генетического разнообразия в исследуемых группах растений использовали 6 пар специфических микросателлитных праймеров: 01ab, 02b1, 04H11, 05G8, 23G4, 28F4. ПЦР проводили с помощью термоциклера GenAmp PCR system 2700 фирмы «Applied Biosystem Inc», США. Ниже приведены параметры ПЦР для микросателлитных локусов на 35 циклов: денатурация при 95 °С – 40 с (5 мин на первом цикле), отжиг праймеров при 50 °С 40 с, синтез цепи при 72 °С 20 с (10 мин на последнем цикле). Для электрофоретического разделения продуктов амплификации микросателлитов использовали 6%-ный полиакриламидный гель, содержащий 1х трис-боратный буфер, pH=7,8. Электрофорез проводили при напряжении 750 В в течение 8–9 часов (в зависимости от размера фрагмента). Затем окрашивали гель сереброем по стандартной методике.

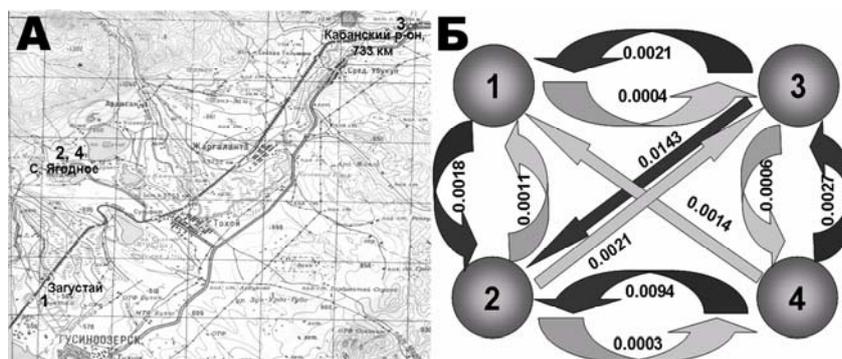


Рис. 1. А. Карта районов сбора образцов; Б. Схема потоков генов между популяциями. Цифрами обозначены номера групп растений

Филогенетическое древо по микросателлитным локусам строили с помощью матрицы генетических дистанций DAS, которая основана на частоте встречаемости аллелей у двух сравниваемых организмов, а не на разнице в длине повтора (программа Populations 1.2.30) методом объединения ближайших соседей (neighbour-joining), в программе SplitsTree 4.0.

Скорость миграции (поток генов) и значение F_{st} -критерия рассчитывали, используя информацию об эффективных размерах популяций и попарных генетических расстояниях по микросателлитным локусам. Для того чтобы рассчитать два значения F_{st} -критерия для групп яблони сибирской, выделенных по географическому расположению [12–14], оценили средние генетические дистанции между группами – \tilde{f} , а также средние генетические дистанции в первой группе – f_1 и во второй группе – f_2 (попарно для всех групп). На основании полученных средних дистанций рассчитали F_{st}^1 -степень генетической изоляции между второй группой и первой и F_{st}^2 -степень генетической изоляции между первой группой и второй по формулам:

$$F_{st}^1 = \frac{\tilde{f} - f_1}{\tilde{f}}, \quad (1)$$

$$F_{st}^2 = \frac{\tilde{f} - f_2}{\tilde{f}}. \quad (2)$$

Известно, что приближенное значение F_{st} -критерия [15; 16] можно оценить, зная эффективный размер популяции Ne и скорость миграции или поток генов m по следующей формуле:

$$F_{st} = \frac{1}{4Ne_m + 1}. \quad (3)$$

Эффективный размер популяции в данном случае принимали равным числу плодоносящих деревьев в каждой группе растений. Он составил в группе № 1 – 40 растений, в группе № 2 – 30, в № 3 и № 4 – 300 и 200 растений соответственно. Используя формулу (3), исходя из известных значений F_{st} и эффективных размеров популяций, можно вычислить скорость миграции m_1 – из второй группы в первую и m_2 – из первой группы во вторую по следующим соотношениям:

$$m_1 = \frac{1 - F_{st}^1}{4Ne_1 F_{st}^1}, \quad (4)$$

$$m_2 = \frac{1 - F_{st}^2}{4Ne_2 F_{st}^2}, \quad (5)$$

в этих соотношениях Ne_1 и Ne_2 известные эффективные размеры популяций для первой и второй групп организмов. Для того чтобы оценить статистическую достоверность получаемых результатов, необходимо определить, достоверно ли различаются в формулах (1) и (2) величины $\tilde{f} - f_1$ и $\tilde{f} - f_2$. Поскольку закон распределения в выборках межгрупповых и внутригрупповых генетических дистанций нам не известен, для оценки статистической достоверности результатов мы использовали U критерий Уилкоксона – Манна – Уитни [9]. Учитывая достаточно большие размеры выборок, отсутствие достоверных различий $\tilde{f} - f_1$ и $\tilde{f} - f_2$ будет свидетельствовать о том, что две исследуемые группы генетически однородны, т. е. представляют собой одну непрерывную популяцию.

Результаты и обсуждение

В Прибайкалье и Забайкалье существует высокое разнообразие яблони сибирской по высоте деревьев и морфологическим особенностям. Наибольший интерес представляют разные формы яблони сибирской на территории Бурятии. Мы исследовали четыре группы растений, произрастающих в дельте р. Селенги. Группа растений № 1 – смешанная, состоит из карликовых и высокорослых форм яблони сибирской, произрастает у подножий южного склона Хамбинского хребта Гусиноозерской котловины в долине р. Загустай. Группа № 2 – карликовые яблони, произрастающие в с. Ягодное Гусиноозерского района вдоль русла ручья. Группа № 3 – природная популяция типичных высокорослых яблонь *M. baccata* на территории Кабанского района. Группа № 4 – высокорослые яблони из заброшенного сада в с. Ягодное [4]. Поскольку исследуемые карликовые и высокорослые яблони генетически очень близки, для изучения генетической дифференциации и оценки потока генов между разными формами *M. baccata* использовали быстро эволюционирующие микросателлитные маркеры [2].

Для оценки степени генетической изоляции между исследуемыми группами яблонь вычислили коэффициент F_{st} [16] в двух направлениях. Результаты анализа показали, что самое высокое значение F_{st} -критерия (0,95) между 1-й и 4-й группами растений, что свидетельствует о низком обмене генетической информацией. Самое низкое значение F_{st} -критерия (0,37) между 2-й и 3-й группами, следовательно, они свободно обмениваются генетической информацией. Несимметричное значение F_{st} -критерия выявлено для 3-й и 4-й, а также для 2-й и 4-й групп. Поскольку значения F_{st} -критерия обратно пропорциональны скорости миграции, то, зная эффективный размер популяции, мы оценили интенсивность потока генов (рис. 1, Б).

По результатам исследования оказалось, что потоки генов между группами яблонь не равнозначны. Наибольшее количество мигрантов наблюдается из 3-й группы во 2-ю группу. В свою очередь поток генов из 2-й группы в 3-ю на порядок меньше. Вероятно, это можно объяснить разными эффективными размерами исследуемых популяций (N_e 3-й группы – около 300 растений, а N_e второй группы – чуть больше 30 растений). Отмечен равнозначный поток генов из 1-й группы (N_e около 40 растений), во 2-ю. Поток генов из 4-й группы, кото-

рая произрастает в заброшенном саду (N_e порядка 200 растений), в остальные группы незначителен. Таким образом, между всеми исследуемыми группами существует довольно высокая подразделенность, за исключением 2-й и 3-й группы, между которыми есть интенсивный поток генов.

Методом объединения ближайших соседей (neighbour-joining) по микросателлитным локусам построено филогенетическое древо (рис. 2). На древе видно, что все четыре группы деревьев яблони сибирской образуют самостоятельные клады, за исключением 2-й группы, в которую также попадают несколько растений, принадлежащих 3-й группе. Это можно объяснить большой величиной потока генов из 3-й популяции во 2-ю. Наблюдаемая картина в целом коррелирует с полученными значениями F_{st} -критерия.

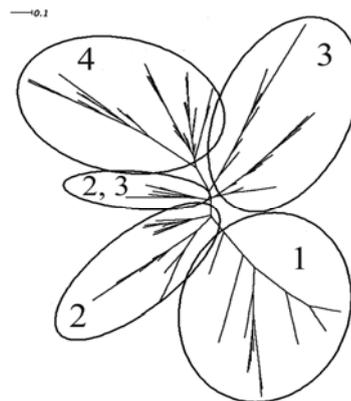


Рис. 2. Филогенетическое древо, построенное для шести микросателлитных локусов на основе матрицы генетических дистанций DAS, с помощью метода объединения ближайших соседей. Цифрами обозначены номера групп растений

С помощью микросателлитных маркеров показана степень изоляции и поток генов между группами растений. Несмотря на то, что все группы яблонь принадлежат одному виду *M. baccata*, высокая степень изоляции между ними позволяет предположить, что в каждой группе могут происходить процессы адаптации к условиям окружающей среды, приводящие к образованию новых форм. Таким образом, учитывая экологическую пластичность вида *M. baccata* и высокую степень генетической изоляции между группами, логично предположить происхождение карликовых форм яблони сибирской от высокорослых растений этого вида.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект № 05–04–97253 р_Байкал_а и интеграционного проекта СО РАН № 5.13

Литература

1. Вартапетян В. В. Новый вид дикорастущей яблони Сибири / В. В. Вартапетян, Л. В. Соловьева // Вестн. МГУ. Сер. биол. – 1981. – № 4. – С. 26–31.
2. Животовский Л. А. Микросателлитная изменчивость в популяциях человека и методы её изучения / Л. А. Животовский // Вестн. ВОГиС. – 2006. – Т. 10, № 1. – С. 74–96.
3. Манниатис Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Манниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. – М.: Мир, 1984. – 480 с.
4. Пономаренко В. В. *Malus chamardabanica* (Vobasae) из Забайкалья / В. В. Пономаренко // Бот. журн. – 1988. – Т. 73. – С. 78–83.
5. Рудиковский А. В. Уникальные и редкие формы яблони сибирской Селенгинского района Бурятии / А. В. Рудиковский, Е. Г. Рудиковская, Л. В. Дударева // Сиб. экол. журн. – 2008. – № 2. – С. 327–333.
6. Doyle J. J. Preservation of plant samples for DNA restriction endonuclease analysis / J. J. Doyle, E. Dickson // Taxon. – 1987. – Vol. 36. – P. 715–722.
7. Dunemann F. Genetic relationships in *Malus* evaluated by RAPD «fingerprinting» of cultivars and wild species / F. Dunemann, R. Kahnau, H. Schmidt // Plant Breeding. – 1994. – Vol. 113. – P. 150–159.
8. Forte A. V. Phylogeny of wild *Malus* species revealed by morphology, RAPD markers, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 and chloroplast gene matK sequences / A. V. Forte, D. B. Dorochov, N. I. Savelyev et al. // SALAS, P.: Proceedings of 9TH International Conference of Horticulture, September 3th–6th 2001. – 2001. – Vol. 1. – P. 60–65.
9. Mann H. B. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other / H. B. Mann, D. R. Whitney // Ann. Math. Statist. – 1947. – Vol. 18. – P. 50–60.
10. Microsatellites in *Malus X domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification / P. Guilford, S. Prakash, J.M. Zhu et al. // Theor Appl Genet. – 1997. – Vol. 94. – P. 249–254.
11. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple / L. Gianfranceschi, N. Seglias, R. Tarchini et al. // Theor Appl Genet. – 1998. – Vol. 96. – P. 1069–1076.
12. Slatkin M. Inbreeding coefficients and coalescence time / M. Slatkin // Gent. Res. Camb. – 1991. – Vol. 58 – P. 167–175.
13. Slatkin M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies / M. Slatkin // Genetics. – 1995. – Vol. 139. – P. 457–462.
14. Slatkin, M. The influence of gene flow on genetic distance / M. Slatkin, T. Maruyama // Am. Nat. – 1975. – Vol. 109. – P. 597–601.
15. Waples R. S. Separating the wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species / R. S. Waples // Hered. – 1998. – Vol. 89. – P. 438–450.
16. Wright S. Breeding structure of populations in relation to speciation / S. Wright // Am. Nat. – 1940. – Vol. 74. – P. 232–248.

Origin of *Malus baccata* dwarf forms from Republic of Buryatia territory

E. V. Kuznetsova¹, T. E. Peretolchina², Y. S. Bukin²,
D. Y. Scherbakov^{2,3}, A. V. Rudikovskiy¹

¹ Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk

² Institute of Limnology SB RAS, Irkutsk

³ Irkutsk State University, Irkutsk

Abstract. Phylogenetic relations between four plant groups of apple tree *Malus baccata* (L.) Borkh, which grow in Republic of Buryatia, were studied using six highly polymorphic microsatellite loci. Groups were defined according to their geographic location. Higher degree of genetic isolation was found between groups of plants that were situated geographically close with each other. Thus, putative mechanism of the origin of dwarf forms of *M. baccata* can be the plants' physiological adaptation to peculiar local environment conditions.

Key words: *Malus baccata*, microsatellite markers, genetic polymorphism.

Кузнецова Елена Вячеславовна
Сибирский институт физиологии и биохимии
растений СО РАН
664033, Иркутск, ул. Лермонтова 132
аспирант, ведущий инженер лаборатории физиологии
и продуктивности растений СИФИБР СО РАН
тел. (395 2) 42–50–09, факс (395 2) 51–07–54
E-mail: elen@nextmail.ru

Kuznetzova Elena Vyatcheslavovna
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
664033, Irkutsk, 132, Lermontova St.
doctoral student, leading engineer, Laboratory
of Plant Physiology and Productivity
phone: (395 2) 42–50–09, fax: (395 2) 51–07–54
E-mail: elen@nextmail.ru

Перетолчина Татьяна Евгеньевна
Лимнологический институт СО РАН
664033 г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3, а/я 278,

Peretolchina Tatyana Evgenyevna
Institute of Limnology SB RAS
664033, Irkutsk, 3, Ulan-Batorskaya St.

кандидат биологических наук
научный сотрудник лаборатории геносистематики
тел. (395 2) 42-29-23, факс (395 2) 42-54-05
E-mail: tanya@lin.irk.ru

Букин Юрий Сергеевич
Лимнологический институт СО РАН
664033 г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3, а/я 278,
кандидат биологических наук, старший научный
сотрудник лаборатории геносистематики
тел. (395 2) 42-29-23, факс (395 2) 42-54-05
E-mail: bukinyura@mail.ru

Щербаков Дмитрий Юрьевич
Лимнологический институт СО РАН
664033 г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3, а/я 278,
доктор биологических наук
зав. лабораторией геносистематики
тел. (395 2) 42-29-23, факс (395 2) 42-54-05
E-mail: sherb@lin.irk.ru

Рудиковский Александр Викторович
Сибирский институт физиологии и биохимии
растений СО РАН
664033, Иркутск, ул. Лермонтова 132
кандидат биологических наук, старший научный
сотрудник лаборатории физиологии
и продуктивности растений
тел. (395 2) 42-50-09, факс (395 2) 51-07-54

Ph.D. in Biology
research scientist, Laboratory of Genosystematics
phone: 42-65-04, fax: 42-54-05
E-mail: tanya@lin.irk.ru

Bukin Yuri Sergeevitch
Institute of Limnology SB RAS
664033, Irkutsk, 3, Ulan-Batorskaya St.
Ph.D. in Biology, senior research scientist,
Laboratory of Genosystematics
phone: 42-65-04, fax: 42-54-05
E-mail: bukinyura@mail.ru

Scherbakov Dmitriy Yurievitch
Institute of Limnology SB RAS
664033, Irkutsk, 3, Ulan-Batorskaya St.
D.Sc. in Biology
Head of Laboratory of Genosystematics
phone: 42-65-04, fax: 42-54-05
E-mail: sherb@lin.irk.ru

Rudikovski Aleksandr Viktorovitch
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
664033, Irkutsk, 132, Lermontova St.
Ph.D. in Biology, senior research scientist,
Laboratory of Plant Physiology and Productivity
phone: (395 2) 42-50-09, fax: (395 2) 51-07-54