

ОЛЬГА МИХАЙЛОВНА ФЕДОRENKO

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории генетики, Институт биологии Карельского научного центра РАН

fedorenko_om@mail.ru

МАРИНА ВИТАЛЬЕВНА ГРИЦКИХ

младший научный сотрудник лаборатории генетики, Институт биологии Карельского научного центра РАН

genmg@mail.ru

ОЛЬГА НИКОЛАЕВНА ЛЕБЕДЕВА

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, доцент, руководитель лаборатории генетики, заместитель директора по научной работе, Институт биологии Карельского научного центра РАН

olebedeva@krc.karelia.ru

АЛЕКСАНДР ФЕДОРОВИЧ ТИТОВ

доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, руководитель лаборатории экологической физиологии растений Института биологии, председатель Президиума Карельского научного центра РАН

titov@krc.karelia.ru

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH., РАСПОЛОЖЕННЫХ НА СЕВЕРНОЙ ГРАНИЦЕ АРЕАЛА ВИДА

В статье обсуждается вопрос об уровне генетического разнообразия периферических популяций. Представлены результаты изучения генетической изменчивости природных популяций *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (RAPD-анализ), находящихся на северной границе ареала вида. Полученные данные дополняют существующие представления о генетическом полиморфизме краевых популяций.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., генетическое разнообразие, RAPD-маркеры, северная граница ареала вида, краевые популяции

Генетическое разнообразие является основой адаптивных и эволюционных изменений в популяциях и вместе с тем выступает одним из важнейших факторов их устойчивости [1], [8]. Поэтому вопросы о роли генетического полиморфизма и механизмах поддержания этого вида изменчивости составляют одну из центральных проблем популяционной генетики. Также к числу широко обсуждаемых относится и вопрос о величине популяционно-генетического разнообразия в центре и на периферии ареалов видов. Ранее, основываясь на результатах изучения хромосомной и морфологической изменчивости, исследователи склонялись к мнению, что степень полиморфизма почти всегда убывает по мере приближения к границе видового ареала и что периферические популяции зачастую мономорфны [5], [10], [11]. Появление и широкое применение метода электрофореза белков не только позволило выявить в природных популяциях существование огромной генетической изменчивости [4], но и по-иному рассматривать ее распределение по территории ареала. Так, Левонтин, учитывая высокую нестабильность условий существования на периферии ареала, под-

черкивал: «...в разное время отбираются совершенно разные генотипы. Не удивительно, что генная гетерозиготность здесь высокая...» [13].

Территория Карелии является северной границей ареала распространения арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) – модельного объекта многих генетических исследований. Самые северные его популяции известны в Карелии на широте 62°55', в Норвегии – 67°20'. Условия произрастания растений на северной границе ареала вида являются экстремальными из-за резких колебаний температур, дефицита тепла летом и холодных зим, значительной изменчивости фотопериодических условий. В таких условиях среды под влиянием естественного отбора неизбежно происходят изменения в распределении аллельных частот, связанные с разной приспособленностью генотипов.

Ранее с помощью изоферментного анализа нами была изучена генетическая вариабельность 10 природных популяций арабидопсиса северной части ареала вида [7], расположенных вдоль широтного градиента (61°16' – 62°12' с. ш.) на протяжении примерно 150 км. В результате было выявлено значительное генетическое разнообра-

зие северных природных популяций, почти в 2,5 раза превышающее уровень изменчивости популяций этого вида в центре ареала (Англия, 54°00' с. ш.) [9], а также превышение средних значений популяционных характеристик других самоопыляющихся видов растений [12] (табл. 1). Причем чем севернее располагалась популяция, тем, как правило, выше оказывалась доля полиморфных локусов ($P_{95\%}$): $r = 0,68$, $P < 0,05$.

В настоящей работе представлены результаты изучения генетического разнообразия природных популяций *A. thaliana*, расположенных на северной границе ареала вида, с помощью RAPD-анализа – метода, который имеет ряд достоинств и преимуществ, позволяя, в частности, исследовать геном в целом и выявлять полиморфизм большого числа локусов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе исследованы семь популяций арабидопсиса, расположенные на территории Карелии вдоль широтного градиента на протяжении около 200 км (географические координаты самой северной популяции – 62°55' с. ш., 34°25' в. д., а самой южной – 61°49' с. ш., 35°10' в. д.). Две популяции островные, расположены на островах Онежского озера – Радколье и Климецкий, остальные – континентальные. Названия континентальных популяций даны в соответствии с близлежащими населенными пунктами (д. Царевичи, ст. Шуйская, д. Косалма, с. Кончезеро, г. Медвежьегорск), а островных – по географическим названиям островов.

Материалом для молекулярно-генетического анализа послужили растения *A. thaliana*, выращенные в лабораторных условиях в смеси земли и песка (2 : 1) под люминесцентными лампами из семян, собранных в ходе экспедиции 2008 года. Выделение ДНК из листьев 30 взрослых растений каждой популяции проводили по протоколу

Мёллера и др. [14]. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) осуществляли с помощью шести RAPD-праймеров произвольных последовательностей: № 2 (5'-GTGTCGAGTC-3'), № 4 (5'-AGGTCTGACG-3'), № 7 (5'-GTCGATCGAG-3'), № 8 (5'-CGAGCCGATC-3'), OPC-5 (5'-GATGA CCGCC-3'), P-01D (5'-AGCAGCGTCG-3'), («Синтоль», Россия). Амплификацию ДНК проводили по следующему температурному профилю: начальная денатурация 2 мин при 94 °C, следующие 35 циклов по схеме 94 °C (60 с), 35 °C (40 с), 72 °C (40 с) и конечная элонгация 10 мин при 72 °C. Продукты амплификации разделяли методом электрофореза в 6-процентном полиакриламидном геле в ТВЕ-буферном растворе. ПЦР-продукты окрашивали бромистым этидием и фотографировали в проходящем УФ-свете. Анализ молекулярной массы фрагментов осуществляли относительно маркера молекулярной массы (100 bp – 1 Kb) («Силекс», Россия).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием стандартных подходов и методов, принятых в популяционно-генетических исследованиях [2], и пакетов программ POPGENE [18] и PHYLIP (<http://evoluti on.genetics.washington.edu>). Для этого были составлены бинарные матрицы, в которых присутствие или отсутствие в спектре одинаковых фрагментов ДНК обозначали как «1» или «0». Для определения уровня генетического разнообразия популяций вычисляли показатели генетического разнообразия: долю полиморфных локусов при 95-процентном и 99-процентном критериях (P), ожидаемую гетерозиготность (H_{exp}). Генетическую дифференциацию популяций определяли по коэффициенту генетической дистанции Нея (D_N) [15]. Кластерный анализ с формированием ветвей дендрограммы производили невзвешенным парногрупповым методом UPGMA (пакет программ PHYLIP).

Таблица 1

Показатели генетического разнообразия в популяциях <i>A. thaliana</i>					
Популяция	Географические координаты, с. ш.	$P_{95\%}$, %	$P_{99\%}$, %	H_{exp}	
RAPD-анализ, карельские популяции					
Климецкий	61°49'	44,63	47,93	0,164 ± 0,018	
Царевичи	62°01'	48,76	48,76	0,170 ± 0,017	
Косалма	62°01'	29,75	36,36	0,110 ± 0,016	
Шуйская	62°00'	34,71	39,67	0,121 ± 0,016	
Радколье	62°05'	56,20	66,12	0,205 ± 0,017	
Кончезеро	62°08'	17,36	23,97	0,048 ± 0,010	
Среднее		38,57	43,80	0,136 ± 0,016	
Медвежьегорск	62°55'	14,88	33,06	0,063 ± 0,018	
Аллозимный анализ					
Карельские популяции [7]	61°16' – 62°12'	35,00	43,70	0,124 ± 0,056	
Британские популяции [9]	54°00'	–	16,50	0,055	
Самоопылители, среднее по 33 видам [12]	–	–	18,99	0,058	

Примечание. $P_{95\%}$ и $P_{99\%}$ – доля полиморфных локусов при 95-процентном и 99-процентном критериях соответственно; H_{exp} – ожидаемая гетерозиготность.

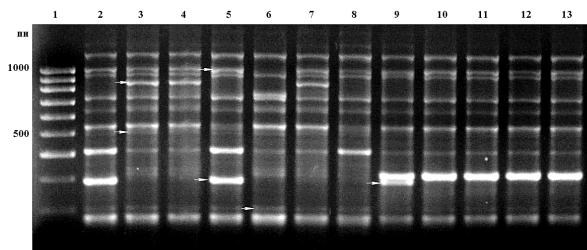


Рис. 1. RAPD-спектры геномной ДНК растений *A. thaliana* из популяции Радколье (2–8) и Климецкий (9–13), полученные с помощью праймера OPC-5: 1 – маркер молекулярной массы (100 пн – 1000 пн). Стрелками отмечены полиморфные фрагменты ДНК

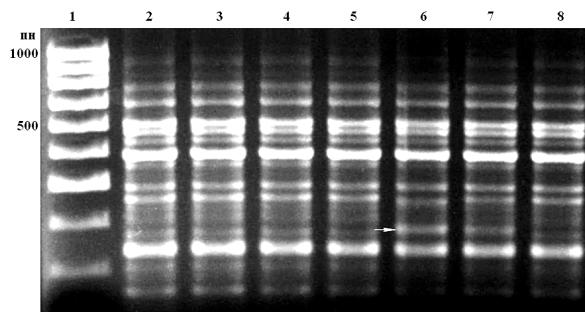


Рис. 2. RAPD-спектры геномной ДНК растений *A. thaliana* из популяции Медвежьегорск (2–8), полученные с помощью праймера № 8: 1 – маркер молекулярной массы (100 пн – 1000 пн). Стрелкой отмечены полиморфные фрагменты ДНК

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В целом была изучена вариабельность 121 RAPD-локуса двух островных и пяти континентальных популяций *A. thaliana*. На электрофореограммах спектров фрагментов ДНК отдельных растений выявлялись как мономорфные, общие для всех образцов, так и полиморфные фрагменты (рис. 1, 2). На основании частот фрагментов ДНК были вычислены основные показатели уровня генетического разнообразия в исследуемых популяциях – доля полиморфных локусов (P) при 95-процентном и 99-процентном критериях и ожидаемая гетерозиготность (H_{exp}) (табл. 1).

Проведенный анализ показал, что уровень генетического разнообразия природных популяций *A. thaliana*, расположенных на северной периферии ареала вида, оказался сопоставимым с установленным ранее с помощью аллозимного метода [7], то есть в 2–2,5 выше, чем в популяциях центральной части ареала [9]. Столь высокий популяционный полиморфизм нетипичен для самоопыляющихся видов растений (табл. 1). В связи с этим предполагается, что значительный уровень генетического разнообразия арабидопсиса в северной части его ареала может быть связан с жесткими экологическими условиями произрастания, в которых сильный естественный отбор может быстро менять свое направле-

ние [4], [16], [17]. Однако самая северная популяция арабидопсиса, находящаяся в районе Медвежьегорска, проявила значительно более низкий уровень изменчивости по доле полиморфных локусов ($P_{95\%} = 14,88\%$) и ожидаемой гетерозиготности ($H_{exp} = 0,063$) по сравнению со средними значениями этих параметров для популяций, расположенных почти на 200 км южнее. Тем не менее в группе этих популяций наблюдаются заметные колебания значений показателей уровня изменчивости (табл. 1). Значительное сокращение генетического разнообразия в некоторых из исследованных популяций, в том числе и в самой северной, может свидетельствовать о более сильном давлении отбора, который приводит к выживанию относительно немногих, наиболее приспособленных к жестким условиям среды генотипов.

Для характеристики генетических взаимоотношений исследованных популяций был использован кластерный анализ методом UPGMA (пакет программ PHYLIP) (рис. 3) на основе значений дистанций Нея (D_N) (табл. 2). Как видно из дендрограммы, популяция, произрастающая в окрестностях Медвежьегорска, существенно отличается от всех других ($0,226 < D_N > 0,287$). Она значительно обособлена и формирует отдельное плечо. Данное обстоятельство указывает на то, что самая северная популяция не только имеет пониженный уровень изменчивости, но и отличается своеобразием генетической структуры. Остальные популяции разделены на два подкластера. Один из них включает две континентальные популяции, которые в широтном градиенте наиболее близки к Медвежьегорску, – Кончезеро и Косалма. Во втором подкластере максимальное генетическое родство показали островные популяции Радколье и Климецкий ($D_N = 0,079$), группирующиеся вместе. Вероятно, особенности микроэволюционных процессов в островных популяциях (ослабление миграционного потока генов, усиление роли дрейфа генов) обусловили особенности их генетической структуры.

Таблица 2
Генетические расстояния (D_N)
между северными природными
популяциями *A. thaliana*

Популяция	Радколье	Климецкий	Царевичи	Шуйская	Косалма	Кончезеро	Медвежьегорск
Радколье	0						
Климецкий	0,079	0					
Царевичи	0,103	0,088	0				
Шуйская	0,109	0,111	0,098	0			
Косалма	0,105	0,118	0,128	0,159	0		
Кончезеро	0,131	0,118	0,128	0,121	0,109	0	
Медвежьегорск	0,226	0,244	0,245	0,260	0,244	0,287	0

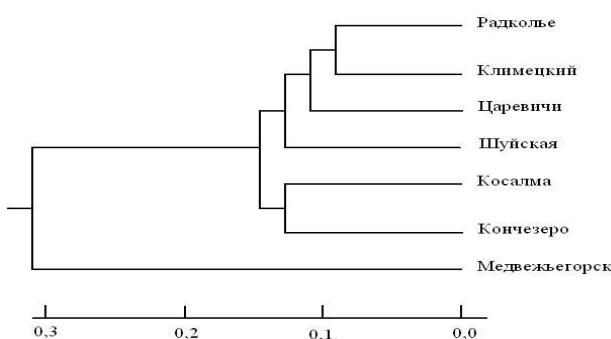


Рис. 3. Дендрограмма генетических различий северных популяций *A. thaliana*, построенная на основе генетических дистанций Ней

Следует отметить, что островная популяция Радкое показала очень высокий уровень генетического разнообразия, тогда как близкая по географической широте континентальная популяция Кончезеро – низкий (табл. 1). По-видимому, зафиксированные отличия связаны с природно-климатическими условиями произрастания растений этих популяций. В частности, остров Радкое характеризуется такими уникальными особенностями, как наличие скальных обнажений и шунгитовых пород [6], которые обуславливают своеобразие микроклиматических и почвенных

условий, а растительность представлена большим числом видов, включая редкие для Карелии [3].

Таким образом, результаты проведенного исследования показали, что в целом в северных природных популяциях *A. thaliana* выявлен значительный объем генетического разнообразия, не характерный для самоопылителей. Отмеченная неоднозначность в распределении величины генетического разнообразия не отрицает, как нам представляется, справедливость обеих гипотез, касающихся уровня полиморфизма периферических популяций. Очевидно, вопрос заключается в том, насколько условия произрастания конкретных популяций приближены к крайним условиям выживания вида. Полученные данные дополняют существующие представления относительно генетического разнообразия краевых природных популяций, расположенных на границах ареала вида, и позволяют по-новому рассматривать формальные противоречия, имеющиеся в результатах, полученных разными авторами и лежащих в основе двух, по сути, прямо противоположных точек зрения по этому принципиально важному вопросу.

Работа выполнена при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы. ГК № 02.740.11.0700.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алтухов Ю. П. Генетические процессы в популяциях. М.: Академкнига, 2003. 431 с.
2. Животовский Л. А. Статистические методы анализа частот генов в природных популяциях // Итоги науки и техники. Общая генетика. М.: ВИНИТИ, 1983. Т. 8. С. 76–104.
3. Кузнецов О. Л. Флора и растительность кижских шхер // Растительный мир Карелии и проблемы его охраны. Петрозаводск, 1993. С. 107–141.
4. Левонтин Р. С. Генетические основы эволюции: Пер. с англ. М.: Мир, 1978. 338 с.
5. Майр Э. Зоологический вид и эволюция: Пер. с англ. М.: Мир, 1968. 597 с.
6. Соколов В. А. Карельские агрономические руды. Петрозаводск: Гос. изд-во Карело-Финской ССР, 1956. С. 22–29.
7. Федоренко О. М., Савушкин А. И., Олимпиенко Г. С. Генетическое разнообразие природных популяций *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. в Карелии // Генетика. 2001. Т. 37. № 2. С. 223–229.
8. Хедрик Ф. Генетика популяций: Пер. с англ. М.: Техносфера, 2003. 592 с.
9. Abbott R. J., Gomes M. F. Population genetic structure and outcrossing rate of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // Heredity. 1989. Vol. 62. Part 3. P. 411–418.
10. Carson H. L. The population genetics of *Drosophila robusta* // Advan. Genet. 1958. Vol. 9. P. 1–40.
11. Dobzhansky Th. Genetics and the origin of species. 3rd ed., rev. Columbia. N. Y., 1951. 353 p.
12. Hamrick J. L., Linhart Y. B., Mitton J. B. Relationship between life history characteristic and electrophoretically detectable genetic variation in plants // Ann. Rev. Ecol. Syst. 1979. Vol. 10. P. 173–200.
13. Lewontin R. C. The adaptations of populations to varying environments // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1957. Vol. 22. P. 395–408.
14. Möller E. M., Bahnweg G., Sandermann H., Geiger H. H. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues // Nucl. Acids Res. 1992. Vol. 20. № 22. P. 6115–6116.
15. Nei M. Genetic distance between populations // Amer. Natur. 1972. Vol. 106. P. 283–292.
16. Schwartz M. K., Mills L. S., Ortega Y. et al. Landscape location affects genetic variation of Canada lynx (*Lynx canadensis*) // Molecular Ecology. 2003. Vol. 12. P. 1807–1816.
17. Stenøien H. K., Fenster Ch. B., Tonteri A., Savolainen O. Genetic variability in natural populations of *Arabidopsis thaliana* in northern Europe // Molecular Ecology. 2005. Vol. 14. P. 137–148.
18. Yeh F. C., Boyle T. J. B. Population genetic analysis of codominant and dominant markers and quantitative traits // Belgian J. Bot. 1997. Vol. 129. P. 157.