

## ОЦЕНКА СИСТЕМЫ СКРЕЩИВАНИЯ В ПОПУЛЯЦИЯХ *PINUS CEMBRA* L. (PINACEAE) С ПОМОЩЬЮ ИЗОФЕРМЕНТНЫХ И МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ

Е.А. МУДРИК, кандидат биологических наук;  
М.М. БЕЛОКОНЬ, кандидат биологических наук;  
Ю.С. БЕЛОКОНЬ, Е.В. ЖУЛИНА, Д.В. ПОЛИТОВ, доктор биологических наук  
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

### Введение

Анализ системы скрещивания перекрестноопыляемых растений имеет ключевое значение для выявления роли инбридинга в формировании генетической изменчивости и дифференциации популяций, особенно у видов с фрагментированным ареалом. Сокращение ареала и, как следствие, изоляция и затруднение потока генов приводят к изменениям в генетической структуре популяций, в том числе и к нарушению оптимального соотношения доли само- и перекрестного опыления растений. Сосна кедровая европейская (*Pinus cembra* L.), реликтовый вид субальпийского пояса Альп и Карпат, испытывает хроническое антропогенное воздействие вследствие интенсивного землепользования и вырубки лесов, что отрицательно отражается на внутривидовом уровне генетического разнообразия. Так, ранее с использованием изоферментов в качестве генетических маркеров нами был показан высокий уровень инбридинга в популяциях на восточной границе распространения *P. cembra* – в Украинских Карпатах [1-4]. Особенности системы скрещивания этого вида в основной, альпийской, части ареала практически не изучены. В единственной популяции из Итальянских Альп, где оценки системы скрещивания были получены по трем аллелизмным локусам [5], уровень ауткроссинга был выше, чем в карпатских, но ниже, чем у близкородственного широкоареального вида – сосны кедровой сибирской (*Pinus sibirica* Du Tour) [1, 2]. В этой связи представляет интерес исследование уровня инбридинга *P. cembra* из центральной части ареала, что более полно отобразит направление генетических процессов в популяциях различного географического происхождения и вида в целом. В настоящее время для анализа системы скрещивания разных древесных растений все большее применение находят маркеры изменчивости ДНК, а именно микросателлитные локусы (SSR – single sequence repeat) [6, 7]. В пользу их использования свидетельствует кодоминантность, полиаллельность и высокий уровень полиморфизма, а также потенциально большая селективная нейтральность по сравнению с изоферментами. Исследований, посвященных прямым сравнениям оценок системы скрещивания по этим двум классам маркеров, практически нет. Данная работа посвящена анализу параметров системы скрещивания *P. cembra* в альпийских популяциях с одновременным использованием традиционных молекулярно-генетических маркеров (изоферменты) и маркеров «нового поколения» (ядерные микросателлиты).

### Объекты и методы исследования

В качестве материала для исследования использовали семена от свободного опыления двух популяций *P. cembra* из западной и восточной частей Австрийских Альп: Умхаузен (25 деревьев, 47° 05' с.ш., 10° 01' в.д., 1800–1980 м н.у.м.) и Пааль (30 деревьев, 47° 02' с.ш., 14° 01' в.д., 1650–1900 м н.у.м.). Особенности репродуктивной биологии хвойных позволяют при одновременном анализе гаплоидного эндосперма (мегагаметофита) и диплоидного зародыша одного семени идентифицировать материнский и отцовский аллели в генотипе зародыша, что учитывается при расчете доли самоопыления и повышает точность и устойчивость ее оценок. Согласно рекомендациям К.Ритланда [8], от каждого материнского дерева анализировали по 8 семян (отдельно гаплоидный эндосперм и диплоидный зародыш), при этом выборки зародышей составили соответственно 200 и 240 образцов в двух изученных популяциях. Генотипы материнских деревьев устанавливали по сегрегации аллелей среди эндоспермов. В качестве изоферментных маркеров использовали полиморфные локусы алкогольдегидрогеназы (*Adh-1*), формиадегидрогеназы (*Fdh*), лейцинаминопептидазы (*Lap-3*), малатдегидрогеназы (*Mdh-2*, *Mdh-4*) и фосфоглюкомутаза (*Pgm-1*), для которых идентификация аллелей и генотипов была наиболее надежна и в гаплоидных, и диплоидных тканях семени. Электрофорез изоферментов

эндоспермов и зародышей семян проводили на соседних дорожках крахмального геля по описанной ранее методике [9]. В качестве микросателлитных маркеров использовали локусы *Pc1b*, *Pc18*, *Pc23* [10]. Выделение ДНК осуществляли с помощью набора реагентов D1Atom™ DNA Prep100, электрофорез ПЦР-продуктов проводили в полиакриламидном геле в трис-ЭДТА-боратной буферной системе, окрашивание гелей – раствором бромистого этидия с последующей визуализацией в УФ-свете. Средние однолокусные ( $t_s$ ) и многолокусные ( $t_m$ ) оценки степени перекрестного опыления производили с помощью программы MLTR 3.0 [8, 11], для расчета параметров генетической изменчивости использовали надстройку для электронной таблицы MS Excel – GenAlex 6.1 [12].

### Результаты и обсуждение

Средние значения однолокусной оценки ( $t_s$ ) для шести изоферментных локусов существенно отличались в двух изученных популяциях и составили соответственно 0,925 в западно- и 0,774 в восточноавстрийской выборках (табл. 1). Многолокусная оценка ( $t_m=0,916$ ) в популяции Умхаузен соответствовала однолокусной, а в популяции Пааль была значительно выше ( $t_m=0,880$ ), но в среднем между обеими выборками отличалась только на уровне ошибки. При допущении, что полное перекрестное опыление (ауткроссинг) принимается за 1, процент инбредных семян в изучаемых популяциях составил от 8,4 (Умхаузен) до 12% (Пааль). Главная причина инбридинга заключается в самоопылении растений, однако в выборке Пааль помимо собственно самоопыления около 10 % скрещиваний происходит между близкородственными растениями (biparental inbreeding), на что указывает существенная разница значений  $\Delta t=t_m - t_s = 0,107$ .

Таблица 1

**Значения параметров системы скрещивания в популяциях *Pinus cembra* по данным изоферментных и микросателлитных (SSR) маркеров**

показатель	Популяция					
	Австрийские Альпы				Украинские Карпаты [3, 4]	
	Умхаузен		Пааль		Горганы	Яйко
	изоферменты	SSR	изоферменты	SSR	изоферменты	изоферменты
$t_s$	0,925±0,080	0,823±0,039	0,774±0,049	0,819±0,044	0,706±0,070	0,645±0,058
$t_m$	0,916±0,070	0,879±0,036	0,880±0,036	0,893±0,038	0,748±0,064	0,700±0,054
$t_m - t_s$	-0,009	0,056	0,107	0,074	0,042	0,056
$F_{IS(exp)}$	0,044	0,064	0,064	0,057	0,172	0,215
$F_{IS}$	0,025	0,080	0,080	0,120	0,113	0,229

Примечание.  $t_s$  – однолокусная оценка,  $t_m$  – многолокусная оценка,  $F_{IS}$  – фактический коэффициент инбридинга,  $F_{IS(exp)}$  – ожидаемый коэффициент инбридинга.

Полученные оценки показателей ауткроссинга превышают таковые для *P. cembra* из Итальянских Альп ( $t_m = 0,808$ ) [5] и особенно Украинских Карпат, уровень инбридинга которых достигает 25–30% [3, 4] (табл. 1). Вероятная причина такого разброса значений заключается в низкой эффективной численности и плотности растений *P. cembra* в Украинских Карпатах (древостои на 70–80% состоят из ели, что создает экранирующий эффект и затрудняет перенос пыльцы *P. cembra*), тогда как достаточно высокие значения ауткроссинга в выборках из основной части ареала в Австрийских Альпах соответствуют данным, установленным для близкородственного вида с широким ареалом – *P. sibirica* ( $t_m = 0,882$ ) [1, 2]. Уровень инбридинга в обеих австрийских популяциях *P. cembra*, оцененный с помощью индекса фиксации Райта ( $F_{IS}$ ), в среднем оказался невысоким и показал дефицит гетерозигот соответственно 2,5 и 6,4% (табл. 1). В карпатских выборках дефицит гетерозигот был больше – 11,3 и 22,9%. В целом полученные значения  $F_{IS}$  соответствовали ожидаемым ( $F_{IS(exp)}$ ), рассчитанным из значений  $t_m$  по формуле  $F_{IS(exp)} = (1-t)/(1+t)$  [13].

Значения многолокусной оценки степени ауткроссинга австрийской *P. cembra* на основе анализа трех микросателлитных локусов оказались близкими в обеих популяциях и соответствовали изоферментным данным. Однако значения  $t_s$  не отличались между популяциями, как это было показано по аллозимам. Положительная разница  $\Delta t=t_m-t_s$

свидетельствует о близкородственных скрещиваниях в обеих выборках. Уровень инбридинга (8 и 12%), установленный с помощью микросателлитных локусов, был выше, чем по изоферментным. Завышенные значения  $F_{IS}$  по микросателлитам могут быть связаны со спецификой использования данных маркеров: существует вероятность неучтенных гетерозиготных зародышей в случае, если их генотипы содержат т.н. нуль-аллели. Из-за мутаций в зоне отжига праймеров некоторые аллели микросателлитных локусов не амплифицируются в ПЦР, что затрудняет идентификацию гетерозиготных генотипов.

Уровень генетической изменчивости австрийских популяций *P. cembra* по данным микросателлитных локусов оказался значительно выше, чем по изоферментным (табл. 2). Это объясняется высоким полиморфизмом SSR-маркеров: среднее число аллелей ( $N_A$ ) на изоферментный локус в выборках материнских деревьев и зародышей семян было в пределах 2,0–3,3, тогда как в случае с микросателлитами ~ 6,7–8,0 (деревья) и 9,0–12,3 (зародыши).

Таблица 2

**Генетическая изменчивость австрийских популяций *Pinus cembra* в выборках материнских деревьев (Д) и зародышей их семян (З) по данным изоферментных и микросателлитных маркеров**

Выборка		Маркер							
		изоферменты				микросателлиты			
		$N_A$	$H_O$	$H_E$	$F_{IS}$	$N_A$	$H_O$	$H_E$	$F_{IS}$
Умхаузен	Д	2,000	0,159±0,050	0,188±0,073	0,037±0,069	6,667	0,600±0,262	0,573±0,248	-0,045±0,041
	З	2,333	0,172±0,069	0,181±0,073	0,025±0,027	9,000	0,536±0,238	0,576±0,252	0,080±0,035
Пааль	Д	2,833	0,353±0,106	0,287±0,069	-0,171±0,080	8,000	0,575±0,207	0,571±0,211	-0,026±0,026
	З	3,333	0,248±0,071	0,265±0,070	0,080±0,039	12,333	0,451±0,207	0,530±0,242	0,120±0,043

Примечание.  $N_A$  – среднее число аллелей на локус,  $H_O$  – наблюдаемая гетерозиготность,  $H_E$  – ожидаемая гетерозиготность,  $F_{IS}$  – коэффициент инбридинга.

Недостаток гетерозигот в выборках зародышей у хвойных, обусловленный самоопылением и частично скрещиваниями между совместно произрастающими родственными растениями (семейственная структура), как правило, нивелируется к репродуктивной стадии деревьев, приводя генетическую структуру популяции к равновесному состоянию согласно закону Харди-Вайнберга или к небольшому эксцессу гетерозигот (отбор против инбредного потомства и балансирующий отбор в пользу гетерозигот) [1, 2, 14]. Наглядное проявление этой тенденции можно наблюдать в выборке Пааль, где значение наблюдаемой аллозимной гетерозиготности было существенно выше у материнских деревьев (0,353), чем у зародышей (0,248). При сравнении микросателлитной гетерозиготности на разных онтогенетических стадиях подобная тенденция к повышению ее уровней в репродуктивной части популяции также наблюдается (табл. 2), что в некоторой степени противоречит представлениям о селективной нейтральности микросателлитов. Отрицательные значения коэффициента инбридинга  $F_{IS}$  в изучаемых популяциях *P. cembra* свидетельствуют о дефиците гетерозигот у зародышей и их слабом избытке в выборках материнских растений. Однако в связи с большими, чем по аллозимам, статистическими ошибками микросателлитных оценок, об устойчивости этой тенденции и возможных ее объяснениях можно будет судить лишь при анализе более репрезентативного массива данных.

**Выводы**

Анализ системы скрещивания в двух популяциях *P. cembra* из Австрийских Альп выявил высокую степень перекрестного опыления растений как с использованием изоферментных, так и микросателлитных локусов. Многолокусные оценки ауткроссинга в этих популяциях по изоферментам значительно превышали данные, полученные ранее для карпатских выборок *P.*

*cembra*. Показана эффективность одновременного применения двух классов генетических маркеров – аллозимов и микросателлитов – для анализа системы скрещивания и выявления причин инбридинга в популяциях хвойных.

### Благодарность

Выражаем большую признательность за предоставление семян *P. cembra* из Австрийских Альп Dr. Silvio Schüeler (Федеральный исследовательский центр по лесам, Вена, Австрия) в рамках сотрудничества, инициированного грантом РФФИ 08-04-92670 АНФ-з «Молекулярно-генетические маркеры, филогеография и популяционная генетика для устойчивого лесного хозяйства: Евроазиатская перспектива». Работа поддержана программами Президиума РАН «Биологическое разнообразие» (подпрограмма «Генофонды и генетическое разнообразие») и «Происхождение биосферы и эволюция био-геологических систем» (направление II), ОБН РАН «Биоресурсы России: Оценка состояния и фундаментальные основы мониторинга», а также ФЦП «Научно-педагогические кадры инновационной России» (направление 1.1, Госконтракт 02.740.11.0281).

### Список литературы

1. Политов Д.В., Крутовский К.В., Алтухов Ю.П. Характеристика генофондов популяций кедровых сосен по совокупности изоферментных локусов // Генетика.–1992.–Т. 28, № 1.–С. 93-114.
2. Politov D.V., Krutovskii K.V. Allozyme polymorphism, heterozygosity, and mating system of stone pines (*Pinus*, subsection *Cembrae*) // Proceedings International workshop on subalpine stone pines and their environment: The status of our knowledge. Ogden, Utah: USDA Forest Service Intermountain Research Station, 1994.–P. 36-42.
3. Система скрещивания и возрастная динамика уровней инбридинга в популяциях *Pinus cembra* L. Украинских Карпат / Политов Д.В., Пирко Н.Н., Пирко Я.В., Мудрик Е.А., Белоконь М.М., Коршиков И.И // Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету ім.Володимира Гнатюка. Серія: Біологія.–2007. – Т. 3, № 33. – С. 80-85.
4. Analysis of mating system in two *Pinus cembra* L. populations of the Ukrainian Carpathians / Politov D.V., Pirko Ya.V., Pirko N.N., Mudrik E.A., Korshikov I.I. // Annals of Forest Research (ICAS).– 2008. – V. 51. – P. 11-18.
5. Lewandowski A., Burczyk J. Mating system and genetic diversity in natural populations of European larch (*Larix decidua*) and stone pine (*Pinus cembra*) located at higher elevations // Silvae Genetica. – 2000. – V. 49, № 3. – P. 158-161.
6. Lian C.L., Miwa M., Hogetsu T. Outcrossing and paternity analysis of *Pinus densiflora* (Japanese red pine) by microsatellite polymorphism // Heredity. – 2001. – V. 87. – P. 88-98.
7. Use of molecular markers for estimating breeding parameters: a case study in a *Pinus pinaster* Ait. progeny trial / Gaspar M.J., de-Lucas A., Alia R., Paiva J.A.P., Hidalgo E., Louzada J., Almeida H., Gonzalez-Martinez S.C. // Tree Genetics & Genomes. – 2009. – V. 5, № 4. – P. 609-616.
8. Ritland K. Estimation of mating systems // Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1983. – P. 289-302.
9. Аллозимный полиморфизм европейской кедровой сосны, *Pinus cembra* L. в горных популяциях Альп и Восточных Карпат / Белоконь М.М., Политов Д.В., Белоконь Ю.С., Алтухов Ю.П. // Генетика. – 2005. – Т. 41, № 11. – С. 1538-1551.
10. Isolation and characterization of polymorphic nuclear microsatellite loci in *Pinus cembra* L. / Salzer K., Sebastiani F., Gugerli F., Buonamici A., Vendramin G.G. // Molecular Ecology Resources. – 2009. – V. 9. – P. 858-861.
11. Ritland K. Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent loci // Heredity. – 2002. – V. 88. – P. 221-228.
12. Peakall R., Smouse P.E. GenAlex 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // Molecular Ecology Notes. – 2006. – V. 6. – P. 288-295.
13. Brown A.H.D., Burdon J.J., Jarosz A.M. Isozyme analysis of plant mating systems // Isozymes in plant biology. Dioscorides Press; Portland Oregon; USA, 1989. – P. 73-86.
14. Altukhov Yu.P. The role of balancing selection and overdominance in maintaining allozyme polymorphism // Genetica. – 1991. – V. 85, № 1. – P. 79-90.