

УДК 575.174.015.3:582.683.2

ОСОБЕННОСТИ МИКРОСАТЕЛЛИТНОГО ПОЛИМОРФИЗМА ДВУХ ВИДОВ *Arabidopsis*

© 2015 г. О. М. Федоренко, М. В. Зарецкая

Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук, Петрозаводск 185910
e-mail: fedorenko_om@mail.ru

Поступила в редакцию 03.04.2015 г.

Представлены результаты изучения особенностей микросателлитного полиморфизма двух близкородственных видов *Arabidopsis*, различающихся типом скрещивания. В популяциях *Arabidopsis thaliana*, расположенных на северной периферии ареала вида (Карелия), выявлено значительное генетическое разнообразие, что нехарактерно для самоопыляющихся видов растений. Более полиморфными оказались популяции северной границы ареала вида в бассейне Онежского озера ($P_{99\%} = 0.43$; $H_{\text{exp}} = 0.17$) по сравнению с популяциями островов Ладоги, расположенными примерно на 300 км южнее ($P_{99\%} = 0.39$; $H_{\text{exp}} = 0.15$). Предполагается, что высокий популяционный полиморфизм *A. thaliana* в северной части его ареала скорее всего связан с жесткими экологическими условиями произрастания и представляет основу адаптационных процессов. Популяции *A. thaliana* высокодифференцированы ($G_{\text{ST}} = 0.783$), что является типичным для инбредных видов. Однако столь высокая межпопуляционная дифференциация связана, вероятно, с низким уровнем потока генов: пять популяций из семи проанализированных расположены на островах, т.е. в той или иной степени изолированы. Выявленные большие различия популяций *A. thaliana* по уровню полиморфизма, а также высокое гаплотипическое разнообразие предполагают постледниковую колонизацию территории Карелии множеством различных предковых форм. Обсуждается вопрос об участии уникальных аллелей микросателлитных локусов с большим количеством динуклеотидных повторов в адаптивной эволюции *A. thaliana*. Популяция редкого для Карелии вида – *Arabidopsis lyrata* ssp. *petraea* – находится в полной изоляции и вследствие особенностей микроэволюционных процессов в таких популяциях имеет невысокий для аутбредных видов уровень полиморфизма ($P_{99\%} = 0.64$; $H_{\text{exp}} = 0.16$). Тем не менее популяция существует в Карелии на протяжении длительного периода времени, что свидетельствует об ее успешной адаптации в данных условиях.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis lyrata* ssp. *petraea*, генетическое разнообразие, микросателлитные маркеры, северная периферия ареала вида, изоляция расстоянием.

DOI: 10.7868/S001667581512005X

Генетическое разнообразие играет важную роль для адаптации и выживания популяций. Популяции самоопыляющихся видов растений вследствие своей инбредной природы обычно имеют более низкий уровень полиморфизма и гетерозиготности по сравнению с аутбредными видами. Тем не менее в природе многие самоопылители прекрасно адаптированы и имеют обширные ареалы. В частности, модельный вид *Arabidopsis thaliana* широко распространен по всему миру. При этом предполагается, что широкое распространение его произошло недавно, в результате быстрой миграции с территории первоначального происхождения вида в Гималаях [1–3]. По-видимому, инбредные виды имеют свои оригинальные механизмы адаптации. Отбор и ограничение рекомбинации у них способствуют организации генов на основе коадаптированных комплексов генов [4, 5].

В последнее время северная граница ареала *A. thaliana* достигла территории Карелии. Самые

северные популяции известны в Карелии на широте $62^{\circ}55'$. Популяции, существующие на границах ареалов видов, представляют особый интерес для изучения генетических механизмов адаптации их к крайним условиям выживания. Согласно одной из эволюционных стратегий выживания популяций – стратегии активного реагирования, при неблагоприятных условиях происходит повышение темпов генетической изменчивости, способствующее отбору новых генетических вариантов [6]. Предыдущие наши исследования [7–9] подтвердили теоретические представления Колчанова и соавт. [6], показав, что характерной особенностью северных природных популяций *A. thaliana* является высокий уровень генетического разнообразия, что также согласуется с представлениями Левонтина о популяционно-генетической структуре краевых популяций [10].

Одним из наиболее близких в систематическом положении *A. thaliana* видов является пере-

крестноопыляемый вид — *Arabidopsis lyrata* ssp. *petraea* (далее *A. l. petraea*). Ряд авторов считают, что *A. l. petraea* может быть неплохим кандидатом на роль аутбредной модели в популяционно-генетических исследованиях [11–13]. Сравнение близкородственных перекрестноопыляемых и самоопыляющихся видов растений будет способствовать пониманию влияния системы скрещивания на становление генетической изменчивости. Близкое систематическое положение *A. thaliana* и *A. l. petraea* подтверждено во многих исследованиях семейства Brassicaceae. Использование хлоропластной ДНК [2] и ядерных последовательностей [14] показало наиболее тесное родство *A. thaliana* с *A. l. petraea* по сравнению с другими видами рода *Arabidopsis*. *A. l. petraea* является редким для Карелии видом, единственная популяция находится рядом с самой северной популяцией *A. thaliana*, на широте 62°55' [15]. Популяция *A. l. petraea* окружена лесным массивом и пространственно изолирована географическим расстоянием: ближайšie к ней популяции известны на о. Коткано в Белом море, на Кольском полуострове и в Швеции. Изолированные популяции характеризуются своеобразием микроэволюционных процессов, в частности низкой интенсивностью потока генов или полным его отсутствием. При небольшом размере таких популяций ожидаемый генетический дрейф приводит к снижению уровня панмиксии, усилению инбридинга и как следствие этого снижению генетического разнообразия. Тем не менее именно своеобразие генетических процессов при изоляции позволяет каждой популяции изменяться независимо и приводит к формированию уникальных особенностей генофонда [16].

В настоящее время для анализа популяционной структуры и оценки филогенетических взаимоотношений между популяциями широко применяются микросателлитные маркеры. Микросателлитные последовательности составляют класс умеренных тандемных повторов ДНК варьирующего числа, характеризуются высокой скоростью спонтанного мутирования, большим аллельным разнообразием и гетерозиготностью [17]. Для *A. thaliana* Белл и Эке [18] описали 30 микросателлитных локусов и определили величину их изменчивости среди лабораторных линий. Обширное исследование полиморфизма *A. thaliana*, проведенное Иннан и соавт. [19] на 42 образцах растений, собранных со всего мира, позволило выявить существенное разнообразие по микросателлитным локусам на уровне вида, несмотря на его инбредную природу. При этом большая часть разнообразия пришлась на межпопуляционный компоненту, что характерно для самоопылителей и свидетельствует о значительной дивергенции популяций. Для *A. l. petraea* показана возможность успешной амплификации аналогичных

микросателлитных локусов с праймерами, используемыми для *A. thaliana* [11]. Сравнение одних и тех же генов у родственных таксонов позволяет оценить ход эволюционных событий. Хотя микросателлиты локализованы в основном в некодирующих регионах генома и, следовательно, должны быть селективно нейтральными, ряд фактов говорит о том, что они могут служить кодирующими или регуляторными элементами [20]. Исходя из этого, микросателлиты как тандемно повторяющиеся последовательности могут иметь значение в адаптивной эволюции. Дупликации генов приводят к избыточности, которая ослабляет давление отбора и тем самым создает предпосылки для функциональной эволюции [21, 22].

В данной работе представлены результаты сравнительного изучения особенностей микросателлитного полиморфизма двух близкородственных видов *Arabidopsis* с разным типом размножения: *A. thaliana* — высокосамофертильного вида и *A. l. petraea* — облигатного перекрестноопыляемого вида, с целью выявления генетических механизмов адаптации к условиям северной периферии ареала одного из них (*A. thaliana*) и к условиям полной изоляции другого (*A. l. petraea*). Проведенное исследование позволит оценить эффекты системы скрещивания на становление генетической изменчивости и генетическую структуру популяций, а также, возможно, внесет вклад в существующие представления о генетических основах адаптации. Данная работа дополняет и расширяет ранее проведенное исследование карельских популяций *A. thaliana* [9].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растения *A. thaliana* представлены семью карельскими популяциями. Три из них относятся к бассейну Онежского озера: Царевичи (62°01' с.ш.; 34°07' в.д.), Радколье (62°05' с.ш.; 35°13' в.д.), Медвежьегорск (62°55' с.ш.; 34°25' в.д.). Четыре популяции находятся примерно на 300 км южнее на островах Ладожского озера: Валаам (61°22' с.ш.; 30°56' в.д.), Самматсаари (61°32' с.ш.; 30°40' в.д.), Пиени-Сартосаари (61°37' с.ш.; 31°15' в.д.) и Маркатсимансаари (61°37' с.ш.; 30°45' в.д.) (рис. 1). Популяция Радколье также островная, а Царевичи и Медвежьегорск континентальные. Растения *A. l. petraea* взяты из популяции Медвежьегорск (61°22' с.ш.; 30°56' в.д.). Названия континентальных популяций даны в соответствии с близлежащими населенными пунктами, а островных — по географическим названиям островов. Проанализировано в среднем по 25 растений *A. thaliana* (от 18 до 30) и 40 растений *A. l. petraea* на локус в каждой популяции.

Популяции анализировали по семи микросателлитным локусам: *ATHCTR1*, *nga59*, *nga111*, *nga162*, *nga168*, *nga172* и *nga225* [18]. Молекуляр-

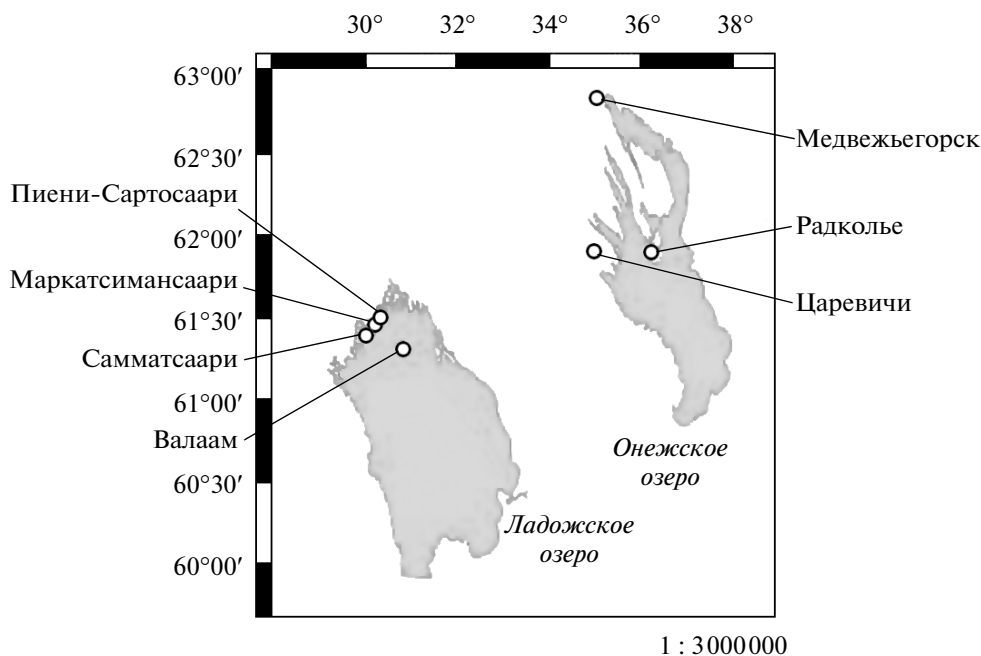


Рис. 1. Места расположения исследуемых популяций в бассейне Онежского озера и на островах Ладожского озера.

ные характеристики изученных локусов представлены в табл. 1. У *A. thaliana* все локусы динуклеотидные, а у *A. l. petraea* некоторые локусы имеют более сложную структуру. Методика выделения ДНК из листьев взрослых растений, ПЦР и фрагментного анализа на SEQ 8000 (“Beckman Coulter”, США) описана в предыдущей статье [9]. Количество динуклеотидных повторов каждого аллеля у *A. thaliana* определяли путем сравнения размера ПЦР-продукта с величиной его же у линии Col-0, число повторов которой установлено [18].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием стандартных подходов, принятых в популяционно-генетических исследованиях [23], пакетов программ PHYLIP (<http://evolution.genetics.washington.edu>), Arlequin ver. 3.11 (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin> 3). Уровень генетического разнообразия популяций определяли с помощью показателей: доли полиморфных локусов при 99%-ном критерии ($P_{99\%}$), числа аллелей на локус (A), гетерозиготности наблюдаемой ($H_{об}$) и ожидаемой (H_{exp})

Таблица 1. Проанализированные микросателлитные локусы в карельских популяциях *A. thaliana* и *A. l. petraea*

Локус*	<i>A. thaliana</i>				<i>A. l. petraea</i>		
	хромосома*	размер аллеля Columbia*, пн	количество повторов		количество повторов**	размер аллеля, пн	
			Columbia*	карельские популяции		по [11]	карельская популяция
<i>ATHCTR1</i>	5	159	(GA) ₁₆	(GA) _{5–11}	(A) _{7...} (GA) _{8...} (T) ₈ (A) _{6...} (GA) ₄	156	154–156
<i>nga59</i>	1	111	(GA) ₁₆	(GA) _{18–61}	(CT) ₄	100	100
<i>nga111</i>	1	128	(GA) ₁₆	(GA) _{12–80}	(A) _{6...} (GA) ₂₂	142	118–150
<i>nga162</i>	3	107	(GA) ₂₁	(GA) _{5–10}	(TA) ₃ (GA) ₅	83	72–78
<i>nga168</i>	2	151	(GA) ₂₅	(GA) _{19–24}	(GA) ₅	105	108–110
<i>nga172</i>	3	162	(GA) ₂₉	(GA) _{10–48}	(GA) _{11...} (A) ₆	122	122–126
<i>nga225</i>	5	119	(CT) ₁₈	(CT) _{10–42}	—	—	100

* По данным Белл и Эке [18]; ** по данным Ван Треурен с соавт. [11].

и количества гаплотипов (N). Генетическую подразделенность популяций характеризовали с помощью статистик генного разнообразия Нея [24]. Генетические различия популяций вычисляли по коэффициенту Нея — D_N [25]. Кластерный анализ с формированием ветвей дендрограммы проводили невзвешенным парно-групповым методом UPGMA (пакет программ PHYLIP). Наличие неравновесия по сцеплению (LD) между всеми парами локусов определяли с использованием теста на LD [26] (пакет программ Arlequin). Процент локусов, находящихся в неравновесии по сцеплению относительно максимально возможного числа локусов в LD (P_d), был определен для каждой популяции [27].

Исследование выполнено на научном оборудовании Центра коллективного пользования ИБ КарНЦ РАН “Комплексные фундаментальные и прикладные исследования особенностей функционирования живых систем в условиях Севера”.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного исследования в семи популяциях *A. thaliana* выявлен 41 аллель по семи микросателлитным локусам. Число аллелей на локус варьирует от 2 (*nga168*) до 10 (*nga59*). В популяции *A. l. petraea* выявлено 15 аллелей по этим же локусам, при этом число аллелей на локус изменяется от 1 (*nga59* и *nga225*) до 4 (*nga111*). В предыдущем нашем исследовании показано, что *A. thaliana* обладает огромной изменчивостью по микросателлитным локусам вопреки инбридной природе вида. Генное разнообразие, несмотря на большой размах изменчивости, в среднем оказалось выше в популяциях бассейна Онежского озера ($H_{\text{exp}} = 0.163$) по сравнению с более южными популяциями Ладоги ($H_{\text{exp}} = 0.148$) [9].

Распределение аллелей по локусам в популяциях представлено на рис. 2. В целом размер аллелей аналогичных локусов больше у *A. thaliana*, чем у *A. l. petraea*, за исключением одного локуса (*ATHCTR*). В карельских популяциях *A. thaliana* выявлены микросателлитные локусы, имеющие уникальные аллели с большим количеством динуклеотидных повторов: *nga59* (55–61 повтор), *nga111* (80 повторов), *nga172* (40–48 повторов) и *nga225* (41–42 повтора). При изучении микросателлитного полиморфизма у 42 экотипов *A. thaliana*, собранных со всего мира, только три локуса из 20 проанализированных имели такие аллели (unique alleles with long repeat) [19]. Это *nga126* (40–44 повтора) и *nga172* (40 повторов) у нескольких экотипов; *nga59* (55 повторов) у одного экотипа (Akita) из Японии, причем интересно, что этот аллель точно совпадает по величине с аллелем этого же локуса из популяции Валаам. Существование таких аллелей может поддерживать-

ся естественным отбором, так как, следуя “модели пошаговых мутаций” (stepwise mutation model) [28], различия в размерах аллелей свидетельствуют о количестве мутационных изменений в числе повторов, которые сохраняются из поколения в поколение. Аллели с большим количеством повторов — это, таким образом, “память” о прошедших мутационных событиях [29]. По данным Иннан и соавт. [19], лабораторная линия Col-0 имеет более крупные аллели по сравнению с другими 41 экотипами по 6 локусам из 19 проанализированных авторами. В нашем исследовании такие аллели имели три локуса Col-0 из семи проанализированных нами, совпадающие с данными Иннан и соавт. [19], — *ATHCTR1*, *nga162* и *nga168* (табл. 1; рис. 2).

Результаты оценки внутривидового разнообразия представлены в табл. 2. В целом в популяциях *A. thaliana* выявлено значительное генетическое разнообразие, не характерное для самоопыляющихся видов растений. В среднем более полиморфными оказались популяции северной границы ареала вида в бассейне Онежского озера ($P_{99\%} = 0.43$; $H_{\text{exp}} = 0.17$) по сравнению с популяциями островов Ладоги, расположенными примерно на 300 км южнее ($P_{99\%} = 0.39$; $H_{\text{exp}} = 0.15$). В связи с этим мы склонны придерживаться высказанной нами ранее версии объяснения результатов исследования [8, 9]: высокий популяционный полиморфизм *A. thaliana* в северной части его ареала скорее всего связан с жесткими экологическими условиями произрастания и представляет основу адаптационных процессов. Значительное генетическое разнообразие является в данном случае необходимой предпосылкой для выживания популяций в экстремальных и нестабильных условиях. Однако среди популяций бассейна Онежского озера и среди популяций Ладожских островов выявлены популяции как с высоким уровнем генетического разнообразия, так и с невысоким. Наименьшее разнообразие оказалось в самой северной популяции — Медвежьегорск ($P_{99\%} = 0.14$; $A = 1.14$; $H_{\text{exp}} = 0.02$). Полученные данные согласуются с работой норвежских ученых, изучавших популяции арабидопсиса Скандинавии по микросателлитным локусам [30]. Популяции расположены в тех же широтах, что и карельские, при этом среди них также были обнаружены высокополиморфные, низкополиморфные и даже мономорфные популяции. В Скандинавии частота полиморфных локусов варьировала от 0.04 до 0.60, а ожидаемая гетерозиготность от 0.01 до 0.21. По мнению авторов, полученные результаты позволяют предположить постледниковую колонизацию полуострова множеством различных предковых форм *A. thaliana*. Возможно, этот же процесс сказался и на таких больших различиях в величине генетического разнообразия карельских популяций. Кроме то-

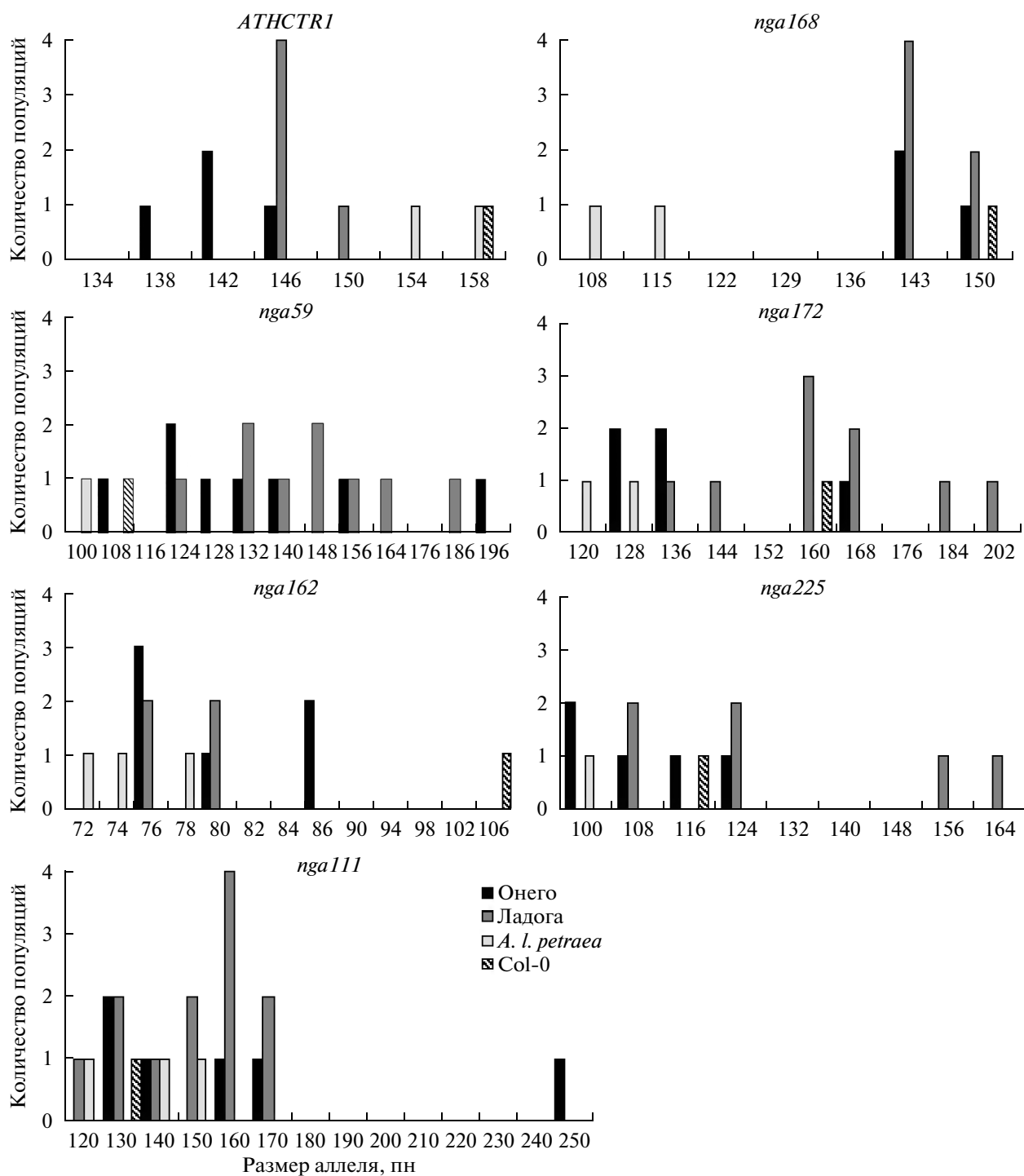


Рис. 2. Распределение аллелей по микросателлитным локусам в природных популяциях *A. thaliana* бассейнов Онежского и Ладожского озер и популяции *A. l. petraea* пригорода Медвежьегорска.

го, микросателлиты как некодирующие локусы имеют свои особенности микроэволюции у инбредных видов, к которым относится арабидопсис. В популяциях инбредных видов снижение уровня изменчивости может быть связано с уменьшением их численности, вплоть до вымира-

ния в результате таких эффектов, как “хитч-хайкинг”, фоновый отбор, дрейф генов, которые являются следствием существенной подразделенности и пониженной частоты рекомбинации этих видов [30]. Неожиданно высокое генетическое разнообразие популяций Радколье ($A = 3.0$; $P_{99\%} =$

Таблица 2. Генетическая вариабельность по микросателлитным локусам в северных природных популяциях двух видов *Arabidopsis*

Показатели	<i>A. thaliana</i>									<i>A. l. petraea</i> популяция пригорода Медвежьегорска
	популяции бассейна Онежского озера				популяции бассейна Ладожского озера					
	1	2	3	среднее	4	5	6	7	среднее	
$P_{99\%}$	0.14	0.86	0.28	0.43	0.86	0.14	0.28	0.28	0.39	0.64
A	1.14	3.00	1.29	1.81	3.00	1.25	1.71	1.42	1.84	2.00
H_{exp}	0.02	0.45	0.03	0.17	0.42	0.05	0.10	0.04	0.15	0.16
H_{ob}	0.01	0.06	0.02	0.03	0.05	0.00	0.02	0.01	0.02	0.11
N	2	23	3	9	22	4	6	5	9	17
P_d	—	38.0%	—	12.7%	9.5%	—	—	—	2.4%	4.8%

Примечание. Представлены показатели генетической изменчивости: частота полиморфных локусов ($P_{99\%}$), число аллелей на локус (A), среднее генное разнообразие (H_{exp}), частота гетерозигот (H_{ob}), количество гаплотипов (N) и процент пар локусов, находящихся в значимом неравновесии по сцеплению (LD) по сравнению с максимально возможным количеством пар локусов в LD (P_d). “—” — разнообразие отсутствует. Популяции *A. thaliana*: 1 — Медвежьегорск, 2 — Радколье, 3 — Царевичи, 4 — Валаам, 5 — Самматсаари, 6 — Пиени-Сартосаари, 7 — Маркатсимансаари.

= 0.86; $H_{\text{exp}} = 0.45$; $H_{\text{ob}} = 0.06$) и Валаам ($A = 3.0$; $P_{99\%} = 0.86$; $H_{\text{exp}} = 0.42$; $H_{\text{ob}} = 0.05$) можно объяснить также уникальными природными особенностями островов (см. [9]).

Карельская популяция *A. l. petraea* была проанализирована примерно 20 лет назад Ван Треурен и соавт. [11] по 10 микросателлитным локусам. Для того чтобы выявить возможные изменения в генетической структуре, произошедшие за это время, мы провели свое исследование. Результаты показали, что увеличилось аллельное разнообразие и произошли изменения в размерах аллелей по некоторым локусам, вероятно в результате мутационных событий. Достоверность различий подтверждена для четырех локусов из шести сравниваемых с помощью χ^2 -критерия (табл. 3). Внутрипопуляционное разнообразие, оцененное коллегами [11], оказалось невысоким для аутбредного вида ($P_{99\%} = 0.40$; $H_{\text{exp}} = 0.145$). Наши данные показали, что за прошедшие почти 20 лет уровень полиморфности увеличился ($P_{99\%} = 0.64$) и стал сопоставимым с таковым у других перекрестноопыляемых видов растений ($P_{99\%} = 0.51$) [31]. Однако генное разнообразие ($H_{\text{exp}} = 0.16$) (табл. 2) как определяющий показатель уровня генетического разнообразия остался ниже среднего значения, вычисленного на основе 36 аутбредных видов растений ($H_{\text{exp}} = 0.19$) [31]. Пониженный уровень ожидаемой гетерозиготности медвежьегорской популяции *A. l. petraea* можно объяснить ее пространственной изолированностью — значительной удаленностью от других популяций. Особенности микроэволюционных процессов в замкнутых популяциях (уменьшение скорости миграции генов, усиление роли дрейфа генов и др.) способствуют снижению уровня панмиксии и генетического разнообразия [10, 16]. Однако, несмотря на отсутствие потока генов и

небольшую численность, карельская популяция *A. l. petraea* успешно возобновляется на протяжении длительного периода времени: она известна с 1941–1944 гг. [32]. По-видимому, этому способствует хорошо развитая система самонесовместимости *A. l. petraea* и постоянное перекомбинирование генетического материала при скрещиваниях.

Определение степени генетической дифференциации исследованных популяций с помощью статистик генного разнообразия Нея [24] показало, что большая часть общего генного разнообразия приходится на межпопуляционную компоненту. Такое распределение генетического разнообразия характерно для популяций инбредных видов. Однако относительная величина межпопуляционного разнообразия в данном исследовании ($G_{ST} = 0.783$) намного превышает значения этого показателя для британских популяций *A. thaliana* ($G_{ST} = 0.563$) [33], популяций других самоопылителей ($G_{ST} = 0.523$) [34] и континентальных карельских популяций *A. thaliana* ($G_{ST} = 0.527$) [7]. Полученные данные указывают на существенную подразделенность популяций *A. thaliana* в северной части ареала вида, которая может быть результатом ослабления потока генов между ними, так как большая часть проанализированных популяций являются островными, т.е. они в той или иной степени изолированы. Об этих процессах свидетельствуют высокие для локальных популяций значения генетических дистанций Нея (D_N) [25]: среднее D_N составило 0.190. По данным Айала [35], среднее D_N для популяций растений — 0.035. При этом D_N между популяциями бассейна Онежского озера, в составе которых только одна популяция находится на острове, изменялось от 0.168 до 0.235, а между популяциями островов Ладожского озера размах генетических различий больше — от 0.080 до 0.264. Это еще раз подтвер-

Таблица 3. Частоты аллелей микросателлитных локусов в популяции *A. l. petraea* пригорода Медвежьегорска

Локус	Размер аллеля, пн	Частота аллеля	Частота аллеля*	Достоверность различий частот аллелей
<i>ATHCTRI</i>	154	0.05	—	$\chi^2 = 8.45$; $d.f. = 2$; $p < 0.05$
	156	0.95	0.83	
	157	—	0.17	
<i>nga59</i>	100	1.00	1.00	Нет различий
<i>nga111</i>	118	0.338	0.18	Нет различий $\chi^2 = 7.02$; $d.f. = 3$; $p > 0.05$
	142	0.562	0.82	
	144	0.063	—	
	150	0.037	—	
<i>nga162</i>	72	0.088	—	$\chi^2 = 69.96$; $d.f. = 3$; $p < 0.001$
	74	0.837	—	
	78	0.075	—	
	83	—	1.00	
<i>nga168</i>	108	0.975	0.72	$\chi^2 = 13.42$; $d.f. = 2$; $p < 0.01$
	110	0.025	—	
	131	—	0.28	
<i>nga172</i>	118	—	0.35	$\chi^2 = 52.56$; $d.f. = 2$; $p < 0.001$
	122	0.138	0.65	
	126	0.862	—	
<i>nga225</i>	100	1.00	—	—

* По данным Ван Треурен с соавт. [11].

ждает теоретическое положение о том, что в изолированных популяциях, где поток генов значительно ослаблен, формируются уникальные особенности генофонда, что приводит к их существенной генетической дифференциации [16].

Генетические различия исследованных популяций отражены на дендрограмме, построенной с помощью кластерного анализа на основе значенных дистанций Нея (рис. 3). Все исследованные карельские популяции образовали два больших кластера, между которыми нет четкого разделения на популяции бассейна Онежского и Ладожского озер. Наиболее генетически близки популяции Ладоги: Самматсаари и Маркатсимансаари ($D_N = 0.080$), Валаам и Пиени-Сартосаари ($D_N = 0.109$). В один кластер попали две континентальные популяции — Радколье и Медвежьегорск, при этом последняя из них образует наиболее длинное плечо по сравнению со всеми другими исследованными популяциями. Это связано с тем, что популяция Медвежьегорск имеет наибольшие значения D_N (среднее $D_N = 0.173$) и свидетельствует о своеобразии генетической структуры самой северной из исследованных популяций. Следует отметить, что популяция Медвежьегорск расположена на окраине города, и, возможно, в данном случае происходит усиление неблагоприятных воздействий от совмещения естественных экстремальных факторов среды на северной границе ареала вида и факторов ан-

тропогенного загрязнения. Таким образом, в популяции Медвежьегорск, где условия произрастания растений приближены к крайним условиям выживания вида, сохраняются относительно немногие приспособленные генотипы, устойчивые к неблагоприятным факторам среды.

Поскольку отбор действует не на отдельные гены, а на особей в целом, важно исследовать динамику и сохранение генетической изменчивости с учетом взаимодействия нескольких локусов [16]. В связи с этим были изучены мультилокусные гаметические частоты (частоты гаплотипов) и гаметическое неравновесие (неравновесие по сцеплению, LD) между всеми парами микросателлитных локусов. На гаметические частоты и LD могут влиять все эволюционные факторы — отбор, инбридинг, генетический дрейф, генный поток, мутации и генетический “хитч-хайкинг” [16]. В популяции *A. l. petraea* выявлено 17 гаплотипов, при этом три из них встречались часто, с частотой 0.15 каждый, т.е. составили почти половину выборки. В семи популяциях *A. thaliana* выявлено 65 гаплотипов со средним числом гаплотипов на популяцию — 9 (табл. 2). Каждая популяция имеет свой набор гаплотипов и нет общих гаплотипов для популяций. Наибольшее разнообразие вариантов оказалось в популяциях с самым высоким уровнем полиморфизма: в Радколье — 23 гаплотипа, на Валааме — 22, при этом наиболее частыми в Радколье были 2 гаплотипа с

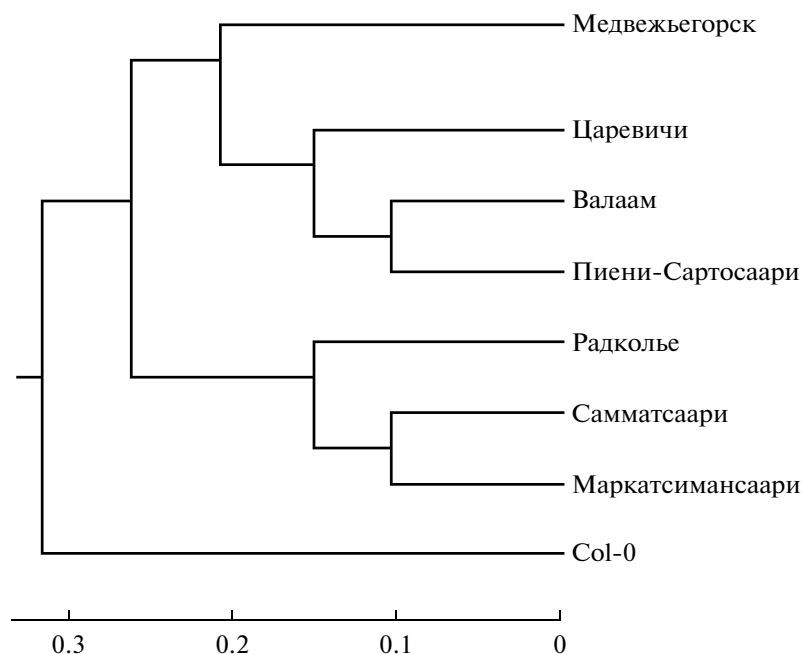


Рис. 3. UPGMA-дендрограмма генетических различий северных природных популяций *A. thaliana*, построенная на основе значений генетических дистанций Нея.

частотой по 0.08, а на Валааме — 2 гаплотипа с частотой 0.10 и 0.12. Для сравнения приведем результаты оценки гаплотипического разнообразия в популяциях *A. thaliana* Скандинавского полуострова: количество гаплотипов варьировало от 1 до 11 и в среднем составило 3 на популяцию [30], что ниже по сравнению с карельскими популяциями. Выявленное нами высокое гаплотипическое разнообразие *A. thaliana* служит еще одним доводом в пользу предположения о постледниковой колонизации территории Карелии множеством различных предковых форм.

У преимущественно самоопыляющихся видов растений генотип организован на основе коадаптированных комплексов генов, т.е. генов, находящихся в гаметическом неравновесии. Созданию этих комплексов способствует отбор и ограничение рекомбинации вследствие инбридинга, что дает возможность образования системы с постоянной гетерогенностью и в значительной степени ограничивает свободу расщепления [4, 5, 36]. Поскольку *A. thaliana* является самоопылителем с небольшой частотой перекрестного опыления [7, 33], его эффективный размер популяции ожидается меньшим, чем у аутбредных видов. Даже независимо от типа отбора небольшой эффективный размер популяции должен приводить к неравновесию по сцеплению [37, 38]. Тест на выявление парных ассоциаций микросателлитных локусов [26] показал наличие неравновесия по сцеплению в двух наиболее полиморфных популяциях *A. thaliana* и в популяции *A. l. petraea*. При этом в популяциях самоопыляющегося вида

процент пар локусов, находящихся в неравновесии по сцеплению, намного больше, чем в популяции перекрестноопыляемого вида (табл. 2). При проведении 21 сравнения по каждой паре локусов значимыми в LD при 5%-ном уровне оказались восемь пар в Радколье (38%), две в Валааме (9.5%) и одна в популяции *A. l. petraea* (4.8%). В популяциях *A. thaliana* большинство пар в LD выявлено для локусов, находящихся в разных хромосомах, что может служить доказательством их адаптивного преимущества. Часто такие ассоциации образовывались между 1-й, 5-й и 3-й хромосомами, и только одна пара между двумя соседними локусами первой хромосомы (*nga59–nga111*). В популяции Радколье среди пар локусов в LD доминировали *ATHCTR*, *nga59*, *nga111* и *nga162*, а в популяции Валаам обнаружены пары: *nga59–nga225* и *nga168–nga172*. Интересно, что большинство ассоциированных локусов в карельских популяциях имеют аллели с большим количеством повторов. Так, в популяции Валаам это *nga59*, *nga225* и *nga172*, а Радколье — *nga59* и *nga111* (рис. 2). Микросателлитные локусы, как некодирующие, в основном нейтральны. Показано [16], что для таких локусов снижение равновесия в ряду поколений обычно ускоряется отбором в ассоциированных с ними локусах (так называемый генетический “хитч-хайкинг”). Следовательно, они являются нейтральными маркерами для блока генов, имеющих адаптивное значение. С другой стороны, появляются свидетельства в пользу функциональной значимости отдельных вариантов tandemных повторов и, таким образом,

их подверженности возможному давлению отбора [17]. Исходя из этого, не исключено, что микросателлитные локусы могут иметь значение для адаптации к условиям северной границы ареала, хотя по нашим данным точные генетические механизмы (мультилокусный отбор, инбридинг, дрейф генов и др.) значимой неслучайной ассоциации аллелей не могут быть установлены. Тем не менее нами показано, что *A. thaliana* способен поддерживать высокий уровень LD по микросателлитным локусам на северной периферии ареала. Для сравнения приведем результаты оценки неравновесия по сцеплению микросателлитных локусов среди 42 экотипов арабидопсиса, собранных со всего мира – 12.1% [19].

Таким образом, полученные результаты демонстрируют активную адаптацию вида *A. thaliana* к условиям северной периферии его ареала. Свидетельством чего является повышенное популяционно-генетическое разнообразие, способствующее отбору новых генетических вариантов, и наличие аллелей с большим количеством динуклеотидных повторов по микросателлитным локусам, которые при этом часто ассоциированы в пары, находящиеся в неравновесии по сцеплению. Снижение равновесия изученных локусов может быть связано с генетическим “хитч-хайкингом” или (как результат накопленных прошедших мутационных событий) поддерживаться естественным отбором. Исходя из этого, можно предположить, что в северных природных популяциях *A. thaliana* идет отбор на увеличение генетического разнообразия, которое представляет основу адаптационных процессов и является в данном случае необходимой предпосылкой для выживания их в экстремальных и нестабильных условиях.

Популяция редкого для Карелии вида – *A. l. petraea* – находится в условиях полной изоляции. Особенности микроэволюционных процессов в таких популяциях способствуют усилению инбридинга, в результате чего сохраняется невысокий уровень внутривидового разнообразия. К тому же популяция существует в данных климатических условиях на протяжении длительного периода времени и, по всей видимости, процессы адаптации уже завершены. Хорошо развитая система самонесовместимости вида и постоянное перекомбинирование генетического материала при скрещиваниях позволяют популяции успешно возобновляться даже при невысоком уровне генетического разнообразия.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (13-04-98838-р_север_a).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. King G., Nienhuis J., Hussey C. Genetic similarity among ecotypes of *Arabidopsis thaliana* estimated by

- analysis of restriction fragment length polymorphism // Theor. Appl. Genet. 1993. V. 86. P. 1028–1032.
2. Price R.A., Palmer J.D., Al-Shehbaz I.A. Systematic relationships of *Arabidopsis* // *Arabidopsis* / Eds Meyerowitz E.M., Somerville C. N.Y.: Cold Spring Harbor, 1994. P. 7–19.
3. Todokoro S., Terauchi R., Kawano S. Microsatellite polymorphisms in natural populations of *Arabidopsis thaliana* in Japan // Jpn. J. Genet. 1995. V. 70. P. 737–749.
4. Weir B.S., Allard R.W., Kahler A.L. Analysis of complex allozymes polymorphisms in barley population // Genetics. 1972. V. 72. № 3. P. 505–523.
5. Животовский Л.А. Интеграция полигенных систем в популяциях. М.: Наука, 1984. 182 с.
6. Колчанов Н.А., Суслов В.В., Шумный В.К. Молекулярная эволюция генетических систем // Палеонтологич. журн. 2003. № 6. С. 58–71.
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. Федоренко О.М., Грицких М.В. Генетическое разнообразие природных популяций *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. на северной границе его ареала: RAPD-анализ // Генетика. 2008. Т. 44. № 4. С. 496–499.
9. Федоренко О.М., Зарецкая М.В., Лебедева О.Н., Титов А.Ф. Генетическое разнообразие природных популяций *Arabidopsis thaliana* (L.), расположенных на северной периферии ареала вида // Тр. КарНЦ РАН. Сер. биогеография. 2014. № 2. С. 36–42.
10. Левонтин П.С. Генетические основы эволюции. М.: Мир, 1978. С. 157–161.
11. Van Treuren R., Kuittinen H., Kärkkäinen K.E. et al. Evolution of microsatellites in *Arabis petraea* and *A. lyrata*, outcrossing relatives of *Arabidopsis thaliana* // Mol. Biol. Evol. 1997. V. 14. P. 220–229.
12. Savolainen O., Langley C.H., Lazzaro B., Freville H. Contrasting patterns of nucleotide variation at the alcohol dehydrogenase locus in the outcrossing *Arabidopsis lyrata* and the selfing *Arabidopsis thaliana* // Mol. Biol. Evol. 2000. V. 17. P. 645–655.
13. Riihimäki M., Podolsky R., Kuittinen H. et al. Studying genetics of adaptive variation in model organisms: flowering time variation in *Arabidopsis lyrata* // Genetica. 2005. № 123. P. 63–74.
14. Koch M., Haubold R., Mitchell-Olds T. Molecular systematics of the Brassicaceae: evidence from coding plastidic *Mat K* and nuclear *CHS* // Amer. J. Bot. 2001. V. 88. P. 534–544.
15. Федоренко О.М., Грицких М.В., Топчиева Л.В., Лебедева О.Н. Сравнительный анализ генетической структуры природных популяций двух видов растений *Arabidopsis* с разной степенью панмиксии // Генетика. 2011. Т. 47. № 4. С. 508–515.
16. Хедрик Ф. Генетика популяций. М.: Техносфера, 2003. 592 с.
17. Никитина Т.В., Назаренко С.А. Микросателлитные последовательности ДНК человека: мутационный процесс и эволюция // Генетика. 2004. Т. 40. № 10. С. 1301–1318.
18. Bell C.J., Ecker J.R. Assignment of 30 microsatellites to the linkage map of *Arabidopsis* // Genomics. 1994. V. 19. P. 137–144.

19. Innan H., Terauchi R., Miyashita T. Microsatellite polymorphism in natural populations of the wild plant *Arabidopsis thaliana* // Genetics. 1997. V. 146. P. 1441–1452.
20. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / Под ред. Алтухова Ю.П. М.: Наука, 2004. 619 с.
21. Оно С. Генетические механизмы прогрессивной эволюции. М.: Мир, 1973. 227 с.
22. Wagner A. Gene duplications robustness and evolutionary innovations // Bioessays. 2008. V. 30. P. 367–373.
23. Животовский Л.А. Статистические методы анализа частот генов в природных популяциях // Итоги науки и техники. Общая генетика. М.: ВИНТИ, 1983. Т. 8. С. 76–104.
24. Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1973. V. 70. P. 3321–3323.
25. Nei M. Genetic distance between populations // Amer. Natur. 1972. V. 106. P. 283–292.
26. Slatkin M. Linkage disequilibrium in growing and stable populations // Genetics. 1994. V. 137. P. 331–336.
27. Stenøien H.K., Sastad S.M. Genetic structure in three haploid peat mosses (*Spliagnum*) // Heredity. 1999. V. 82. P. 391–400.
28. Ohta T., Kimura M. The model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a genetic population // Genet. Res. 1973. V. 22. P. 201–204.
29. Hardy O.J., Charbonnel N., Freville H., Heuertz M. Microsatellite alleles sizes: a simple test to assess their significance on genetic differentiation // Genetics. 2003. V. 163. P. 1467–1482.
30. Stenøien H.K., Fenster Ch.B., Tonteri A., Savolainen O. Genetic variability in natural populations of *Arabidopsis thaliana* in northern Europe // Mol. Ecol. 2005. V. 14. P. 137–148.
31. Hamrick J.L., Linhart I.B., Mitton J.B. Relationship between life history characteristic and electrophoretically detectable genetic variation in plants // Annu. Rev. Ecol. Syst. 1979. V. 10. P. 173–200.
32. Кравченко А.В., Гнатюк Е.П., Кузнецов О.Л. Распространение и встречаемость сосудистых растений по флористическим районам Карелии. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2000. 75 с.
33. Abbott R.J., Gomes M.F. Population genetic structure and outcrossing rate of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // Heredity. 1989. V. 62. Pt 3. P. 411–418.
34. Gottlieb L.D. Electrophoretic evidence and plant populations // Prog. Phytchem. 1981. V. 7. P. 1–46.
35. Айала Ф., Кайзер Дж. Современная генетика. М.: Мир, 1988. С. 215–216.
36. Clegg M.T., Allard R.W., Kahler A.L. Is the gene the unit of selection? Evidence from two experimental plant populations // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1972. V. 69. P. 2474–2478.
37. Hill W.G., Robertson A. Linkage disequilibrium in finite populations // Theor. Appl. Genet. 1968. V. 38. P. 226–231.
38. Ohta T., Kimura M. Linkage disequilibrium due to random genetic drift // Genet. Res. 1969. V. 13. P. 47–55.
39. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. М.: Академкнига, 2003. 431 с.

Specific Features of Microsatellite Polymorphism in Two Species of *Arabidopsis*

O. M. Fedorenko and M. V. Zaretskaya

Institute of Biology, Karelian Research Center of the Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, 185910 Russia
e-mail: fedorenko_om@mail.ru

The results of an analysis of microsatellite polymorphism in two closely related *Arabidopsis* species that differing by their crossing types are presented. Considerable genetic diversity was revealed in *Arabidopsis thaliana* populations located at the northern periphery of the species range (Karelia), which was not typical of self-pollinating species. Populations from the northern boundary of the species range in the basin of Lake Onega were found to be more polymorphic ($P_{99\%} = 0.43$; $H_{\text{exp}} = 0.17$) as compared to populations of the islands of Lake Ladoga, which are located approximately 300 km to the south ($P_{99\%} = 0.39$; $H_{\text{exp}} = 0.15$). It is suggested that the high population polymorphism of *A. thaliana* in the northern part of its range is most likely associated with hostile growing conditions and is the basis for the adaptation processes. *A. thaliana* populations are highly differentiated ($G_{\text{ST}} = 0.783$), which is typical of inbred species. However, such a high interpopulation differentiation is probably due to the low level of gene flow. Specifically, five populations out of seven examined are located on the islands, i.e., are to some extent isolated. These great differences between *A. thaliana* populations in terms of polymorphism, as well as the high haplotype diversity, suggests postglacial colonization of the Karelian territory by many different ancestral forms. The participation of unique alleles of microsatellite loci with many dinucleotide repeats in the adaptive evolution of *A. thaliana* is discussed. A species population that is rare for Karelia, *Arabidopsis lyrata* ssp. *petraea*, is in complete isolation and, due to specific features of the microevolutionary processes in such populations, is characterized by the polymorphism level, which is low for outbred species ($P_{99\%} = 0.64$; $H_{\text{exp}} = 0.16$). Nevertheless, this population exists in Karelia for a long period of time, pointing to its successful adaptation to these conditions.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis lyrata* ssp. *petraea*, genetic diversity, microsatellite markers, northern limits of the species range, isolation by distance.

English translation of the paper is published in “Russian J. Genetics” (2015, vol. 51, no. 12), www.maik.ru.