

УДК 630*165.3

О. Ю. Баранов¹, В. Балиукас², А. Юшкаускайте²¹ Институт леса Национальной академии наук Беларуси² Институт леса Центра аграрных и лесных наук Литвы

**АНАЛИЗ СТЕПЕНИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА
СЕМЕННОГО ПОТОМСТВА *PINUS SYLVESTRIS* L. И *BETULA PENDULA* ROTH.
С РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНЬЮ ФЕНОТИПИЧЕСКОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ**

Проведена оценка пластичности фенотипических признаков и уровня генетического полиморфизма полусибсовых семей сосны обыкновенной и березы повислой. В ходе исследований выполнены: выделение суммарной ДНК из растительных образцов; амплификация микросателлитных локусов, локализованных в ядре, на основе использования технологии полимеразной цепной реакции; электрофоретический анализ ампликонов, генотипирование образцов, описание выявляемого полиморфизма и генетической структуры. Установлено, что группы семей сосны обыкновенной с высоким уровнем экологической пластичности превышают по показателям генетического полиморфизма группы семей с низким уровнем экологической пластичности. Уровень генетической дифференциации был наименьшим среди групп каждой из семей. Для березы повислой установлено: уровень изменчивости для групп, сформированных на основании анализа отдельных признаков и их сочетаний, являлся сходным, что указывает на ограниченное число генов, детерминирующих признаки пластичности. Для каждого признака были выявлены локусы, являющиеся генетическими маркерами для проведения отбора селективируемых признаков. Уровень генетического разнообразия расчетного пыльцевого пула был выше для пластичных семей. Анализ генетической структуры пыльцевого пула, выраженный в частотах встречаемости аллельных вариантов не выявил достоверной корреляции ни с одним из изученных признаков.

Ключевые слова: сосна обыкновенная, береза повислая, генетическая изменчивость, ДНК-маркеры.

O. Baranov¹, V. Baliuckas², A. Jushkauskaite²¹Institute of Forest of the National Academy of Sciences of Belarus²Institute of Forestry of the Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry

**ANALYSIS OF THE DEGREE OF GENETIC POLYMORPHISM
IN SEED PROGENY OF *PINUS SYLVESTRIS* L. AND *BETULA PENDULA* ROTH.
WITH VARIOUS LEVEL OF PHENOTYPIC PLASTICITY**

Evaluation of phenotypic plasticity characteristics and level of genetic polymorphism half-sibling families of Scots pine and Silver birch was carried out. The main stage of work were: isolation of the total DNA from plant samples; carrying out amplification of microsatellite loci that are localized in the nucleus, using technology based on polymerase chain reaction; electrophoretic analysis of amplicons, genotyping of samples, description detectable polymorphism and genetic structure. It was found that the group of families of Scots pine with high ecological plasticity levels exceed the indicators of genetic polymorphism of the group of families with a low level of ecological plasticity. The level of genetic differentiation was the lowest among the groups of each of the families. For Silver birch found that variability groups formed on the basis of analysis of individual features and their combinations was similar, indicating that a limited number of genes determining signs of plasticity. For each trait loci have been identified, which are genetic markers for selection of selectable features. The level of genetic diversity in the design of pollen pool was higher for plastic families. Analysis of the genetic structure of pollen pool, expressed in the occurrence frequencies of allelic variants showed no significant correlation with any of the studied traits.

Key words: scots pine, silver birch, genetic variation, DNA markers.

Введение. Фенотипическая пластичность в последнее время является актуальной темой научных исследований, что связано как с оценкой влияния отдельных абиотических факторов на морфометрические параметры лесных древесных пород, так и с изучением адаптационного потенциала растений в условиях изменяющегося климата, интенсификации процессов

природопользования, увеличения числа интродуцентов, инвазивных видов патогенов и вредителей [1]. Основным аспектом фенотипической пластичности в эволюционной биологии является анализ основных типов изменений растений и установление молекулярных механизмов контроля и реализации генетической информации. Решение данных вопросов позво-

лит прогнозировать изменения структуры ареалов видов, структуры популяций и лесных фитоценозов, продуктивности и устойчивости древостоев различного происхождения в условиях глобального изменения климата. Тем не менее до настоящего времени проблематика фенотипической пластичности остается открытой, что связано с комплексным характером данного явления и определенной сложностью проведения исследований для получения объективных данных. Несмотря на наличие большого числа литературных данных, большинство из них посвящено фрагментарному изучению отдельных признаков у ограниченного числа видов или зачастую содержат спорные и противоречивые результаты и выводы, что не позволяет сформировать единую концепцию и методологию анализа явления фенотипической пластичности [1].

Одним из подходов для изучения фенотипической пластичности является использование генетических маркеров, основанных на анализе структуры и полиморфизма нуклеотидных последовательностей молекулы ДНК [2]. К настоящему времени использование ДНК-маркеров позволило решить фундаментальные и прикладные задачи, связанные с изучением генфондов различных растительных видов, включая оценку интенсивности миграции генов между популяциями, анализ межвидовой гибридизации, построение генетических карт, исследование уровня генетического разнообразия и др. За последнее десятилетие благодаря полному или частичному секвенированию геномов различных растительных видов большие успехи были достигнуты в области идентификации генов и их комплексов, ответственных за проявление хозяйственно ценных признаков [3]. Изучение изменчивости данных локусов позволяет находить аллельные варианты и генотипы, характеризующие ту или иную степень проявления признака [4].

Все вышесказанное обусловило постановку цели данной работы – определение уровня генетической изменчивости полусибсовых семей сосны обыкновенной и березы повислой с различной степенью экологической пластичности признаков на основании анализа полиморфных локусов ядерной ДНК.

Основная часть. *Сосна обыкновенная.* В ходе предварительных морфометрических исследований были изучены 140 полусибсовых семей сосны обыкновенной из 7 популяций Литвы, представленные в 5 испытательных культурах (20 семей в каждом объекте). Измерения проводились в возрасте 30 лет. Фенотипическая пластичность семей была определена по признакам: высота дерева, диаметр ствола,

кривизна ствола, толщина и угол наклона ветвей, плотность древесины [5]. Объектами молекулярно-генетических исследований явились деревья (потомство) из двух полусибсовых семей сосны обыкновенной с различным уровнем экологической пластичности по большому числу исследованных признаков: 462 (с высоким уровнем экологической пластичности) и 479 (с низким уровнем экологической пластичности). В качестве экспериментального материала для выделения ДНК была использована хвоя. Образцы для каждой из семей были собраны в испытательных культурах, произрастающих в трех географически удаленных регионах (D, I, V). Для микросателлитного анализа использовались 5 полиморфных SSR-маркеров ядерной ДНК (локусы PtTX 3116, PtTX 4001, PtTX 2123, PtTX 3013, PtTX 3020). Всего проанализировано 6 выборок: 462D, 462I, 462V, 479D, 479I, 479V (84 дерева).

Береза повислая. Объектами молекулярно-генетических исследований являлись полусибсовые семьи березы повислой: 18–48, 40–117, 18–47, 49–71, 16–161, 18–21, 40–119, 16–162, 49–69, 49–74, 40–118, 16–163. В качестве экспериментального материала для выделения ДНК были использованы ткани листовых пластинок. Общее число образцов (индивидов) составило 160 шт. (по 15 деревьев в каждой группе).

Все исследуемые семьи были сгруппированы по признаку пластичности: отсутствие пластичности – 40–117, 18–48; пластичные семьи – 49–69, 49–74, 49–71, 40–118, 40–119, 16–161, 16–162, 16–163, 18–21, 18–47, в том числе пластичные по 1 признаку – 49–71, 16–161, 18–47; пластичные по 2 признакам – 40–119, 16–162, 18–21; пластичные по 3–4 признакам – 49–69, 49–74, 40–118, 16–163.

Также для всех исследуемых семей были определены признаки, по которым была установлена пластичность: 18–47 – приживаемость; 49–71 – сезонное изменение окраски листьев; 16–161 – сезонное изменение окраски листьев; 18–21 – приживаемость, сезонное изменение окраски листьев; 40–119 – высота, сезонное изменение окраски листьев; 16–162 – высота, начало вегетации; 49–69 – плотность древесины, высота, сохранность, сезонное изменение окраски листьев; 49–74 – плотность древесины, сохранность, начало вегетации, сезонное изменение окраски листьев; 40–118 – высота, кривизна ствола, сохранность, сезонное изменение окраски листьев; 16–163 – высота, диаметр ствола, сезонное изменение окраски листьев.

В качестве маркеров были использованы полиморфные SSR локусы берез – L 2.2, L 1.10, L 7.8, L 10.1, L 0.22, L 7.3, L 5.4. Выбор данных маркеров был обусловлен их высоким уровнем

изменчивости (на основании предварительного анализа показателей полиморфизма: числа аллелей на локус (>5), наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности (0,40–0,90)).

С целью оценки взаимосвязи полиморфизма фенотипических признаков и молекулярно-генетических маркеров были рассчитаны основные параметры генетического полиморфизма.

Заключение. *Сосна обыкновенная.* Анализ распределения значений параметра ожидаемой гетерозиготности (усредненного для 5 локусов) среди групп выявил достоверные различия между семьями. Так, наибольшим значением параметра ожидаемой гетерозиготности (H_e) характеризовалось полусибсовое потомство семьи 462 (0,44–0,47) вне зависимости от региональной принадлежности места произрастания. При этом наибольшие значения были выявлены по локусу PtTX 3116 (0,69–0,78), что вероятно указывает на локализацию данного маркера в группе сцепления с генами, детерминирующими основные морфологические параметры сосны обыкновенной или оказывающими влияние на проявление экологической пластичности данных признаков. Для семьи 479 значение H_e составили 0,33–0,39, по локусу PtTX 3116 – 0,32–0,53.

Значения параметра наблюдаемой гетерозиготности (H_o) для древостоя с низкой пластичностью 479D (0,45) превышали величины для пластичных выборок 462I (0,44) и 462V (0,43). В то же время анализ групп из географически сходных регионов указал на постоянное превышение показателя наблюдаемой гетерозиготности семьи 462 с высоким уровнем экологической пластичности (0,43, 0,44, 0,49) по сравнению со значениями H_o семьи 479 (0,37, 0,42, 0,45) в каждой конкретной локации. Полученные результаты, по всей видимости, указывают на влияние условий произрастания на отбор определенных генотипов и, как следствие, на формирование генетической структуры насаждений сосны обыкновенной. Как и в предыдущем случае, наибольший вклад в значения усредненного показателя H_o внес локус PtTX 3116.

Сравнительное изучение значений показателей гетерозиготности показало, что полусибсовое потомство семьи 462 характеризовалось сходством значений H_o и H_e (различия менее 1%), указывающее на наличие равновесного (по Харди – Вайнбергу) состояния генетической структуры. В то же время в семье 479 наблюдался существенный избыток гетерозигот ($>15\%$). Таким образом, элиминация крайних (альтернативных) гомозиготных генотипов, по всей видимости, является отражением процессов сужения генетического и фенотипического

разнообразия и, как следствие, снижения уровня пластичности морфологических признаков в данной семье.

Береза повислая. Анализ параметров ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготности для различных локусов березы повислой выявил высокий уровень вариации значений среди групп семей (0,18–1,00). При этом уровень как наблюдаемой, так и ожидаемой гетерозиготности носил индивидуальный характер для каждой семьи по изученному перечню локусов.

Кроме того, характер распределения параметров гетерозиготности для различных локусов между семьями березы повислой был разносторонним. Так, локус L 10.1 характеризовался значительной вариацией значений среди полусибсовых семей по сравнению с маркером L 5.4, для которого максимальное значение отклонения от усредненного показателя не превысило 30%, а среднее отклонение составило 11% от рассчитанного показателя. Аналогичные параметры для локуса L 10.1 превысили 50% для максимального и 39% для усредненного отклонения. Анализ локусов, находящихся в одной группе сцепления (L2.2 и L7.3), также выявил разнонаправленность процессов формирования генотипической структуры среди семей, характеризующихся различным уровнем и сочетанием признаков.

Сходные результаты были получены и для параметра ожидаемой гетерозиготности, отражающей генотипическую структуру выборок при условии равновероятного скрещивания. В то же время необходимо отметить, что в большинстве случаев направленность и характер распределения среди семей по показателям H_o и H_e совпадали, что подтверждает формирование специфической генотипической структуры для каждой из выборок.

Таким образом, полученные данные, по всей видимости, указывают на специфичность детерминации изученных селективируемых признаков, для которых выявлены пластичность и отсутствие прямой взаимосвязи между ними. Дополнительным подтверждением данного предположения являются значения параметра наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности среди групп семей березы повислой, объединенных по числу диагностированных признаков, для которых было установлено наличие пластичности. Усредненные значения параметров как наблюдаемой, так и ожидаемой гетерозиготности между группами достоверно не отличались, хотя имеются различия по степени пластичности выборок.

Несмотря на отсутствие значимых отличий по параметру H_o , характер кластеризации значений, полученных для индивидуальных локу-

сов, совпадал с уровнем пластичности, выявляемым в группах. В то же время данная зависимость не была выявлена по показателю H_e , что по всей видимости свидетельствует на превалирование генотипических данных, ассоциированных с параметром пластичности.

Исходя из полученных результатов, на следующем этапе исследований был проведен анализ ассоциации различных локусов (по параметру наблюдаемой гетерозиготности) в группах с разным уровнем пластичности. Для ряда локусов выявлена корреляция только внутри отдельных групп, что также указывает на отсутствие взаимосвязи между уровнем изменчивости и селекционным критерием уровня пластичности.

Оценка генетической структуры семей показала, что достоверная корреляция частот встречаемости аллельных вариантов для семей с селективируемыми признаками установлена только для локуса L 10.1 с признаком фенологии.

Анализ параметров подразделенности показал, что группы в целом и группы, сформированные по отдельным селективируемым признакам, характеризуются сходством показателей F_{st} , что указывает на роль ограниченного числа генов в геноме, ассоциированных с параметрами пластичности.

Детальный анализ параметров гетерозиготности по группам, сформированным на основании одного селективируемого признака, выявил корреляцию между уровнем изменчивости по некоторым локусам и показателями пластичности. Достоверные различия между группами в целом по набору локусов не были установлены. В то же время по признаку приживаемости уровень наблюдаемой гетерозиготности был выше в группе пластичных семей. По признаку диаметра ствола наблюдалась обратная тенденция – усредненный уровень H_o у пластичной группы был ниже. Детальный анализ полученных данных показал, что в каждой группе наблюдалась разнонаправленность формирования

изменчивости для различных локусов. Значимые результаты были получены по признаку диаметра ствола для локуса L 10.1.

В целом полученные данные также подтверждают предположение о генетической детерминации изученных признаков ограниченным числом генов. SSR локусы, для которых выявлены достоверные отличия по уровню гетерозиготности, могут выступать молекулярными маркерами для оценки определенных селективируемых признаков.

Одним из направлений анализа была оценка влияния генетической структуры отцовской составляющей на уровень пластичности. Для этого определялся консенсусный генотип матери по каждому локусу, который впоследствии вычитался из генотипов индивидов, оставляя отцовскую составляющую.

Анализ показателя числа выявленных аллелей для каждого локуса и усредненного значения для выборки в целом выявил достоверную корреляцию с показателями пластичности: группы с более высоким уровнем пластичности характеризовались большим числом аллельного разнообразия (13 против 8), что по всей видимости также может определять увеличение вариации селективируемых признаков.

Сходные результаты были получены при оценке параметра уровня генетического разнообразия H_e , рассчитанного на основании гаплоидной модели пыльцевого пула: общее разнообразие генетической структуры пыльцевого пула было выше в группе пластичных семей (0,81 против 0,75). Более высокие показатели индекса разнообразия Шеннона были также установлены для групп семей, характеризующихся большим числом выявленных пластичных признаков (2,06 против 1,69).

Анализ генетической структуры пыльцевого пула, выраженный в частотах встречаемости аллельных вариантов, не выявил достоверной корреляции ни с одним из изученных признаков.

Литература

1. Pigliucci M. Phenotypic Plasticity: Beyond Nature and Nurture. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2001. 328 p.
2. Which DNA Marker for Which Purpose. Final Compendium of the Research Project Development, optimisation and validation of molecular tools for assessment of biodiversity in forest trees in the European Union / E. M. Gillet (lead.); DGXII Biotechnology FW IV Research Programme Molecular Tools for Biodiversity. Frankfurt, 1999. 253 p.
3. Dixon R. A., Lamb C. J. Metabolic engineering: prospects for crop improvement through the genetic manipulation of phenylpropanoid biosynthesis and defense responses – a review // *Gene*. 1996. Vol. 179. P. 61–71.
4. Pigliucci M. Environmental Heterogeneity: Temporal and Spatial [Electronic resource] // Wiley online library. Published Online. 19 Apr. 2001. URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/npg.els.0001766/full> (date of access: 04.01.2016).
5. Shukla G. K. Some statistical aspects of partitioning genotype – environment components of variability // *Heredity*. 1972. Vol. 29. P. 237–245.

References

1. Pigliucci M. Phenotypic Plasticity: Beyond Nature and Nurture. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2001. 328 p.
2. Gillet E. M. Which DNA Marker for Which Purpose. Final Compendium of the Research Project Development, optimisation and validation of molecular tools for assessment of biodiversity in forest trees in the European Union. Frankfurt, 1999. 253 p.
3. Dixon R. A., Lamb C. J. Metabolic engineering: prospects for crop improvement through the genetic manipulation of phenylpropanoid biosynthesis and defense responses – a review. *Gene*, 1996, vol. 179, pp. 61–71.
4. Pigliucci M. Environmental Heterogeneity: Temporal and Spatial. URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/npg.els.0001766/full> (accessed 04.01.2016).
5. Shukla G. K. Some statistical aspects of partitioning genotype – environment components of variability. *Heredity*, 1972, vol. 29, pp. 237–245.

Информация об авторах

Баранов Олег Юрьевич – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории генетики и биотехнологии. Институт леса Национальной академии наук Беларуси (246001, г. Гомель, ул. Пролетарская, 71, Республика Беларусь). E-mail: betula-belarus@mail.ru

Балиюкас Виргилиус – кандидат биомедицинских наук, заведующий отделом генетики и селекции. Институт леса Центра аграрных и лесных наук Литвы (53101, н. п. Гирионис, ул. Липовая, 1, Каунасский р-н, Литовская Республика). E-mail: Virgilijus.Baliuckas@mi.lt

Юшкаускайте Аушра – аспирант, научный сотрудник отдела генетики и селекции. Институт леса Центра аграрных и лесных наук Литвы (53101, н. п. Гирионис, ул. Липовая, 1, Каунасский р-н, Литовская Республика). E-mail: juskauskaite@gmail.com

Information about the authors

Oleg Baranov – PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Genetics and Biotechnology. Institute of Forest of the National Academy of Sciences of Belarus (71, Proletarskaya str., 246001, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: betula-belarus@mail.ru

Baliuckas Virgilijus – PhD (Biomedicine), Head of Genetics and Breeding Department. Institute of Forestry of the Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry (1, Liepu str., 53101, Girionys, Kaunas distr., Republic of Lithuania). E-mail: Virgilijus.Baliuckas@mi.lt

Jushkauskaite Aushra – PhD student, researcher, Genetics and Breeding Department. Institute of Forestry of the Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry (1, Liepu str., 53101, Girionys, Kaunas distr., Republic of Lithuania). E-mail: juskauskaite@gmail.com

Поступила 16.02.2015