

УДК 575.858

А.В. Рудиковский<sup>1</sup>  
 О.Н. Потемкин<sup>2</sup>  
 Е.Г. Рудиковская<sup>1</sup>  
 Е.В. Кузнецова<sup>3</sup>

A.V. Rudikovskiy  
 O.N. Potemkin  
 E.G. Rudikovskaya  
 E.V. Kuznetsova

## НАЧАЛЬНЫЙ ЭТАП ОБРАЗОВАНИЯ ФОРМ У ЯБЛОНИ СИБИРСКОЙ

### A PRIMARY STAGE OF FORMATION OF SIBERIAN CRAB APPLE FORMS

**Аннотация.** Показано, что карликовые деревья яблони сибирской произошли от высокорослых форм яблони, что подтверждается идентичностью последовательности ITS1 и наличием достоверных генетических потоков между изучаемыми формами. Мы предполагаем, что образование таких форм является начальным этапом экологического видообразования. Об этом говорит отсутствие процессов полиплоидизации, экологически опосредованный отбор против гибридов, а также параллельное образование (во времени и пространстве) карликовых форм яблони сибирской. Об этом свидетельствует также установленная с помощью микросателлитного анализа мозаичность генома и полифилетичность происхождения карликовых форм.

**Ключевые слова:** яблоня сибирская, карликовые формы, экологическое видообразование, контактная зона.

**Summary.** It has been shown that dwarf Siberian crab apple forms had descended from tall apple trees, which is supported by identity of ITS1 structure and presence of detected genetic flow among the forms involved. Formation of such forms is presumed to be an initial stage of ecological speciation. This is evidenced by absence of polyploidization, natural selection against hybrids, as well as parallel formation (in time and space) of dwarf Siberian crab apple forms. Genomic mosaicism and polyphyletic origin of dwarf forms revealed by the microsatellite analysis also confirm this viewpoint.

**Key words:** Siberian crab apple, dwarf forms, ecological species formation, contact zone.

**Введение.** В последнее время наблюдается оживление научного интереса к идее о том, что макроэволюция является результатом комплекса микроэволюционных процессов, происходящих под действием экологической дивергентной селекции. Это процесс экологического видообразования. Оно определяется как «процесс, в ходе которого развиваются барьеры для потока генов между популяциями как результат действия дивергентной селекции на экологической основе» (Schluter, 2001, 2009). Обновление интереса к механизмам возникновения репродуктивной изоляции приводит к постепенному пересмотру старой классификации видообразования, основанной только на основе географической разделенности популяций (аллопатрия или симпатрия) (Rundle, 2005).

Фактические доказательства экологического видообразования получены как в условиях дикой природы, так и в экспериментальных условиях (Schluter, 2009). Существуют два различных подхода в изучении этого процесса (Via, 2009). Оба подхода основаны на изучении дивергенции от варибельной популяции к подразделенным популяциям. Главной целью исследований является изучение развития внутренних барьеров для потока генов. Первый подход (ретроспективный) основан на изучении уже сформировавшихся видов (или на стадии завершения видообразования). В этом случае оцениваются прошлые события и делаются выводы о причинах видообразования. Второй подход на уровне популяции анализирует процессы взаимодействия экологии и генетических факторов,

<sup>1</sup>Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, ул. Лермонтова, 132; 664033, Иркутск, Россия; e-mail: prod@sifibr.irk.ru

<sup>2</sup>Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, ул. Золотодолинская, 101; 630090, Новосибирск, Россия; e-mail: 1964o@mail.ru

<sup>3</sup>Лимнологический институт СО РАН, ул. Улан-Баторская, 3; 664033 Иркутск, Россия; e-mail: elenakuznetsova01@gmail.com

<sup>1</sup>Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, SB RAS, Lermontova str., 132; 664033, Irkutsk, Russia

<sup>2</sup>Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Zolotodolinskaya str., 101; 630090, Novosibirsk, Russia

<sup>3</sup>Limnological Institute, SB RAS, Ulan-Batorskaya str., 3; 664033, Irkutsk, Russia

в различных ситуациях приводящих к развитию барьеров для потока генов. При помощи анализа частично изолированных экотипов, или рас можно изучать генетические изменения, сопровождающие репродуктивную изоляцию между видами, аккумуляция которых приводит к образованию вида.

Интенсивное формообразование у яблони ягодной было инициировано при переносе ее с берегов Селенги в район озера Щучье Гусиноозерского района Республики Бурятия, находящийся в зоне контакта сухой степи и тайги (Рудиковский и др., 2008). Под влиянием особых экологических условий контактной зоны рост растений яблони сибирской подавляется, и растения приобретают карликовый или суперкарликовый габитус, формируются в виде куста, а также имеют длинные чашелистики, более узкие листья и мелкий плод.

Целью нашей работы был поиск доказательств того, что появление карликовых форм является результатом процессов ранней стадии экологического видообразования яблони сибирской, произрастающей в необычных для нее условиях контакта леса и степи.

#### Материалы и методы исследований.

Сбор материала проводился на территории Республики Бурятия. В 2007 году листья были собраны из четырех точек, всего было проанализировано 130 деревьев. Исследовались четыре группы растений, произрастающих на территории Южной Бурятии (рис. 1). Группа 1 – карликовые яблони, произрастающие в с. Ягодное Гусиноозерского района вдоль русла ручья. Группа 2 (контрольная) представлена природной популяцией типичных высокорослых яблонь *Malus baccata* (L.) Borkh. на территории Кабанского района. Группа 3 – это высокорослые яблони из заброшенного сада в с. Ягодное (внутри этой группы растет небольшое количество гибридных форм – полукультурных растений). Группа 4 – смешанная, состояла из карликовых и высокорослых форм яблони сибирской, произраставших в долине р. Загустай у подножия южного склона Хамбинского хребта Гусиноозерской котловины. Часть растений (высокорослые формы) этой группы интродуцирована человеком. Другая часть состояла из дикорастущих карликовых и высокорослых форм яблони сибирской. Группа растений № 4 была включена в исследование для подтверждения параллелизма в видообразовании карликовых форм яблони сибирской.

Изучали морфологическую вариабельность [с помощью морфометрических методов], полиморфизм внутреннего транскрибируемого спейсера ITS1 и микросателлитных локусов ядерной ДНК. Для сравнения высокорослых и карликовых форм яблони сибирской применяли методы классической морфометрии. Оценка признаков проводилась по величинам значений длины и ширины листовой пластинки, длины черешка, числу жилок первого порядка с левой стороны листа, а также вычисленному отношению длины листа к ширине и длины черешка к длине листовой пластинки. Математическую обработку проводили с помощью скриптов, написанных на языке R (пакеты *ape*, *cluster*, *vegan*).

ДНК экстрагировали из листьев по модифицированному методу Дойла и Диксона (Doyle, Dickson, 1987). Статистическую обработку полученных микросателлитных данных проводили с использованием компьютерных программ. Присутствие «нулевых» аллелей проверяли с помощью программы Micro-Checker (Van Oosterhout et al., 2004) с использованием метода J.F.Y. Brookfield (1996). Частоты аллелей рассчитывали с помощью программы GENEPOP (Raymond, Rousset, 1997). Наблюдаемую ( $H_o$ ) и ожидаемую ( $H_e$ ) гетерозиготности, а также значения *Fst* (Cockerham, 1973; Weir, Cockerham, 1984), отражающие степень генетической изоляции между группами, подсчитывали с помощью программы ARLEQUIN (Schneider et al. 2000). Отклонение от равновесия Харди-Вайнберга проверяли с помощью критерия  $\chi^2$  (Рокицкий, 1973).

Для построения дерева, основанного на данных полиморфизма микросателлитных локусов, использовались генетические расстояния DAS (Chacabarty, Jin, 1993) и метод объединения ближайших соседей (NJ), реализованные в программе Population версии 1.2.30 (Langella, 2002). Филогенетическое дерево строили с помощью программы SplitsTree 4.0 (Huson, Bruant, 2006).

**Результаты исследований и их обсуждение.** Для представителей всех исследуемых групп растений были расшифрованы нуклеотидные последовательности внутреннего транскрибируемого спейсера ITS1 (internal transcribed spacer), находящегося между генами 18S рРНК и 5,8S рРНК. По результатам анализа установлено, что все исследованные нуклеотидные последовательности, принадлежащие растениям как карликовой, так и высокорослой формы *M. baccata*, идентичны. Следовательно, существование

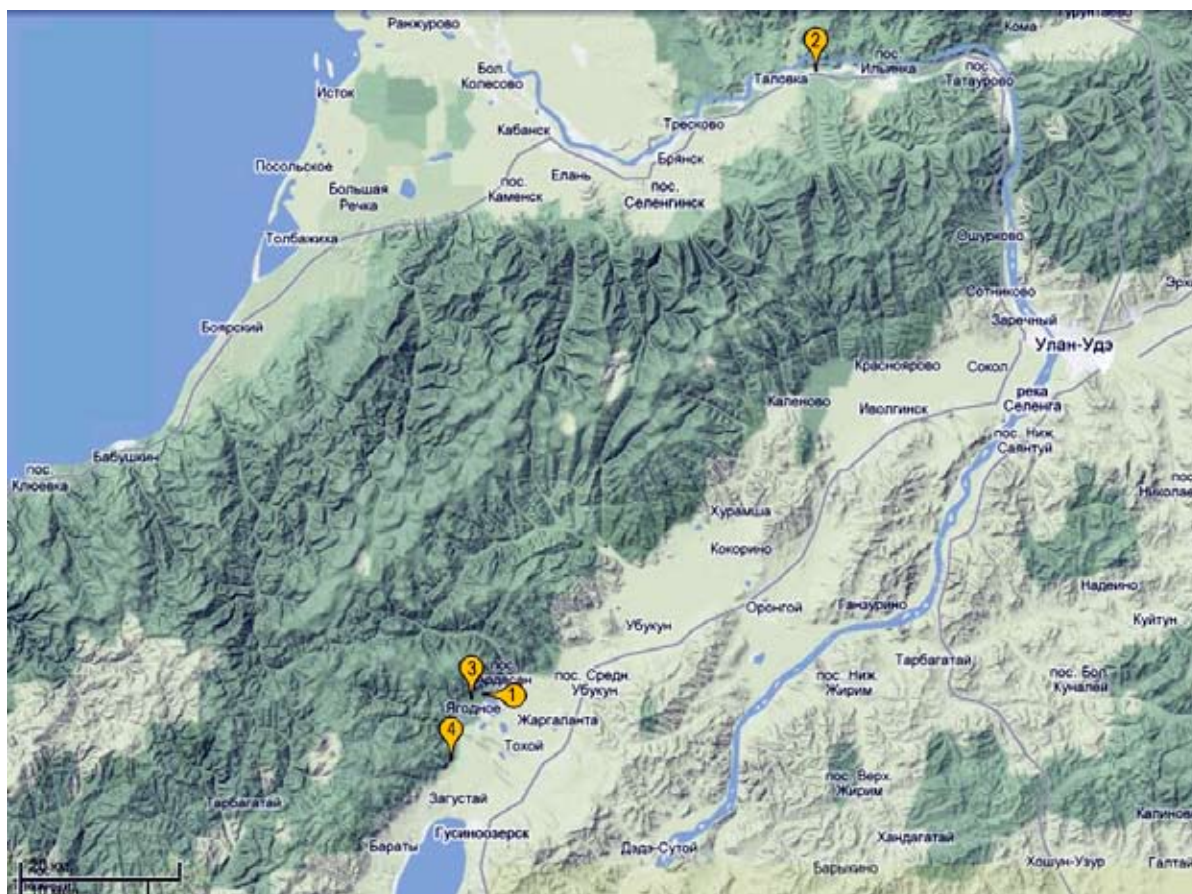


Рис. 1. Карта района сбора образцов. Номерами обозначены группы растений.

двух форм яблони сибирской (высокорослой и карликовой), сильно отличающихся морфологически, но не отличающихся генетически по маркеру ITS1, позволяет предполагать, что это экологические формы одного вида *M. baccata*, который обладает большой морфологической пластичностью (Кузнецова, 2010). Такой вывод подтверждается и данными о значительных генных потоках между исследуемыми группами, полученный с помощью микросателлитного анализа (Кузнецова и др., 2010).

Признано, что на ранних и поздних этапах эволюции видообразование посредством полиплоидии было и остается одним из основных путей видообразования растений (Raun et al., 2009; Richards et al., 2009). Для того, чтобы исключить возможность того, что изучаемые карликовые формы являются полиплоидами, был проведен хромосомный анализ. Показано, что у исследуемых форм яблони одинаковое число хромосом ( $2n = 34$ ). Частота встречаемости полиплоидных клеток составляет примерно 1% от общего числа. Это значение незначительно, поэтому можно заключить, что карликовые и высокорослые формы яблони сибирской являются

диплоидами (рис. 2). Так как морфологические отличия изучаемых форм были значительны, мы предприняли более детальное исследование полиморфизма *M. baccata* по морфологическим признакам. На основании морфологических измерений листьев было установлено, что распределение признака внутри групп не подчиняется закону нормального распределения (табл. 1). Из приведенной таблицы видно, что по морфологическим признакам наиболее отличаются группы 2 и 3 (достоверные отличия максимум на 13%). При этом нужно отметить, что карликовые и высокорослые формы яблони сибирской образуют единую общность по таким признакам, как длина и ширина листовой пластинки, отношению длины листа к его ширине, отношению длины черешка к длине листовой пластинки. Группа растений № 3 (искусственные насаждения высокорослых форм, с. Ягодное) перекрывается со всеми исследуемыми группами, что свидетельствует о наличии в ней большого разнообразия по наблюдаемым морфологическим признакам. Можно сделать вывод, что все признаки в рамках одного организма полиморфны, но средние значения у них сдвинуты, поэтому для дальней-

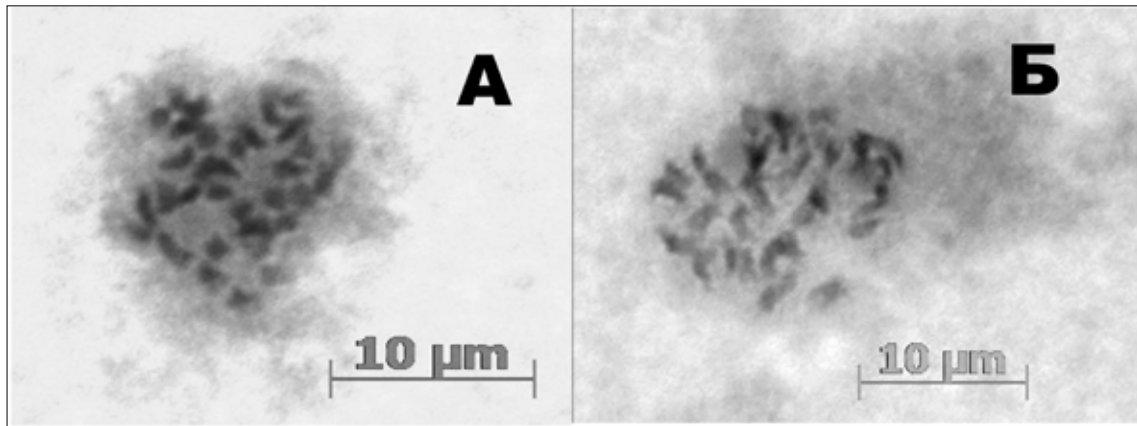


Рис. 2. Хромосомный набор высокорослой (А) и карликовой (Б) яблони сибирской.

шего анализа нужно ориентироваться именно на средние значения признаков.

После этого мы исследовали морфометрические признаки цветков и листьев разных по росту форм яблони (длина и ширина листовая пластинка, длина черешка, количество жилок с одной стороны листа, диаметр цветка, длина и ширина лепестков, длина чашелистиков и количество цветков в соцветии). С помощью методов главных компонент были найдены наиболее эффективные комбинации признаков. Для анализа популяционной структуры было построено неукорененное простирающееся дерево на основе анализа морфометрических параметров. Было выяснено, что группа карликовых форм (№ 1) и природная группа высокорослых яблонь (№ 2) по морфологическим признакам образуют отдельные клады, а растения из группы искусственных насаждений высокорослых форм (№ 3) распределены по всему дереву, что, по-видимому, является следствием смешанного происхождения этой группы (Кузнецова и др., 2010). Степень генетической дифференциации между разными формами *M. baccata* исследовали с помощью быстро эволюционирующих микросателлитных маркеров. Значения ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготности были высокими, что говорит о высокой степени диверсификации изучаемых групп растений (Кузнецова, 2010).

Во всех исследованных группах с использованием критерия  $\chi^2$  по некоторым локусам с высокой достоверностью выявлены отклонения наблюдаемых частот генотипов от теоретически ожидаемых при равновесии Харди-Вайнберга. Такое поведение характерно для микросателлитных маркеров, т. к. микросателлитные маркеры могут быть сцеплены с локусами, находящимися под действием селективного отбора. Наиболее равновесной по данному критерию является контрольная группа № 2 (природные высокорослые яблони, растущие в Кабанском районе). Среднее значение показателя  $F_{ST}$  определяющего подразделенность между всеми изучаемыми группами сибирской яблони, очень велико и равняется 0,334. Следовательно, внутривидовая составляющая генетической изменчивости яблони равна 66,6%, тогда как ее межпопуляционная составляющая очень высока – 33%. Такое значение говорит о чрезвычайно высокой подразделенности изучаемых групп растений. Показатель  $F_{ST}$  между конкретными группами растений также очень высок и превышает значение 0,3 (Кузнецова, 2010). Оценку генетической подразделенности между популяциями различных видов яблони на основе микросателлитного и других анализов проводили разные группы исследователей. Уровень  $F_{ST}$  между популяциями в этих исследованиях никогда не превышал значе-

Таблица 1

Оценка различий между группами по морфологическим признакам (в %)

Группы	Длина листа	Ширина листа	Длина листа/ширина листа	Длина черешка	Длина черешка/длина листа	Количество жилок с 1 стороны листа	Общий % отличий
1 и 2	8	29	21	0	0	0	10
1 и 3	0	0	0	20	0	0	6
2 и 3	9	17	24	13	0	14	13

ния 0,16 (Gharghani et al., 2009). Было установлено, что на начальном этапе экологического видообразования дивергентная селекция является причиной сильной гетерогенности среди локусов у находящихся в стадии начала расхождения видов, вызванная эффектами положения таких локусов в геноме. Такая геномная вариабильность обозначена как «генетическая мозаичность при видообразовании» (Via, 2009). Успешным и информативным способом выявления регионов генома, находящимся под влиянием дивергентной селекции у видов в начале видообразования является изучение показателя  $F_{ST}$  по каждому локусу. Как можно видеть на рисунке 3, подразделенность между исследуемыми группами яблони сибирской очень сильно отличается в случае анализа отдельных локусов. По нашему мнению, такая мозаичность является результатом дивергентной селекции под влиянием экологических условий и является одним из характерных черт (*signature*) экологического образования.

Первой рядом с с. Ягодное была посажена человеком группа растений № 3 (сейчас группа состоит из небольшого количества привитых полукультурных растений и значительного количества высокорослых растений яблони сибирской). Уже гораздо позднее из семян с растений из этой группы, разнесенных птицами и животными, выросли карликовые деревья яблони ягодной, пространственно отделенные от группы № 3 рукавом ручья (рис. 4). Небольшое количество полукультурных сортов, привитых во времена заложения сада, сохранились и сейчас в тех местах, где почва рядом с протекающим горным ручьем поддерживается в увлажненном состоянии. Морфологические отличия этих растений (высокий рост, сильная опушенность листа и плодоножки, размер и форма плода, широкие и крупные листья) говорят о том, что они представляют собой гибриды между яблоней домашней и сибирской (рис. 5). В связи с этим интересно было выяснить, есть ли гибридные фенотипы в составе группы растений № 1 (карликовые растения яблони ягодной), которая сформировалась на основе распространения семян из группы 3. Анализ опушенности листьев, плодоножки, размеров плода говорит о том, что признаков яблони домашней в растущих карликовых растениях не было выявлено (рис. 6).

Факт элиминации гибридов подтвердился и на геномном уровне с помощью микросателлитного анализа. Так, по локусу 23g4 в группе № 3 выявляется шесть аллелей, в то время как в

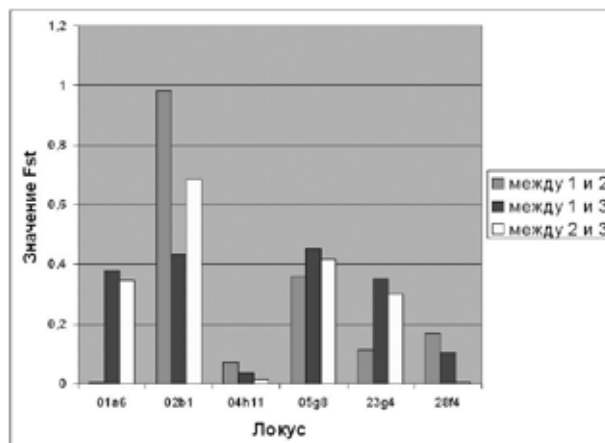


Рис. 3. Значения  $F_{st}$  между исследуемыми группами.

группе № 1 – всего один аллель (рис. 7). Элиминация гибридов и редких аллелей, присутствующих в первичной группе, может рассматриваться как эффект экологической селекции против гибридов, который является очень важным для экологического видообразования и является его характерной чертой (*signature*). Опосредовано об этом говорит индекс молекулярно-генетического разнообразия в каждой группе растений, рассчитанный с помощью программы ARLEQUIN. Для высокорослых форм яблони из заброшенного сада (группа № 3) характерно самое высокое значение индекса молекулярно-генетического разнообразия – 0,59. Значения этого параметра для природной группы яблонь (группа № 2) составляет 0,50. У группы яблони с карликовым типом роста (группа № 3) наблюдается пониженное значение индекса молекулярно-генетического разнообразия, что, по-видимому, указывает на то, что способность к карликовому росту генетически детерминирована и относительно редко встречается у диких высокорослых яблонь.

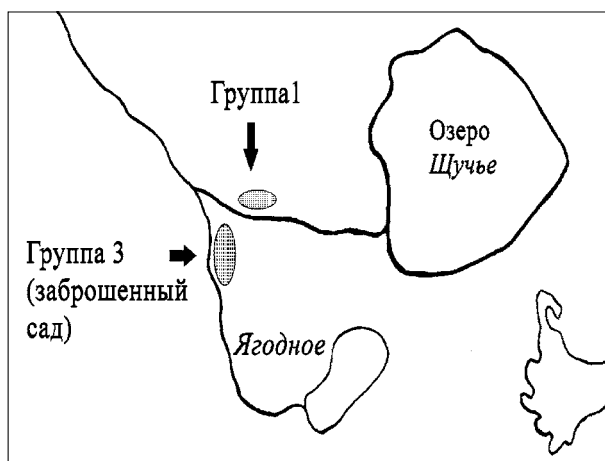


Рис. 4. Карта-схема расположения групп яблони под с. Ягодное.



Рис. 5. Листья и отцветшие цветки высокорослой гибридной яблони.



Рис. 6. Листья и отцветшие цветки карликовой яблони сибирской.

Считается, что параллельное видообразование является еще одним убедительным доказательством того, что дивергентная натуральная селекция приводит к репродуктивной изоляции (Rundle, Nosil, 2005; Schluter, 2001; Via, 2009). Предполагается, что диплоидные виды могут происходить в нескольких местах и в разное время от одного исходного вида. Показано, что

3 небольших популяции карликовых *Eucalyptus globules*, растущих на гранитных мысах Юго-Восточной Австралии неподалеку от высокорослых популяций, являются результатом такого видообразования (Gharghani et al., 2009).

Карликовые формы яблони ягодной, схожие по морфологии, выявлены еще в одном месте, которое находится в зоне контакта леса

и степи в Гусиноозерском районе Республики Бурятия. Эта группа была обозначена как группа № 4 и состояла как из карликовых, так и высокорослых растений. Филогенетический анализ микросателлитных локусов показал, что эта группа деревьев генетически очень близка к природной популяции яблони сибирской и произошла от нее (Кузнецова и др., 2010). При этом морфологические и генетические данные свидетельствуют о том, что карликовые и высокорослые формы яблони недостаточно изолированы друг от друга, чтобы это имело таксономическое значение. По происхождению карликовые растения разных групп (1 и 4) полифилетичны (Кузнецова, 2010).

Здесь стоит упомянуть и карликовую форму, на основании изучения которой в 1980 г. было предложено выделить ее в качестве нового эндемичного вида дикорастущей яблони Забайкалья (Вартапетян, Соловьева, 1981). Территориально она находилась на южном склоне озера Щучье. К сожалению, из-за интенсивной застройки в районе ее произрастания многочисленных баз отдыха и закладки противопожарных полос работ эта группа растений безвозвратно утеряна. Судя по морфологическим описаниям, растения яблони из описанной группы были карликовыми, имели более узкие листья, длинные чашелистики. Вполне вероятно, что образование этой группы растений также явилось результатом микроэволюционных процессов на основе яблони сибирской под влиянием особых условий контактной зоны.

**Заключение.** Перенос яблони сибирской из условий, характерных для мест ее обитания (приуроченность к берегам и островам рек) в условия контактной зоны степи и тайги (смена ниши) вызвало у нее интенсивные процессы формообразования. Основными трендами этих процессов является уменьшение размеров деревьев (карликовость) и формирование кустовой формы. Главным дивергентным экологическим фактором, воздействующим на эти процессы, является, видимо, недостаток влаги в весенне-

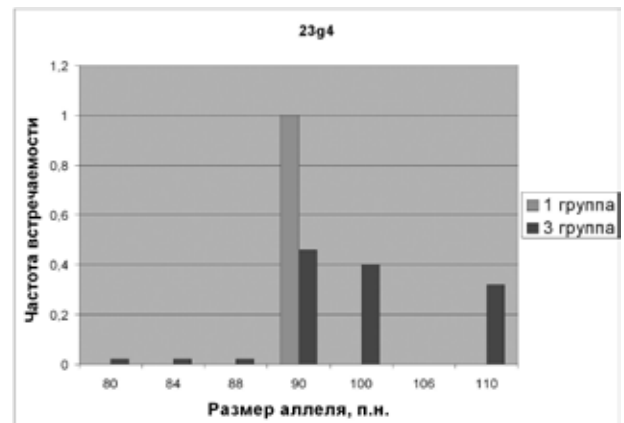


Рис. 7. Количество аллелей по локус 23g4 в группе 1 и 3.

летний период. Морфологические и генетические данные (идентичность нуклеотидных последовательностей внутреннего транскрибируемого спейсера ITS1 и наличие достоверных генных потоков между группами) свидетельствуют о том, что карликовые и высокорослые формы яблони еще недостаточно репродуктивно изолированы друг от друга. Тем не менее, судя по показателям *Fst*, их генетическая подразделенность уже достаточно высока. Отсутствие полиплоидии и многочисленность появления карликовых деревьев говорит о том, что микроэволюционные события развиваются по модели экологического видообразования. Об этом говорит мозаичность генома, установленная с помощью изучения значений *Fst* по отдельным локусам. Это подтверждается также экологически опосредованным отбором против гибридных генотипов, а также параллельным образованием (во времени и пространстве) карликовых форм яблони сибирской. Об этом же говорит полифилетичность происхождения карликовых форм яблони сибирской, выявленная с помощью микросателлитного анализа. Таким образом, подтверждается предположение о том, что карликовые деревья являются экологической формой яблони сибирской.

Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта 11-04-00793.

## ЛИТЕРАТУРА

- Вартапетян В.В., Соловьева Л.В.** Новый вид дикорастущей яблони Сибири // Вестник МГУ. Сер. биол., 1981. – № 4. – С. 26–31.
- Кузнецова Е.В.** Генетико-биохимическая дифференциация и происхождение карликовых форм яблони сибирской – *Malus baccata* (L.) Borkh.: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Иркутск: СИФИБР СО РАН, 2010. – 21 с.
- Кузнецова Е.В., Перетолчина Т.Е., Рудиковский А.В., Щербаков Д.Ю.** Видообразование *in status nascendi* у яблони сибирской – *Malus baccata* (L.) Borkh. // Вестник МГУ. Сер. биол., 2010. – Т. 65, № 4. – С. 76–79.

- Рудиковский А.В., Рудиковская Е.Г., Дударева Л.В., Кузнецова Е.В.** Уникальные и редкие формы яблони сибирской Селенгинского района Бурятии // Сибирский экологический журнал, 2008. – № 2. – С. 327–333.
- Рокицкий П.Ф.** Биологическая статистика. – Минск: Вышэйшая школа, 1973. – 320 с.
- Brookfield J.F.Y.** A simple new method for estimating null allele of animal mitochondrial DNA // Molecular Ecology, 1996. – Vol. 5. – P. 453–455.
- Chacrabarty R., Jin L.** Determination of relatedness between individuals by DNA fingerprinting // Human Biology, 1993. – Vol. 65. – P. 875–895.
- Cockerham C.C.** Analyses of gene frequencies // Genetics, 1973. – Vol. 74. – P. 679–700.
- Doyle J.J., Dickson E.** Preservation of plant samples for DNA restriction endonuclease analysis // Taxon, 1987. – Vol. 36. – P. 715–722.
- Huson D.H., Bryant D.** Application of phylogenetic networks in evolutionary studies // Molecular Biology and Evolution, 2006. – Vol. 23 (2). – P. 254–267.
- Gharghani A., Zamani Z., Talaie A., Oraguzie N.C., Fatahi R., Hajnajari H., Wiedow C., Gardiner S.E.** Genetic identity and relationships of Iranian apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars and landraces, wild *Malus* species and representative old apple cultivars based on simple sequence repeat (SSR) marker analysis // Genetic Resources and Crop Evolution, 2009. – Vol. 56. – P. 829–842.
- Langella O.** 2002. Populations 1.2.30 [online]. Available from <http://bioinformatics.org/~tryphon/populations/>
- Paun O., Forest F., Fay M.F., Chase M.W.** Hybrid speciation in angiosperms: parental divergence drives ploidy // New Phytologist, 2009. – Vol. 182. – P. 507–518.
- Raymond M., Rousset F.** GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenism // Journal of Heredity, 1997. – Vol. 86. – P. 248–249.
- Richards C.M., Volk G.M., Reilley A.A., Henk A.D., Lockwood D.R., Reeves P.A., Forsline P.L.** Genetic diversity and population structure in *Malus sieversii*, a wild progenitor species of domesticated apple // Tree Genetics and Genomes, 2009. – Vol. 5. – P. 339–347.
- Rundle H.D., Nosil P.** Ecological speciation // Ecology Letters, 2005. – Vol. 8. – P. 336–352.
- Schluter D.** Ecology and the origin of species // Trends in Ecology and Evolution, 2001. – Vol. 16 (7). – P. 372–380.
- Schluter D.** Evidence for ecological speciation and its alternative // Science, 2009. – Vol. 323. – P. 737–741.
- Schneider S., Roessli D., Excoffier L.** Arlequin: A software for population genetics data analysis. Ver 2.000 // Genetics and Biometry Lab., Dept. of Anthropology, University of Geneva, 2000.
- Van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P.M., Shipley P.** Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data // Molecular Ecology Notes, 2004. – Vol. 4. – P. 535–538.
- Via S.** Natural selection in action during speciation // Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 2009. – Vol. 106 (1). – P. 9939–9946.
- Weir B.S., Cockerham C.C.** Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure // Evolution, 1984. – Vol. 38. – P. 1358–1370.