

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
Центральный ботанический сад
Научно-практический центр по биоресурсам
Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича
Институт леса



Проблемы сохранения биологического разнообразия и использования биологических ресурсов

Материалы III Международной конференции,
посвященной 110-летию со дня рождения академика Н.В. Смольского
(7–9 октября 2015 г., Минск, Беларусь)

**В двух частях
Часть 1**

**Секция 1. Ресурсы и биоразнообразие растительного мира:
современное состояние, воспроизводство, охрана
и устойчивое использование**

**Секция 2. Современные направления изучения
ботанических коллекций для сохранения
и рационального использования
биоразнообразия растительного мира**

Минск
«Конфидо»
2015

УДК 502.174:574.1(082)

ББК 20.18я43

П78

Редакционная коллегия:

д.б.н., чл.-кор. НАН Беларуси В.В. Титок (ответственный редактор),

д.б.н. Е.И. Анисимова,

к.б.н. Б.Ю. Аношенко,

к.б.н. Д.Б. Беломесецева,

к.б.н. П.Н. Белый,

д.б.н. Е.И. Бычкова,

к.б.н. Т.В. Волкова,

к.б.н. Л.В. Гончарова,

д.б.н. С.А. Дмитриева,

к.б.н. Е.Я. Куликова,

к.б.н. А.В. Пугачевский,

д.б.н., чл.-кор. НАН Беларуси В.П. Семенченко,

к.б.н. В.А. Цинкевич

Материалы печатаются в авторской редакции.

Иллюстрации предоставлены авторами публикаций.

П78 **Проблемы сохранения биологического разнообразия и использования биологических ресурсов:** материалы III Международной научно-практической конференции, посвященной 110-летию со дня рождения академика Н.В. Смольского. (7–9 октября 2015, Минск, Беларусь). В 2 ч. Ч. 1 / Нац. акад. наук Беларуси [и др.]; редкол.: В.В. Титок [и др.]. – Минск: Конфидо, 2015. – 514 с.

ISBN 978-985-6777-74-8.

В сборнике представлены материалы III Международной научно-практической конференции «Проблемы сохранения биологического разнообразия и использования биологических ресурсов», посвященной 110-летию со дня рождения академика Н.В. Смольского. Часть 1: секция 1 «Ресурсы и биоразнообразие растительного мира: современное состояние, воспроизводство, охрана и устойчивое использование» и секция 2 «Современные направления изучения ботанических коллекций для сохранения и рационального использования биоразнообразия растительного мира».

УДК 502.174:574.1(082)

ББК 20.18я43

ISBN 978-985-6777-74-8

© ГНУ «Центральный ботанический сад
Национальной академии наук Беларуси», 2015
© Оформление. ЗАО «Конфидо», 2015

Молекулярно-генетическое изучение видового разнообразия лесных древесных растений (на примере ботанических коллекций родов *Betula* L. и *Pinus* L.)

Баранов О.Ю.¹, Пантелеев С.В.¹, Гончарова Л.В.², Спиридович Е.В.², Тарасевич А.В.³

¹ Институт леса НАН Беларуси, Гомель, Беларусь, betula-belarus@mail.ru

² Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Беларусь

³ Укрлесконсалтинг, Житомир, Украина

Резюме. В ходе исследований проведен молекулярно-генетический анализ видов родов *Betula* L. и *Pinus* L. Показано соответствие результатов ДНК-анализа с существующей систематикой сосен и берез. Для карельской березы рассмотрены особенности генетической структуры для генов ядерной и хлоропластной ДНК.

Summary. Baranov O.Yu., Panteleev S.V., Goncharova L.V., Spiridovich E.V., Tarasevich A.V. **Molecular genetic study of forest tree species diversity (for example, botanical collections of genera *Betula* L. and *Pinus* L.)** The molecular genetic analysis of species of the genera *Betula* L. and *Pinus* L. was carried out. The correspondence of the results of DNA analysis with the existing taxonomy of pines and birches was shown. For the curly birch the features of genetic structure of the nuclear genes and chloroplast DNA were studied

Среди лесных растений наибольшую важность с экологической и хозяйственной точек зрения представляют древесные виды, являющиеся главным средообразующим компонентом лесных фитоценозов и обеспечивающих основные типы продукции лесной отрасли. Одна из центральных проблем лесной генетики – изучение, сохранение и воспроизводство генофондов основных лесообразующих и хозяйственно-ценных пород, поскольку генетическое разнообразие, являясь базовым компонентом биоразнообразия, определяет способность живых организмов и их сообществ приспосабливаться к изменениям условий окружающей среды [1].

Среди широкого спектра фундаментальных задач, связанных с исследованием генофонда и решаемых с помощью ДНК-маркеров, изучение микро- и макроэволюционных процессов, включая анализ филогенетических и генетико-таксономических взаимоотношений, представляет собой особую важность. Это связано с возможностью проведения дискретной оценки внутри- и межвидового разнообразия, уточнения систематического положения таксонов различного ранга [1].

Исходя из вышесказанного, целью настоящего исследования явился анализ близкородственных видов (включая разновидности) родов *Betula* L. и *Pinus* L. на основании растений, представленных в ботанических коллекциях.

Среди европейских полнодревесных видов берез наибольшее распространение имеют береза повислая (*Betula pendula*) и береза пушистая (*Betula pubescens*). Кустарниковые виды – береза низкая (*Betula humilis*) и береза карликовая (*Betula nana*) – в условиях умеренного пояса представлены редкими островными популяциями. Среди разновидностей березы повислой наиболее важной является карельская, или узорчатая береза *Betula pendula* var. *carelica*, которая характеризуется узорчатой текстурой древесины. Несмотря на утвердившийся систематический статус карельской березы, деревья с аналогичной структурой древесины были описаны и для березы пушистой, и для гибридных триплоидных форм берез. Кроме того, в отличие от большинства древесных видов, карельская береза представлена группой переходных морфологических форм и не имеет четкого дендрологического описания [2].

Исследование нуклеотидной последовательности гена алкогольдегидрогеназы выявило широкий спектр изменчивости среди изученных видов берез. Следует отметить, что наибольшее количество видоспецифических SNP было отмечено для второго интрона *Adh* гена [3]. Нуклеотидный состав данного региона березы карельской (*B. pendula* var. *carelica*) был идентичным полученному для березы повислой (*B. pendula*). В то же время береза пушистая (*B. pubescens*) характеризовалась наличием видоспецифического полиморфизма. Выявленные SNP у изученных видов берез были связаны как с замещением нуклеотидов, так и с их делецией или вставкой, что затрудняло интерпретацию результатов, полученных прямым секвенированием диплоидных и тетраплоидных тканей. Для березы повислой доля нуклеотидных позиций, представленных в гетерозиготном состоянии в анализируемом регионе, составляла в среднем 1/500 нуклеотидов, для образцов березы карельской – 2–3/500. В случае березы пушистой точная оценка показателя гетерозиготности оказалась невозможной в силу полиплоидности кариотипа ее клеток и сложной структурой получаемых электрофоретических данных. Поэтому в качестве основной видоспецифической нуклеотидной структуры для березы пушистой принимали основания, характеризующиеся наибольшим флуоресцентным сигналом. Тем не менее в большинстве случаев видоспецифических нуклеотидных позиций кроме основного пика наблюдали минорные пики с интенсивностью сигнала $\approx 25\%$, соответствующие нуклеотидному основанию для березы повислой, что указывало на присутствие в геноме *B. pubescens* аллельных вариантов (генома) *B. pendula*. Данное явление может быть объяснено как филогенетической общностью данных видов, так и наличием интрогрессивной гибридизации между ними.

Проведенный сравнительный анализ нуклеотидной структуры фрагмента гена *Adh* образцов березы карельской из различных географических регионов показал высокий уровень сходства, что и обусловило низкие значения параметра генетической дифференциации (рис. 1).

Кроме того, в ходе анализа изменчивости микросателлитных локусов хлоропластной ДНК (рис. 2) установлена идентичность гаплотипов карельской (узорчатой) березы и березы повислой из одних и тех же географических регионов, что косвенно указывает на детерминацию признака узорчатости древесины небольшой группой генов и на происхождение данного варианта от основного вида – березы повислой. На основании географической изменчивости текстуры древесины рядом исследователей предложено обозначать вариант березы узорчатой согласно его региональному местопроизрастанию, например, на Украине – березой украинской.

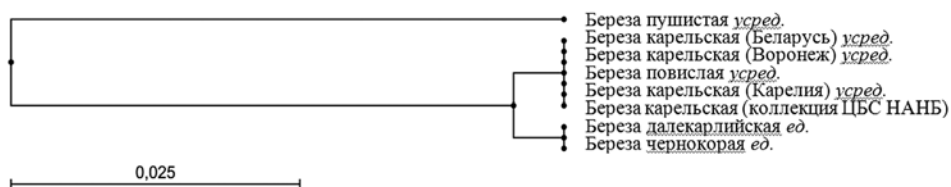


Рис. 1. Дендрограмма, иллюстрирующая генетическую дифференциацию среди изученных видов и биотипов берез на основании секвенирования гена *Adh*

В качестве другого примера изучения генетико-таксономических взаимоотношений представлены результаты сравнительного анализа 12 видов сосен из коллекции ЦБС НАН Беларуси (*Pinus peuce*, *Pinus ×schwerinii*, *Pinus griffithii*, *Pinus koraiensis*, *Pinus pumila*, *Pinus cembra*, *Pinus sibirica*, *Pinus strobus*, *Pinus mugo*, *Pinus nigra*, *Pinus sylvestris*, *Pinus contorta*) на основании использования RAPD-маркеров. В ходе предварительного анализа 40 десятичных праймеров для проведения генетико-таксономических исследований были отобраны девять (*Oligo 6*, *Oligo 8*, *Oligo 9*, *Oligo 11*, *Oligo 85*, *Oligo 91*, *Oligo 94*, *Oligo 98*, *Oligo 105*), для которых выявлены стабильные ПЦР-спектры среди изучаемых видов сосен (рис. 3).

Полученные данные анализа 41 RAPD-локуса позволили рассчитать коэффициенты Эвклидовой дистанции (Statistica 6.0) и, используя невзвешенный парно-групповой метод кластерного анализа (UPGMA), построить дендрограмму (рис. 4), иллюстрирующую степень генетической дифференциации среди изученных 12 видов сосен.

Как видно из структуры дендрограммы, изученные виды сосен разделились на два больших кластера, включающих виды пятихвойных (подрод *Strobus*: *P. peuce*, *P. griffithii*, *P. ×schwerinii*, *P. koraiensis*, *P. sibirica*, *P. strobus*, *P. pumila*, *P. cembra*) и двуххвойных (подрод *Pinus*: *P. mugo*, *P. contorta*, *P. nigra*, *P. sylvestris*) сосен, что соответствует современной систематике рода *Pinus*, основанной на изучении морфологических признаков.

Кластер подрода *Strobus* разделился на виды подсекций *Strobi* (*P. griffithii*, *P. ×schwerinii*, *P. strobus*) и *Cembrae* (*P. koraiensis*, *P. sibirica*, *P. pumila*, *P. cembra*).

Интересным оказались результаты кластеризации видов подсекции *Strobi*. Сосна Шверина не является самостоятельным видом, а представляет собой гибрид между сосной гималайской (*P. griffithii* = *P. wallichiana*) и сосной веймутовой (*P. strobus*). Таким образом, полученные на основании RAPD-анализа результаты кластеризации видов подсекции *Strobi* также полностью совпадают с существующей систематикой рода *Pinus*, при этом гибридная сосна

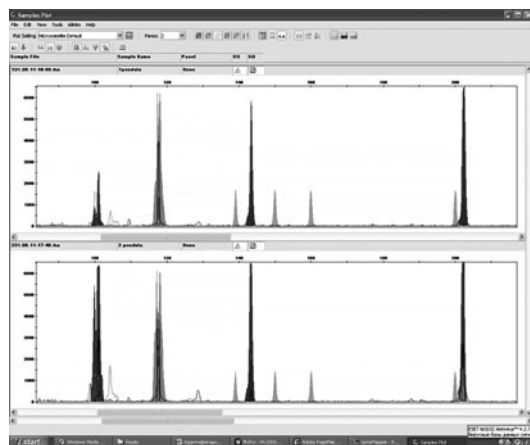


Рис. 2. Электрофоретический спектр SSR-локусов хлоропластной ДНК березы повислой и березы украинской (узурчатой) из Житомирской области Украины

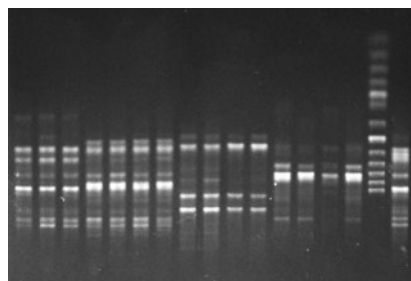


Рис. 3. Электрофореграмма ПЦР-спектра по локусу *Oligo 8* (*P. sibirica*, *P. strobus*, *P. mugo*, *P. contorta*)

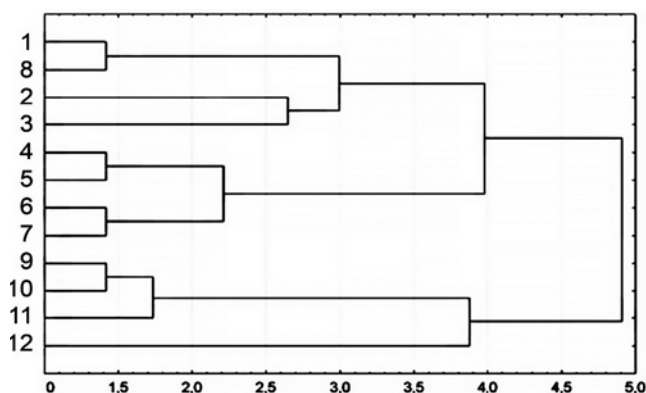


Рис. 4. Дендрограмма, иллюстрирующая уровень генетической дифференциации изученных видов сосен на основании анализа RAPD-локусов: 1 – *P. Peuce*; 2 – *P. ×schwerinii*; 3 – *P. griffithii*; 4 – *P. koraiensis*; 5 – *P. pumila*; 6 – *P. cembra*; 7 – *P. sibirica*; 8 – *P. strobus*; 9 – *P. mugo*; 10 – *P. nigra*; 11 – *P. sylvestris*; 12 – *P. contorta*

Шверина (*P.×schwerinii*) имеет промежуточную генетическую структуру между сосной веймутовой и сосной Гриффита (сосной гималайской). Кроме того, следует обратить внимание на выявленный низкий уровень генетической дифференциации между видами *P. strobus* и *P. peuce*, что также согласуется с незначительными морфолого-анатомическими отличиями между данными видами, при этом последний вид часто рассматривается как реликтовый остаток сосны веймутовой, эндемично сохранившийся с плейстоцена на территории Балкан.

Относительно видов *Cembrae* необходимо отметить, что разделение их на две пары (*P. koraiensis*–*P. pumila* и *P. sibirica*–*P. cembra*), по данным RAPD-анализа, совпадает с результатами генетико-таксономических исследований этих видов, проведенных с использованием изоферментного анализа [4].

Несмотря на объединение в один кластер всех изученных двухвойных сосен (подрод *Pinus*) – сосны горной (*P. mugo*), сосны черной (*P. nigra*), сосны обыкновенной (*P. sylvestris*) и сосны скрученной (*P. contorta*), – данные виды не являются близкородственными, что также видно из величины дистанции, то есть значительных генетических различий между группами (*P. mugo*, *P. nigra*, *P. sylvestris*) и *P. contorta*. В то же время виды *P. mugo*, *P. nigra* и *P. sylvestris* характеризовались высоким уровнем генетического сходства, что соответствует результатам изоферментного анализа [4].

Список литературы

1. Падутов, В.Е. Методы молекулярно-генетического анализа / В.Е. Падутов, О.Ю. Баранов, Е.В. Воропаев. – Минск: Юнипол, 2007. – 176 с.
2. Кузенева, О.И. Род береза – *Betula* L. // Флора СССР. – 1936. – Т. 5. – С. 269–305.
3. Jarvinen, P. Phylogenetic relationships of *Betula* species (Betulaceae) based on nuclear ADH and chloroplast MATK sequences / P. Jarvinen [et al.] // American Journal of Botany. – 2004. – Vol. 91 (11). – P. 1834–1845.
4. Гончаренко, Г.Г. Популяционная и эволюционная генетика сосен Восточной Европы и Сибири / Г.Г. Гончаренко, А.Е. Силин. – Минск: Тэхналогія, 1997. – 191 с.