

Д. И. Каган, аспирант; О. Ю. Баранов, канд. биол. наук
(Институт леса НАН Беларуси)

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ЛОКУСОВ ХЛОРОПЛАСТНОЙ ДНК ЛЕСООБРАЗУЮЩИХ ПОРОД ЮГА БЕЛАРУСИ

The aim of this study was to increase knowledge about the genetic variability of chloroplast DNA (cpDNA) loci of oaks and birches from Belarus, ecologically and economically very important species in this country. Variation at four cpDNA fragments was studied using restriction enzymes (PCR-RFLP method). Two haplotypes were identified in populations of *Quercus robur*, two haplotypes – in populations of *Betula pendula*. This information may help to indicate probable routes oaks of postglacial recolonisation, helping in the verification of the natural origin of stands, useful in the certification of the geographic origin of oak and birch wood.

Введение. В последнее время особую актуальность приобрела проблема сохранения биологического и генетического разнообразия. Решение многих проблем лесовосстановления невозможно без знания генофондов основных лесообразующих пород, поскольку нарушение сложившейся в насаждениях адаптивной генетической структуры может приводить к ухудшению состояния популяций или даже к их распаду. Использование различных типов ДНК-маркеров позволяет решать фундаментальные и прикладные задачи, связанные с изучением генофондов популяций различных растительных видов [1, 2], включая оценку интенсивности обмена генетическим материалом между популяциями, анализ межвидовой гибридизации, исследование уровня генетического разнообразия и др.

Цель работы – изучение изменчивости локусов хлоропластной ДНК лесообразующих пород юга Беларуси на основании использования PCR-RFLP-метода.

PCR-RFLP-метод (полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ)) основан на изучении изменчивости размера определенных ДНК-фрагментов, образовавшихся вследствие расщепления ДНК рестрикционными ферментами. Разница в RFLP-спектре, выявляемая между двумя организмами, является следствием либо точечной мутации, либо реорганизации областей ДНК между рестрикционными сайтами. Данный метод нашел свое применение в таких областях науки, как генетика популяций, систематика и филогения, генетическое картирование и др. [3].

Дуб черешчатый. Дуб черешчатый (*Quercus robur* L.) – широко распространенный вид в Европе, произрастающий на территории от Испании до России и представляющий собой огромный экологический и экономический ресурс среди широколиственных древесных видов растений. Однако являясь одной из главных лесообразующих пород Беларуси (276,5 тыс. га), в последние годы его доленое участие в составе лесов республики сокращается и составляет на сегодня лишь 3,5%. Проведенная в 2006 г. инвентаризация дубрав Беларуси выявила усыха-

ние 15–25% насаждений. Проблема деградации дубрав затронула не только нашу республику, но и страны ближнего и дальнего зарубежья, приобретая все более и более глобальный характер. Для ее разрешения необходим комплексный подход, предусматривающий также и знание генетических аспектов современного состояния и функционирования дубравных насаждений [4].

В настоящее время при молекулярно-генетических исследованиях дуба черешчатого особую популярность приобрели методы, основанные на изучении локусов хлоропластной ДНК (хлДНК). Это обусловлено следующими особенностями хлоропластного генома дуба: 1) наследование осуществляется только по материнской линии, что значительно сокращает величину генного потока для данного типа маркеров и придает полиморфизму хлДНК большую структурированность по сравнению с ядерным полиморфизмом; 2) хлоропластная ДНК характеризуется отсутствием рекомбинации генов и, следовательно, низкой скоростью изменений, возникающих в процессе эволюции [5]. Вышеперечисленные свойства локусов хлоропластной ДНК дуба сделали их удобным инструментом для проведения исследований в области геногеографии данного рода растений.

Так, на основании PCR-RFLP-анализа хлоропластной ДНК и одновременного исследования ядерных маркеров установлено, что во время последнего ледникового периода spp. *Quercus* существовал в виде трех изолированных рефугиумов (линия А – Балканы, В – Испания, С – Италия), каждый из которых характеризовался генетической разнородностью для хлоропластных и ядерных генов. В результате последующего расселения дуба на север Европы и пыльцевого обмена между восточным и западным рефугиумами произошла постепенная спецификация геномов, возникли отдельные ветви расселения дуба. Все это привело к возникновению консервативных гаплотипов, по которым можно проследить ледниковую и постледниковую историю расселения spp. *Quercus* [6].

В настоящее время, используя в основном 4 пары универсальных праймеров и 2 рестриктазы, проанализировано более 500 популяций spp. *Quercus*, произрастающих на территории всей Европы, в которых выявлено свыше 30 различных гаплотипов [7–9].

На основании данных, полученных в результате PCR-RFLP-анализа локусов хлоропластной ДНК дуба черешчатого и дуба скального, проведено генетическое картографирование данных пород на территории Польши. Проанализировав 33 популяции *Quercus robur* и *Quercus petraea*, было выявлено 9 гаплотипов, 5 из которых были известны ранее, 4 – обнаружены впервые. Авторы установили, что дубравные насаждения Польши имеют историческую связь с дубравами таких стран, как Германия, Франция, Италия, Испания, страны Балканского полуострова [10].

Исследования, проведенные в Швейцарии, установили наличие 2 гаплотипов дуба черешчатого: западного, пришедшего из Италии, и восточного – из Балкан и/или Франции. Одновременно с анализом хлоропластных локусов был проведен изоферментный анализ исследуемых популяций с целью установления каких-либо закономерностей между историческим расселением дуба черешчатого и полиморфизмом локусов ядерной ДНК. Низкий уровень генетической изменчивости изоферментных локусов между популяциями с разными гаплотипами хлоропластной ДНК (следовательно, и различными путями постледниковой расселения) указал на отсутствие влияния ледниковой и постледниковой истории распространения популяций на строение и структуру локусов ядерной ДНК [11].

Береза повислая. Березовые леса занимают третье место по удельному вкладу в формирование лесов нашей республики, составляя более 16,5% от всей лесопокрытой площади Беларуси. На территории нашей республики произрастают 4 вида березы: *B. pendula* Roth., *B. pubescens* Ehrh., *B. humilis* Schrank и *B. nana* L. Наибольший ареал занимает береза повислая (около 11%).

Большинство молекулярно-генетических исследований spp. *Betula* направлены на изучение состояния популяционно-генетических ресурсов ряда видов берез и оценку уровня подразделенности, интенсивности генного потока и дифференциации между популяциями, различающимися по экологическим условиям произрастания и изолированности [12]. Особую актуальность вызывают вопросы, касающиеся внутри- и межвидовой таксономии, а также установления филогенетических и эволюционных взаимоотношений видов данного рода растений. В последние годы для решения данных вопросов наибольшую популярность приобрел PCR-RFLP-анализ хлоропластной ДНК.

Так, например, зарубежными учеными проведены исследования по изучению генетической

структуры популяций *B. pendula*, *B. pubescens*, *B. nana* на основании анализа локусов хлоропластной ДНК PCR-RFLP- и SSRP-методами. Выборка составила 55 популяций, произрастающих на территории Евразии. По результатам исследований у березы повислой было выделено 2 гаплотипа, что указывает на низкий уровень филогенетической структуры данного вида, и 7 гаплотипических групп у березы пушистой, вследствие чего уровень генетической подразделенности ее популяций выше, чем у *B. pendula*. Ученые предполагают, что участие юго-западной части ареала обоих видов при расселении на материке в постледниковый период незначительно, а восточные и западные популяции *B. pendula*, *B. pubescens* в Европе, по-видимому, имеют различное происхождение [13].

В исследованиях ученых А. Палме, К. Су, С. Палссона и М. Ласэкса различные варианты хлоропластных гаплотипов у *B. pendula*, *B. pubescens* и *B. nana* были использованы для выявления гибридизации между данными видами. Установлено, что географический фактор оказывает более сильное влияние на уровень генетической изменчивости представителей spp. *Betula* по сравнению с фактором видовой принадлежности изучаемых индивидуумов: между собой виды отличались незначительно, в то время как уровень изменчивости в 11% был обусловлен географическими различиями между двумя основными местами проведения исследований (Скандинавия и западная часть России). Все гаплотипы, обнаруженные более чем у 2% индивидуумов, были разделены между видами, и уровень обнаруженной интрогрессивной гибридизации был достаточно высок: 0,79 между *B. pubescens* и *B. pendula*, 0,67 между *B. pubescens* и *B. nana* [14].

Материалы и методы. Материал для анализа был собран в насаждениях дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) на территории Василевичского лесхоза (популяция № 1) и Речицкого лесхоза (популяция № 2), в насаждениях березы повислой (*Betula pendula* Roth.) на территории Чечерского лесхоза. В каждом насаждении было проанализировано по 20 деревьев. В качестве экспериментального материала были использованы ткани листьев (дуб, береза) или древесина (дуб). Препараты суммарной ДНК дуба черешчатого были получены при помощи СТАВ-метода [15], березы повислой – SDS-метода [16]. Для выделения ДНК дуба использовали следующие компоненты: экстрагирующий буфер А (СТАВ 2%, Трис-НСl 0,1М, NaCl 1,4М, EDTA 20мМ), экстрагирующий буфер В (СТАВ 5%, EDTA 350мМ), осаждающий буфер С (СТАВ 1%, Трис-НСl 50мМ, EDTA 10мМ), растворяющий буфер D (NaCl 1М, Трис-НСl 10мМ, EDTA 1мМ), хлороформ, ацетат аммония 7,5М, изопропанол, этанол 70%. Для выделения ДНК

березы использовали следующие реагенты: экстрагирующий буфер (SDS 0,5%, Трис-НСl 200мМ, NaCl 250мМ, EDTA 25мМ), хлороформ, ацетат калия 5М, изопропанол, этанол 70%. Далее препараты ДНК исследовались при помощи PCR-RFLP-метода. Первым этапом анализа являлась амплификация локусов хлоропластной ДНК с использованием коммерческих наборов (фирма «Sigma», «ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора»). Реакционная ПЦР-смесь имела следующий состав: 10-кратный ПЦР-буфер (Трис-НСl (рН 9,0) 100 мМ, КCl 500 мМ, MgCl₂ 25 мМ) – 2,5 мкл; вода (MilliQ) – 19,8 мкл; смесь нуклеотидтрифосфатов (10 мМ р-р каждого) – 0,5 мкл; праймер 1 (20 мМ р-р) – 0,5 мкл; праймер 2 (20 мМ р-р) – 0,5 мкл; ДНК-полимераза (5 ед./мкл) – 0,2 мкл; образец ДНК (20 нг/мкл) – 1 мкл. И использованные для анализа локусов хлоропластной ДНК сочетания пар праймеров и ферментов-рестриктаз приведены в табл. 1. Амплификацию проводили по следующей программе: 1 этап (1 цикл) – денатурация: $t = 3$ мин, $T = 94^\circ\text{C}$. 2 этап (30–40 циклов) – денатурация: $t = 30$ с, $T = 94^\circ\text{C}$; отжиг: $t = 30$ с, T_a (температура отжига) = $T_{\text{плав}} - 2^\circ\text{C}$ (табл. 1); элонгация: $t = 45$ с, $T = 72^\circ\text{C}$. 3 этап (1 цикл) – элонгация: $t = 7$ мин, $T = 72^\circ\text{C}$; охлаждение реакционной смеси: $t = 5$ мин, $T = 4^\circ\text{C}$. Следующим этапом являлось разрезание амплифицированных участков хлоро-

пластной ДНК двумя рестриктазами (TaqI, HinfI) с целью обнаружения изменений в консервативных для вида участках ДНК. Далее проводили электрофоретическое фракционирование продуктов амплификации в агарозном геле (1%) с применением Трис-ЭДТА-Боратного буфера (рН 8,3) [17]. Для визуализации выявленных ампликонов гели окрашивали раствором бромистого этидия. Документирование продуктов электрофореза достигалось за счет видеосканирования в УФ-свете специальной системой «Image Master VDS» (фирма «Amersham Pharmacia Biotech»). Маркером молекулярного веса являлся маркер «DRigest III» (фирма «Amersham Pharmacia Biotech»).

Результаты и их обсуждение. Поскольку концентрация и чистота препарата ДНК являются важными характеристиками, непосредственно влияющими на возможность успешного проведения амплификации [17], были установлены значения этих показателей. Концентрация суммарной ДНК дуба черешчатого составляла от 120 нг/мкл до 460 нг/мкл, а чистота препарата A260/280 = 1,67–1,71; концентрация суммарной ДНК березы повислой составляла от 160 нг/мкл до 390 нг/мкл, а чистота препарата A260/280 = 1,78–1,81. Дополнительное электрофоретическое фракционирование препаратов суммарной ДНК в агарозном геле указало на отсутствие деградации выделенной нуклеиновой кислоты.

Таблица 1

Сочетания пар праймеров и рестриктаз для проведения PCR-RFLP-анализа хлоропластной ДНК дуба черешчатого и березы повислой

Участок гена	Праймеры	Число нуклеотидов	Последовательность (5'–3')	Температура плавления, °С	Рестриктаза
DT	Trn D [tRNA-Asp (GUC)]	19	5'-ACCAATTGAACTACAATCC-3'	54,5	Taq I
	Trn Tr [tRNA-Thr (GGU)]	20	5'-CTACCACTGAGTTAAAAGGG-3'		
AS	Psa A [PSI (P700 apo-protein A1)]	22	5'-ACTTCTGGTTCCGGCGAACGAA-3'	57,5	Taq I
	Trn Sr [tRNA-Ser (GGA)]	22	5'-AACCACTCGGCCATCTCTCCTA-3'		
AS	Psa A [PSI (P700 apo-protein A1)]	22	5'-ACTTCTGGTTCCGGCGAACGAA-3'	57,5	Hinf I
	Trn Sr [tRNA-Ser (GGA)]	22	5'-AACCACTCGGCCATCTCTCCTA-3'		
CD	Trn C [tRNA-Cys (GCA)]	20	5'-CCAGGTCAAATCTGGGTGTC-3'	58,0	Taq I
	Trn Dr [tRNA-Asp (GUC)]	20	5'-GGGATTGTAGTTCAATTGGT-3'		
CD	Trn C [tRNA-Cys (GCA)]	20	5'-CCAGGTCAAATCTGGGTGTC-3'	58,0	Hinf I
	Trn Dr [tRNA-Asp (GUC)]	20	5'-GGGATTGTAGTTCAATTGGT-3'		
TF	Trn T [tRNA-Thr (UGU)]	20	5'-CATTACAAATGCGATGCTCT-3'	57,5	Taq I
	Trn Fr [tRNA-Phe (GAA)]	19	5'-ATTGAACTGGTGACACGAG-3'		
TF	Trn T [tRNA-Thr (UGU)]	20	5'-CATTACAAATGCGATGCTCT-3'	57,5	Hinf I
	Trn Fr [tRNA-Phe (GAA)]	19	5'-ATTGAACTGGTGACACGAG-3'		

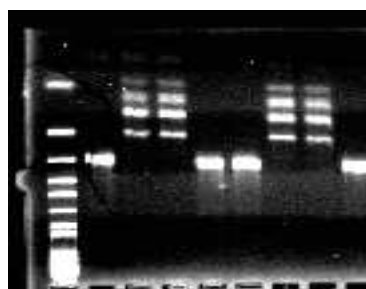
PCR-RFLP гаплотипы дуба черешчатого (*Q. robur* L.)

Локусы	DT	AS	CD	TF
Гаплотипы	<i>Taq</i> I	<i>Hinf</i> I	<i>Taq</i> I	<i>Hinf</i> I
4 (A)	1 1 1 1	1 1 2 3	1 5 2 2 2 2	2 0 1
7 (A)	1 1 8 1	1 1 2 3	1 5 2 2 2 2	2 0 2

PCR-RFLP гаплотипы березы повислой (*B. pendula* Roth.)

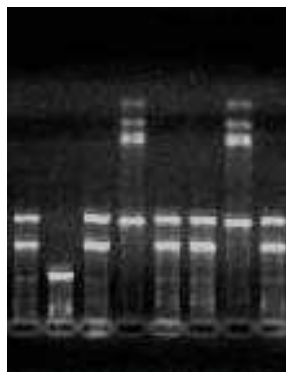
Локусы	CD	CD	AS	TF	TF
Гаплотипы	<i>Hinf</i> I	<i>Taq</i> I	<i>Taq</i> I	<i>Hinf</i> I	<i>Taq</i> I
4 (A)	1 1 2 1 1 1	3 1 1	1	1 1	1 1
7 (A)	1 1 1 1 1 1	1 1 1	3	1 1	1 1

Далее на основании использования PCR-RFLP-анализа была изучена изменчивость 4 локусов хлоропластной ДНК дуба черешчатого и березы повислой (рис. 1, 2). На основании полученных данных по всем четырем локусам для *Q. robur* и *B. pendula* в исследуемых насаждениях выявлено по 2 гаплотипа для каждого вида растений (табл. 2, 3): дуб черешчатый – гаплотипы 4, 7; береза повислая – гаплотипы А, С (обозначения гаплотипов взяты в соответствии с работами [6, 14]).



1 2 3 4 5 6 7 8 9

Рис. 1. PCR-RFLP-анализ хлоропластной ДНК дуба черешчатого (*Q. robur* L.). Локус DT, фермент-рестриктаза *Taq* I.: 1 – маркер молекулярной массы; 2–8 – PCR-RFLP-спектры



1 2 3 4 5 6 7 8

Рис. 2. PCR-RFLP-анализ хлоропластной ДНК березы повислой (*B. pendula* Roth.). Локус AS, фермент-рестриктаза *Hinf* I.: 2 – ампликоны ДНК без разрезания ферментом; 1, 3–8 – PCR-RFLP-спектры

В дальнейшем данные исследования будут расширены с целью выявления всех вариантов гаплотипов дуба черешчатого и березы повислой Беларуси.

Заключение. В результате проведенных исследований была отработана методика проведения PCR-RFLP-анализа дуба черешчатого (*Q. robur* L.) и березы повислой (*B. pendula* Roth.). На основании использования данного метода была изучена изменчивость 4 локусов (DT, AS, CD, TF), являющихся универсальными для многих видов растений. В ходе работы выявлено 2 гаплотипа дуба черешчатого (4, 7) и 2 гаплотипа березы повислой (А, С). В дальнейшем исследования планируется расширить.

Данные, полученные в результате изучения изменчивости локусов хлоропластной ДНК дуба и березы на основании использования PCR-RFLP-метода, могут быть использованы при изучении процессов расселения видов в постледниковый период, установлении природного происхождения популяций, при сертификации древесины с целью установления ее географического происхождения.

Литература

- Morgante, M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics / M. Morgante, A. M. Olivieri // *The Plant Journal*. – 1993. – Vol. 3. – P. 175–182.
- Гостимский, С. А. Использование молекулярных маркеров для анализа генома растений / С. А. Гостимский, З. Г. Кокаева, В. К. Боброва // *Генетика*. – 1999. – Т. 35. – № 11. – С. 1538–1549.
- Падутов, В. Е. Методы молекулярно-генетического анализа / В. Е. Падутов, О. Ю. Баранов, Е. В. Воропаев. – Минск: Юнипол, 2007. – 176 с.
- Каган, Д. И. Современное состояние дубрав: лесоводческие и генетические аспекты / Д. И. Каган // *Сб. науч. тр. / Ин-т леса НАН Бе-*

ларуси. – Гомель, 2007. – Вып. 67: Проблемы лесоведения и лесоводства. – С. 51–62.

5. Which DNA Marker for Which Purpose. Final Compendium of the Research Project Development, optimization and validation of molecular tools for assessment of biodiversity in forest trees in the European Union / URL; E. M. Gillet (lead.), DGXII Biotechnology FW IV Research Programme Molecular Tools for Biodiversity. – Frankfurt, 1999. – 253 p.

6. Is there a correlation between chloroplastic and nuclear divergence, or what are the roles of history and selection on genetic diversity in European oaks? / A. Kremer [et al.] // Forest Ecology and Management. – 2002. – Vol. 156. – P. 75–87.

7. Chloroplast DNA variation of oaks in France and the influence of forest fragmentation on genetic diversity / R. J. Petit [et al.] // Forest Ecology and Management. – 2002. – Vol. 156. – P. 115–129.

8. Distribution of chloroplast DNA variation in British oaks (*Quercus robur* and *Q. petraea*): the influence of postglacial colonisation and human management / J. E. Cottrell [et al.] // Forest Ecology and Management. – 2002. – Vol. 156. – P. 181–195.

9. Chloroplast DNA variation of white oaks in northern Balkans and in the Carpathian Basin / S. Boudas [et al.] // Forest Ecology and Management. – 2002. – Vol. 156. – P. 197–209.

10. Glaz, I. Genetic cartography of oaks in Poland using PCR-RFLP markers of the chloroplast DNA / I. Glaz // Glas. sum. pokuse. – Zagreb, 2000. – Vol. 37. – P. 481–487.

11. Finkeldey, R. Genetic variation of oaks (*Quercus* spp.) in Switzerland. 3. Lack of impact

of postglacial recolonization history on nuclear gene loci / R. Finkeldey, G. Matyas // Springer-Verlag [Electronic resource]. – 2002. – Mode of access: <http://www.icrisat.org/nars/Content/TAG/link.springer.de/link/service/journals/00122>. – Date of access: 11.03.2008.

12. Hattemer, H. H. Genetic markers in birch / H. H. Hattemer, W. Steiner, D. Kownatzki // Silvae Genetica. – 1990. – Vol. 39. – № 2. – P. 45–50.

13. Comparative phylogeography and population structure of two European birch species, *Betula pendula* and *B. pubescens* with high level of haplotypes sharing / A. Buonamici [et al.] // Proceedings of the 51st Italian Society of Agricultural Genetics Annual Congress, Riva del Garda, 23–26 september, 2007. – Riva del Garda, 2007. – P. 48.

14. Extensive sharing of chloroplast haplotypes among European birches indicates hybridization among *Betula pendula*, *B. pubescens* and *B. nana* / A. E. Palme [et al.] // Molecular Ecology. – 2004. – Vol. 13. – P. 167–178.

15. Rogers, S. O. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues / S. O. Rogers, A. J. Bendich // Plant Molecular Biology. – 1985. – Vol. 5. – P. 69–76.

16. Дорохов, Д. Б. Быстрая и экономичная технология RAPD-анализа растительных геномов / Д. Б. Дорохов, Э. Клоке // Генетика. – 1997. – Т. 33. – № 4. – С. 443–450.

17. Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual / T. Maniatis, J. Sambrook, E. F. Fritsch. – Cold Spring Harbor: Laboratory Press, 1989. – 324 p.