

УДК 630*165.3:674.031.632.13

О. Ю. Баранов, канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник
(ГНУ «Институт леса НАН Беларуси»);
В. Балюцкас, канд. биол. наук, зав. отделом,
(Институт леса, Центр аграрных и лесных наук Литвы)

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ХОЗЯЙСТВЕННО ЦЕННЫХ ФОРМ БЕРЕЗ

Береза – одна из наиболее распространенных лесных пород в Беларуси. Она не только выполняет важную экологическую функцию в лесных ассоциациях, но имеет большое лесохозяйственное и промышленное значение. Целью данной работы явилось выявление специфических ДНК-маркеров для идентификации и паспортизации хозяйственно-ценных форм и генотипов березы повислой, березы пушистой, березы карельской. В ходе выполнения исследований был проведен ПЦР-анализ с 25 произвольными праймерами, 20 парами специфических праймеров. В результате проведенного анализа были выявлены генетические особенности различных хозяйственно ценных форм берез. На основании выполненных исследований сформирован набор из 3 олигонуклеотидных праймеров для амплификации диагностических RAPD-локусов, 20 представлены 10 парами для амплификации полиморфных диагностических STS-локусов. Полученные данные использованы для разработки методического руководства по генетической идентификации и паспортизации хозяйственно-ценных форм и генотипов берез.

Birches are one of the most common forest tree species in Belarus. They play not only an important ecological role in forest associations, but have a large forestry and industrial importance. The purpose of this study was to identify specific DNA markers for identification and certification of commercially valuable forms and genotypes of silver birch, downy birch, curly birch. During the investigations PCR analysis was carried out with 25 arbitrary primers, 20 pairs of specific primers. The analysis identified the genetic characteristics of various commercially valuable forms of birches. Based on the investigations set of primers was formed: set of 3 oligonucleotide primers for amplification of diagnostic RAPD-loci, 20 primers are represented by 10 pairs for amplification of polymorphic STS-diagnostic loci. Results of the investigation were used to develop a manual for the genetic identification and certification of commercially valuable forms and genotypes of birches.

Введение. В Беларуси произрастают несколько видов берез. Береза повислая, или бородавчатая (*B. pendula* Roth., или *B. verrucosa* Ehrh.), и береза пушистая (*B. pubescens* Ehrh.) – широко распространенные виды, образующие самостоятельные лесные формации со своим доминированием – производные повислоберезовые леса, сменяющие хвойные или широколиственные насаждения на минеральных почвах, и коренные пушистоберезовые леса на болотных эдафотопсах [1]. Береза низкая (*B. humilis* Schrank) произрастает на территории республики локальными очагами на низинных, переходных болотах и в заболоченных речных долинах, представляя собой кустарниковые заросли [1]. Береза карликовая (*B. nana* L.) представлена редкими островными популяциями, произрастающими на сфагновых болотах и, реже, в других местах северной части Беларуси.

Являясь одной из наиболее распространенных лесных пород в Беларуси (16,5%), береза не только имеет большое лесохозяйственное и промышленное значение как подгон, лесообразующая, быстрорастущая, почвоулучшающая порода, источник высококачественной древесины и др., но и выполняет важную экологическую функцию в лесных ассоциациях в качестве эдификатора.

Древесина березы применяется в фанерном, мебельном производствах. Прессованная и окра-

шенная древесина используется как заменитель особенно твердых и ценных тропических пород [2].

Из декоративных форм березы повислой известны плакучая береза, чернокорая береза, береза с краснеющими листьями, с красными пыльниками и др. [2]. Некоторые авторы присваивают чернокорой форме березы повислой видовой статус – *Betula atrata* Kotula [3].

Редкая и хозяйственно важная разновидность березы повислой – береза карельская (*Betula pendula* Roth. var. *carelica* Mercl.). Она является очень ценным сырьем для лесообработывающей промышленности [4]. Данная порода представляет собой дерево второй величины высотой до 25 м или сильно ветвящийся кустарник с приподнимающимися стволиками до 3 м в высоту. Характерной особенностью березы карельской является высокодекоративная текстура древесины, получившая мировую известность [4]. Узорчатая древесина с успехом применяется для отделки мебели и внутренних помещений зданий, производства изделий различных форм и сувениров. Она напоминает своей текстурой мрамор с переливами различных оттенков и темными включениями разнообразной формы. На стволах образуются утолщения в виде мелкой бугорчатости, шаровидных наплывов или отдельных вздутий. Крупные утолщения формируются чаще всего в местах отхода от

стволов толстых скелетных ветвей. С возрастом вся поверхность ствола покрывается толстой коркой с темными продольными трещинами [2, 4]. В местах утолщений, вздутий и выпуклостей трещины появляются раньше, затем они распространяются по всему стволу. По внешнему виду березу карельскую можно разделить на четыре формы: высокоствольная узорчатая, короткоствольная узорчатая, кустовидная узорчатая и полнодревесная безузорчатая [4].

Среди хозяйственно ценных форм березы пушистой наиболее распространенными являются каповые формы. Капы – шаровидные разрастания тканей стебля древесных растений, связанные с образованием скопления спящих почек. Для капов характерны следующие особенности: возникают они обычно на стволах, реже – на ветвях и очень редко – на корнях; могут достигать очень крупных размеров и веса около 1 тонны; капы образуются практически у всех видов лиственных пород; среди хвойных видов обнаруживаются достаточно редко; чаще всего капы развиваются в относительно неблагоприятных условиях произрастания; склонность образовывать капы у различных древесных видов неодинакова; прирост древесины капов больше прироста древесины ствола; спящие почки на поверхности капа своим основанием прирастают на величину годичного прироста; почечные следы разветвляются в древесине капа.

Перечисленные формы берез не только имеют важное хозяйственное значение как источник декоративного материала и как элементы ландшафтного дизайна [2], но и представляют собой определенную научную ценность в качестве модели для изучения механизмов регуляции клеточного цикла и процесса дифференциации растительных клеток.

Целью работы явилось выявление специфических ДНК-маркеров для идентификации и паспортизации хозяйственно ценных форм и генотипов берез.

Основная часть. Материал для анализа был собран в природных насаждениях *B. pendula* и *B. pubescens*, расположенных на территории Гомельского и Брестского ПЛХО. Хозяйственно ценный вариант березы повислой – *B. pendula* var. *carelica* – был представлен материалом от различных деревьев четырех морфологических форм березы карельской из коллекции культур березы карельской, расположенной на территории Корневской экспериментальной базы Института леса НАН Беларуси и генетического резервата березы карельской Климовичского лесхоза.

Проведение молекулярно-генетического анализа экспериментального материала берез проводилось по следующим этапам: выделение суммарной ДНК из образцов, проведение поли-

меразной цепной реакции для амплификации изучаемых локусов, анализ полученных ампликонов методом гель-электрофореза.

Выделение ДНК производилось из тканей почек, листьев и древесины СТАВ-методом [5]. В ходе исследования были использованы ДНК-маркеры, различающиеся своей методологией: STS-маркеры (специфические локусы) и RAPD-маркеры (произвольно амплифицированные локусы). STS-маркеры были представлены SSR-локусами, или микросателлитами (высокополиморфные локусы, характеризующиеся наличием нуклеотидных повторов в структуре ДНК), и EST-локусами (экспрессируемые гены).

ПЦР-анализ проводился с применением *Taq DNA Polymerase*TM (Fermentas) согласно инструкции фирмы-производителя. В ходе исследования были использованы праймеры, описанные в работах [6–9], позволяющие выявлять перечисленные выше типы маркеров.

Электрофоретическое разделение продуктов полимеразной цепной реакции проводили в агарозном и ПААГ гелях. Для изучения ряда характеристик ампликонов был использован генетический анализатор ABI Prism 310 (фирма Applied Biosystems).

В результате проведенного RAPD-анализа березы карельской было отобрано три праймера Oligo 6, Oligo 8, Oligo 9 [6], амплифицирующих локусы с наибольшим значением коэффициента подразделенности F_{st} . На основе анализа частот встречаемости аллельных вариантов, выявляемых данными праймерами RAPD-маркеров, была определена степень генетической дифференциации между морфологическими формами. Наименьшие значения коэффициента генетической дистанции D_N наблюдались среди наиболее схожих форм – короткоствольной и кустовидной (0,009), безузорчатой и высокоствольной (0,018). Наибольшие значения D_N выявлены между парами безузорчатая – кустовидная (0,049) и высокоствольная – кустовидная (0,048) [10].

Анализ степени дифференциации по каждому RAPD-локусу в отдельности выявил, что наиболее существенный вклад в структуру дендрограммы вносит локус Oligo 9³⁰⁴. Например, у высокоствольных форм в ходе проведенного анализа не было выявлено рецессивного аллеля по Oligo 9³⁰⁴, в то время как у низкоствольных форм частота аллеля «0» данного локуса составила около 50%. Исходя из значений частот встречаемости аллельных вариантов изученных RAPD-локусов и использования ряда дополнительных маркеров построена таблица определения различных форм березы карельской, позволяющая проводить раннюю диагностику форм в посадочном материале *B. pendula* var. *carelica*, что является важным при культивировании этой породы на плантациях.

Для разработки эффективной системы генетической паспортизации берез были изучены микросателлитные локусы серии Vr и L [7, 9]. В результате проведенного анализа было отобрано четыре микросателлитных локуса, позволяющих выявить наибольшее суммарное число различных электрофоретических вариантов.

На основании полученных результатов рассчитано, что при использовании данных четырех микросателлитных локусов теоретически можно генотипировать 32 млн. деревьев. На практике, данного набора локусов достаточно для проведения генетической паспортизации 14 млн. деревьев с вероятностью ошибки $7,1 \times 10^{-8}$.

Дополнительным аспектом использования микросателлитных локусов явилось также и определение пloidности форм берез. Проведенное изучение пloidности подтвердил предварительный цитогенетический анализ образцов березы пушистой – $4n$, березы повислой – $2n$, гибридов березы повислой и березы пушистой – $3n$, березы карельской – $2n$ [11]. В большинстве образцов наблюдался определенный уровень миксопloidных клеток – 8–20%, что характерно для тканей покрытосеменных древесных растений. Наибольшим значением миксопloidии характеризовалась береза карельская.

В ходе проведенной амплификации образцов ДНК березы повислой и березы пушистой с праймерами для выявления локусов рибосомального оперона были получены ПЦР-спектры, представленные для всех образцов одной зоной амплификации. При детальном изучении ПЦР-спектров образцов капов наряду с основной фракцией наблюдалась более легкая слабоокрашенная зона, не относящаяся к амплифицируемому локусу ДНК растения. Среди образцов нормальных тканей этого же дерева такие фракции не встречались [12].

Установить происхождение данных фракций и провести их идентификацию в ходе данной работы не удалось, что связано с ограниченными возможностями ПЦР-анализа. На следующем этапе работы планируется провести секвенирование данных фрагментов, что позволит провести их идентификацию. Следует также отметить, что у ряда образцов тканей капов не наблюдалось дополнительного ампликона, что может быть обусловлено различными причинами – как генетическими особенностями структуры капа, так и природой его происхождения.

Заключение. В целом, в ходе проведенных исследований был сформирован набор из 23 олигонуклеотидных праймеров, позволяющих проводить генетическую паспортизацию и диагностику хозяйственно ценных форм берез.

Данная работа выполнялась в рамках гранта БРФФИ (договор № Б07М-077 от 01.03.2007 г.).

Литература

1. Березовые леса Беларуси: типы, ассоциации, сезонное развитие и продуктивность / под. общ. ред. И. Д. Юркевича. – Минск: Навука і тэхніка, 1992. – 183 с.
2. Гроздова, Н. Б. Береза / Н. Б. Гроздова. – М.: Лесная промышленность, 1979. – 81 с.
3. Побурушко, В. Ф. Эколого-биологические особенности и внутривидовая изменчивость некоторых видов рода *Betula* L. на границах ареалов (в условиях Беларуси): дис. ... канд. биол. наук: 03.00.05. / В. Ф. Побурушко. – Минск, 1992. – 146 с.
4. Барсукова, Т. Л. Береза карельская в Белоруссии / Т. Л. Барсукова // Сельское хозяйство Белоруссии. – 1986. – № 8. – С. 38–45.
5. Падутов, В. Е. Методы молекулярно-генетического анализа / В. Е. Падутов, О. Ю. Баранов, Е. В. Воропаев. – Минск: Юнипол, 2007. – 176 с.
6. Использование метода произвольно амплифицированной полиморфной ДНК (RAPD-PCR) для изучения генетической изменчивости основных лесобразующих пород Беларуси / А. Е. Силин [и др.] // Сб. науч. тр. / ИЛ НАН Беларуси. – Гомель, 2002. – Вып. 55. Проблемы лесоведения и лесоводства. – С. 151–161.
7. Kulju, K. K. M. Twenty-three microsatellite primer pairs for *Betula pendula* (*Betulaceae*) / K. K. M. Kulju, M. Pekkinen, S. Varvio // Molecular Ecology Notes. – 2004. – V.4 (3). – P. 471–473.
8. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics / T. J. White [et al.] // A Guide to Methods and Applications / M. A. Innis [et al.]. – New York: Academic Press, 1990. – P. 315–322.
9. Wu, B. Development of microsatellite markers in white birch (*Betula platyphylla* var. *japonica*) / B. Wu, C. Lian, T. Hogetsu // Molecular Ecology Notes. – 2002. – V. 2 (4). – P. 413–415.
10. Дроздов, А. Л. Молекулярно-генетический анализ морфологических форм березы карельской / А. Л. Дроздов, О. Ю. Баранов // Тезисы 6-й Пущинской школы-конф. молодых ученых «Биология – наука 21 века», Пущино, 20–24 мая 2002. – М., 2002. – С. 242.
11. Баранов, О. Ю. Использование молекулярно-генетических маркеров для анализа пloidности осины и березы / О. Ю. Баранов, В. Балюцкас // Сб. науч. тр. / Институт леса НАН Беларуси. – Гомель, 2009. – Вып. 69. Проблемы лесоведения и лесоводства. – С. 129–135.
12. Баранов, О. Ю. Молекулярно-генетический анализ капов различных древесных пород / О. Ю. Баранов, Ю. Н. Исаков // Сб. науч. тр. / Институт леса НАН Беларуси. – Гомель, 2008. – Вып. 68. Проблемы лесоведения и лесоводства. – С. 145–151.