

9. Любавская А.Я. Селекция и интродукция карельской берёзы // Автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук. М. 1969. 48 с.
10. Махнев А.К. Интродукция карельской берёзы на Среднем Урале // Интродукция и акклиматизация декоративных растений. Свердловск: Изд-во УНЦ АН СССР. 1982. С.30–35.
11. Сакс К.А., Бандерс В.Л. Карельская берёза в Латвийской ССР. Рига: Зинатне, 1969. С.97–110.
12. Селекция берёзы на декоративные качества древесины для организации сырьевой базы художественным промыслам в условиях Кировской области. Отчёт о НИР № 119 (закл.). Костромская ЛОС; рук. С.Н.Багаев. Кострома, 1974. 108 с.
13. Яскина Л.В. Культуры карельской берёзы в Узбекистане // Тр. Чаткальского горно-лесного государственного заповедника. Вып. III. Ташкент. 1972. С.175–183.

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF CURLY BIRCH BASED ON ALCOHOLDEHYDROGENASE GENE SEQUENCING DATA

Baranov O.Yu.¹, Nicolaeva N.N.², Mashkina O.S.³, Baliuckas V.⁴

¹ Forest Research Institute of NAS of Belarus, 246001 Belarus, Homel, Proletarskaya St. 71, E-mail: betula-belarus@mail.ru

² Forest Research Institute of Karelian Scientific Centre of RAS, 185910 Russia, Petrozavodsk, Pushkinskaya St., 11, E-mail: fri2011@krc.karelia.ru

³ Voronez State University, 394000 Russia, Voronez, University Sq., 1, E-mail: olga_mashkina@yahoo.com

⁴ Institute of Forestry, Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, Lithuania LT-53101, Gyryonys, Liepu St., 1, E-mail: virgis.baliuckas@mail.ru

Abstract. The objects of molecular genetic studies were *in vitro* cultures, trees from the artificial and natural stands of *Betula pendula* Roth.var. *carelica* Mercl., *Betula pubescens* Ehrh. and *Betula pendula* Roth. The phylogenetic relationships between these species were investigated using a part of the nuclear *ADH* gene sequences. The *ADH* phylogeny suggests existing systematics of curly birch. Five polymorphic microsatellite loci were used for additional genetic analysis of forms of *Betula pendula* var. *carelica*. Results of study showed features of genetic structure of habitual forms by isozyme and SSRP assay.

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БЕРЕЗЫ КАРЕЛЬСКОЙ НА ОСНОВАНИИ ДАННЫХ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ГЕНА АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Баранов О.Ю.¹, Николаева Н.Н.², Машкина О.С.³, Балиуцкас В.М.⁴

¹ Институт леса НАН Беларуси, 246001 Беларусь, г. Гомель, ул. Пролетарская 71, E-mail: betula-belarus@mail.ru

² Институт леса КарНЦ РАН, 185910 РФ, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11, E-mail: fri2011@krc.karelia.ru

³ Воронежский государственный университет, 394000 РФ, г. Воронеж, Университетская пл., 1, E-mail: olga_mashkina@yahoo.com

⁴ Институт леса Центра аграрных и лесных наук Литвы, Литва LT-53101, н.п.Гирионис, Липовая ал., 1, E-mail: virgis.baliuckas@mail.ru

Карельская береза является не только хозяйственно важной породой, как ценное сырье для производства мебели и предметов интерьера, а также представляет собой уникальный модельный объект для изучения аспектов физиологии растительной клетки. Так, проведенные разносторонние исследования биологических особенностей карельской березы показали, что они, в основном, связаны с наличием аномальных процессов при делении и дифференцировки камбиальных клеток [7].

Большинством исследователей карельская береза рассматривается как разновидность березы повислой — *Betula pendula* Roth. var. *carelica* Mercl., которая характеризуется узорчатой текстурой древесины [7, 6]. Несмотря на утвердившийся систематический статус карельской березы, деревья с аналогичной структурой древесины были описаны и для березы пушистой, а также гибридных триплоидных форм берез [3]. Кроме того, в отличие от большинства древесных пород, карельская береза представлена группой переходных морфологических форм и не имеет четкого дендрологического описания. В естественных условиях *B. pendula* var. *carelica* представлена различными вариантами, включая деревья высотой до 25 м или сильно ветвящиеся кустарники с приподнимающимися стволиками до 3 м высотой [7, 6]. Имеющиеся литературные данные, связанные с изучением происхождения данной породы и установлением факторов, обуславливающих узорчатость древесины, зачастую разрозненны и противоречивы [7, 3]. Использование

молекулярно-генетических методов анализа позволило провести полномасштабные филогенетические исследования, установить характер наследования и проявления различных признаков для ряда родов и видов древесных растений. Существенным преимуществом данного вида анализа явился непосредственный анализ генетического материала и большое количество изучаемых признаков (маркеров) [8].

Целью данной работы явилось изучение филогенетических взаимоотношений карельской березы с близкородственными видами секции *Albae* на основании сравнительного анализа нуклеотидной структуры гена алкогольдегидрогеназы (*Adh*).

Экспериментальный материал для анализа был представлен различными морфологическими формами карельской березы из *in vivo* и *in vitro* коллекций Института леса НАН Беларуси (10 инд.), Научно-исследовательского института лесной генетики и селекции (Воронеж) (7 инд.), Института леса КарНЦ РАН (5 инд.). Кроме *B. pendula* var. *carelica*, для сравнительного анализа были использованы следующие виды берез: Б. пушистая (10 инд.), Б. приземистая (*B. humilis* Schrank) (3 инд.), Б. карликовая (*B. nana* L.) (3 инд.), Б. повислая (15 инд.), включая рассеченолистную форму — Б. далекарлийскую (1 инд.), и Б. чернокорая (1 инд.).

Выделение ДНК производили из тканей почек SDS-методом [8]. Нуклеотидная структура праймеров для изучения региона гена *Adh* (ВрADHF GCACCACCACAAGTAGGTGAAG, ВрADHR AATCTTGAAGCCCCAGCAATCC) и условия амплификации были взяты из работы [10]. Используемые праймеры фланкируют регион алкогольдегидрогеназы *Betula* spp., включающий в себя 2–5 интроны и 2–6 экзоны данного гена. Для видового изучения фрагмента *Adh* гена анализируемые ПЦР-зоны вырезали из геля и секвенировали с применением генетического анализатора ABI Prism 310 (Applied Biosystems) на основании использования набора BigDye Terminator Sequence Kit v.1.1, согласно протоколу компании-изготовителя. Нуклеотидную структуру секвенированных ампликонов берез анализировали с помощью программы BLAST в GenBank NCBI [5] и CLC Sequence viewer 6.3.

Дополнительно для некоторых коллекционных форм карельской березы был проведен изоферментный и микросателлитный анализы, согласно [1, 11]. В качестве SSR-маркеров были использованы полиморфные локусы L2.2, L5.5, L7.8, L10.1, L52 [11]. Материал для анализа был собран в коллекции культур карельской березы Института леса НАН Беларуси. Данный опытный объект был создан из смешанной партии семенного материала, собранного в белорусских популяциях карельской березы [2]. Близкое расположение и отсутствие значительных барьеров для обмена генетическим материалом между популяциями делают несущественным влияние фактора географической изменчивости. Материал для исследований был представлен по наиболее типичными по внешнему признаку деревьями четырех морфологических форм: безузорчатая (БУ), узорчатая высокоствольная (УВ), узорчатая короткоствольная (УК) и узорчатая кустовидная (УКВ). Количество деревьев в каждом варианте было равным и составило 24 индивидуума.

В ходе проведенной амплификации фрагмента *Adh* гена для всех изученных образцов берез были получены однотипные электрофоретические спектры, включающие основной ампликон размером ≈ 1100 н.п. (рис. 1). Как видно из рисунка, деревья березы пушистой характеризуются наличием дополнительных минорных фракций (1400–1500 п.н.) на фореграммах. Следует отметить, что в отличие от результатов, полученных в работе [10], электрофоретический спектр *B. nana* также был представлен основным ампликоном, размером ≈ 1100 п.н. (рис 1).

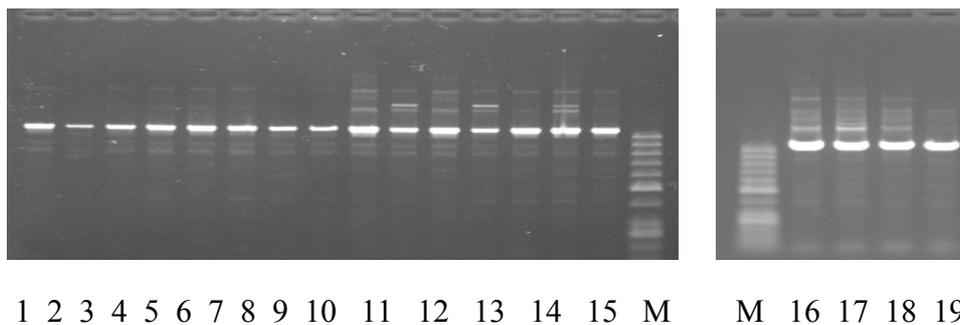


Рисунок 1. Электрофоретический спектр видов берез по изучаемому фрагменту *Adh* гена.

1-6 — Б. карельская, 7, 8 — Б. повислая, 9-15 — Б. пушистая, 16-19 Б. карликовая

Проведенное секвенирование данного региона выявило широкий спектр изменчивости среди изученных образцов видов берез. Следует отметить, что наибольшее количество видоспецифических SNP было отмечено для второго интрона Adh гена. Как видно из денситограммы, представленной на рисунке 2, нуклеотидный состав данного региона карельской березы идентичен полученному для березы повислой. В тоже время береза пушистая характеризуется наличием видоспецифического полиморфизма. Следует отметить, что выявленные SNP у изученных видов берез были связаны как замещением нуклеотидов, так и 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 карельской березы и березы далекарлийской 2–3/500. В случае березы пушистой точная оценка показателя гетерозиготности оказалась невозможной в силу полиплоидности *B. pubescens* и сложной структурой получаемых электрофоретических данных. Поэтому в качестве основной видоспецифичной нуклеотидной структуры для березы пушистой принимались основания, характеризующиеся наибольшим флюоресцентным сигналом. Тем не менее, в большинстве случаев видоспецифических нуклеотидных позиций кроме основного пика наблюдался минорный пик с интенсивностью сигнала $\approx 25\%$, соответствующий нуклеотидному основанию для березы повислой, что указывает 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.

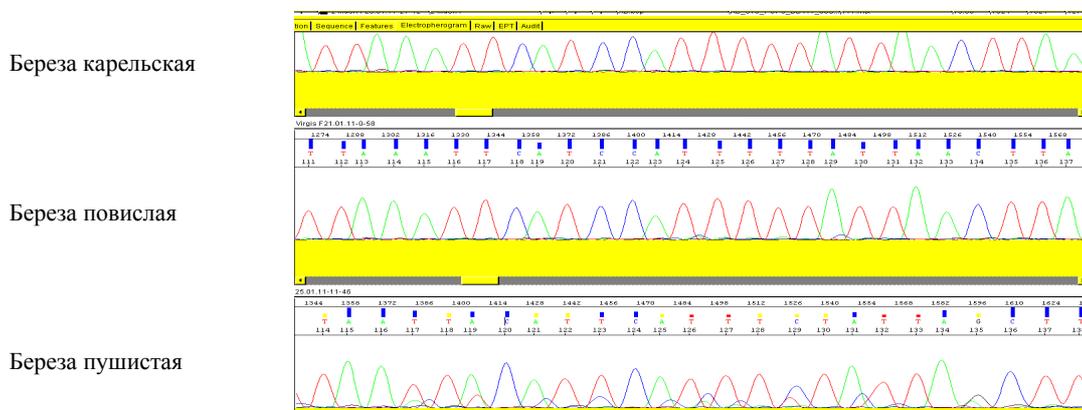


Рисунок 2. Денситограмма фрагмента второго интрона Adh гена Б. карельской, Б. повислой и Б. пушистой.

Также интересным моментом изучения нуклеотидной структуры гена Adh берез явилось выявление в интронных областях различных типов тандемных повторов, представленных на рисунке 3. Как видно из рисунка, основной выявляемой изменчивостью в данном регионе является изменение нуклеотидной структуры повторов, а не их числа.

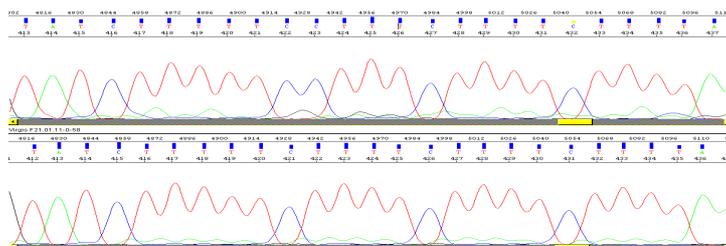


Рисунок 3. Тандемные повторы в Adh гене образцов берез.

Проведенный сравнительный анализ нуклеотидной структуры фрагмента гена Adh образцов карельской березы из различных географических регионов показал высокий уровень сходства, что

представлено на рисунке 4. Полученные результаты были также подтверждены результатами кластеризации, представленными на рисунке 5.

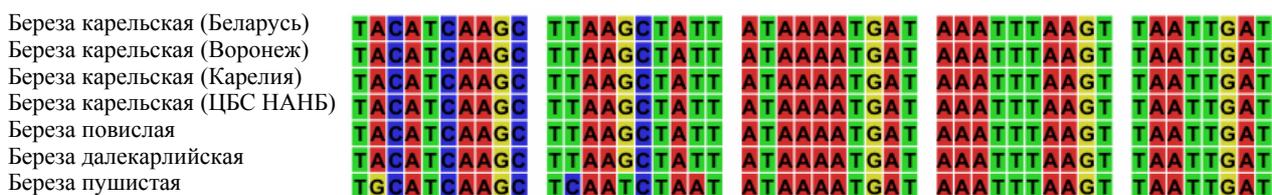


Рисунок 4. Сравнительный анализ образцов карельской березы из различных регионов.

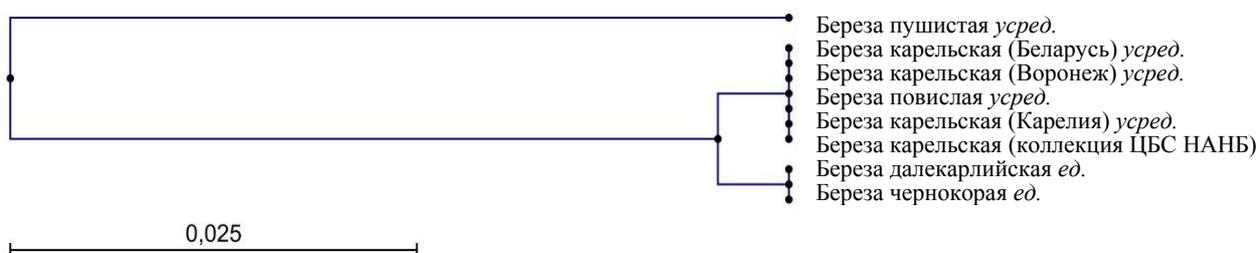


Рисунок 5. Дендрограмма, иллюстрирующая генетическую дифференциацию среди изученных видов и форм берез на основании анализа Adh гена.

Наиболее значимые результаты были получены при анализе генетической структуры форм карельской березы по микросателлитному локусу L2.2. Как видно из таблицы, распределение параметра наблюдаемой гетерозиготности по данному локусу среди форм карельской березы было аналогично полученным ранее данным по гену Gpi-2 [1]. Наибольшая величина H_o приходится на особи, имеющие промежуточное строение между высокоствольными и низкоствольными узорчатыми формами. Наименьшие значения данного показателя соответствуют крайним по габитусу формам – безузорчатой (высокоствольной) и узорчатой кустовидной. При этом показатели ожидаемой гетерозиготности среди форм имеют сходные значения. Отсутствие 100 % наблюдаемой гетерозиготности по данному локусу среди центральных форм может быть объяснено удаленным расположением (и, соответственно, наличием рекомбинации) в хромосоме микросателлитного маркера от генов, детерминирующих габитуальные признаки.

Таблица. Распределение средних значений показателей гетерозиготности среди форм карельской березы

Обозначение форм	Название локуса			
	L2.2.		Gpi-2	
	H_o	H_e	H_o	H_e
БУ	50,0	71,4	58,3	54,0
УВ	72,7	79,2	91,7	51,8
УК	75,0	78,3	75,0	48,9
УКВ	45,5	74,9	66,7	52,2

Для определения степени генетической дифференциации среди форм карельской березы были рассчитаны коэффициенты генетической дистанции Nei и построена дендрограмма [12]. Общие схемы дендрограмм, по результатам анализа 20 изоферментных генов и локусу L2.2 представлены на рисунке 6.

Исходя из структуры кластеризации для двух случаев видно наличие градиентного ряда *безузорчатая форма карельской березы–узорчатая высокоствольная форма карельской березы–узорчатая короткоствольная форма карельской березы–узорчатая кустовидная форма карельской березы*, который имеет прямую корреляцию с общим внешним строением — от полнодревесных форм к кустарникам.



Рисунок 6. Схематическое изображение структур дендрограмм, иллюстрирующих степень генетической дифференциации среди форм карельской березы по данным анализа изоферментных генов (слева) и SSR-локусу L2.2 (справа).

Выявленные особенности в генетической структуре *B. pendula* var. *carelica* подтверждают предположение о том, что формовое разнообразие карельской березы имеет генетическую детерминацию. Наиболее вероятной генетической моделью формирования габитуальных форм является полигенная, а не полиаллельная система, что согласуется с результатами опытов по самоопылению *B. pendula* var. *carelica*, продемонстрировавших расщепление потомства исходных родительских особей на различные формы [2]. Исходя из предлагаемой модели, у узорчатых высокоствольных и короткоствольных форм большинство из локусов, определяющих осевую структуру, находится в гетерозиготном («гибридном») состоянии. На это также указывает и постоянное расщепление габитуальных признаков в семенном потомстве форм карельской березы [7, 6, 2]. При этом гетерозиготное состояние обусловлено одновременным сочетанием условными группами аллелей первого (высокоствольного) и второго (кустовидного) типов.

Увеличение доли генов, представленных аллелями первого типа в гомозиготном состоянии, приводит к формированию признаков, свойственных крайним вариантам высокоствольных форм, вплоть до потери узорчатости и внешнему подобию березе повислой. Преобладание гомозиготных генов с аллелями второго типа обуславливает развитие кустовидных форм. Отсутствие карликовых форм карельской березы в коллекции культур может быть обусловлено их пониженной жизнеспособностью в лесорастительных условиях Беларуси или результатом проведения селекционных рубок. Кроме того, в ряде работ, связанных с анализом результатов скрещиваний форм карельской березы, выдвинуто предположение о наличии летальных вариантов генотипов, обуславливающих постоянное присутствие abortивных семян у *B. pendula* var. *carelica* и нарушение законов Менделевского расщепления признаков [2].

Проведенный филогенетический анализ карельской березы, основанный на данных сравнительного изучения нуклеотидной структуры гена алкогольдегидрогеназы, подтвердил существующее систематическое положение *B. pendula* var. *carelica* и ее происхождение от березы повислой. Генетический анализ форм карельской березы выявил достоверное увеличение показателя наблюдаемой гетерозиготности в центральных (по габитусу) формах *B. pendula* var. *carelica* по сравнению с крайними формами. Изучение уровня генетической дифференциации среди форм показало наличие прямой корреляции аллельной структуры с распределением габитуальных признаков. На основании полученных данных предложена гипотеза полигенной системы наследственной детерминации формирования габитуальных признаков карельской березы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баранов, О.Ю. Особенности генетической структуры березы карельской по гену Gri-2 // Селекция, генетические ресурсы и сохранение генофонда лесных древесных растений (Вавиловские чтения). Гомель: ИЛ НАН Беларуси, 2003. Вып. 59. С. 181–185.
2. Барсукова, Т.Л. Изменчивость, отбор и разведение березы карельской в Беларуси // Автореф. дис.... канд. с.-х. наук: 06.03.01. Гомель, 1995. 222 с.
3. Буторина, А.К. О природе узорчатости древесины у карельской березы // Генетические и экологические основы повышения продуктивности лесов. Воронеж: НИИЛГиС, 1993. С. 40–47.
4. Евдокимов А.П. Биология и культура карельской березы. Л.: Изд-во Ленинградского университета, 1989. 226 с.
5. Кузенева О.И. Род береза – *Betula* L. // Флора СССР. М.-Л., 1936. Т. 5. С. 269–305.
6. Любавская А.Я. Карельская береза. М.: Лесная промышленность, 1978. 158 с.
7. Новицкая, Л.Л. Карельская береза: механизмы роста и развития структурных аномалий. Петрозаводск: Verso, 2008. 144 с.

8. Падутов, В.Е. Методы молекулярно-генетического анализа. Мн.: Юнипол, 2007. 176 с.
9. Яковлев, Ф.С. Анатомическое строение ствола карельской березы // Известия Карело-Финской научной базы АН СССР. 1949. Вып.1. С. 3–19.
10. 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.
11. 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. Vol. 4 (3). P. 471–473.
12. Nei, M. Molecular population genetics and evolution / M. Nei / Amsterdam: Holland Press. 1975. 278 p.

VARIABILITY OF CARELICA BIRCH BY MORPHOLOGICAL FORMS IN CULTURES OF DIFFERENT AGE IN BELARUS CONDOTIONS

Barsukova T.L.

State Scientific Institution The V.F.Kuprevich institute of Experimental Botany
Akademichnaya St., 27, Minsk BY-220072, Republic of Belarus Fax: +375 (17) 284-18-53. E-mail: exp-bot@biobel.bas-net.by,
WWW Home Page: <http://botany-institute.bas-net.by>

Abstract. Our research on artificial Karelian birch stands in Belarus has revealed that in all sites figured and unfigured forms are in the region of the 50:50 ratio. This ratio does not significantly vary as the birches age. The reasons for a low germination rate for seeds of Karelian birch have been revealed and the species composition of the most abundant seed pests has been identified. The need for taking measures to control the pests, particularly *Aradus betulae* L., has been underlined.

ИЗМЕНЧИВОСТЬ БЕРЕЗЫ КАРЕЛЬСКОЙ ПО МОРФОЛОГИЧЕСКИМ ФОРМАМ В КУЛЬТУРАХ РАЗНОГО ВОЗРАСТА В УСЛОВИЯХ БЕЛАРУСИ

Барсукова Т.Л.

Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича
Беларусь, г.Минск, ул. Академическая,27,+375 17 284 16 95, E-mail:BarsukovaTL@yandex.ru

В естественных насаждениях на территории Беларуси береза карельская встречается совместно с березой повислой и другими породами, и, как правило, находится во втором ярусе и не плодоносит. В настоящее время с целью обеспечения деревообрабатывающих предприятий декоративной древесиной необходимо создавать лесосеменные плантации и культуры этой породы.

Для популяции березы карельской характерна высокая степень гетерогенности, т. е. особи отличаются друг от друга по фенотипическим и генотипическим характеристикам. Группа особей, отличающихся одним или несколькими сходными признаками, рассматриваются в качестве внутривидовой популяционной категории – формы. Поэтому изучение изменчивости березы карельской проводили на основе популяционно-генетического подхода к оценке вида.

По внешнему виду и хозяйственному значению выделено шесть узорчатых и одна безузорчатая формы березы карельской: высокоствольные (Ia – крупноузорчатая и Ib – шаровидноутолщенная), короткоствольные (IIa – пятнистоузорчатая и IIб – лироствольная), кустовидная, кустарниковая и безузорчатая. По мере перехода от древовидных жизненных форм к кустовидным и кустарниковым меняется текстура древесины: от безузорчатой к крупноузорчатой и мелкоузорчатой [4].

Узорчатость древесины тесно коррелирует с некоторыми внешними признаками отличия карельской березы, связь с которыми осуществляется посредством физиологических процессов. Например, местным нарушением камбиальной активности, что приводит к ослаблению радиального прироста, проявляющегося в разного рода неровностях на поверхности ствола. В местах нарушения деятельности камбиального слоя на поверхности ствола появляются продольные впадинки, бороздки, и, наоборот, в местах нормального функционирования происходит образование валиков и бугорков. Неровности на поверхности ствола и, нередко, на скелетных ветвях кроны проявляются также в форме округло-вытянутых вздутий и бугорчатости. Указанные признаки отличия не только свидетельствуют о наличии узорчатой древесины, но также характеризуют ее текстуру [5].