

© Л. В. Ветчинникова,
А. Ф. Титов, Л. В. Топчиева,
Н. Л. Рендаков

Институт биологии Карельского на-
учного центра РАН, Институт леса
Карельского научного центр РАН

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ПОПУЛЯЦИЙ КАРЕЛЬСКОЙ БЕРЕЗЫ В КАРЕЛИИ С ПОМОЩЬЮ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ

ВВЕДЕНИЕ

✿ Впервые изучена генетическая структура популяций карельской березы *Betula pendula* var. *carelica* (Mercklin) Hämet-Ahti, у которой естественное возобновление отсутствует. На основании величин ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготности установлен преимущественный отбор гомозигот на фоне снижения доли гетерозигот. Обнаруженная межпопуляционная дифференциация ($F_{st} = 0,145$) свидетельствует о высокой частоте близкородственных скрещиваний. Выявленные популяционно-генетические особенности позволяют считать, что в наблюдающемся сокращении численности популяций карельской березы и деградации ее генофонда, наряду с другими причинами, участвуют генетические механизмы.

✿ **Ключевые слова:** генетическая структура популяции; гетерозиготность; межпопуляционная дифференциация; карельская береза *Betula pendula* var. *carelica* (Mercklin) Hämet-Ahti.

В последние десятилетия заметно обострилась проблема сохранения и восстановления генофонда редких и исчезающих видов растений. В их ряду особое место занимает карельская береза *Betula pendula* var. *carelica* (Mercklin) Hämet-Ahti, отличительной чертой которой является высокодекоративная узорчатая текстура древесины. В связи с уникальностью и локальностью произрастания карельская береза высоко ценится на мировом рынке и в отличие от других древесных растений продается на вес в килограммах, а не в кубических метрах. В настоящее время в соответствии с Красной книгой Российской Федерации и системой Международного союза охраны природы (МСОП) она отнесена к категории 2EN, т. е. к числу исчезающих, находящихся в опасном состоянии видов (Артемьев и др., 2007).

На территории Республики Карелия к 1970 г. произрастало около 5 тыс. деревьев карельской березы, но к 2003 г. их численность снизилась почти наполовину (Ветчинникова, 2005, 2006). Этому способствовали ее биологические особенности (дизъюнктивный ареал, ограниченность ресурсов, расщепление признаков в семенном потомстве и др.) и селективная элиминация (связанная с изъятием из популяций лучших деревьев путем их выборочной рубки). Несмотря на столь значительное сокращение численности, карельские природные популяции этой березы до сих пор остаются наиболее крупными в России (около 2,5 тыс. деревьев). Помимо Республики Карелия в небольших количествах карельская береза встречается на территории ряда стран Северной Европы и местами в Восточной Европе. Лесов она не образует, произрастает группами или одиночно. Дополнительным фактором, усугубляющим ситуацию с ее численностью, является то, что на всем протяжении ареала естественное возобновление карельской березы практически отсутствует (Ветчинникова, 2005; Щурова, 2006). В соответствии с характерным для нее типом размножения карельская береза относится к анемофильным растениям, что теоретически могло бы вести к увеличению генетической рекомбинации и гетерозиготности за счет перекрестного опыления и распространения семян ветром (Алтухов, 2003; Алтухов и др., 2004). Однако изучение реальной структуры популяций карельской березы не подтверждает этого.

В настоящее время развитие ДНК-технологий, основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР), открыло новые методические возможности для изучения генетических факторов, обуславливающих особенности динамики популяционно-генетической структуры тех или иных видов древесных растений, в том числе и таких как карельская береза, знание которых необходимы при выработке стратегии сохранения их генофонда и/или рациональном использовании ресурсов.

В связи с вышеизложенным целью данной работы явилось изучение генетического разнообразия популяций карельской березы на основе использования микросателлитных маркеров и выявление возможных генетических причин сокращения ее численности и деградации генофонда.

ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили 2-летние саженцы карельской березы, полученные из семян от контролируемого опыления. Гибридизацию проводили на де-

Поступила в редакцию 13.01.2012
Принята к публикации 16.03.2012

Таблица 1

Характеристика праймеров и их последовательность

Локус	Номер доступа в базе NCBI	Последовательность праймеров 5' – 3'	
		Прямой	Обратный
L2.3	AF310847	Cy5cagtggttggacggtgagaa	cgggtgaagtagacggaact
L5.4	AF310862	Cy5aagggcacctgcagattaaga	aaaattgcaacaaaacgttgc
L7.3	AF310864	Cy5ggggatccagtaagcggtat	casacgagagatagagtaacggaa
L7.4	AF310855	Cy5tgaaacgaacggaagagttg	atagcagacttttcatccg

Таблица 2

Число аллелей и величина наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности в трех популяциях карельской березы, находящихся на территории Карелии

Локус	Количество аллелей (A)	Гетерозиготность	
		Наблюдаемая (H_o)	Ожидаемая (H_e)
L2.3	10	0,58	0,78
L5.4	6	0,21	0,76
L7.3	8	0,59	0,81
L7.4	7	0,68	0,76
В среднем	7,8	0,52	0,78

ревьях, представляющих три наиболее крупные популяции карельской березы, расположенные в северной части ее ареала. Одна из популяций находится на северном побережье Онежского озера («северная» популяция «Заонежье»), а две других — на южном («южные» популяции «Каккорово-1», «Каккорово-2»). От каждой популяции анализировали по 30 случайно выбранных растений. Листовые пластинки отбирали в весенний период в фазу распускания.

ДНК из листьев выделяли при помощи набора AxuGen Multisource Genomic DNA Kit (AxuGen). Микросателлитный анализ проводили по четырем локусам: L2.3, L5.4, L7.3, L7.4 (Kulju et al., 2004). Для амплификации ДНК использовали 4 праймера («Синтол», Россия) (табл. 1).

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в амплификаторе iCycler iQ5 (Bio-Rad), используя набор для ПЦР («Силекс», Россия), по следующей программе: денатурация — 1 мин при 94 °С, отжиг — 1 мин при 52 °С, полимеризация — 1 мин при 72 °С; количество циклов — 35; достраивание фрагментов — 10 мин при 72 °С. Реакционная смесь для ПЦР объемом 30 мкл содержала 50 нг ДНК исследуемых образцов, 100 пМ праймера, 1 ед. Taq полимеразы («Силекс», Россия), 0,2 мМ dNTP, 2,5 мкл 10×буфера для Taq полимеразы, согласно инструкции к набору для ПЦР («Силекс», Россия). Разделение и определение микросателлитных фрагментов осуществляли на приборе SEQ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter) с помощью набора GenomeLab Fragment Analysis (Beckman Coulter). Для статистической обработки результатов использовали пакеты программ PopGene 1.32, GenStat 7.0, Arlequin 3.01.

Для определения уровня генетического разнообразия популяций определяли количество аллелей (A), приходящееся на один локус, и вычисляли наблюдаемую (H_o) и ожидаемую гетерозиготность (H_e). Кластерный анализ проводили с помощью пакета программ PopGen 1.32.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На основании изучения генетического разнообразия трех наиболее крупных популяций карельской березы, расположенных в северной части ее ареала на территории Карелии, обнаружено, что число аллелей в данной выборке варьировало от 6 до 10 и в среднем составило 7,8 на локус (табл. 2).

Микросателлитный анализ ДНК показал, что минимальные величины наблюдаемой (H_o) и ожидаемой гетерозиготности (H_e) были характерны для локуса L5.4, и они равнялись соответственно 0,21 и 0,76. Для других исследованных локусов величина H_o колебалась от 0,58 до 0,68, а величина H_e — от 0,76 до 0,81 (табл. 2). Следует отметить, что полученное нами значение H_e превышает показатели, рассчитанные на основе данных аллозимного и РАПД анализа карельской березы и других видов берез (равные 0,2 и 0,44, соответственно) (Баранов, Марковская, 2003; Zeng et al., 2003; Топчиева и др., 2008). Относительно высокие значения наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности, очевидно, связаны в данном случае с анализом наиболее вариабельной части генома, представленной микросателлитными локусами (Никитина, Назаренко, 2004). Во всех исследуемых популяциях значения H_e превосходили значения H_o , что говорит о преимущественном накоплении гомозигот (табл. 2). Обнаруженное снижение доли гетерозигот, в свою очередь, может свидетельствовать о пониженной выживаемости растений в изученных популяциях в целом и уменьшении генетического разнообразия в каждой из них.

Оценка выживаемости растений по некоторым физиологическим показателям показала, что при скрещивании деревьев карельской березы между собой всхожесть семян составляет в среднем около 49% (максимальная — 68%, минимальная — 4%), что несколько ниже, чем при свободном опылении (56%). При направленном опылении

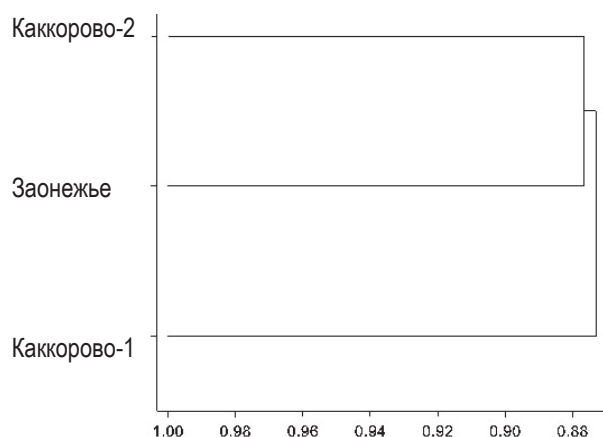


Рис. 1. Дендрограмма, характеризующая степень генетического сходства растений трех популяций карельской березы, находящихся на территории Карелии

Таблица 3.

Показатели генетического разнообразия в трех популяциях карельской березы, находящихся на территории Карелии

Популяция	Количество аллелей (A)	H_o	H_e
Заонежье	7	0,53	0,67
Каккорово-1	7	0,56	0,70
Каккорово-2	6,5	0,46	0,67

Таблица 4.

Значения F-статистики Райта для трех популяций карельской березы, находящихся на территории Карелии

Локус	F_{is}	F_{it}	F_{st}
L2.3	0,1510	0,2564	0,1242
L5.4	0,6659	0,7241	0,1743
L7.3	0,1434	0,2645	0,1414
L7.4	-0,0446	0,1028	0,1411
Среднее	0,2223	0,3351	0,1450

карельской березы пыльцой березы повислой всхожесть семян варьировала от 25 до 75%. Однако при свободном опылении у карельской березы вероятность появления в потомстве особей с узорчатой древесиной невелика и может составлять всего 2–3%, в лучшем случае не более 25% (Ермаков, 1986). Также отрицательно сказывается на процессах опыления и оплодотворения низкое качество пыльцы (жизнеспособность пыльцы и длина пыльцевой трубки), выявленное нами ранее (Николаевская и др., 2008). Добавим к этому, что к настоящему времени природные популяции карельской березы по своей возрастной структуре (70 лет и более) являются перестойными или спелыми (Ветчинникова, 2005; Щурова, 2006). Многие деревья имеют наклоненный вид и покрылись лишайниками, а выпуклости, характерные для карельской березы, просматриваются с трудом. При этом естественное возобновление выражено крайне слабо.

Сравнительный анализ генетического разнообразия внутри каждой из популяций выявил наибольшие и наименьшие значения по изученным показателям (A , H_o , H_e) у деревьев, представляющих «южные» популяции карельской березы, соответственно «Каккорово-1» и «Каккорово-2» (табл. 3). «Северная» популяция «Заонежье» характеризовалась средними по сравнению с ними значениями этих величин.

Кластерный анализ показал, что растения, представляющие популяции «Заонежье» и «Каккорово-2», попадают в один кластер, что говорит об их несколько более тесном генетическом родстве (рис. 1). Другая группа растений, представляющая популяцию «Каккорово-1», образовала отдельное плечо, хотя выявленные при этом различия и не являются значительными. Не исключено, что сходство в генетической структуре географически более удаленных популяций («Заонежье» и «Каккорово-2»), может быть обусловлено тем, что одна из них («Каккорово-2») представляет собой искусственно созданное насаждение, в котором часть деревьев имеет «заонежское» происхождение.

Оценка генетической дифференциации популяций карельской березы, расположенных на территории Карелии, проведена на основании значений показателя F-статистики Райта (F_{st}) (табл. 4), средняя величина которого оказалась равной 0,145. Полученные данные свидетельствуют о значительной дифференциации изученных популяций и указывают на наличие в них большого числа близкородственных скрещиваний.

Таким образом, впервые исследована генетическая структура трех наиболее крупных популяций карельской березы, произрастающих на территории Карелии. На основании микросателлитного анализа ДНК показан относительно высокий уровень генетического разнообразия ($H_e = 0,78$), что, возможно, связано с анализом наиболее варибельной части генома. Вместе с тем, установлена значительная межпопуляционная дифференциация ($F_{st} = 0,145$), которая, по всей вероятности, обусловлена изолированностью популяций и усилением инбридинга. Обнаруженное уменьшение доли гетерозигот, очевидно, свидетельствует о пониженной выживаемости растений в изученных популяциях в результате сужения генетического разнообразия (Алтухов и др., 2004). Выявленные популяционно-генетические особенности позволяют считать, что в наблюдающемся сокращении численности особей в изученных популяциях карельской березы и деградации ее генофонда, наряду с другими причинами, участвуют генетические механизмы.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Отделения биологических наук РАН «Биологические ресурсы России: оценка состояния и фундаментальные основы мониторинга».

Выражаем благодарность заведующей лаборатории генетики Института биологии Карельского научного центра

РАН к.б.н. О. Н. Лебедевой и старшему научному сотруднику, к.б.н. О. М. Федоренко за полезное участие в обсуждении результатов исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Артемов А. В., Ветчинникова Л. В., Гнатюк Е. П.* и др., 2007. Красная книга Республики Карелия / под ред. Э. В. Ивантера, О. Л. Кузнецова. Петрозаводск: Карелия. 368 с.
2. *Алтухов Ю. П.*, 2003. Генетические процессы в популяциях М.: Академкнига, 431 с.
3. *Алтухов Ю. П., Салменкова Е. А., Курбатова О. Л.* и др., 2004. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях. М.: Наука, 619 с.
4. *Баранов О. Ю., Марковская Ю. А.*, 2003. Особенности генетической структуры березы карельской по гену Gr1-2 // Проблемы лесоведения и лесоводства: Сб. науч. трудов Ин-та леса НАН Беларуси. Вып. 50. Гомель: ИЛ НАН Беларуси. С. 181–185.
5. *Ветчинникова Л. В.*, 2006. Обследование популяции карельской березы на территории Музея-заповедника Кижы — охраняемого природного объекта и национального достояния Республики Карелия // Бюллетень экологических исследований на территории Государственного музея-заповедника «Кижы». 2005 год. Петрозаводск: ФГУК «Государственный музей-заповедник «Кижы». С. 19–23.
6. *Ветчинникова Л. В.*, 2005. Карельская береза и другие редкие представители рода *Betula* L. М.: Наука. 269 с.
7. *Ермаков В. И.*, 1986. Механизмы адаптации березы к условиям Севера. Л.: Наука, Ленинградское отделение. 144 с.
8. *Никитина Т. В., Назаренко С. А.*, 2004. Микросателлитные последовательности ДНК человека: мутационный процесс и эволюция // Генетика. Т. 40. № 10. С. 1301–1318.
9. *Николаевская Т. С., Ветчинникова Л. В., Лебедева О. Н., Кузнецова Т. Ю.*, 2008. Морфофизиологическая характеристика пыльцы различных видов березы в условиях Восточной Фенноскандии // Труды Карельского научного центра РАН. Серия Биогеография. Выпуск 14. Петрозаводск. С. 84–91.

10. *Топчиева Л. В., Ветчинникова Л. В., Малышева И. Е.* и др., 2008. Оценка генетического разнообразия популяции карельской березы с использованием РАПД-маркеров // Актуальные проблемы сохранения биоразнообразия в экстремальных условиях северного климата. Апатиты: «К&М». С. 91–92.
11. *Щурова М. Л.*, 2006. Будущее карельской березы в Карелии // Лесной вестник. МГУЛ, № 5, С. 64.
12. *Kulju K. K. M., Pekkinen M., Varvio S.*, 2004. Twenty-three microsatellite primer pairs for *Betula pendula* (Betulaceae) // Molecular Ecology Notes. Vol. 4. P. 471–473.
13. *Zeng J., Zou Y., Bai J., Zheng H.*, 2003. RAPD analysis of genetic variation in natural populations of *Betula alnoides* from Guangxi, China // Euphytica. Vol. 134. N 1. P. 33–41.

ESTIMATION OF GENETIC DIVERSITY OF KARELIAN BIRCH POPULATIONS IN KARELIA USING MICROSATELLITE MARKERS

Vetchinnikova L. V., Titov A. F., Topchieva L. V., Rendakov N. L.

☉ **SUMMARY:** We studied genetic structure of populations of Karelian birch *Betula pendula* var. *carelica* (Mercklin) Hämet-Ahti, which lacks second growth. Based on the values of expected and observed heterozygosity, the predominant selection of homozygotes on the background of decrease of the heterozygotes fraction was revealed. Interpopulation differentiation rate ($F_{st} = 0,145$) indicates a high inbreeding frequency. Observed genetic characteristics of the population suggest that genetic mechanisms play a role in the current decrease of the population size of Karelian birch and its genetic degradation.

☉ **KEY WORDS:** genetic structure of population; heterozygosity; population differentiation; *Betula pendula* var. *carelica* (Mercklin) Hämet-Ahti.

☉ Информация об авторах

Ветчинникова Лидия Васильевна — руководитель группы биотехнологии воспроизводства древесных растений доктор биологических наук, доцент. Институт леса Карельского научного центра РАН. 185910, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, д. 11. E-mail: vetchin@krc.karelia.ru.

Титов Александр Федорович — руководитель лаборатории экологической физиологии растений, доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, профессор. Институт биологии Карельского научного центра РАН. 185910, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, д. 11

Топчиева Людмила Владимировна — руководитель группы молекулярной биологии, кандидат биологических наук. Институт биологии Карельского научного центра РАН. 185910, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, д. 11

Рендаков Николай Львович — научный сотрудник, кандидат биологических наук. Институт биологии Карельского научного центра РАН, группа молекулярной биологии. 185910, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, д. 11

Vetchinnikova Lidya Vasiljevna — Head in the Group For Woody Plant Regeneration Biotechnology, Doctor (DSc) of Biology, Assistant Professor Forest Research Institute of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences. Pushkinskaya st., 11, Petrozavodsk. 185910. E-mail: vetchin@krc.karelia.ru.

Titov Alexander Fedorovich — Head in the Laboratory of Plant Ecophysiology, Doctor (DSc) of Biology, RAS Corr. Fellow, Professor Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences. Pushkinskaya st., 11, Petrozavodsk. 185910.

Topchieva Ludmila Vladimirovna — Head in the Molecular Biology Group, Cand. (PhD) of Biology, Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences. Pushkinskaya st., 11, Petrozavodsk. 185910.

Rendakov Nikolai Ljvovich — Research Associate Cand. (PhD) of Biology, Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences Molecular Biology Group. Pushkinskaya st., 11, Petrozavodsk. 185910.