

УДК 630*165:575.17

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ГАПЛОТИПОВ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ ДНК ЕЛИ ЕВРОПЕЙСКОЙ В ГЕОГРАФИЧЕСКИХ КУЛЬТУРАХ

© 2014 г. В. Е. Падутов, А. И. Сидор,

Д. И. Каган, О. А. Ковалевич, С. Н. Верас

Институт леса Национальной академии наук Беларуси

Республика Беларусь, 246001, Гомель, ул. Пролетарская, 71

E-mail: forestgen@mail.ru, pinselekt@gmail.com, quercus-belarus@mail.ru,

o-kovalevich@mail.ru, veras.svetlana@mail.ru

Поступила в редакцию 31.07.2014 г.

Проведен генетический анализ митохондриального (мтДНК) и хлоропластного (хпДНК) геномов 27 климатипов ели европейской в географических культурах (Чериковский лесхоз, Беларусь). Установлено, что проанализированные климатипы представлены бореальным и карпатским гаплотипами мтДНК. Первый из них встречается во всех регионах произрастания климатипов (Приуральский, Северо-Западный, Центральный, Прибалтийский, Белорусский, Юго-Западный), второй – только на территории Белорусского и Юго-Западного. Показано, что уровень полиморфизма хпДНК значительно выше по сравнению с мтДНК. Для ряда аллелей локусов хпДНК обнаружена клинальная изменчивость по частотам их встречаемости. Выявлено, что отдельные гаплотипы хпДНК ели европейской подобно гаплотипам мтДНК могут быть представлены как во всех регионах исследованной части ареала, так и на определенных его территориях.

Ключевые слова: *ель европейская, изменчивость, митохондриальная ДНК, хлоропластная ДНК, гаплотип, географические культуры.*

ВВЕДЕНИЕ

Актуальной задачей при организации селекционного семеноводства древесных видов является соблюдение установленных лесосеменным районированием границ географического и экологического ареалов использования семенного и посадочного материала при лесовосстановлении и лесоразведении. В настоящее время в качестве одного из инструментов установления происхождения и контроля переброски репродуктивного материала могут использоваться методы молекулярно-генетического анализа цитоплазматической ДНК, для тех или иных вариантов (гаплотипов) которой обычно характерна приуроченность к определенным географическим районам произрастания исследуемых видов. Особенно это характерно для древесных растений с широким географическим и экологическим ареалом (ель европейская, сосна обыкновенная, дуб черешчатый и др.).

Цель работы – изучение изменчивости локусов цитоплазматической (митохондриальной и хлоропластной) ДНК ели европейской в семенных потомствах различного географического происхождения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовались климатипы ели европейской в географических культурах, созданных в 1979 г. на основе разработанных Всероссийским научно-исследовательским институтом лесоводства и механизации лесного хозяйства программы и методики на территории Государственного лесохозяйственного учреждения «Чериковский лесхоз» Могилевского государственного производственного лесохозяйственного объединения (Беларусь). В исследование включены потомства 27 популяций ели европейской шести регионов (Юго-Западного, Белорусского, Прибалтийского, Северо-Западного, Центрального и При-

уральского). Выделение ДНК осуществлялось из тканей почек и хвои модифицированным СТАВ-методом (Падутов и др., 2007). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) митохондриальной ДНК (мтДНК) проводили по локусу *mt15-D02* (Litkowiec et al., 2009), хлоропластной ДНК (хпДНК) – по микросателлитным локусам *Pt 26081*, *Pt 63718* и *Pt 71936* (Vendramin et al., 1996). Электрофоретическое фракционирование и визуализация продуктов амплификации мтДНК выполнялись в агарозных гелях с последующим окрашиванием бромистым этидием по стандартной методике (Падутов и др., 2007), хпДНК – с помощью генетического анализатора ABI PRISM 310 согласно инструкции фирмы-изготовителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Генетический анализ мтДНК показал, что в проанализированных семенных потомствах выявлены два митотипа: карпатский (величина ПЦР-продукта *mt15-D02* составляла 1249 п. н.) и бореальный (753 п. н.) (Litkowiec et al., 2009). В табл. 1 приведены частоты встречаемости митотипов для всех изученных климатипов ели европейской в географических культурах Чериковского лесхоза.

На основании проведенного генетического анализа климатипов ели европейской построена геногеографическая карта, отражающая территориальное распространение митотипов по локусу *mt15-D02* (см. рисунок). В климатипах Приуральского, Северо-Западного, Центрального и Прибалтийского регионов обнаружен бореальный митотип (753 п. н.), частота встречаемости которого здесь составляет 100 %, и не найден карпатский (1249 п. н.). В двух регионах (Юго-Западном и Белорусском) выявлены оба митотипа, причем на территории Юго-Западного региона установлено доминирование карпатского митотипа. Так, в трех из четырех проанализированных климатипах данного региона (Львовская, Закарпатская и Ивано-Франковская области) частота его встречаемости 100 %, и только в климатипе из Ровенской области он был полностью замещен бореальным. В Белорусском регионе карпат-

ский митотип обнаружен только у деревьев климатипов из Брестской (80 %) и Гродненской (60 %) областей, бореальный – в составе климатипов всех областей Беларуси.

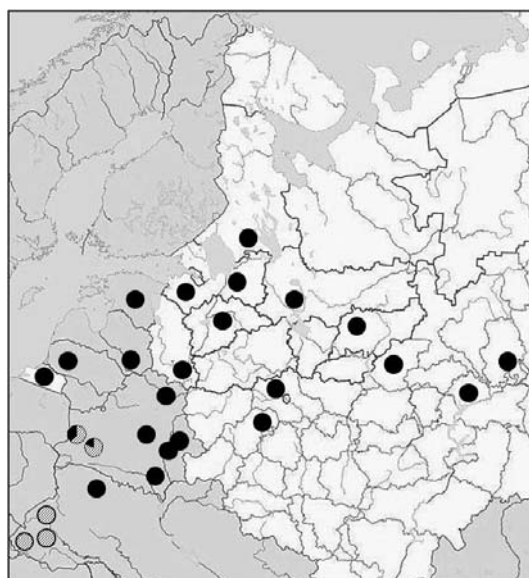
Генетический анализ хпДНК позволил выявить более высокий уровень полиморфизма климатипов по сравнению с мтДНК. Для проанализированных локусов суммарно выявлено 13 аллелей. Пять аллелей обнаружено в локусе *Pt 63718*, по четыре – в локусах *Pt 26081* и *Pt 71936*. Частоты встречаемости аллелей по каждому локусу в регионах представлены в табл. 2.

При анализе аллельных частот у климатипов ели европейской обращают на себя внимание выраженные различия между географическими регионами по ряду аллелей. Так, например, в локусе *Pt 63718* частота встречаемости аллеля 92 уменьшается в северном и северо-восточном направлениях, изменяясь от 50 % в Юго-Западном регионе до 10 % в Прибалтийском и 0 % в Северо-Западном и Приуральском регионах. Сходная тенденция установлена и для аллеля *Pt 63718*⁹⁷, частота которого снижается в широтном направлении с запада на восток до полного его исчезновения в Центральном и Приуральском регионах. Частота аллеля *Pt 63718*⁹⁶ возрастает в северо-восточном направлении от 30 % (Юго-Западный регион) до 100 % (Приуральский регион). Для климатипов Приуральского региона по локусу *Pt 63718* установлено отсутствие полиморфизма. По локусу *Pt 71936* частота встречаемости аллеля 142 увеличивается в направлениях Юго-Западный регион → Прибалтийский и Юго-Западный регионы → Приуральский регион.

На основании полученных результатов по аллельному разнообразию климатипов ели европейской в географических культурах Чериковского лесхоза составлены многолокусные генотипы проанализированных деревьев. Сочетание размерных вариантов аллелей в локусах позволило выявить 18 гаплотипов хпДНК (хлоротипов), 8 из которых встретились в единственном числе. Частота встречаемости остальных хлоротипов варьировала от 0.022 до 0.208. Только шесть из 18 хлоротипов встречались с частотой выше 5 % (табл. 3).

Таблица 1. Частота встречаемости митотипов по локусу *mt15-D02* в семенных потомствах ели европейской различного географического происхождения

№ п/п	№ климатипа по Госреестру	Происхождение семян		Частота встречаемости, %	
		Страна, республика или область	Лесхоз, лесничество	Карпатский	Бореальный
Юго-Западный регион					
1	16	Ровенская обл.	Рафаловский	0	100
2	17	Закарпатская обл.	Раховский	100	0
3	18	Ивано-Франковская обл.	Ивано-Франковский	100	0
4	18А	Львовская обл.	Турковский	100	0
Белорусский регион					
5	11	Витебская обл.	Бешенковичский	0	100
6	12	Могилевская обл.	Чериковский	0	100
7	12А	Могилевская обл.	Чериковский	0	100
8	13	Гомельская обл.	Гомельский	0	100
9	14	Минская обл.	Червенский	0	100
10	15А	Гродненская обл.	Волковысский	60	40
11	15	Брестская обл.	Ивацевичский	80	20
Прибалтийский регион					
12	8	Эстония	Вильяндинский	0	100
13	9	Литва	Тауракий	0	100
14	10	Латвия	Даугавпилсский	0	100
15	30	Калининградская обл.	–	0	100
Северо-Западный регион					
16	3	Карелия	Кашканское лес-во	0	100
17	5	Ленинградская обл.	Тосненский	0	100
18	6	Ленинградская обл.	Лисинский	0	100
19	7	Псковская обл.	Великолукский	0	100
20	32А	Новгородская обл.	–	0	100
21	24	Вологодская обл.	Череповецкий	0	100
Центральный регион					
22	27	Костромская обл.	Галичский	0	100
23	29	Московская обл.	Солнечногорский	0	100
24	32	Калужская обл.	Калужский	0	100
25	31	Горьковская обл.	–	0	100
Приуральский регион					
26	34	Татарстан	Сабинский	0	100
27	35	Удмуртия	Ижевский	0	100



Распространение митотипов ели европейской по территории Европейской России, Прибалтики и ряда стран СНГ (локус *mt15-D02*). Круг черного цвета – бореальный митотип; круг белого цвета в полоску – карпатский.

Таблица 2. Частота встречаемости аллельных вариантов по трем микросателлитным локусам хпДНК у ели европейской в географических культурах Чериковского лесхоза

Аллель	Географический регион					
	Юго-Западный	Белорусский	Прибалтийский	Центральный	Северо-Западный	Приуральский
<i>Pt 63718</i>						
91	–	0.021	–	–	–	–
92	0.500	0.125	0.100	0.110	–	–
95	–	0.062	0.100	0.223	0.200	–
96	0.300	0.667	0.700	0.667	0.700	1.000
97	0.200	0.125	0.100	–	0.100	–
<i>Pt 26081</i>						
108	0.100	–	–	–	–	–
109	0.600	0.688	0.700	0.667	0.800	0.667
110	0.200	0.312	0.300	0.333	0.200	0.333
111	0.100	–	–	–	–	–
<i>Pt 71936</i>						
141	–	0.043	–	0.222	0.100	–
142	0.400	0.521	0.800	0.445	0.500	0.555
143	0.600	0.396	0.200	0.333	0.400	0.445
144	–	0.022	–	–	–	–

Распределение выявленных в географических культурах гаплотипов хпДНК ели европейской с частотой встречаемости выше 5 % по географическим регионам произрастания материнских насаждений показало, что отдельные хлоротипы ели европейской могут встречаться как во всех регионах исследованной части ареала (хлоротипы 1, 2; хлоротип 3 кроме Юго-Западного региона), так и концентрироваться на определенных его территориях. Хлоротипы 4, 5 и 6 встречаются в основном в западной части исследованного ареала: хлоротипы 4 и 6 – в Юго-Западном и Белорусском регионах с единичным заносом в Центральный; хлоротип 5 – в Юго-Западном, Белорусском и Прибалтийском регионах.

Таблица 3. Хлоротипы ели европейской в географических культурах Чериковского лесхоза (с частотой встречаемости выше 5 %)

Хлоротип	<i>Pt 63718</i>	<i>Pt 26081</i>	<i>Pt 71936</i>	Частота встречаемости
1	96	109	142	0.208
2	96	109	143	0.208
3	96	110	142	0.177
4	97	109	143	0.073
5	92	109	143	0.063
6	92	110	142	0.063

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследований проведен генетический анализ цитоплазматической ДНК климатипов ели европейской в географических культурах (Чериковский лесхоз, Беларусь). Для хлоропластной ДНК выявлен более высокий уровень полиморфизма по сравнению с митохондриальной ДНК (18 и 2 гаплотипа соответственно). На основании полученных данных установлены места географической локализации гаплотипов мтДНК и хпДНК ели европейской на территории Европейской России, Прибалтики и ряда стран СНГ. Показано, что гаплотипы ели европейской могут встречаться как во всех регионах исследованной части ареала, так и на определенных его территориях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Падутов В. Е., Баранов О. Ю., Воронаев Е. В.* Методы молекулярно-генетического анализа. Минск: Юнипол, 2007. 176 с.
- Litkowiec M., Dering M., Lewandowski A.* Utility of two mitochondrial markers for identification of *Picea abies* refugial origin // *Dendrology*. 2009. V. 61. P. 65–71.
- Vendramin G. G., Lelli L., Rossi P., Morgante M.* A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in *Pinaceae* // *Mol. Ecol.* 1996. V. 5. P. 111–114.

The Variability of Cytoplasmic DNA Haplotypes of Norway Spruce in the Provenance Trials

V. E. Padutov, A. I. Sidor, D. I. Kagan, O. A. Kovalevich, S. N. Veras

Institute of Forest, National Academy of Sciences of Belarus

Proletarskaya str., 71, Gomel, 246001 Republic of Belarus

E-mail: forestgen@mail.ru, pinselekt@gmail.com, quercus-belarus@mail.ru,
o-kovalevich@mail.ru, veras.svetlana@mail.ru

A genetic analysis of mitochondrial (mtDNA) and chloroplast (cpDNA) genomes of 27 climatotypes of Norway spruce was conducted in the provenance (Cherikov forestry district, Republic of Belarus). It was found that the analyzed climatotypes presented boreal and carpathian mtDNA haplotypes. The first of them is found in all regions of growth climatotypes (Priuralsky, Northwest, Central, Baltic, Byelorussian, Southwest), the second – only in Belarusian and Southwest regions. It is shown that polymorphism cpDNA significantly higher in comparison with the mtDNA. For a number of alleles of loci cpDNA the clinal variation was found in the frequency of their occurrence. It was revealed that some cpDNA haplotypes, as haplotypes mtDNA, of Norway spruce can be represented as in all regions of the investigated part of the range as on certain of its territories.

Keywords: *Norway spruce (Picea abies), variability, mitochondrial DNA, chloroplast DNA, haplotype, provenance trails.*