

Использование ITS маркеров для определения видовой принадлежности берез секции *Apterocaryon*

The use of ITS markers for identification of birch species from section *Apterocaryon*

Медведева С. О.¹, Черепанова О. Е.¹, Филиппов Е. Г.¹, Копориков А. Р.²

Medvedeva S. O.¹, Cherepanova O. E.¹, Filippov E. G.¹, Koporikov A. R.²

¹ Ботанический сад УРО РАН, г. Екатеринбург, Россия
E-mails: so.medvedeva@gmail.com; botgarden.olga@gmail.com; filorch@mail.com,
¹ Botanical Garden UrB RAS, Ekaterinburg, Russia

² Институт экологии растений и животных УРО РАН, г. Екатеринбург, Россия. E-mail: Koporikov@mail.ru
² Institute of plant and animal ecology UB RAS, Ekaterinburg, Russia

Реферат. *Betula nana*, *B. humilis* – кустарниковые формы берез секции *Apterocaryon* (карликовые березы), широко распространенные в Северном полушарии. Виды встречаются на болотных, тундровых и гольцовых почвах, нередко произрастая совместно на сфагновых болотах. Были высказаны предположения о гибридизации диплоидных *B. nana* и *B. humilis* с тетраплоидной березой пушистой *B. pubescens* из секции *Betula* (белые березы). Предпринимались попытки исследования наличия и интенсивности гибридизации данных видов с помощью молекулярно-генетических методов. Цель данного исследования заключается в изучении генетического полиморфизма *B. nana* и *B. humilis* на Среднем Урале на основе ITS маркеров ядерной рибосомальной ДНК. Данные маркеры были впервые исследованы у кустарниковых форм берез на территории РФ. Показано, что регион ITS 1–2 является информативным и позволяет дифференцировать близкородственные виды берез *B. humilis*, *B. nana*, произрастающие на территории Среднего Урала. Виды характеризовались отдельными риботипами, у образцов *B. nana* выявлено 5, *B. humilis* – 2 риботипа. Популяции *B. nana* показали большую изменчивость данного региона в сравнении с *B. humilis*, что может свидетельствовать о более высоком адаптивном потенциале карликовой березы, а также об отсутствии существенных изменений численности популяций данного вида во время последнего оледенения в четвертичном периоде.

Ключевые слова. Береза карликовая, береза пушистая, гибридизация, ядерная рибосомальная ДНК, ITS маркеры.

Summary. *Betula nana*, *B. humilis* are shrub birch forms of the section *Apterocaryon* (dwarf birches), widespread in the Northern Hemisphere. The species are found on marsh, tundra and bald soils, often growing together on sphagnum bogs. There were suggestions about the hybridization of the diploid *B. nana* and *B. humilis* with the tetraploid downy birch *B. pubescens* from the section *Betula* (white birches). Attempts were made to study the presence and intensity of hybridization of these species using molecular genetic methods. The aim of the study is to investigate the genetic polymorphism of *B. nana* and *B. humilis* in the Middle Urals based on ITS markers of nuclear ribosomal DNA. These markers are for the first time studied in shrub birch forms on the Russian Federation territory. It is shown that the ITS 1–2 region is informative and makes it possible to differentiate closely related birch species *B. humilis*, *B. nana* growing in the Middle Urals. Species were characterized by individual ribotypes; *B. nana* samples had 5 ribotypes, and *B. humilis* samples had 2 ribotypes. Populations of *B. nana* showed greater variability in this region compared to *B. humilis*, which may indicate a higher adaptive potential of dwarf birch, as well as the absence of significant changes in the population size of this species during the last Quaternary glaciation.

Key words. Dwarf birch, downy birch, hybridization, ITS markers, nuclear ribosomal DNA.

Введение. *Betula* L. (береза) – род деревьев и кустарников, произрастающих в Северном полушарии и встречающихся в различных местообитаниях, включая болотные, высокогорные, тундровые и лесные сообщества. Данный род включает 4 подрода и 8 секций: подр. *Acuminata* (секц. *Acuminatae*), *Aspera* (секц. *Asperae* и *Lentae*), *Betula* (секц. *Apterocaryon*, *Betula*, *Costatae* и *Dahuricae*) и *Nipponobetula* (секц. *Nipponobetula*) (Ashburner, McAllister, 2016). В нашей стране широко представлены березы секции *Betula* (белые березы) и *Apterocaryon* (карликовые березы).

В секцию карликовых берез входят кустарниковые виды с размерами листовой пластины менее 5 см (Ashburner, McAllister, 2016) Типичные представители на территории Евразии – это *Betula nana* L. (береза карликовая) и *Betula humilis* Schrank (береза низкая). Ареал карликовой березы охватывает всю территорию Сибири, Урал, Северную Европу, при этом береза низкая произрастает в более южных широтах Евразии. Оба вида предпочитают влажные местообитания и встречаются на болотных, тундровых и гольцовых почвах, нередко произрастая совместно на сфагновых болотах (Соколов и др., 1980).

Были высказаны предположения о гибридизации диплоидных *B. nana* и *B. humilis* ($2n = 2x = 28$) с тетраплоидной березой пушистой *B. pubescens* ($2n = 4x = 56$), с образованием триплодных гибридов ($2n = 3x = 42$) (Thorsson et al., 2007; Ananthawat-Jonsson et al., 2010). Предпринимались попытки выявления наличия и интенсивности гибридизации данных видов с помощью молекулярно-генетических методов, показано влияние интрогрессии на генетический полиморфизм представителей рода *Betula* (Palme et al., 2004; Jadwiszczak et al., 2012). Для изучения генетического разнообразия берез проводились исследования с использованием таких молекулярных маркеров, как межгенные спейсеры ядерной рибосомальной ДНК (ITS-регион) (Wang et al., 2016), микросателлитные последовательности ядерной ДНК (Tsuda et al., 2017), межгенные спейсеры хлоропластной ДНК (Jadwiszczak et al., 2012).

В связи с вышесказанным, целью данной работы стало изучение генетического полиморфизма *B. nana* и *B. humilis* на Среднем Урале на основе ITS маркеров ядерной рибосомальной ДНК (рДНК).

Материалы и методы исследования. Сравнительный анализ полиморфизма транскрибируемых межгенных спейсеров ITS 1–2 ядерной рДНК проведен на образцах листьев берез, собранных в естественных местообитаниях (табл.). Последовательность региона ITS 1–2 ольхи серой (*Alnus incana* (L.) Moench) была загружена из Генбанка (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (от 10 апреля 2022)) и использована в качестве внешней группы для построения филогенетического дерева (табл.).

Таблица

Места сбора и риботипы образцов

№	Вид	Места сбора образцов / Реф. № Генбанка	Риботипы
1	<i>B. nana</i>	Болото Ольховское, близ г. Богданович. 56°52'1.00" с. ш., 61°38'46.70" в. д.	6,7
2	<i>B. nana</i>	Болото окр. Слюдорудника (Челябинская обл.). 55°39'50.40" с. ш., 60°20'10.10" в. д.	3
3	<i>B. nana</i>	Болото Шабровское, близ п. Шабровский. 56°35'36.38" с. ш., 60°34'59.81" в. д.	4,5
4	<i>B. nana</i>	Нижний Атян, Челябинская область 55°09'1.00" с. ш., 61°24'4.00" в. д.	4
5	<i>B. humilis</i>	Оз. Багаряк, близ дер. Космаково. 56°22'37.91" с. ш., 60°50'7.80" в. д.	1,2
6	<i>B. humilis</i>	Болото Ольховское, близ г. Богданович. 56°52'1.00" с. ш., 61°38'46.70" в. д.	1,2
7	<i>B. humilis</i>	Болото окр. Слюдорудника (Челябинская обл.). 55°39'50.40" с. ш., 60°20'10.10" в. д.	1
9	<i>A. incana</i>	Генбанк реф. № AJ251665, Европа	Внешняя группа

Тотальная ДНК была выделена с использованием СТАБ-метода (Doyle J. J., Doyle J. L., 1990) с некоторыми модификациями (Medvedeva et al., 2021). Амплификацию регионов ITS 1–2 проводили с использованием универсальных праймеров, реакционных условий и температурных режимов, рекомендованных для этих участков (White et al., 1990). Последующее секвенирование проводили по методу Сэнгера при помощи BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Genetic Analyzer 3130; NimaGen, Netherlands). Редактирование и выравнивание полученных последовательностей выполнялось вручную в программах BioEdit7.0 (Hall, 1999) и Mega6 (Tamura et al., 2013).

Для проведения статистического анализа единичные образцы были объединены в группы по видовому признаку. Уровень дифференциации и распределение генетического полиморфизма между группами риботипов (анализ молекулярной вариации, AMOVA) определяли с помощью программного пакета DNASP 6.0 (Rozas et al., 2017). Значения FST были получены для оценки молекулярной дивергенции между отдельными группами. Филогенетические отношения между риботипами реконструированы с помощью NETWORK ver. 4.6.1.2 (метод Reduced Median, RM) (Bandelt et al., 1999).

Результаты и обсуждение. В результате секвенирования межгенного спейсера (ITS 1–2) ядерной рДНК различных образцов берез были получены последовательности длиной около 600 п. н. и выявлено 7 риботипов, отношения между которыми были визуализированы в виде сети (рис. 1).

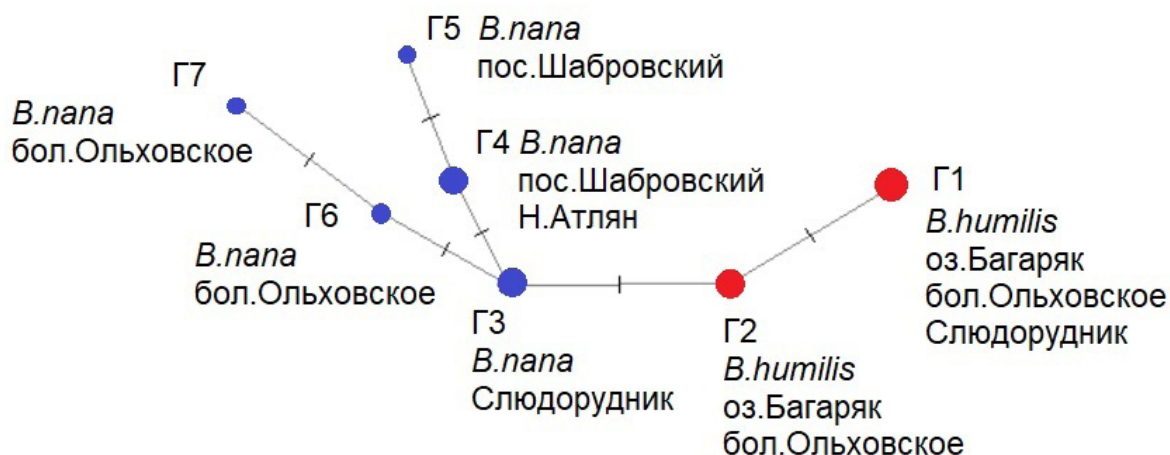


Рис. 1. Генетическая сеть, демонстрирующая взаимоотношения между исследуемыми образцами *Betula nana*, *B. humilis*, на основе матрицы генетических дистанций Nei для секвенированных последовательностей ядерной рДНК (регион ITS 1–2).

Общее число проанализированных сайтов составило 530 (включая гэпы), общее количество полиморфных сайтов – 4, тип мутаций – нуклеотидные замены. Виды *B. nana* и *B. humilis* характеризовались отдельными риботипами, при этом у *B. nana* было выявлено 5, у *B. humilis* – 2 риботипа (табл.). Регион ITS 1–2 оказался достаточно информативным и позволил дифференцировать близкородственные виды берез *B. humilis*, *B. nana*, произрастающие на территории Среднего Урала. Образцы *B. humilis* имели замену в один нуклеотид (Т→С) в позиции 70 п. н., в отличие от образцов *B. nana*. При этом индекс генетической дифференциации F_{ST} между группами образцов *B. humilis* и *B. nana* составил 0,34, что свидетельствует о значительной дивергенции этих видов.

Образцы березы карликовой характеризуются большим нуклеотидным и генетическим разнообразием ($P_i = 0,003$, $H_e = 0,905$), по сравнению с образцами березы низкой ($P_i = 0,001$, $H_e = 0,600$), что может свидетельствовать о более высоком адаптивном потенциале и генетической пластичности *B. nana* по сравнению с *B. humilis*, а также о том, что данный вид за последнее время не испытывал значительных сокращений численности. Это позволяет сделать предположение об отсутствии существенных изменений ареала карликовой березы во время последнего оледенения четвертичного периода.

Разобщенность риботипов *B. humilis* и *B. nana* подтверждается также филогенетическим деревом, построенным на основании нуклеотидных последовательностей региона ITS 1–2 ядерной рДНК. Исследованные образцы формируют на дереве две группы, соответствующие их видовой принадлежности (рис. 2).

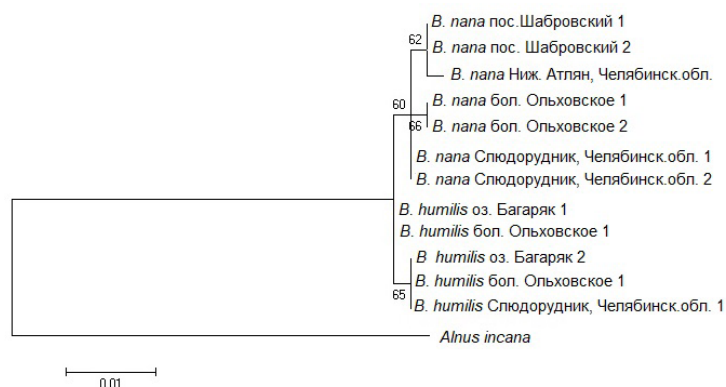


Рис. 2. Филогенетическое дерево видов р. *Betula*, построенное на основе спейсера ITS 1–2 ядерной рДНК (принцип максимального правдоподобия).

Выводы. Регион ITS 1–2 ядерной рДНК позволяет дифференцировать близкородственные виды берез *B. humilis* и *B. nana*, произрастающие на территории Среднего Урала. Популяции *B. nana* характеризуются большей изменчивостью данного региона в сравнении с *B. humilis*, что может свидетельствовать как о более высокой адаптивности *B. nana*, так и об отсутствии существенных изменений численности популяций данного вида во время последнего оледенения в четвертичном периоде. Для верификации данных предположений требуется исследование большего количества популяций карликовой и низкой берез из различных локализаций.

Благодарности. Работа выполнена по государственному заданию Ботанического сада УрО РАН.

ЛИТЕРАТУРА

- Соколов С. Я., Связева О. А., Кубли В. А.** Аралы деревьев и кустарников СССР. В трех томах. Т. 1 – Л.: Наука, 1980. – 97 с.
- Ananthawat-Jónsson K., Thórsson T., Tensch E. M., Greilhuber J.** Icelandic Birch Polyploids — The Case of a Perfect Fit in Genome Size // *Journal of Botany*, 2010. – 347254. DOI: 10.1155/2010/347254
- Ashburner K., McAllister H. A.** The Genus *Betula*: A Taxonomic Revision of Birches. – London: Kew Publishing, 2016. – 21 p.
- Bandelt H. J., Forster P., Röhl A.** Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // *Mol Biol Evol.*, 1999. – № 1. – P. 37–48. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036
- Doyle J. J., Doyle J. L.** Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue // *Focus*, 1990. – Vol. 12. № 1. – P. 13–15.
- Hall T. A.** Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // *Nucl. Acid Symp.*, 1999. – № 41. – P. 95–98. DOI: 10.12691/ajmr-3-2-1
- Jadwiszczak K., Banaszek A., Jabłonska E., Sozinov O. V.** Chloroplast DNA variation of *Betula humilis* Schrk. in Poland and Belarus // *Tree Genetics and Genomes*, 2012. – № 8. – P. 1017–1030. DOI: 10.1007/s11295-012-0482-y
- Medvedeva S., Cherepanova O., Tolkach O., Ponomarev V., Malosieva G.** TrnL-trnF cpDNA polymorphism in some representatives of the genus *Betula* // *BIO Web of Conferences*, 2021. – № 35. – 00017. DOI: 10.1051/bioconf/20213500017
National Center of Biotechnology Information URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Accessed 10.04.2022).
- Palmé A. E., Su Q., Palsson S., Lascoux M.** Extensive sharing of chloroplast haplotypes among European birches indicates hybridization among *Betula pendula*, *B. pubescens* and *B. nana* // *Molecular Ecology*, 2004. – № 13. – P. 167–178. DOI: 10.1046/j.1365-294x.2003.02034.x
- Rozas J., Ferrer-Mata A., Sánchez-DelBarrio J. C., Guirao-Rico S., Librado P., Ramos-Onsins S. E., Sánchez-Gracia A.** DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets // *Mol. Biol. Evol.*, 2017. – № 34. – P. 3299–3302. DOI: 10.1093/molbev/msx248
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S.** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 // *Molecular biology and evolution*, 2013. – Vol. 30, № 12. – P. 2725–2729. DOI: 10.1093/molbev/mst197.
- Thórsson Æ. Th., Palsson S., Sigurgeirsson A., Ananthawat-Jonsson K.** Morphological variation among *Betula nana* (diploid), *B. pubescens* (tetraploid) and their triploid hybrids in Iceland // *Annals of Botany*, 2007 – Vol. 99, № 6. – P. 1183–1193.
- Tsuda Y., Semerikov V., Sebastiani F., Vendramin G. G., Lascoux M.** Multispecies genetic structure and hybridization in the *Betula* genus across Eurasia // *Molecular Ecology*, 2017. – № 26. – P. 589–605. DOI: 10.1111/mec.13885
- Wang N., McAllister H. A., Bartlett P. R., Buggs R. J. A.** Molecular phylogeny and genome size evolution of the genus *Betula* (Betulaceae) // *Ann Bot-London*, 2016. – № 117. – P. 1023–1035. DOI: 10.1093/aob/mcw048
- White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor T.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // *PCR protocols: a guide to methods and applications* / M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White (eds.). – New York: Academic Press, 1990. – P. 315–322.