

БИОЛОГИЯ
BIOLOGYУДК 581.174.1:575.111:582.632.1
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2019-63-3-312-316>Поступило в редакцию 12.09.2018
Received 12.09.2018**О. Ю. Баранов, П. С. Кирьянов, С. В. Пантелеев, Л. В. Можаровская,
А. В. Падутов, О. А. Разумова, член-корреспондент В. Е. Падутов***Институт леса Национальной академии наук Беларуси, Гомель, Республика Беларусь***АНАЛИЗ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ХЛОРОПЛАСТНОГО
ГЕНОМА КАРЕЛЬСКОЙ БЕРЕЗЫ НА ОСНОВАНИИ ДАННЫХ
ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ**

Аннотация. Проведено секвенирование и аннотация хлоропластного генома карельской березы. Выявлен высокий уровень сходства структурно-функциональной организации хлДНК среди видов семейства Betulaceae. Разработан набор праймеров для оценки уровня экспрессии EST-маркеров хлДНК карельской березы методом ПЦР-РВ.

Ключевые слова: хлДНК, высокопроизводительное секвенирование, карельская береза

Для цитирования: Анализ структурно-функциональной организации хлоропластного генома карельской березы на основании данных высокопроизводительного секвенирования / О. Ю. Баранов [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2019. – Т. 63, № 3. – С. 312–316. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2019-63-3-312-316>

**Oleg Yu. Baranov, Pavel S. Kiryanov, Stanislav V. Pantelev, Ludmila V. Mozharovskaya, Alexandr V. Padutov,
Olga A. Razumova, Corresponding Member Vladimir E. Padutov***Forest Research Institute of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Republic of Belarus***ANALYSIS OF STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ORGANIZATION OF THE CURLY BIRCH
CHLOROPLAST GENOME BASED ON THE NEXT-GENERATION SEQUENCING DATA**

Abstract. The sequencing and annotation of the curly birch chloroplast genome were carried out. A high level of similarity of the structural and functional organization of cpDNA among the species of the Betulaceae family was revealed. A set of primers was developed to assess the level of expression of EST markers of the curly birch cpDNA by the real time PCR method.

Keywords: cpDNA, next-generation sequencing, curly birch

For citation: Baranov O. Yu., Kiryanov P. S., Pantelev S. V., Mozharovskaya L. V., Padutov A. V., Razumova O. A., Padutov V. E. Analysis of structural and functional organization of the curly birch chloroplast genome based on the next-generation sequencing data. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2019, vol. 63, no. 3, pp. 312–316 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2019-63-3-312-316>

Введение. Одним из путей интенсификации развития лесной отрасли является расширение видового спектра выращиваемых древесных пород, характеризующихся наличием значительного числа хозяйственно ценных признаков и свойств. С одной стороны, это обусловлено потребностью увеличения ассортимента лесоматериалов для деревоперерабатывающих предприятий, с другой – возрастающей необходимостью увеличения биологической продуктивности и устойчивости лесных насаждений, сохранения их средообразующей функции в условиях изменяющегося климата. В настоящее время данный подход реализуется как за счет плантационного выращивания интродуцированных видов древесных растений, так и за счет постадийного наращивания ресурсов редких представителей местной флоры.

Одной из хозяйственно ценных форм древесных растений является карельская береза (*Betula pendula* Roth. var. *carelica* Mercl.). Характерной особенностью данной породы является

высокодекоративная текстура древесины, получившая мировую известность, применяемая для отделки мебели и внутренних помещений зданий, производства изделий декора и сувениров. Структура рисунка напоминает собой мрамор с переливами широкого спектра оттенков и темными включениями разнообразной формы.

Отличительной особенностью внешнего вида узорчатых форм берез является, как правило, наличие на стволах утолщений в виде мелкой бугорчатости, шаровидных наплывов или отдельных вздутий в местах отхода толстых скелетных ветвей. Другая специфика карельской березы связана с большим разнообразием габитуальных форм – от кустарников до полнодревесных растений, что сопоставимо с межвидовой изменчивостью в пределах рода *Betula*. По запасам естественных ресурсов карельской березы в настоящее время Республика Беларусь занимает одно из лидирующих положений – общая площадь лесных насаждений, занимаемых *B. pendula* var. *carelica*, составляет порядка 700 га. Одним из вопросов, связанных с интенсификацией воспроизводства высокодекоративных по текстуре древесины форм карельской березы, является установление механизмов формирования указанных морфолого-анатомических особенностей. Основываясь на литературных материалах можно выделить ряд основных гипотез происхождения карельской березы, учитывающих экологическую, филогенетическую, биохимическую, физиологическую, фитопатологическую и наследственную специфику данной породы, однако ни одна из предложенных концепций досконально не объясняет возникновение и воспроизведение структурно-функциональных аномалий, а также не находит полного экспериментального подтверждения, что, по всей видимости, указывает на многофакторный характер формирования признака узорчатости древесины [1].

В настоящее время для изучения наследственных особенностей карельской березы наиболее информативным является геномный подход, позволяющий производить анализ структурно-функциональных характеристик генов в их совокупности. Одним из потенциальных объектов исследования *B. pendula* var. *carelica* может выступать ее пласто́м (хпДНК), что обусловлено отмечаемой физиологической особенностью – формирование узорчатости древесины происходит только в условиях высокой освещенности. При этом основным предметом исследования будет выступать не генетический полиморфизм хлоропластных локусов, поскольку в гаплотипически единообразном потомстве (хпДНК у покрытосеменных растений передается, как правило, по материнской линии) наблюдается расщепление по признаку узорчатости, а структурно-функциональные аспекты связаны с особенностями организации пластома, регуляции и экспрессии его генов [2]. Проведенный анализ международных генетических баз данных показал, что к настоящему времени информация по структуре хпДНК карельской березы представлена лишь фрагментарно и не отражает полного спектра геномных и геногеографических характеристик данной породы.

Исходя из всего вышесказанного, целью данного исследования явилось проведение секвенирования хпДНК карельской березы, установление структурно-функциональной организации хлоропластного генома, сравнительный анализ с другими видами древесных растений и разработка набора ДНК-маркеров для оценки функциональной активности локусов хпДНК у узорчатых и безузорчатых форм берез.

Материалы и методы исследования. В качестве экспериментального материала были использованы фрагменты вегетативных органов двух узорчатых клонов карельской березы (КС06 и Ia) из коллекции культур *in vitro* Института леса НАН Беларуси. Выделение хлоропластов и получение препаратов нуклеиновых кислот, насыщенных хпДНК, производились на основании общепринятой методики [3]. Высокопроизводительное секвенирование хпДНК осуществлялось с использованием Ion Torrent™ PGM System (Thermo Scientific, США), согласно протоколу анализа (200 п. н.), рекомендуемому компанией-производителем. Обработку результатов секвенирования, включая сборку и аннотацию последовательностей, выполняли с помощью программного пакета Lasergene v.11 (DNASTAR, Израиль).

Результаты и их обсуждение. В результате *de novo* сборки первичных данных высокопроизводительного секвенирования хпДНК клонов карельской березы получена консенсусная последовательность размером 161123 нуклеотидов (задепонирована в GeneBank NCBI под но-

мером MG966529) [4]. Выявленные различия между клонами были обусловлены однонуклеотидным полиморфизмом (позиция 7787), связанным с дупликацией в повторяющейся последовательности ($n = 9$) мононуклеотидного мотива А-типа.

Изучение частоты встречаемости нуклеотидных оснований в хпДНК карельской березы показало, что доминирующими видами нуклеотидов являются А и Т, суммарно составляя 64,0 % от всех типов оснований (31,5 и 32,5 % соответственно). На долю нуклеотидов G и C приходится 17,7 и 18,3 %. Распределение оснований в пределах коротких (≤ 10 мономеров) участков нуклеотидной последовательности было, как правило, произвольным – частота встречаемости большинства типов олигонуклеотидных сочетаний соответствовала ожидаемым вероятностным показателям их формирования, что указывает на отсутствие выраженного отбора последовательностей определенной структуры. В то же время в отдельных случаях наблюдались статистически достоверные отклонения от расчетных параметров. Например, в случае гомодимеров CC и GG – частота их встречаемости (4,5 и 4,1 %) была выше ожидаемых значений (3,3 и 3,1 %), при этом комбинации CG (3,0 %) и GC (2,8 %) соответствовали прогнозируемой величине – 3,2 %.

Распределение нуклеотидных оснований в молекуле хпДНК карельской березы на макроуровне носило выраженный кластерный характер и включало два АТ-насыщенных участка размером 22 и 120 тыс. п. н. (данные области содержат тРНК- и белок-кодирующие последовательности), разделенных двумя более короткими (10 тыс. п. н.) GC-насыщенными регионами (относятся к инвертированным повторам хпДНК и содержат в основном гены рибосомных РНК 4,5S, 5S, 16S и 23S).

Проведенный сравнительный анализ нуклеотидной последовательности рибосомальных генов хпДНК карельской березы с депонентами (не относящимися к пластомным данным) базы данных GeneBank NCBI выявил наибольшую степень сходства *B. pendula* var. *carelica* с представителями отдела Цианобактерий, для которых также является характерным повышенное содержание GC-оснований по сравнению с другими видами прокариотических организмов.

В ходе проведенной аннотации хлоропластного генома было выявлено 130 кодирующих локусов, представляющих различные функциональные системы (таблица).

Следует отметить, что ряд локусов хлоропластного генома был представлен в двух копиях. Как правило, это было связано с локализацией данных генов (*trnN-GUU*, *trnR-ACG*, *trnL-CAA*, *trnI-CAU*, *trnA-UGC*, *trnI-GAU*, 4.5S ribosomal RNA, 5S ribosomal RNA, 16 S ribosomal RNA, 23S ribosomal RNA, *ycf1*, *ycf2*, *rpl23*, *rps7*, *rpl2*) в дублированном регионе молекулы хпДНК – инвертированных повторам, разделяющих с обеих сторон две монокопийные области – малую и большую единичные копии.

Детальный анализ перечня и последовательности расположения локусов показал, что структура хлоропластного генома карельской березы в незначительной степени отличается от пластов представителей семейства Betulaceae (роды *Betula*, *Alnus*, *Carpinus*, *Corylus*), находящихся в базе данных GeneBank NCBI. В ходе сопоставления нуклеотидных последовательностей как отдельных локусов, так и в целом молекулы хпДНК установлено, что наименьшие генетические различия были выявлены между карельской березой и березой повислой ($D_{\text{усред}} = 0,0004$), что соответствует их текущему таксономическому положению – *B. pendula* var. *carelica* и *B. pendula* соответственно.

Следует отметить, что выявленные молекулярно-генетические отличия были локализованы только в некодирующих участках геномов. В то же время диагностированные различия между пластами карельской березы и других видов рода *Betula* были связаны как с некодирующими участками генома, так и с кодирующими (в частности, гены *ndhF*, *ycf1*, *matK*, *atpI*). При этом размеры различающихся участков в некодируемых областях пластома могли достигать до 40 нуклеотидных оснований.

Также в ходе проведенных исследований на основании полученных данных секвенирования и аннотации хлоропластного генома разработан набор праймеров [5] для оценки уровня экспрессии генов, локализованных в хпДНК карельской березы, с целью оценки их роли в формировании узорчатой текстуры древесины.

Функциональная принадлежность аннотированных локусов хлоропластного генома карельской березы

Functional belonging of the curly birch chloroplast genome

Кодируемый продукт Coded product	Локус Locus	Функциональная принадлежность Functional belonging
Субъединицы РНК полимеразы	rpoA, rpoC2, rpoC1, rpoB	Транскрипция генов
Рибосомальные РНК	4,5S rDNA, 5S rDNA, 16 S rDNA, 23S rDNA	Биосинтез белка
Транспортные РНК	trnA, trnH, trnK, trnQ, trnS, trnG, trnR, trnC, trnD, trnY, trnE, trnT, trnM, trnS, trnL, trnF, trnV, trnW, trnP, trnI, trnR, trnN	Биосинтез белка
Структурные белки большой субъединицы рибосомы	rpl2, rpl33, rpl20, rpl36, rpl14, rpl16, rpl22, rpl23, rpl32	Биосинтез белка
Структурные белки малой субъединицы рибосомы	rps2, rps16, rps14, rps4, rps18, rps12, rps11, rps8, rps3, rps19, rps 7, rps15	Биосинтез белка
Структурные белки фотосистемы 1	psaB, psaA, psaI, psaJ, psaC	Световая стадия фотосинтеза
Структурные белки фотосистемы 2	psbA, psbK, psbI, psbM, psbD, psbC, psbZ, psbJ, psbL, psbF, psbE, pabB, psbT, psbN, psbH	Световая стадия фотосинтеза
Цитохромы	petN, petA, petL, petG, petB, petD	Световая стадия фотосинтеза
Субъединицы АТФ синтазы	atpA, atpF, atpH, atpI, atpE, atpB	Биосинтез АТФ
Большая субъединица рибулозо-1,5-дифосфат карбоксилазы	rbcL	Темновая стадия фотосинтеза
Геминкорпорирующий белок	ccsA	Биогенез цитохрома С
Фактор инициации трансляции	infA	Биосинтез белка
Субъединицы НАДФ дегидрогеназы	ndhJ, ndhK, ndhC, ndhB, ndhF, ndhD, ndhE, ndhG, ndhI, ndhA, ndhH	Световая стадия фотосинтеза
Матураза	matK	Сплайсинг мРНК
Структурный белок мембраны хлоропласта	cemA	Мембранный транспорт
Протеиназа	clpP	Катоболизм белка
Ацетил-СоА карбоксилаза	accD	Биосинтез жирных кислот
Открытые рамки считывания	ycf1, ycf2, ycf3, ycf4	Не установлена

Заключение. Структурно-функциональная организация хпДНК карельской березы имела высокую степень сходства с березой повислой, а также с изученными видами родов *Betula*, *Alnus*, *Carpinus*, *Corylus*. Диагностированные межвидовые отличия нуклеотидной последовательности в кодирующих участках пластома были связаны, как правило, с нуклеотидными заменами, в некодирующих – с заменами, инсерциями и делециями. Данные молекулярно-таксономического анализа карельской березы соответствуют ее существующему систематическому положению – *Betula pendula* var. *carelica*.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект № Б17-63).

Acknowledgements. The work was sponsored by the Belarusian Republication Foundation for Fundamental Research (Project No. Б17-63).

Список использованных источников

1. Ветчинникова, Л. В. Происхождение карельской березы: эколого-генетическая гипотеза / Л. В. Ветчинникова, А. Ф. Титов // Экологическая генетика. – 2016. – Т. 14, № 2. – С. 3–18. <https://doi.org/10.17816/ecogen1423-18>
2. Bajaj, Y. S. Plant Protoplasts and Genetic Engineering II / Y. S. Bajaj. – Berlin, 1989. – 499 p. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-74454-9>
3. Methods for obtaining and analyzing whole chloroplast genome sequences / R. K. Jansen [et al.] // Methods in enzymology. – 2005. – Vol. 395. – P. 348–384. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(05\)95020-9](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(05)95020-9)
4. National center for biotechnology information [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. – Date of access: 17.07.2018.
5. Перечень праймеров для амплификации методом ПЦР локусов хпДНК [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://mega.nz/#!WoUXSA7L!BQ3BtGtZAI7jnQsEX0Vh7VaXN Hju4LJPJD9oWRMU2-4>. – Дата доступа: 13.08.2018.

References

1. Vetchinnikova L. V., Titov A. F. Genesis of the Karelian Birch. An Ecogenetic hypothesis. *Ecological genetics*, 2016, vol. 14, no. 2, pp. 3–18 (in Russian). <https://doi.org/10.17816/ecogen1423-18>

2. Bajaj Y. S. *Plant Protoplasts and Genetic Engineering II*. Berlin, 1989. 499 p. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-74454-9>

3. Jansen R. K., Raubeson L. A., Boore J. L., de Pamphilis C. W., Chumley T. W., Haberle R. C., Wyman S. K., Alverson A. J., Sallie R. P., Herman J., Matthew H., Jennifer F., Kuehl V., McNeal J. R., Leebens-Mack J., Cui L. Methods for obtaining and analyzing whole chloroplast genome sequences. *Methods in enzymology*, 2005, vol. 395, pp. 348–384. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(05\)95020-9](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(05)95020-9)

4. National center for biotechnology information. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> (accessed 17 July 2018).

5. *The list of PCR primers for amplification of the loci of cpDNA*. Available at: <https://mega.nz/#!WoUXSA7L!BQ3BtG-tZAI7jnQsEX0Vh7VaXN HjU4LJPJD9oWRMU2-4> (accessed 13 August 2018).

Информация об авторах

Баранов Олег Юрьевич – д-р биол. наук, доцент, заведующий сектором. Институт леса НАН Беларуси (ул. Пролетарская, 71, 246050, Гомель, Республика Беларусь). E-mail: betula-belarus@mail.ru.

Кирьянов Павел Сергеевич – мл. науч. сотрудник. Институт леса НАН Беларуси (ул. Пролетарская, 71, 246050, Гомель, Республика Беларусь). E-mail: PKirjanov@yandex.ru.

Пантелеев Станислав Викторович – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт леса НАН Беларуси (ул. Пролетарская, 71, 246050, Гомель, Республика Беларусь). E-mail: stasikdesu@mail.ru.

Можаровская Людмила Валентиновна – мл. науч. сотрудник. Институт леса НАН Беларуси (ул. Пролетарская, 71, 246050, Гомель, Республика Беларусь). E-mail: milamozh@yandex.ru.

Падутов Александр Владимирович – мл. науч. сотрудник. Институт леса НАН Беларуси (ул. Пролетарская, 71, 246050, Гомель, Республика Беларусь). E-mail: apadutov@yandex.by.

Разумова Ольга Александровна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт леса НАН Беларуси (ул. Пролетарская, 71, 246050, Гомель, Республика Беларусь). E-mail: o-kovalevich@mail.ru.

Падутов Владимир Евгеньевич – член-корреспондент, д-р биол. наук, заведующий лабораторией. Институт леса НАН Беларуси (ул. Пролетарская, 71, 246050, Гомель, Республика Беларусь). E-mail: forestgen@mail.ru.

Information about the authors

Baranov Oleg Yur'evich – D. Sc. (Biology), Assistant professor, Head of the Department. Forest Research Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (71, Proletarskaya Str., 246050, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: betula-belarus@mail.ru.

Kiryanov Pavel Sergeevich – Junior researcher. Forest Research Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (71, Proletarskaya Str., 246050, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: PKirjanov@yandex.ru.

Pantelev Stanislav Victorovich – Ph. D. (Biology), Senior researcher. Forest Research Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (71, Proletarskaya Str., 246050, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: stasikdesu@mail.ru.

Mozharovskaya Ludmila Valentinovna – Junior researcher. Forest Research Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (71, Proletarskaya Str., 246050, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: milamozh@yandex.ru.

Padutov Alexandr Vladimirovich – Junior researcher. Forest Research Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (71, Proletarskaya Str., 246050, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: apadutov@yandex.by.

Razumova Olga Alexandrovna – Ph. D. (Biology), Senior researcher. Forest Research Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (71, Proletarskaya Str., 246050, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: o-kovalevich@mail.ru.

Padutov Vladimir Evgen'evich – Corresponding Member, D. Sc. (Biology), Head of the Laboratory. Forest Research Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (71, Proletarskaya Str., 246050, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: forestgen@mail.ru.