

УДК 575.85

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ И МИКРОСАТЕЛЛИТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЛОИДНОСТИ НЕКОТОРЫХ ОБРАЗЦОВ *Betula L.*

С. О. Медведева¹, О. Е. Черепанова¹, Е. Г. Филиппов¹, А. Ю. Тептина²

¹ Ботанический сад УрО РАН
620144, Екатеринбург, ул. 8 марта, 202а

² Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина
620062, Екатеринбург, ул. Мира, 19

E-mail: so.medvedeva@gmail.com, Botgarden.olga@gmail.com, Filorch@mail.ru, atepina@gmail.com

Поступила в редакцию 11.07.2024 г.

Береза карликовая (*Betula nana L.*) – циркумполярный низкий кустарник, распространенный в Северном полушарии. Ранее были высказаны предположения о ее гибридизации с симпатическим видом – березой пушистой (*Betula pubescens Ehrh.*) – с образованием триплоидных гибридов в северных районах Западной Евразии. Данные о наличии и интенсивности гибридизации этих видов на территории России немногочисленны и требуют дополнительного изучения и верификации. Цель данного исследования – изучение уровня ploидности некоторых образцов березы, произрастающих в горной тундре в Алтайском горном массиве, для выявления триплоидных гибридных форм. В работе использован метод проточной цитометрии в сочетании с анализом ядерных микросателлитных локусов. Среднее содержание ДНК (2С) у исследованных образцов березы карликовой и б. повислой (*B. pendula Roth*) составило 0.966 и 0.974 пг соответственно, подтверждая их диплоидный геном, при этом значение этого показателя у предполагаемого гибридного образца отличалось в 1.46 раз и составило 1.413 пг, что свидетельствует о его вероятном триплоидном геноме. Анализ ядерных микросателлитных локусов позволил верифицировать данные, полученные методом проточной цитометрии. Показано, что ядерные локусы L3.1, L7.3, L1.10, L5.4 в наибольшей степени подходят для выявления триплоидных гибридных образцов берез. Выполненная работа подтверждает существование гибридов березы карликовой и б. пушистой в популяциях карликовых берез. Для их поиска эффективно использование метода проточной цитометрии в сочетании с микросателлитным анализом.

Ключевые слова: гибридизация, береза карликовая, размер генома, содержание ДНК, фрагментный анализ.

DOI: 10.15372/SJFS20240606

ВВЕДЕНИЕ

Гибридизация – распространенное явление при видообразовании у растений, предположительно около 11 % древесных видов произошло в результате этих процессов (Ellstrand et al., 1996; Schley et al., 2022). Межвидовая гибридизация между близкородственными видами в естественных условиях у некоторых таксономических групп происходит достаточно часто. Например, у представителей рода береза (*Betula L.*), включающего, по разным данным, от 30 до 120 таксонов видового и подвидового ранга, встречаются полиплоиды предположительно

гибридной природы (Furlow, 1990; Ashburner, McAllister, 2013; Koropachinskiy, 2015; Медведева, Черепанова, 2023). При этом накоплено относительно мало экспериментальных данных, подтверждающих формирование новых таксонов в результате гибридизации, а также указывающих на приобретение новых адаптаций в этом процессе, усиливающих приспособленность к изменяющимся условиям среды (Peñalba et al., 2024). Среди всего многообразия видов, входящих в род береза, особый интерес представляют тетраплоид береза пушистая (*Betula pubescens Ehrh.*), диплоид б. повислая (*B. pendula Roth*), диплоид б. карликовая (*B. nana L.*), наиболее

широко распространенные на территории Евразии (Агапова и др., 1990).

Береза карликовая, относящаяся к секции *Aptercaryon* (Медведева, Черепанова, 2023), – низкий ветвистый кустарник Северного полушария, высотой до 1 м. Произрастает в арктической и горной тундре, а также на моховых сфагновых или гипновых болотах лесной полосы. Ареал вида охватывает всю территорию Сибири, Урал, Северную Европу. Листовая пластина (ЛП) обладает набором признаков, позволяющих безошибочно идентифицировать данный вид в полевых условиях: размеры не более 2.5 см, тупозубчатый край, округлое или ширококлиновидное основание (Ashburner, McAllister, 2013).

Гибридизация березы карликовой с другими видами берез из секции *Betula* малоизучена, однако представляет интерес как для селекции, так и для понимания эволюционных процессов. Описание межвидовых гибридов березы карликовой с б. пушистой и б. повислой встречается как в отечественной, так и в зарубежной литературе (Цвелев, 2000; Thorsson et al., 2007; Anamthawat-Jónsson et al., 2010)

Впервые гибрид между березами карликовой и повислой описан в 1895 г. как *B. × bottnica* Mela (*B. × fennica* Dörf.) (Князев и др., 2018). Гибрид между березами пушистой и карликовой описан в 1830 г. как *B. intermedia* Thomas ex Gaud. (Чхобадзе и др., 2014; Князев и др., 2018). Для этих гибридных таксонов приводится следующее описание: побеги опушенные или слабо опушенные, покрыты малочисленными железистыми бородавками. Листья мелкие, с неоттянутой верхушкой, на обратной стороне листа бородавки и опушение в углах жилок отсутствуют. Данные гибриды распространены в горных тундрах или подгольцовых криволесьях, в местах совместного произрастания родительских видов (Князев и др., 2018; Медведева и др., 2023). Ранее уже выдвигалось предположение о том, что гибридизации способствуют низкие температуры Севера, где чаще отмечаются гибриды, например в лесах Исландии (Thorsson et al., 2007), а на основании результатов анализа пыльцы по профилям торфа – о гибридизации берез карликовой и пушистой в Исландии в период голоцена (Karlsdóttir et al., 2012). Большинство исследовательских работ, описывавших процессы гибридизации между карликовыми и белыми березами, охватывают территорию европейской части ареалов данных видов. При этом на территории РФ гибридов, подтвержденных комплексным

методологическим подходом, ранее не обнаружено. Предпринимались попытки исследования наличия и интенсивности гибридизации березы карликовой, б. пушистой, б. повислой с помощью и молекулярно-генетических маркеров, таких как регионы хлоропластной ДНК (хпДНК) (Palme et al., 2004; Jadwiszczak et al., 2012), ядерные микросателлитные последовательности (Маслов и др., 2019), а также методом проточной цитометрии (Anamthawat-Jónsson et al., 2010). В результате изучения молекулярно-генетической структуры популяций березы карликовой, б. пушистой, б. повислой были выявлены межвидовые гаплотипы, отмеченные для всех трех видов, что указывает на гибридизацию между данными таксонами (Palme et al., 2004; Jadwiszczak et al., 2012). При этом маркеры хпДНК и ядерные микросателлитные последовательности позволяют лишь предположить наличие гибридизации, в отличие от метода проточной цитометрии, точно определяющего гибридную природу отдельно взятого образца, если геномы его родительских форм отличаются по плоидности (Anamthawat-Jónsson et al., 2010).

Цель исследования заключалась в изучении уровня плоидности некоторых образцов берез, произрастающих в горной тундре в Алтайском горном массиве, с помощью метода проточной цитометрии и микросателлитного анализа для выявления возможных триплоидных гибридных форм.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В работе исследованы образцы березы карликовой, б. повислой и образец березы предположительно гибридной природы, произрастающие на Семинском перевале, а также образцы б. карликовой, собранные в районе с. Онгудай и г. Сарлык в горной тундре Республики Алтай (табл. 1).

Указанные точки сбора материала имели сходный состав наиболее часто встречающихся видов. В первом ярусе доминировала сосна сибирская (*Pinus sibirica* Du Tour). Кустарнички представлены березой карликовой и ивой прямосережчатой (*Salex rectijulis* Ledeb. ex Trautv.). В травянистом ярусе были отмечены горечавка крупноцветковая (*Gentiana grandiflora* Laxm.), г. Фишера (*G. Fischeri* P. A. Smirn.), фиалка алтайская (*Viola altaica* Ker Gawl.), калужница болотная (*Caltha palustris* L.), дриада острозубчатая (*Dryas oxyodonta* Juz.), водо-

Таблица 1. Относительное содержание ДНК и размер генома образцов березы карликовой, б. повислой, б. пушистой

| Образцы | Точка сбора | Географические координаты | 2С содержание ДНК $\pm SE$, пг | Предполагаемая плоидность |
|--------------------------------|--------------------|------------------------------------|---------------------------------|---------------------------|
| Береза карликовая | Семинский перевал | 51°02'43" с. ш. | 0.96 \pm 0.009 | 2x |
| Б. повислая | | 85°36'15" в. д. | 0.97 \pm 0.012 | 2x |
| Береза – предполагаемый гибрид | | | 1.41 \pm 0.009 | 3x |
| Б. карликовая | с. Онгудай | 50°44'53" с. ш. 86°08'18" в. д. | 0.97 \pm 0.007 | 2x |
| | г. Сарлык | 51°04'43" с. ш. 85°44'05" в. д. | 0.96 \pm 0.006 | 2x |
| Б. пушистая | г. Большой Иремель | 54°32'00" с. ш. 58°50'20" в. д. | 1.82 \pm 0.025 | 4x |

Примечание. *SE* – стандартная ошибка среднего арифметического значения.

сбор железистый (*Aquilegia glandulosa* Fisch. ex Link), змеголовник крупноцветковый (*Dracocephalum grandiflorum* L.), бадан толстолистный (*Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch), кизильник горизонтальный (*Cotoneaster horizontalis* Decne.), брусника обыкновенная (*Vaccinium vitis-idaea* L.), купальница азиатская (*Trollius asiaticus* L.), лаготис сизый (*Lagotis glauca* Gaertn.), калиантемум алатавский (*Callianthemum alatavicum* Freyn), змеевик большой (*Bistorta officinalis* Delarbre), мытник алтайский (*Pedicularis altaica* Steph. ex Steven), манжетка обыкновенная (*Alchemilla vulgaris* L.), ветреник косматый (*Anemonastrum crinitum* (Juz.) Holub), кошачья лапка двудомная (*Antennaria dioica* (L.) Gaertn.), осока черноголовая (*Carex melanocephala* Turcz.).

В каждой географической точке собрано по 5–7 побегов березы карликовой и б. повислой на расстоянии 20 м между отдельными растения-

ми для получения максимальной изменчивости, а также 1 образец предполагаемой гибридной природы (рис. 1).

В качестве группы сравнения нами использовались образцы тетраплоидной березы пушистой, собранные на г. Большой Иремель, Южный Урал. Данный вид не встретился нам по трансекте сбора образцов в Алтайском горном массиве, однако был необходим в исследовании для оценки плоидности методом проточной цитометрии (Galbraith et al., 1997). Независимо от места произрастания береза пушистая имеет тетраплоидный набор и удвоенное содержание ДНК по сравнению с б. карликовой. Гибрид между этими видами имеет промежуточное содержание ДНК (Anamthawat-Jónsson et al., 2010). В качестве внутреннего стандарта использовали паслен ложноперецный (*Solanum pseudocapsicum* L.) с 2С = 2.59 пг (Temsch et al., 2010). Для приготовления суспензии ядер свежие листья образ-

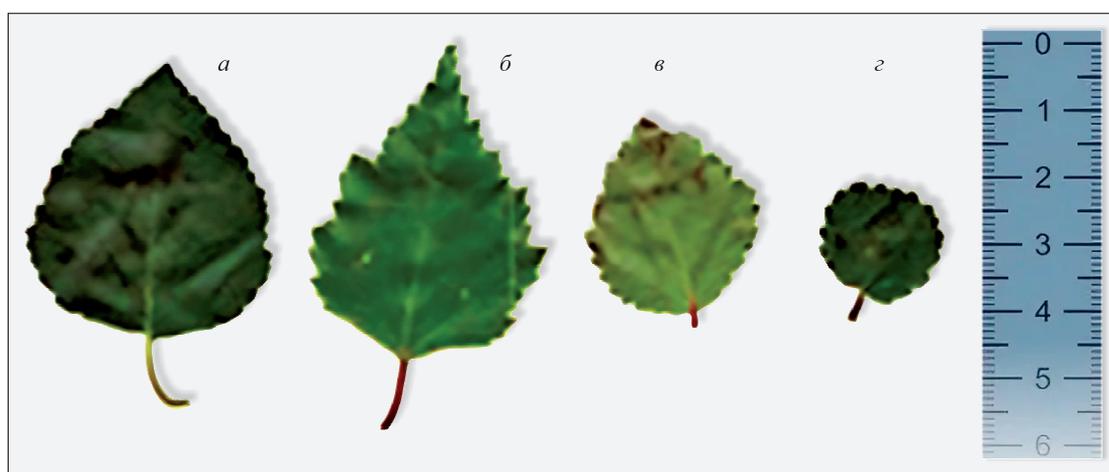


Рис. 1. Листовые пластины образцов березы пушистой, г. Большой Иремель, Южный Урал (а), б. повислой, Семинский перевал, Алтай (б), березы – предполагаемого гибрида, Семинский перевал, Алтай (в), б. карликовой, Семинский перевал, Алтай (г).

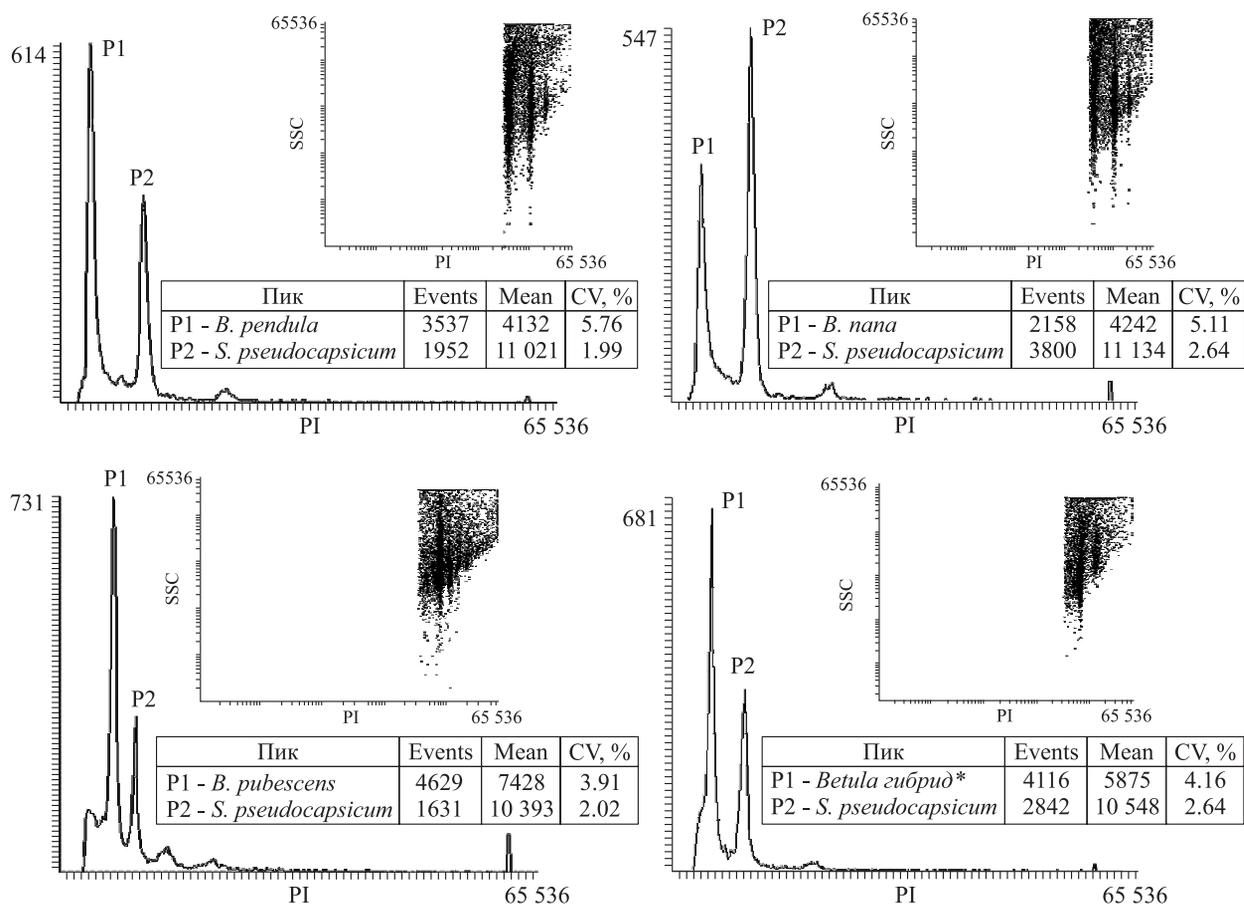


Рис. 2. Образцы гистограмм, полученных при исследовании относительного содержания ДНК изученных берез. Events – число событий, Mean – среднее пика, CV – коэффициент вариации, %. * Береза гибрид – исходя из 2С содержания ДНК триплоидный образец предположительно является гибридом березы карликовой и б. пушистой.

цов измельчались с листьями стандарта в 1 мл Tris-MgCl₂ буфера (0.4 М Tris-основание, 4 мМ MgCl₂ · 6H₂O, 0.5 % Triton X-100) с добавлением PI (50 мкг/мл), РНКазы (50 мкг/мл) и β-меркаптоэтанола (1 мкл/мл) (Pfosser et al., 1995). Измельченные образцы затем фильтровали через нейлоновый фильтр с размером пор 50 мкм и инкубировали 30 мин при 37 °С. Замеры флуоресценции образцов производили не менее 3 раз с периодичностью одно измерение в сутки, для последующих расчетов брали среднее значение трех измерений. Детекцию пиков флуоресценции проводили при помощи проточного цитометра Partec CyFlow PA (Partec, GmbH) с лазерным источником излучения с длиной волны 532 нм. Для дальнейшей интерпретации данных использовали пики с не менее чем 1000 детектируемых частиц (рис. 2).

Содержание ДНК исследуемых образцов рассчитывали исходя из формулы: содержание ДНК (2С, пг) образца = $f \times$ содержание ДНК (2С, пг) стандарта, где f = среднее значение G1 пика образца / среднее значение G1 пика стандарта.

Визуализацию и обработку гистограмм проводили с использованием штатного программного обеспечения проточного цитометра CyView (Partec, GmbH). Расчет содержания ДНК и статистическую обработку проводили методами параметрической статистики в Microsoft Excel 2003. Итоговые данные представляют собой среднюю арифметическую величину и ее стандартную ошибку.

ДНК из образцов выделяли с помощью СТАВ-метода (Doyle J. J., Doyle J. L., 1990). Для проведения микросателлитного анализа использованы семь полиморфных SSR-локусов берез – L 2.3, L 3.4, L 5.4, L 1.10, L 7.3, L 10.1, L 3.1 (Kulju et al., 2004; Truong et al., 2005). Температурный профиль ПЦР состоял из первоначальной денатурации при 94 °С в течение 5 мин, 30 циклов амплификации (денатурация 94 °С – 1 мин, отжиг 57 °С – 75 с, элонгация 1 мин 15 с при 72 °С) и завершающей элонгации 10 мин при температуре 72 °С. Длину амплифицированных фрагментов определяли на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500. Визуализацию

и обработку данных проводили с использованием программы ДНК ФА, стандарт длин S550 (ООО «Синтол», Москва, Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Среднее содержание ДНК (2С) у исследованных образцов березы карликовой и б. повислой составило 0.966 и 0.974 пг соответственно (табл. 1). Данные значения свидетельствуют о диплоидном геноме образцов (Anamthawat-Jónsson et al., 2010). Среднее содержание ДНК у образцов березы пушистой составило 1.823 пг, подтверждая их тетраплоидный геном. При этом предполагаемый гибридный образец показал промежуточное между березой карликовой и б. пушистой среднее значение содержания ДНК – 1.413 пг (в 1.46 раз больше, чем у диплоидных образцов березы карликовой), свидетельствующее о его вероятном триплоидном геноме (табл. 1). Согласно практике проточной цитометрии, содержание ДНК триплоидных образцов отличается от диплоидных образцов в 1.3–1.5 раза (Doležel et al., 2007). Полученные нами данные подтверждаются исследованиями, проведенными ранее на территории Европы (Thorsson et al., 2007; Anamthawat-Jónsson et al., 2010; Wang et al., 2016). По опубликованным работам содержание ДНК всех диплоидных видов рода береза находится в узком диапазоне – от 0.88 до 1.08 пг. Тетраплоидные виды берез показывают значение содержания ДНК, кратное 2, относительно диплоидов – от 1.8 до 2.2 пг соответственно. По разным данным, содержание ДНК березы карликовой составляет от 0.91 до 1.0 пг, у б. пушистой – от 1.79 до 2.01 пг. Были выявлены триплоидные гибриды между березой карликовой и б. пушистой со средним промежуточным содержанием ДНК 1.36 пг

(Anamthawat-Jónsson et al., 2010; Wang et al., 2016). При этом в России у берез определено только число хромосом (Агапова и др., 1990). Метод подсчета хромосом у берез – достаточно трудоемкий в связи с их малыми размерами, поэтому проточная цитометрия представляется авторам наиболее удобной и перспективной для поиска гибридов.

Данные проточной цитометрии были дополнены микросателлитным анализом. Изучение микросателлитных спектров образцов показало, что наибольшим аллельным разнообразием характеризуются локусы L3.1, L7.3, L1.10, L5.4 (табл. 2).

Данные локусы выявили наличие трех аллелей у гибридного образца, при этом пики данных аллелей имели одинаковую интенсивность флуоресценции, что подтверждает триплоидность его генома, выявленную с помощью метода проточной цитометрии (рис. 3).

Таким образом, ядерные локусы L3.1, L7.3, L1.10, L5.4 в наибольшей степени подходят для выявления триплоидных гибридов берез. Отдельные образцы березы карликовой и б. повислой имели до двух пиков одинаковой интенсивности флуоресценции по всем локусам (в соответствии с их диплоидным геномом).

Микросателлитный спектр отдельных образцов березы пушистой соответствовал тетраплоидному геному: выявлено до четырех пиков, в случае трех пиков их интенсивность флуоресценции различалась (один пик имел большую интенсивность флуоресценции, чем два других) (рис. 3).

В литературе описано присутствие триплоидных гибридов березы карликовой и б. пушистой в популяциях б. карликовой. При этом отмечается, что в некоторых популяциях, произрастающих в горных районах, гибридные растения не обнаружены вовсе (Thorsson et al., 2007;

Таблица 2. Разнообразие микросателлитных локусов у исследованных образцов

| Вид | Точка сбора | Общее число выявленных аллелей* | | | | | | |
|---------------------------|-------------------|---------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | | L 2.3 | L 3.4 | L 5.4 | L 1.10 | L 7.3 | L 10.1 | L 3.1 |
| Береза карликовая | Семинский перевал | 2 | 2 | 3 | 4 | 2 | 2 | 1 |
| Б. повислая | Там же | 2 | 3 | 2 | 3 | 3 | 1 | 4 |
| Береза гибрид | » | 1 | 2 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 |
| Б. пушистая | г. Большой Ирмель | 2 | 2 | 3 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Длина ПЦР продукта, п. н. | | 197–203 | 251–269 | 240–270 | 167–193 | 187–219 | 232–263 | 210–230 |

* Отдельные образцы березы карликовой и б. повислой имели не более двух аллелей по всем локусам, б. пушистой – не более четырех.

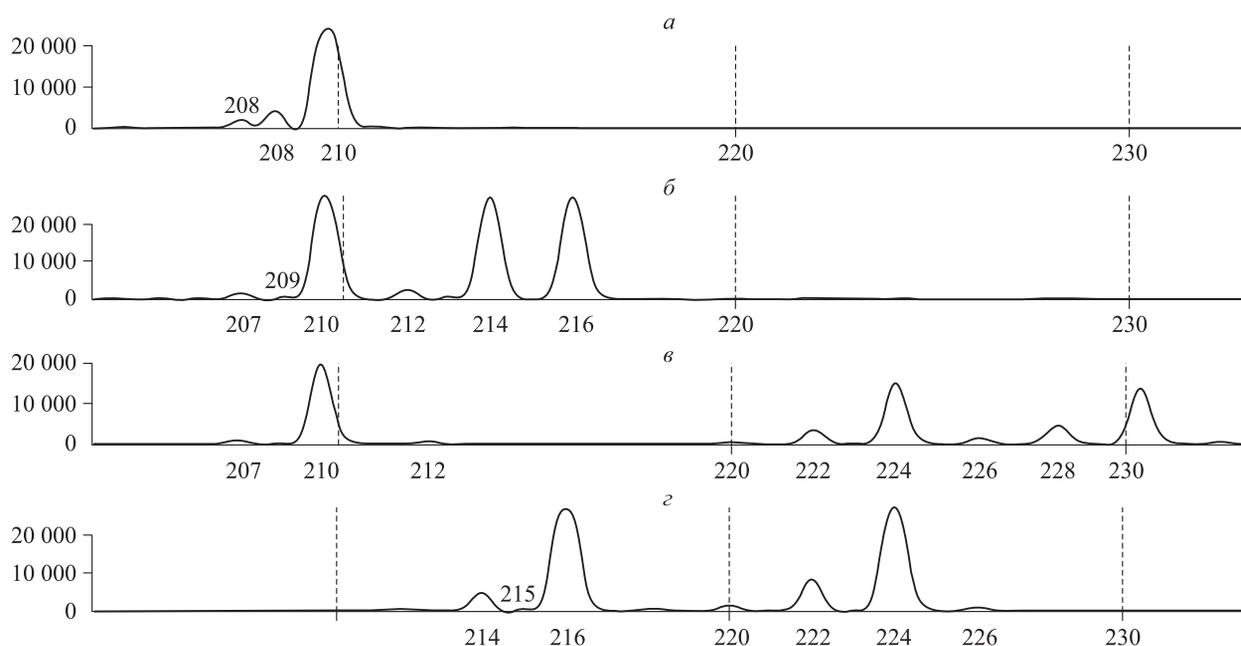


Рис. 3. Пики флуоресценции SSR-локуса L 3.1.

а – береза карликовая, Семинский перевал; *б* – гибридный образец березы; *в* – б. пушистая, г. Большой Ирмель; *г* – б. повислая, Семинский перевал, указанные значения соответствуют длине фрагмента (в п. н.).

Anamthawat-Jónsson et al., 2010). Собранные в Алтайском горном массиве образцы березы карликовой и б. повислой оказались диплоидными, исходя из полученных данных о содержании ДНК (диапазон варьирования 2С содержания ДНК составил 0.998–0.959 пг). При этом лишь один образец показал содержание ДНК, промежуточное между диплоидным и тетраплоидным геномом (1.413 пг). Триплоидная природа образца, подтвержденная также анализом ядерных микросателлитных локусов, может быть следствием гибридизации с березой пушистой, которая не встретилась нам в ходе сбора материала по заложенной трансекте. По литературным данным, этот вид произрастает вблизи Семинского перевала, и, следовательно, может быть одной из родительских форм для обнаруженного гибрида (Ревушкин, 1988). Малочисленность гибридов позволяет предположить, что гибридизация между березой карликовой и б. пушистой – явление редкое и, вероятно, чаще встречается в более северных районах Западной Евразии. Эта гипотеза согласуется с ранее выдвинутыми предположениями о том, что гибридизация берез более распространена на севере по сравнению с югом в связи с коротким периодом вегетации, нивелирующим межвидовые фенологические различия, что увеличивает возможность скрещиваний симпатрических видов (Hampe et al., 2005; Wang et al., 2016; Cherepanova et al., 2024).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами данные свидетельствуют о существовании триплоидных гибридов березы карликовой и б. пушистой в популяциях карликовых берез, произрастающих в лесном массиве горной тундры на Алтае. Проведенный анализ показывает, что метод проточной цитометрии в сочетании с микросателлитным анализом является эффективным инструментом для поиска и верификации триплоидных гибридов берез.

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (РНФ) (грант № 23-24-00598).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Агапова Н. Д., Архарова К. Б., Вахтина Л. И., Земскова Е. А., Тарвис Л. В. Числа хромосом цветковых растений флоры СССР: семейства Aceraceae – Menyanthaceae. Л.: Наука. Ленингр. отд-ние, 1990. 233 с.
- Князев М. С., Третьякова А. С., Подгаевская Е. Н., Золотарева Н. В., Куликов П. В. Конспект флоры Свердловской области. Ч. III: Двудольные растения (Aristolochiaceae – Monotropaceae) // Фиторазнообразие Восточной Европы. 2018. Т. 12. № 2. С. 4–95.
- Маслов А. А., Баранов О. Ю., Сирин А. А. Идентификация видов берез в заболоченных лесах центра Русской равнины по результатам молекулярно-генетического анализа // Лесоведение. 2019. № 3. С. 177–187.
- Медведева С. О., Черепанова О. Е. Таксономические вопросы рода *Betula* // Сиб. лесн. журн. 2023. № 2. С. 65–75.

- Медведева С. О., Черепанова О. Е., Филиппов Е. Г., Копориков А. Р. Использование ITS-маркеров для определения видовой принадлежности берез секции *Arterocaryon* // Пробл. ботаники Юж. Сибири и Монголии. 2023. Т. 22. № 2. С. 187–190.
- Ревушкин А. С. Высокогорная Флора Алтая. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1988. 320 с.
- Цвелев Н. Н. Определитель сосудистых растений Северо-Западной России (Ленинградская, Псковская и Новгородская области). СПб.: СПХФА, 2000. 782 с.
- Чхобадзе А. Б., Филиппов Д. А., Левашов А. Н. Сосудистые растения Вологодской части Андомской возвышенности // Фиторазнообразие Вост. Европы. 2014. Т. 8. № 1. С. 20–42.
- Anamthawat-Jónsson K., Thórsson T., Temsch E. M., Greilhuber J. Icelandic birch polyploids – the case of a perfect fit in genome size // J. Bot. 2010. V. 2. Article 347254. 9 p.
- Ashburner K., McAllister H. A. The genus *Betula*: A taxonomic revision of birches. L.: Royal Bot. Gardens, Kew, 2013. 432 p.
- Cherepanova O., Medvedeva S., Filippov E., Skaptsov M., Ivchenko T., Teptina A. Biodiversity evolution of a shrub *Betula nana* L. populations in the Urals // Int. J. For. Res. 2024. V. 2024. Iss. 1. Article 2644583. 14 p.
- Doležel J., Greilhuber J., Suda J. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry // Nat. Protoc. 2007. V. 2. Iss. 9. P. 2233–2244.
- Doyle J. J., Doyle J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // Focus. 1990. V. 12. N. 1. P. 13–15.
- Ellstrand N. C., Whitkus R., Rieseberg L. H. Distribution of spontaneous plant hybrids // PNAS. 1996. V. 93. Iss. 10. P. 5090–5093.
- Furlow J. The genera of Betulaceae in the southeastern United States // J. Arnold Arboret. 1990. V. 71. N. 1. P. 1–67.
- Galbraith D. W., Lambert G. M., Macas J., Doležel J. Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants // Curr. Protocols in Cytometry. 1997. V. 2. Iss. 1. Chapter 7 (1). Unit 7.6. Article cy0706s02.
- Hampe A., Petit R. J. Conserving biodiversity under climate change: the rear edge matters // Ecol. Lett. 2005. V. 8. Iss. 5. P. 461–467.
- Jadwiszczak K., Banaszek A., Jabłonska E., Sozinov O. V. Chloroplast DNA variation of *Betula humilis* Schrank in Poland and Belarus // Tree Genet. Genom. 2012. V. 8. Iss. 5. P. 1017–1030.
- Karlsdóttir L., Hallsdóttir M., Thorsson A., Anamthawat-Jonsson K. Early Holocene hybridisation between *Betula pubescens* and *B. nana* in relation to birch vegetation in Southwest Iceland // Rev. Palaeobot. Palynol. 2012. V. 181 (G 3). P. 1–10.
- Koropachinskiy I. Yu. North Asian woody plants. In 2 vol. Novosibirsk: GEO Acad. Publ., 2015. V. 1: Taxaceae – Rosaceae, 527 p.; V. 2: Fabaceae – Asteraceae, 391 p.
- Kulju K. K. M., Pekkinen M., Varvio S. Twenty-three microsatellite primer pairs for *Betula pendula* (Betulaceae) // Molecul. Ecol. Notes. 2004. V. 4. Iss. 3. P. 471–473.
- 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* // Molecul. Ecol. 2004. V. 13. Iss. 1. P. 167–178.
- Peñalba J., Runemark A., Meier J., Singh P., Wogan G., Sánchez-Guillén R., Mallet J., Rometsch S., Menon M., Seehausen O., Kulmuni J., Pereira R. The role of hybridization in species formation and persistence // Cold Spring Harbor Perspectives in Biol. 2024. V. 16. Iss. 3. Article a041445. 24 p.
- Pfossen M., Amon A., Lelle T., Heberle-Bors E. Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and ditelosomic wheat-rye addition lines // Cytometry. 1995. V. 21. Iss. 4. P. 387–393.
- Schley R. J., Twyford A. D., Pennington R. T. Hybridization: a ‘double-edged sword’ for Neotropical plant diversity // Bot. J. Linnean Soc. 2022. V. 199. Iss. 1. P. 331–356.
- Temsch E. M., Greilhuber J., Krisai R. Genome size in liverworts // Preslia. 2010. V. 82. P. 63–80.
- Thorsson A. E. Th., Palsson S., Sigurgeirsson A., Anamthawat-Jonsson K. Morphological variation among *Betula nana* (diploid), *B. pubescens* (tetraploid) and their triploid hybrids in Iceland // Ann. Bot. 2007. V. 99. Iss. 6. P. 1183–1193.
- Truong C., Palmé A. E., Felber F., Naciri-Graven Y. Isolation and characterization of microsatellite markers in the tetraploid birch, *Betula pubescens* ssp. *tortuosa* // Molecul. Ecol. Notes. 2005. V. 5. Iss. 1. P. 96–98.
- 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. 2016. V. 117. Iss. 6. P. 1023–1035.

ANALYSIS OF DNA CONTENT AND NUCLEAR MICROSATELLITE LOCI OF SOME *Betula* L. REPRESENTATIVES

S. O. Medvedeva¹, O. E. Cherepanova¹, E. G. Filippov¹, A. Yu. Teptina²

¹ Botanical Garden, Russian Academy of Sciences, Ural Branch
8 March str., 202a, Yekaterinburg, 620144 Russian Federation

² Ural Federal University named after the first President of Russia B. N. Yeltsin
Mira str., 19, Yekaterinburg, 620062 Russian Federation

E-mail: so.medvedeva@gmail.com, Botgarden.olga@gmail.com, Filorch@mail.ru, aseptina@gmail.com

Dwarf birch (*Betula nana* L.) is a circumpolar low shrub common in the northern hemisphere. Previously, it was suggested that dwarf birch hybridize with a sympatric species – the downy birch (*Betula pubescens* Ehrh.), with the formation of triploid hybrids in the northern regions of Western Eurasia. Data on the presence and intensity of these species hybridization on the territory of the Russian Federation are scarce and require additional study and verification. The purpose of this study was to study the ploidy level of some birch representatives growing in the mountain tundra of the Altai Mountain range to identify hybrid forms. The work used the flow cytometry method in combination with the analysis of nuclear microsatellite loci. The average DNA content of the studied dwarf birch and silver birch (*B. pendula* Roth) samples was $2C = 0.966$ pg and $2C = 0.974$ pg correspondingly, while DNA content of the putative hybrid sample was 1.46 times higher $2C = 1.413$ pg, indicating its probable triploid genome. Analysis of nuclear microsatellite loci confirmed the data obtained by flow cytometry. It was shown that nuclear loci L3.1, L7.3, L1.10, L5.4 are most suitable for identifying triploid hybrid birch samples. The work performed confirms the existence of rare triploid hybrids dwarf birch and downy birch in populations of dwarf birch trees growing in the mountain tundra forest in Altai. The analysis shows that the flow cytometry method in combination with microsatellite analysis is an effective tool for searching and verifying triploid birch hybrids.

Keywords: hybridization, dwarf birch, genome size, DNA content, fragment analyses.

How to cite: Medvedeva S. O., Cherepanova O. E., Filippov E. G., Teptina A. Yu. Analysis of DNA content and nuclear microsatellite loci of some *Betula* L. representatives // *Sibirskij Lesnoj Zurnal* (Sib. J. For. Sci.). 2024. N. 6. P. 44–51 (in Russian with English abstract and references).