ТРУДЫ САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКОГО
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО
ИНСТИТУТА ЛЕСНОГО ХОЗЯЙСТВА

www.journal.spb-niilh.ru
ISSN 2079-6080

DOI 10.21178/2079-6080.2022.1.4
УДК 575.174

Гетероплазмия и ядерные копии митохондриальных генов (NUMTs), выявленные в зоне интрогрессивной гибридизации ели европейской и ели сибирской

© В.А. Волков[1,2], Е.А. Григорьева[1,2], М.В. Лебедева[3], Е.К. Потокина[1,2]

Heteroplasmy and nuclear copies of mitochondrial genes (NUMTs) identified in the zone of introgressive hybridization of Norway spruce and Siberian spruce

V.A. Volkov, E.A. Grigoreva, M.V. Lebedeva, E.K. Potokina (Saint Petersburg State Forest Technical University; Saint Petersburg Forestry Research Institute, All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology)

Studies of possible post-glacial migrations and the processes of formation of areas of coniferous species are of particular interest from the point of view of forest genesis. Molecular markers are effectively used to study the phylogeography of forest-forming species. In this study, for spruces growing in the Native Forest Reserve 'Vepssky Forest', heterogeneous amplification products of the second intron of the *nad1* mitochondrial gene were obtained by PCR with gene-specific primers. By the analysis of the PCR products it has been established that they correspond to mtDNA sequences previously considered species-specific for *Picea abies* and *P. obovata* and are simultaneously amplified using DNA of the same tree. The revealed heterogeneity can be explained by two reasons: mtDNA heteroplasmy or amplification of nuclear copies of mitochondrial genes (NUMT). In order to establish and explain the nature of the detected heterogeneity, the methodological approaches previously used for similar studies in birds and mammals, such as cloning and sequencing of PCR products, amplification of large mtDNA fragments (Long range PCR) and phylogenetic analysis, were used. The obtained results testify in favor of heteroplasmy, which can be considered as a historical trace of close contact between *P. abies* and *P. obovata* in the area of the Vepsovskaya Upland in the northwest of the East

European Plain. The presence of the *P. obovata*-specific haplotype of the *nad1* mitochondrial gene in the spruces of the East European Plain is described for the first time. In conifers, the phenomenon of heteroplasmy is described for the zone of introgressive hybridization of closely related species. Nuclear pseudogenes of mitochondrial origin (NUMTs), similar in sequence to the mitochondrial haplotype of the *nad1* gene, have been described for the first time for European spruce.

Key words: Norway spruce, Siberian spruce, mitochondrial DNA, heteroplasmy, nuclear copies of mitochondrial genes, NUMTs

Гетероплазмия и ядерные копии митохондриальных генов (NUMTs), выявленные в зоне интрогрессивной гибридизации ели европейской и ели сибирской

В.А. Волков, Е.А. Григорьева, М.В. Лебедева, Е.К. Потокина

Исследования возможных путей послеледниковых миграций и процессов формирования ареалов видов хвойных пород представляют особый интерес с точки зрения генезиса лесов. Для изучения филогеографии видов-лесообразователей эффективно используются методы молекулярного маркирования. В нестоящем исследовании проанализирована популяция ели европейской из природного резервата «Вепсский лес». Этот природный объект представляет особый интерес для исследований, поскольку данная территория исторически не была затронута хозяйственной деятельностью человека. Для образцов ДНК елей на территории резервата путем ПЦР с праймерами, специфичными для второго интрона митохондриального гена *nad1*, были выявлены гетерогенные продукты амплификации. Установлено, что у отдельных деревьев одновременно амплифицируются последовательности мтДНК, ранее считавшиеся видоспецифичными для *Picea abies* и *P. obovata*. Выявленную гетерогенность можно объяснить двумя причинами: гетероплазмией мтДНК и амплификацией ядерных копий митохондриальных генов (NUMT). Для того чтобы установить и объяснить природу обнаруженной гетерогенности были использованы методические подходы, ранее использованные для подобных исследований у птиц и млекопитающих – клонирование и секвенирование ПЦР-продуктов, амплификация больших фрагментов мтДНК (Long range PCR) и филогенетический анализ. Полученные результаты свидетельствуют в пользу гетероплазмии, которую можно рассматривать как исторический след тесного контакта *P. abies* и *P. obovata* в районе Вепсовской возвышенности на Северо-Западе Восточноевропейской равнины. Присутствие *P. obovata*-специфичного гаплотипа митохондриального гена *nad1* у елей Восточно-Европейской равнины описывается впервые. У хвойных явление гетероплазмии характерно для зоны интрогрессивной гибридизации близкородственных видов. Впервые для ели европейской описаны ядерные псевдогены митохондриального происхождения (NUMT), сходные по своей Аннотацию последовательности с митохондриальным гаплотипом гена *nad1*.

Ключевые слова: ель европейская, ель сибирская, митохондриальная ДНК, гетероплазмия, ядерные копии митохондриальных генов, NUMTs

Волков Владимир Александрович – заведующий лабораторией центра биоинформатики и геномных исследований СПбГЛТУ, научный сотрудник исследовательской лаборатории СПбНИИЛХ

E-mail: v.volkov@spb-niilh.ru

Григорьева Елизавета Александровна – младший научный сотрудник лаборатории центра биоинформатики и геномных исследований СПбГЛТУ, специалист исследовательской лаборатории СПбНИИЛХ

E-mail: l.grigoreva@gmail.com

Лебедева Марина Валерьевна – научный сотрудник лаборатории стрессоустойчивости растений ВНИИСБ

E-mail: marilistik@mail.ru

Потокина Елена Кирилловна – профессор кафедры лесных культур СПбГЛТУ, ведущий научный сотрудник исследовательской лаборатории СПбНИИЛХ, д-р биол. наук

E-mail: e.potokina@yahoo.com

[1]ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный лесотехнический университет имени С.М. Кирова» (СПбГЛТУ)

194021, Санкт-Петербург, Институтский пер., 5

Телефон: +7 (812) 670-92-46

[2]ФБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт лесного хозяйства» (СПбНИИЛХ)

194021, Санкт-Петербург, Институтский пр., 21

Телефон: (812) 552-80-21

Факс: (812) 552-80-42

[3]ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ВНИИСБ)

127550, Москва, Тимирязевская, 42

Телефон: (499) 976-65-44

Факс: (499) 977-09-47

Введение

Митохондриальная ДНК (мтДНК) является одним из самых эффективных инструментов филогенетических исследований видов растений и животных из-за ее наследования по материнской линии и исключительно высокой скорости мутаций. Часто географическое распространение вариантов мтДНК (митотипов) бывает приурочено к определенному региону или континенту [7, 8, 25]. Например, исследования эволюционной истории человека показали, что глобальная изменчивость гаплогрупп мтДНК характеризуется континентальноспецифичным распределением [1].

Для двух основных видов евразийской тайги – ели европейской *Picea abies* (L.) H. Karst. и ели сибирской (*Picea obovata* Ledeb.) – также были выявлены специфические гаплотипы мтДНК, распространение которых демонстрирует четко очерченные географические области. Так называемая «северная семья» ели европейской, распространенная в странах Западной и Восточной Европы, отличается от «южной семьи» того же вида (Центральная Европа) по специфичному набору структурных вариантов (гаплогрупп) митохондриального гена *nad1*, которые встречаются у одной семьи и отсутствуют у другой [28]. Граница между ареалами этих двух гаплогрупп проходит по Среднепольской возвышенности, где наблюдается дизъюнкция ареала ели европейской. С другой стороны, для того же митохондриального гена *nad1* установлено, что ели, происходящие по материнской линии от *P. obovata*, отличаются от потомков *P. abie*s делецией 9 нуклеотидов и двумя нуклеотидными заменами в последовательности второго интрона [4, 5, 29, 30]. При этом географическое распространение европейской и сибирской гаплогрупп *nad1* в природных популяциях ели на территории РФ строго разграничено в регионе между Уральским хребтом и левобережьем Оби [5, 29, 30]. Примечательно, что территория Восточно-Европейской равнины рассматривается как зона интрогрессивной гибридизации двух видов ели по результатам маркирования ядерного и хлоропластного генома, однако до сих пор не сообщалось о находках ели с ‘obovata’-специфичным гаплотипом митохондриального гена *nad1* западнее Уральского хребта.

Недавно по результатам изучения гаплотипов мтДНК у елей, произрастающих в старовозрастных лесах резервата «Вепсский лес» (Ленинградская обл.), были впервые описаны случаи амплификации у одного и того же дерева ПЦР-фрагментов, последовательности которых соответствовали европейской и сибирской гаплогруппам ели по митохондриальному гену *nad1* [2]. У половины проанализированных деревьев из этой популяции с *nad1*-специфичными праймерами амплифицировались два–три фрагмента одновременно, что может свидетельствовать либо о сосуществовании в одном организме митохондрий с разными геномами (явление гетероплазмии), либо о наличии в ядре встроившихся копий митохондриальных генов (Nuclear copies of Mitochondrial genes, NUMT). Последние также получили название ядерно-митохондриальных псевдогенов (nuclear mitochondrial pseudogenes) [11].

Независимо от его природы, данное явление представляет интерес для филогеографии изучаемых видов елей, так как в обоих случаях может рассматриваться как исторический след недавних процессов видообразования на обсуждаемой территории. Митохондриальная гетероплазмия определяется как наличие более одного митохондриального генома в одном организме, в рамках нашего исследования – это деревья, сочетающие митохондриальные гаплотипы ели европейской и сибирской. Одной из причин возникновения гетероплазмии может быть проникновение мтДНК с отцовской стороны (leakage of paternal mtDNA). Обычно мтДНК наследуется по материнской линии, но иногда, как правило, у гибридов, наблюдается присутствие отцовской мтДНК [18]. Например, такая «утечка» отцовской мтДНК обнаружилась у гибридов ячменя и пшеницы [10], у гибридов между рожью и пшеницей, тритикале [20]. Одновре-

менное присутствие отцовской и материнской мтДНК описано и у хвойных деревьев в зоне интрогрессивной гибридизации [17].

NUMT представляют собой нуклеотидные последовательности, гомологичные участкам мтДНК, но интегрированные в ядерный геном. NUMT были впервые описаны в 1967 году и с тех пор обнаружены у всех видов растений, изученных с этой точки зрения [15]. До сих пор остается спорным вопрос о механизме переноса участков ДНК митохондрий в ядерный геном. Одна из версий предполагает, что это происходит в процессе репарации двухцепочечной ядерной ДНК [16]. Часто новые NUMTs возникают не за счет вставок, а за счет дупликаций ранее интегрированных в ядерный геном митохондриальных псевдогенов [16].

Цель нашего исследования состояла в выяснении возможных причин гетерогенности ПЦР-фрагментов мтДНК у елей резервата «Вепсский лес» (Ленинградская обл.). Эта гетерогенность свидетельствует о сосуществовании в одном организме двух разных гаплотипов мтДНК, которые ранее считались видоспецифичными для двух разных видов – ели европейской и сибирской. В задачи исследования входило выяснить природу этой гетерогенности – имеет ли место митохондриальная гетероплазмия или гетерогенность объясняется наличием в ядре встроившихся копий митохондриальных генов (NUMT).

Материалы и методы исследования

Фрагменты веток елей, у которых была выявлена гетерогенность ПЦР-фрагментов мтДНК (митохондриальная гетероплазмия или NUMTs), были собраны с 36 деревьев в окрестностях поселка Курба на территории парка «Вепсский лес» (Ленинградская обл.). В этом природном резервате сохранились уникальные старовозрастные ельники, возраст основного поколения еловых древостоев достигает 200–300 лет, в то время как отдельные ели имеют возраст 350–400 лет [9].

Для проведения молекулярно-генетического анализа в качестве матрицы использовалась ДНК, выделенная CTAB-методом по Bousquet et al. [12] из высушенной хвои. Для анализа гаплотипов митохондриального гена *nad1*, содержащего тандемные минисателлитные повторы, ПЦР проводили с использованием термоциклера GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems, США). Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 1× буфер для Taq-полимеразы (pH 8,6, 2,5 мМ Mg^{2+}) (Силекс, Россия), 200 мкмоль dNTPs, 0,5 мкмоль каждого из праймеров, 1 ед. Taq-полимеразы (Диалат, Россия) и 2 мкл (30–60 нг) исследуемой ДНК. Для проведения ПЦР использовались праймеры, опубликованные Gugerli et al. [14]: прямой – CTCTCCCTCACCCATATGATG; обратный – AGATCCCCATATATTCCCGG, а также режим проведения ПЦР, рекомендованный автором: преденатурация – 3 мин при 94 °С, далее 26 циклов (1 мин – 94 °С, 1 мин – 57 °С и 2 мин – 72 °С), заключительный этап – 5 мин при 72 °С.

Для идентификации гаплотипов мтДНК ПЦР-фрагменты разделялись путем электрофореза в 1 % агарозном геле, вырезались из геля, очищались с помощью коммерческого набора Cleanup Standard (Евроген, Москва) и секвенировались независимо в двух лабораториях: на генетическом анализаторе «Нанофор-05», а также в компании Евроген (Москва).

Для клонирования очищенные ПЦР-фрагменты лигировали в плазмиду pAL2-T, используя коммерческий набор Quick-TA kit (Евроген), затем штамм *E. coli* (XL-1 Blue) трансформировали с использованием полученных векторов.

Колонии со вставкой отбирали методом бело-голубой селекции и из них выделяли плазмиды. Каждой колонии/выделенной плазмиде присваивали индивидуальный номер. Всего было отобрано по 2–6 колоний ПЦР-продукта с каждого из проанализированных деревьев. Количество выделенной плазмиды оценивалось визуально путем электрофореза на 1 % агарозном геле. С полученными плазмидами проводили ПЦР с использованием универсальных праймеров M13. Полученные ПЦР-фрагменты переосаждали, очищали с использованием коммерческого набора Cleanup Standard, секвени-

ровали на генетическом анализаторе Нанофор 05 с использованием коммерческого набора для подготовки проб BidDye Terminator v3.1.

Для распознавания ядерных копий митохондриальных генов (NUMT) и гетероплазмии нами были разработаны праймеры для амплификации больших фрагментов мтДНК (Long-range PCR): F:GGTAATGTCCGCGTCTCGCC; R:CTCGTCCGCGCTTTGCTTTC.

Реакционная смесь для «Long-range» ПЦР объёмом 25 мкл содержала 5 нг геномной ДНК, 0,5 U Q5 High-Fidelity ДНК-полимеразы (New England BioLabs), 1x Q5 Reaction buffer, 200 мкмоль dNTPs и по 0,5 мкмоль прямого и обратного праймеров. Реакция проводилась при следующих условиях: начальная денатурация 98 °C – 30 сек; 30 циклов (98 °C – 7 сек, 65 °C – 20 сек, 72 ° –1 мин); финальная элонгация 72 °C – 2 мин.

Филогенетический анализ последовательностей второго интрона митохондриального гена *nad1* проводился на основе Байесовского метода в программе Mr. Bayes 3.2.6 [23] с использованием эволюционной модели Jukes-Cantor. Наиболее подходящий тип эволюционной модели выбирался с помощью программы MEGA 7.0 [19]. Для анализа использовались следующие параметры: два одновременных теста по алгоритму Метрополиса для цепей Маркова, состоящих из четырёх цепей в 10000000 поколениях. Первые 25 % полученных деревьев были исключены из дальнейшего анализа. Визуализация филогенетического дерева и графическая работа с ним проводилась в программе MEGA 7.0.

Результаты исследований и их обсуждение

Ранее, при изучении гаплотипов мтДНК в популяциях ели лесов резервата «Вепсский лес» были выявлены случаи амплификации гетерогенных (двойных и более) ПЦР-фрагментов с праймерами, геноспецифичными для митохондриального гена *nad1* [2]. Для того чтобы выяснить, является ли этот факт свидетельством митохондриальной гетероплазмии или следствием того, что праймеры отжигаются на последовательность митохондриального гена и его ядерной копии, необходимо было исключить возможную контаминацию исследуемого растительного материала. С этой целью для деревьев с двумя и более амплифицированными фрагментами была повторно выделена ДНК из отдельных хвоинок, по 4 с каждого дерева. «Поигольный» анализ подтвердил амплификацию двух фрагментов для каждого индивидуального генотипа (рис. 1).

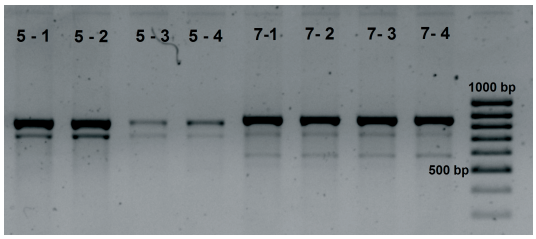

Рис. 1. Различные по размеру ПЦР-продукты, полученные в результате амплификации последовательности второго интрона гена *nad1* для образцов ДНК, выделенных из 4-х отдельных хвоинок деревьев № 5 и № 7 популяции ели резервата «Вепсский лес»

Анализ продуктов амплификации производился двумя способами. Первый способ – путем вырезания фрагментов из геля, их очистки и последующего секвенирования. Этим способом для 7 проанализированных деревьев с двойным/тройным ПЦР-продуктом были секвенированы последовательности всех амплифицированных фрагментов. Результаты прямого секвенирования ПЦР-фрагментов, вырезанных из геля, были дополнительно проверены путем клонирования ПЦР-продуктов в векторе pAL2-T.

После лигирования ПЦР-продукта в плазмиду была проведена трансформация в бактериальные клетки, получены клоны, вставки в клонах секвенированы с праймерами M13. Для каждого из 7 деревьев было получено и секвенировано от 2 до 6 клонов. На рисунке 2 в качестве примера представлены результаты секвенирования вставок у шести проанализированных клонов ПЦР-продукта для ДНК дерева № 5.

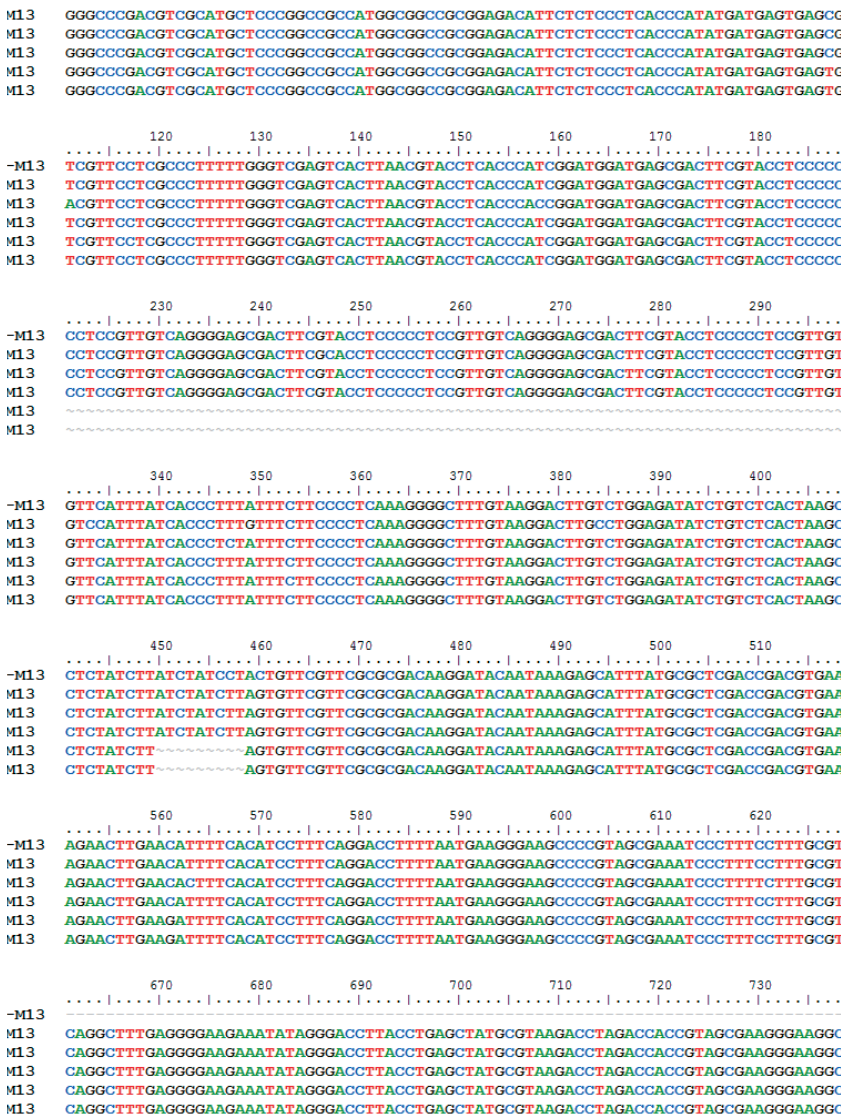

Рис. 2. Результаты секвенирования вставок шести клонов, полученных клонированием ПЦР-продукта второго интрона гена *nad1* для дерева № 5 популяции ели резервата «Вепсский лес»

По результатам секвенирования практически у всех проанализированных деревьев один из амплифицированных фрагментов оказался идентичен какому-либо из уже описанных гаплотипов *P. abies* [28], а дополнительные амплифицированные фрагменты имели особенности, специфичные для гаплотипа *P. obovata*: делецию 9 пн и характерные SNP. Некоторые из таких дополнительных ампликонов были полностью идентичны гаплотипу *nad1* 712, характерному для *P. obovata*. Другие *obovata*-подобные последовательности характеризовались масштабными делециями, которые затрагивали минисателлитный мотив и предшествующий ему участок в ~57 нуклеотидов (рис. 3). Все эти признаки характерны для ядерных копий митохондриальных генов (Nuclear copies of Mitochondrial genes, NUMT) [21].

Рис. 3. Последовательности второго интрона гена *nad1*, секвенированные для елей с обнаруженной гетерогенностью мтДНК после клонирования ПЦР-продукта с использованием плазмиды. Первое число слева в обозначении последовательности – номер дерева в выборке, второе число – номер клона

Таким образом, экспериментально было доказано, что гетерогенные ПЦР-продукты, полученные с праймерами Gugerli et al. [14] для 7 елей из Вепсского леса не являются результатом контаминации и содержат, как минимум, две разных последовательности. Выявленную гетерогенность можно объяснить двумя причинами: гетероплазмией и амплификацией ядерных копий митохондриальных генов (NUMT). Для того чтобы установить и объяснить природу обнаруженной гетерогенности мы следовали методическим подходам Mao et al. [21], исследовавшим точно такое же явление у видов млекопитающих.

1) *Дизайн ПЦР с большим размером целевого продукта.*

Одним из способов исключения амплификации NUMT является дизайн ПЦР с большим размером целевого продукта (Long-range PCR) [11, 21, 27]. Хотя в ядерный геном изредка встраиваются достаточно крупные фрагменты [27], обычно NUMT не превышают 1000 пн [22, 13].

В нашем исследовании для дизайна праймеров была использована последовательность AF142641.1| Picea abies isolate A nad1 gene, intron b/c; mitochondrial gene длиной 2036 пн. Ожидаемый размер ПЦР-фрагмента для гаплотипа 712 P. obovata составляет 1888 пн.

С использованием праймеров Long-range удалось подтвердить амплификацию двух гетерогенных фрагментов (размером ~ 1888 пн) для дерева № 5. Это свидетельствует о наличии митохондриальной гетероплазмии у дерева № 5. Для дерева № 7 и остальных деревьев праймеры Long-range амплифицируют либо единственный ПЦР-продукт, либо ПЦР-продукты, слабо различающиеся по длине, не разделяемые на агарозном геле (рис. 4).

2) *Филогенетический анализ*

Кластеризация последовательностей является хорошим методом для того, чтобы отличить ядерные копии митохондриальных генов от собственно митохондриальных последовательностей [21, 26]. Для ядерных псевдогенов митохондриального происхождения характерен высокий уровень мутирования. Как следствие, неожиданная позиция образца на филогенетическом дереве может служить косвенным свидетельством того, что анализируемая последовательность является ядерно-митохондриальным псевдогеном (NUMT) [11].

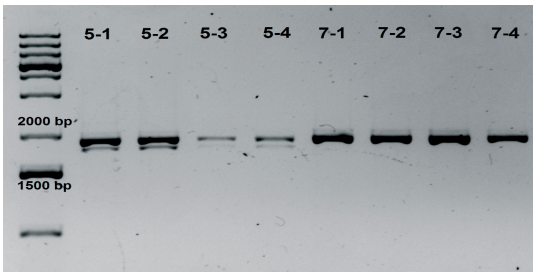

Рис. 4. Гетерогенность ПЦР-продуктов, полученных для второго интрона гена *nad1* с праймерами Long-range для четырех различных хвоинок дерева № 5 и дерева № 7. Ожидаемый размер фрагмента ~ 1888 пн

В проведенный филогенетический анализ были включены все образцы ДНК елей Вепсского леса, для которых удалось секвенировать два или три ПЦР-продукта с праймерами, специфичными для второго интрона *nad1*. Кроме того, в качестве контроля в анализ были включены все опубликованные в базе данных NCBI гаплотипы *P. abies* южного и северного семейств (PopSet: 1067189160) [28, 29], а также гаплотипы *P. obovata* (PopSet: 1067189237). Дополнительно был также включён гаплотип *P. obovata* (KP698160.1), описанный Мудрик с соавт. [4]. В качестве внешней группы использовалась последовательность второго интрона гена nad1 *P. schrenkiana* (KJ177347.1) и *P. likiangensis* (KC239920.1). Результаты филогенетического анализа представлены на рисунке 5.

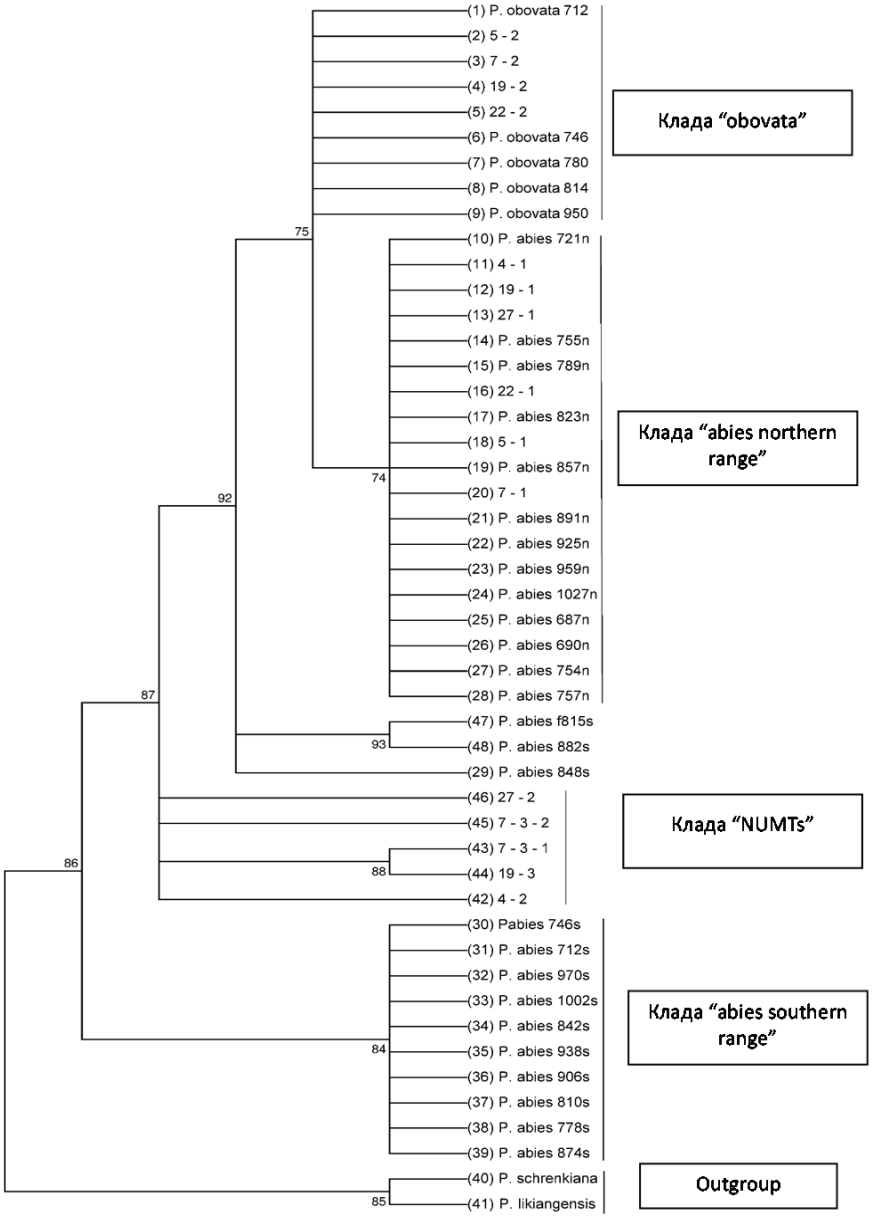

Рис. 5. Филогенетические взаимосвязи вариантов последовательности митохондриального гена *nad1 P. abies* и *P. obovata*, сконструированные с использованием Байесового анализа. Значения в узлах дерева – апостериорные вероятности (вероятности гипотез). *P. schrenkiana* и *P. likiangensis* – внешние группы. Последовательности, обозначенные видовыми эпитетами, заимствованы из базы данных NCBI, числами обозначен номер гаплотипа, согласно первоисточнику; буквенные индексы *n* и *s* обозначают северное и южное семейства *P. abies* соответственно. Последовательности, обозначенные цифрами (5-1, 27-2 и так далее) получены в рамках этого исследования для елей Вепсского леса с гетерогенными продуктами ПЦР (гетероплазмия или NUMT). Первое число – номер дерева в выборке, второе число – номер клонированного продукта ПЦР

На рисунке все образцы ДНК, обозначенные видовыми эпитетами, заимствованы из базы данных NCBI. Все последовательности, обозначенные цифрами (5-1, 27-2 и так далее) получены в рамках данного исследования.

По итогам филогенетического анализа в отдельную кладу объединились все гаплотипы *P. obovata*. Гаплотипы внутри клады «*obovata*» отличаются по количеству минисателлитных повторов. В сестринскую к ней кладу объединились все гаплотипы, выявленные для северной семьи *P. abies* (клада «*abies northern range*»), между собой они различаются также по числу повторов минисателлита с мотивом 34 пн и 37 пн. Отдельную кладу образуют представители южного семейства *P. abies* («*abies southern range*»).

Что касается позиции на филогенетическом дереве последовательностей, секвенированных в нашем исследовании, то они делятся на две группы:

1) полностью гомологичные ранее описанным гаплотипам *nad1* и входящие в состав «видовых» кластеров. Таким образом, последовательности под номерами 5-2, 7-2, 19-2, 22-2 идентичны гаплотипам *nad1*, характерным для *P. obovata*. Последовательности 5-1, 7-1, 19-1, 22-1, амплифицированные с тех же деревьев, идентичны гаплотипам *nad1*, характерным для *P. abies*.

2) группирующиеся на кладограмме вне каких-либо опознаваемых филогенетических групп (27-2, 7-3-2, 19-3, 4-2) – предположительно, ядерные копии митохондриальных генов (NUMT).

По результатам филогенетического анализа, ели № 5, № 7, № 19, № 22 имеют два типа митохондрий, причем один тип идентичен гаплотипу *P. abies*, а другой – гаплотипу *P. obovata*. Например, для дерева № 5 клонированием ПЦР-продуктов и прямым секвенированием установлено наличие в одном организме двух типов последовательности *nad1*: 5-1 (клада "*abies northern range*") и 5-2 (клада "*obovata*") (рис. 5). Возможность митохондриальной гетероплазмии для этого конкретного дерева № 5 подтверждается также и методом Long-range ПЦР. Вместе с тем, у нескольких деревьев из Вепсского леса выявлено присутствие в ядерном геноме копий митохондриальных генов (NUMT), сильно мутировавших, фрагментированных, и, возможно, утративших функциональность (псевдогенов).

Обнаруженную у елей резервата «Вепсский лес» митохондриальную гетероплазмию можно объяснить «утечкой» мтДНК с отцовской стороны (leakage of paternal mtDNA) в момент оплодотворения. Нарушение однородительского наследования митохондрий, возможно, возникает из-за не полностью преодолеваемого репродуктивного барьера и нестабильности гибридов в зоне интрогрессивной гибридизации [17, 31]. Гетероплазмию можно рассматривать как своеобразный исторический след тесного контакта *P. abies* и *P. obovata* на северо-западной окраине Восточноевропейской равнины. В пользу этой гипотезы свидетельствует географическая особенность той уникальной популяции ели, в которой были обнаружены носители мтДНК обоих видов. Природный резерват «Вепсский лес» и прилегающие к нему территории в орографическом отношении являются частью Вепсовской возвышенности, это северная часть Валдайско-Онежской гряды. Данный ландшафт наряду с немногими другими имеет самый высокий послеледниковый возраст на территории Северо-Запада [6]. Валдайско-Онежская гряда совпадает с линией максимума продвижения ледового покрова в осташковский стадиальный цикл позднеледниковья (33–11 тыс. лет назад). Именно по этой гряде проходят «предельные линии ареала» сибирских таежных видов (*Atragene sibirica, Actaea erythrocarpa, Athyrium crenatum, Cystopteris sudetica, Delphinium elatum, Rubus bumulifolius* и других) [3]. Ранее отмечалось, что следы миграции *Picea obovata* на территорию Восточноевропейской равнины могли сохраниться именно в этом районе в виде отдельных экземпляров ели типа *Picea fennica*, встречающихся в настоящее время среди еловых древостоев на Валдайской возвышенности [3].

Недавно опубликованные данные свидетельствуют также о потенциальной значимости изучения ядерных копий митохондриальных генов (NUMT) для филогеографии видов с обширным ареалом. Не только для видов хвойных лесообразователей, но и для некоторых широко распространенных в Палеарктике видов птиц установлено наличие нескольких значительно дивергированных групп митохондриальных гаплотипов [24, 32]. Обычно они разделяются по географическому принципу на западные и восточные, что традиционно объясняют последствиями оледенений, приводивших к обособлению популяций в условиях длительной изоляции в удаленных рефугиумах, где накапливались мутации. Согласно гипотезе Спиридоновой с соавт. [8], появление новых вариантов митохондриального гаплотипа, которые со временем могут стать таксон-специфичными, можно также объяснить рекомбинацией между митохондриальной ДНК и ядерным геномом, содержащим разнообразные копии митохондриальных генов, накопленные за тысячелетия эволюции вида.

Заключение

В результате проведенного исследования нами было установлено, что среди елей в зоне интрогрессивной гибридизации встречаются отдельные деревья, в клетках которых могут одновременно присутствовать последовательности мтДНК, ранее считавшиеся видоспецифичными для *P. abies* и *P. obovata*. Гетероплазмия митохондриальных генов для елей была описана и ранее, например, это явление встречалось в 18 % популяций, исследованных Tollesfrud et al. [28]. Однако присутствие *P. obovata*-специфичного гаплотипа митохондриального гена *nad1* у елей Восточно-Европейской равнины описывается впервые. До сих пор считалось что распространение *P. obovata*-специфичного гаплотипа *nad1* ограничено Сибирским регионом и не заходит западнее Уральского хребта.

Впервые для ели европейской описаны ядерные псевдогены митохондриального происхождения (NUMT), сходные по своей последовательности с митохондриальным гаплотипом гена *nad1*. Из-за высокого уровня мутирования их последовательности не группируются в единый кластер ни с одним гаплотипом, описанным для *P. abies* или *P. obovata* на филогенетических деревьях

Исследование выполнено при поддержке РФФИ, проект №14-04-01418.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Ельцов, Н.П. Роль естественного отбора в эволюции митохондриальных гаплогрупп северо-восточной Евразии / Н.П. Ельцов и др. // Генетика. – 2010. – Т. 46. – №. 9. – С. 1247–1249.

2. Левкоев, Э.А. Изучение генетического разнообразия в популяциях ели европейской на Восточно-Европейской равнин: дис. … канд. с.-х. наук / Э.А. Левкоев. – Санкт-Петербургский Лесотехнический Университет, 2018.

3. Миняев, Н.А. История развития флоры северо-запада европейской части РСФСР с конца плейстоцена: дис. … д-ра биол. наук 03.00.05 / Миняев Николай Александрович. – Л., Ленинградский ордена Ленина государственный университет имени АА Жданова, 1966.

4. Мудрик, Е.А. Пространственное распределение гаплотипов второго интрона гена nad1 в популяциях комплекса европейской и сибирской елей (*Picea abies – P. obovata*) / Е.А. Мудрик и др. // Генетика. – 2015. – Т. 51. – № 10. – С. 1117-1125.

5. Потокина, Е.К. Использование маркеров органельной ДНК для анализа филогеографии восточноевропейской популяции ели европейской *Picea abies* (L.) H. Karst / Е.К. Потокина и др. // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2015. – Т. 18. – № 4/1. – С. 818–830.

6. Природный парк «Вепсский лес» / Т.А. Попова [и др.]; [отв. ред. Т.А. Попова, И.А. Бычкова, Д.Н. Ковалев]; Правительство Ленинградской обл., Науч.-исслед. ин-т космоаэрогеологических методов Министерства природных ресурсов РФ. – Санкт-Петербург: Вести, 2005. – ISBN 5-86153-151-X.

7. Саломашкина, В.В. Новые данные о филогеографии и генетическом разнообразии бурого медведя *Ursus arctos* Linnaeus, 1758 северо-восточной Евразии (анализ полиморфизма контрольного региона мтДНК) / В.В. Саломашкина и др. // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. – 2014. – № 1. – С. 30–39 – DOI: 10.1134/S1067413607030010

8. Спиридонова, Л.Н. Ядерные копии митохондриальных генов – источник новых гаплотипов гена цитохрома b мтДНК *Luscinia calliope (Muscicapidae*, Aves) / Л.Н. Спиридонова и др. // Генетика. – 2016. – Т. 52. – № 9. – С 969–1080.

9. Федорчук, В.Н. Резерват «Вепсский лес» / В.Н. Федорчук, М.Л. Кузнецова, А.А. Андреева, Д.В. Моисеев // СПб.: Изд.-во С.-Петерб. науч.-исслед. ин-т лесного хоз-ва (СПбНИИЛХ), 1998. – 207 с.

10. Aksyonova, E. Heteroplasmy and paternally oriented shift of the organellar DNA composition in barley-wheat hybrids during backcrosses with wheat parents / E. Aksyonova et al. // Genome. – 2005. – Т. 48. – № 5. – С. 761–769.

11. Bensasson, D. Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses / D. Bensasson et al. // Trends in ecology & evolution. – 2001. – Т. 16. – № 6. – С. 314–321.

12. Bousquet, J. DNA amplification from vegetative and sexual tissues of trees using polymerase chain reaction / J. Bousquet, L. Simon, M. Lalonde // Can. J. Forest Res. – 1990. – V. 20. – P. 254–257.

13. Calvignac, S. Preventing the pollution of mitochondrial datasets with nuclear mitochondrial paralogs (numts) / S. Calvignac et al. // Mitochondrion. – 2011. – Т. 11. – № 2. – С. 246–254.

14. Gugerli, F. Haplotype variation in a mitochondrial tandem repeat of Norway spruce (*Picea abies*) populations suggests a serious founder effect during postglacial re-colonization of the western Alps / F. Gugerli et al. // Molecular Ecology. – 2001. – Т. 10. – № 5. – С. 1255–1263.

15. Hazkani-Covo, E. Molecular poltergeists: mitochondrial DNA copies (numts) in sequenced nuclear genomes / E. Hazkani-Covo, R.M. Zeller, W. Martin // PLoS genetics. – 2010. – Т. 6. – № 2. – С. e1000834.

16. Hazkani-Covo, E. Numt-mediated double-strand break repair mitigates deletions during primate genome evolution / E. Hazkani-Covo, S. Covo // PLoS genetics. – 2008. – Т. 4. – № 10. – С. e1000237.

17. Jaramillo-Correa, J.P. Mitochondrial genome recombination in the zone of contact between two hybridizing conifers / J.P. Jaramillo-Correa, J. Bousquet // Genetics. – 2005. – Т. 171. – № 4. – С. 1951–1962.

18. Kmiec, B. Heteroplasmy as a common state of mitochondrial genetic information in plants and animals / B. Kmiec, M. Woloszynska, H. Janska // Current genetics. – 2006. – Т. 50. – № 3. – С. 149–159.

19. Kumar, S. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets / S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura // Molecular biology and evolution. – 2016. – Т. 33. – № 7. – С. 1870–1874.

20. Laser, B. Parental and novel copies of the mitochondrial orf25 gene in the hybrid crop-plant triticale: predominant transcriptional expression of the maternal gene copy / B. Laser et al. // Current genetics. – 1997. – Т. 32. – № 5. – С. 337–347.

21. Mao, X. Heteroplasmy and ancient translocation of mitochondrial DNA to the nucleus in the Chinese Horseshoe Bat (*Rhinolophus sinicus*) complex / X. Mao et al. // PLoS One. – 2014. – Т. 9. – № 5. – С. e98035.

22. Richly, E. NUMTs in sequenced eukaryotic genomes / E. Richly, D. Leister // Molecular biology and evolution. – 2004. – Т. 21. – № 6. – С. 1081–1084.

23. Ronquist, F. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models / F. Ronquist, J.P. Huelsenbeck // Bioinformatics. – 2003. – Т. 19. – № 12. – С. 1572–1574.

24. Saitoh, T. Old divergences in a boreal bird supports long-term survival through the Ise Ages / T. Saitoh, P. Alstrom, I. Nishiumi et al. // BMC Evol. Biol. – 2010. – V. 10. – № 35. – URL: http://www.biomedcentral.com/1471-2148/10/35]. – DOI: 10.1186/ 1471-2148-10-35 (дата обращения: 20.02.2009)

25. Semerikov, V.L. Mitochondrial DNA variation pattern and postglacial history of the Siberian larch (*Larix sibirica* Ledeb.) / V.L. Semerikov, A.I. Iroshnikov, M. Lascoux // Russian Journal of Ecology. – 2007. – T. 38. – № 3. – C. 147–154.

26. Sorenson, M.D. Multiple independent transpositions of mitochondrial DNA control region sequences to the nucleus / M.D. Sorenson, R.C. Fleischer // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1996. – T. 93. – № 26. – C. 15239–15243.

27. Sorenson, M.D. Numts: a challenge for avian systematics and population biology / M.D. Sorenson, T.W. Quinn // The Auk. – 1998. – T. 115. – №. 1. – C. 214–221.

28. Tollefsrud, M.M. Genetic consequences of glacial survival and postglacial colonization in Norway spruce: combined analysis of mitochondrial DNA and fossil pollen / M.M. Tollefsrud et al. // Molecular Ecology. – 2008. – T. 7. – № 18. – C. 4134–4150.

29. Tollefsrud, M.M. Late Quaternary history of North Eurasian Norway spruce (*Picea abies*) and Siberian spruce (*Picea obovata*) inferred from macrofossils, pollen and cytoplasmic DNA variation / M.M. Tollefsrud et al. // Journal of Biogeography. – 2015. – T. 42. – № 8. – C. 1431–1442.

30. Tsuda, Y. The extent and meaning of hybridization and introgression between Siberian spruce (*Picea obovata*) and Norway spruce (*Picea abies*): cryptic refugia as stepping stones to the west? / Y. Tsuda et al. // Molecular Ecology. – 2016. – T. 25. – № 12. – C. 2773–2789.

31. Wagner, D.B. Paternal leakage of mitochondrial DNA in *Pinus* / D.B. Wagner et al. // Theoretical and Applied Genetics. – 1991. – T. 82. – № 4. – C. 510–514.

32. Zink, R.M. Mitochondrial phylogeographies of five widespread Eurasian bird species / R.M. Zink, A. Pavlova, S. Drovetski, S. Rohwer // J. Ornithol. – 2008. – V. 149. – № 3. – P. 399–413. – DOI: 10.1007/s10336-008-0276-z

REFERENCES

1. Eltsov N.P., Volodko N.V., Starikovskaya E.B., Mazunin I.O., Sukernik R.I. The Role of Natural Selection in the Evolution of Mitochondrial Haplogroups in Northeastern Eurasia. *Genetika*. 2010, no. 46, pp. 1105–1107, doi: 10.1134/S1062359014010087.

2. Levkoev Eh.A. Izuchenie geneticheskogo raznoobraziya v populyatsiyakh eli evropejskoj na Vostochno-Evropejskoj ravnine. candidate's thesis, Sankt-Peterburzhskij lesotekhnicheskij universitet, 2018. (In Russian)

3. Minyaev N. Istoriya Razvitiya Flory Severo-Zapada Evropejskoj Chasti RSFSR s Kontsa Plejstotsena. Doctor's thesis, Leningradskij ordena Lenina gosudarstvennyj universitet imeni A.A. Zhdanova, 1966. (In Russian)

4. Mudrik E.A., Polyakova T.A., Shatokhina A.V., Bondarenko G.N., Politov D.V. Spatial Distribution of Intron 2 of Nad1 Gene Haplotypes in Populations of Norway and Siberian Spruce (*Picea abies–P. obovata*) Species Complex. *Russ. J. Genet. Appl. Res*. 2015, no. 51, pp. 957–965, doi:10.1134/S1022795415100129.

5. Potokina E.K., Kiseleva A.A., Nikolaeva M.A., Ivanov S.A., Ulianich P.S., Potokin A.F. Analysis of the polymorphism of organelle DNA to elucidate the phylogeography of Norway spruce in the East European Plain. *Russ. J. Genet. Appl. Res*. 2015, no. 5, pp. 430–439, doi:10.1134/S2079059715040176.

6. Popova T.A. Prirodnyj Park "Vepsskij Les." Pravitel'stvo Leningradskoj obl., Nauch.-issled. in-t kosmoaehrogeologicheskikh metodov M-va prirodnykh resursov RF. Sankt-Peterburg, 2005. (In Russian)

7. Salomashkina V.V., Kholodova M.V., Tuten'kov O.Yu., Moskvitina N.S., Erokhin N.G. New Data on the Phylogeography and Genetic Diversity of the Brown Bear *Ursus arctos* Linnaeus, 1758 of Northeastern

Eurasia (mtDNA Control Region Polymorphism Analysis). *Biol. Bull. Russ. Acad. Sci*. 2014, no. 41, pp. 38–46, doi:10.1134/S1062359014010087.

8. Spiridonova L.N., Valchuk O.P., Red'kin Ya.A., Kryukov A.P. Nuclear mtDNA Pseudogenes as a Source of New Variants of the mtDNA Cytochrome b Haplotypes: A Case Study of Siberian Rubythroat *Luscinia calliope (Muscicapidae*, Aves). *Russ. J. Genet*. 2016, no. 52, pp. 952–962, doi:10.1134/S1022795416090131.
9. Fedorchuk V., Kuznetsova M., Andreeva A., Moiseev D. Rezervat «Vepsskij les». Lesovodstvennye Issledovaniya. St. Petersburg, 1998. (In Russian)
10. Aksyonova E., Sinyavskaya M., Danilenko N., Pershina L., Nakamura C., Davydenko O. Heteroplasmy and Paternally Oriented Shift of the Organellar DNA Composition in Barley–Wheat Hybrids during Backcrosses with Wheat Parents. *Genome*, 2005, no. 48, pp. 761–769, doi:10.1139/g05-049.
11. Bensasson D. Mitochondrial Pseudogenes: Evolution's Misplaced Witnesses. *Trends in Ecology & Evolution*, 2001, no. 16, pp. 314–321, doi:10.1016/S0169-5347(01)02151-6.
12. Bousquet J., Simon L., Lalonde M. DNA amplification from vegetative and sexual tissues of trees using polymerase chain reaction. *Can. J. For. Res*. 1990, no. 20, pp. 254–257, doi:10.1139/x90-037.
13. Calvignac S., Konecny L., Malard F., Douady C.J. Preventing the Pollution of Mitochondrial Datasets with Nuclear Mitochondrial Paralogs (Numts). *Mitochondrion*, 2011, no. 11, pp. 246–254, doi: 10.1016/j.mito.2010.10.004.
14. Gugerli F., Sperisen C., Buchler U., Magni F., Geburek T., Jeandroz S., Senn J. Haplotype Variation in a Mitochondrial Tandem Repeat of Norway Spruce (*Picea abies*) Populations Suggests a Serious Founder Effect during Postglacial Re-Colonization of the Western Alps. *Mol. Ecol.*, 2001, no. 10, pp. 1255–1263, doi:10.1046/j.1365-294X.2001.01279.x.
15. Hazkani-Covo E., Zeller R.M., Martin W. Molecular Poltergeists: Mitochondrial DNA Copies (Numts) in Sequenced Nuclear Genomes. *PLoS Genet.,* 2010, no. 6, pp. e1000834, doi: 10.1371/journal.pgen.1000834.
16. Hazkani-Covo E., Covo S. Numt-Mediated Double-Strand Break Repair Mitigates Deletions during Primate Genome Evolution. *PLoS Genet.,* 2008, no. 4, pp. e1000237, doi: 10.1371/journal.pgen.1000237.
17. Jaramillo-Correa J.P., Bousquet J. Mitochondrial Genome Recombination in the Zone of Contact Between Two Hybridizing Conifers. *Genetics,* 2005, no. 171, pp. 1951–1962, doi: 10.1534/genetics.105.042770.
18. Kmiec B., Woloszynska M., Janska H. Heteroplasmy as a Common State of Mitochondrial Genetic Information in Plants and Animals. *Curr. Genet.,* 2006, no. 50, pp. 149–159, doi: 10.1007/s00294-006-0082-1.
19. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, no. 33, pp. 1870–1874, doi: 10.1093/molbev/msw054.
20. Laser B., Mohr S., Odenbach W., Oettler G., Kück U. Parental and Novel Copies of the Mitochondrial Orf25 Gene in the Hybrid Crop-Plant Triticale: Predominant Transcriptional Expression of the Maternal Gene Copy. *Current Genetics*, 1997, no. 32, pp. 337–347, doi: 10.1007/s002940050286.
21. Mao X., Dong J., Hua P., He G., Zhang S., Rossiter S.J. Heteroplasmy and Ancient Translocation of Mitochondrial DNA to the Nucleus in the Chinese Horseshoe Bat (*Rhinolophus sinicus*) Complex. *PLoS ONE,* 2014, no. 9, pp. e98035, doi: 10.1371/journal.pone.0098035.
22. Richly E. NUMTs in Sequenced Eukaryotic Genomes. *Molecular Biology and Evolution,* 2004, 21, 1081–1084, doi: 10.1093/molbev/msh110.
23. Ronquist F., Huelsenbeck J.P. MrBayes 3: Bayesian Phylogenetic Inference under Mixed Models. *Bioinformatics,* 2003, no. 19, pp. 1572–1574, doi: 10.1093/bioinformatics/btg180.
24. Saitoh T., Alström P., Nishiumi I., Shigeta Y., Williams D., Olsson U., Ueda K. Old Divergences in a Boreal Bird Supports Long-Term Survival through the Ice Ages. *BMC Evol. Biol.*, 2010, no. 10, p. 35, doi: 10.1186/1471-2148-10-35.

25. Semerikov V.L., Iroshnikov A.I., Lascoux M. Mitochondrial DNA Variation Pattern and Postglacial History of the Siberian Larch (*Larix sibirica* Ledeb.). *Russ. J. Ecol*., 2007, no. 38, pp. 147–154.

26. Sorenson M.D., Fleischer R.C. Multiple Independent Transpositions of Mitochondrial DNA Control Region Sequences to the Nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1996, no. 93, pp. 15239–15243, doi: 10.1073/pnas.93.26.15239.

27. Sorenson M.D., Quinn T.W. Numts: A Challenge for Avian Systematics and Population Biology. *The Auk,* 1998, no. 115, pp. 214–221, doi: 10.2307/4089130.

28. Tollefsrud M.M., Kissling R., Gugerli F., Johnsen Ø., Skrøppa T., Cheddadi R., van der Knaap W.O., Latałowa M., Terhürne-Berson R., Litt T., Geburek T., Brochmann C., Sperisen C. Genetic Consequences of Glacial Survival and Postglacial Colonization in Norway Spruce: Combined Analysis of Mitochondrial DNA and Fossil Pollen. *Molecular Ecology*, 2008, no. 17, pp. 4134–4150, doi: 10.1111/j.1365-294X.2008.03893.x.

29. Tollefsrud M.M., Latałowa M., van der Knaap W.O., Brochmann C., Sperisen C. Late Quaternary History of North Eurasian Norway Spruce (*Picea abies*) and Siberian Spruce (*Picea obovata*) Inferred from Macrofossils, Pollen and Cytoplasmic DNA Variation. *J. Biogeogr.* 2015, no. 42, pp. 1431–1442, doi: 10.1111/jbi.12484.

30. Tsuda Y., Chen J., Stocks M., Källman T., Sønstebø J.H., Parducci L., Semerikov V., Sperisen C., Politov D., Ronkainen T., Väliranta M., Vendramin G.G., Tollefsrud M.M. and Lascoux M. The Extent and Meaning of Hybridization and Introgression between Siberian Spruce (*Picea obovata*) and Norway Spruce (*Picea abies*): Cryptic Refugia as Stepping Stones to the West? *Mol. Ecol*. 2016, no. 25, pp. 2773–2789, doi: 10.1111/mec.13654.

31. Wagner D.B., Dong J., Carlson M.R., Yanchuk A.D. Paternal Leakage of Mitochondrial DNA In *Pinus*. *Theoret. Appl. Genetics,* 1991, no. 82, pp. 510–514, doi: 10.1007/BF00588607.

32. Zink R.M., Pavlova A., Drovetsk S., Rohwer S. Mitochondrial Phylogeographies of Five Widespread Eurasian Bird Species. *J. Ornithol.* 2008, no. 149, pp. 399–413, doi: 10.1007/s10336-008-0276-z.

Статья поступила в редакцию 2.02.2022