

А.Є. Демкович

ВИКОРИСТАННЯ МІКРОСАТЕЛІТНИХ ЛОКУСІВ В МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОМУ АНАЛІЗІ ВИДІВ РОДУ *VINCETOXICUM WOLF* ФЛОРИ УКРАЇНИ

Vincetoxicum Wolf, SSR, поліморфізм, молекулярно-генетичний аналіз

Рід *Vincetoxicum Wolf* містить більш ніж 100 видів, поширених на території Євразії [11]. Система роду по цей час не розроблена [19]. В Україні нараховується біля 15 видів роду [13], більшість з яких є рідкісними в окремих регіонах України – *V. cretaceum* (Pobed.) Wissjul., *V. donetzicum* Ostapko, *V. flavum* Ostapko, *V. intermedium* Taliev, *V. maeoticum* (Kleopow) Barbar., *V. rossicum* (Kleopow) Barbar., *V. ucrainicum* Ostapko та потребують охорони [6, 7, 11]. При цьому, наявність ефективного вегетативного розмноження, значне розповсюдження апоміксису, водночас із здатністю до міжвидового схрещування, ускладнюють як встановлення таксономічних меж, так і розробку заходів щодо збереження окремих видів. У різних не споріднених груп видів спостерігаються паралелізми у мінливості, складна систематика роду стимулює опис нових таксонів, обґрунтованість яких потребує додаткових досліджень з використанням молекулярно-генетичних методів [2, 3].

Мета та завдання роботи

Для використання в популяційно-генетичних дослідженнях українських видів роду *Vincetoxicum* було проведено модифікацію та впровадження методики мікросателітного аналізу, відбір SSR локусів для отримання первинних даних молекулярно-генетичного поліморфізму та визначення їх придатності до популяційно-генетичного і філогенетичного аналізу на основі первинних оцінок поліморфізму.

Об'єкти та методи досліджень

Досліджували 13 видів роду *Vincetoxicum* флори Південного Сходу України. Для отримання ДНК використовували матеріал семи рослин *V. maeoticum*, шести рослин *V. scandens* Sommier & Levier і *V. hirundinaria* Medik., п'яти – *V. laxum* (Bartl.) Gren. & Godr., чотирьох рослин *V. intermedium*, двох – *V. steposum* (Pobed.) A. Löve & D. Löve, *V. jalicola* Juz., *V. flavum*, по одній рослині *V. ucrainicum*, *V. rossicum*, *V. donetzicum*, *V. cretaceum*, *V. albovianum* (Kusn.) Pobed. Також аналізували *Cynanchum acutum* L. (раніше усіх представників роду *Vincetoxicum* відносили до роду *Cynanchum* L.).

ДНК виділяли за допомогою комерційних наборів для виділення ДНК з тваринних тканин «Diatom DNA ргєr» (Ізоген, Росія). Для сорбції фенольних сполук з рослинних тканин використано високомолекулярний полівінілпіролідон (ПВП, K90).

Для вивчення молекулярно-генетичного поліморфізму мікросателітних локусів використовували вісім пар праймерів, підібраних до *Vincetoxicum atratum* Mogg. et Dence. [17] (табл. 1). Температура відпалу, що наведена в таблиці, є оптимізованою для українських видів роду при використанні для полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) набору «GenePak PCR Core» (Ізоген, Росія). Оптимальну температуру відпалу знаходили, варіюючи її з шагом 0,2°C, починаючи з приведеної для *V. atratum* і орієнтуючись на якісний характер ампліконів – наявність множинних смуг при занадто низькій температурі і зменшення кількості продукту при перевищенні оптимальної температури.

Для кожного із аналізованих зразків ДНК було проведено ПЛР за попередньо оптимізованої температури із кожною парою праймерів до відповідного мікросателітного локусу.

Таблиця 1. Послідовності праймерів, оптимізована для українських видів роду *Vincetoxicum* Wolf температура відпалу та діапазон довжин ампліконів для мікросателітних локусів.

Праймер	Послідовність	Температура відпалу	Діапазон довжин фрагментів у <i>V. atratum</i> , та у українських видів роду <i>Vincetoxicum</i>
Vinc5(F)	GTGGGAGTGAGAAATTGTAGC	62	273–287*
Vinc5(R)	CTTCTGAACTGCATCTGACC	62	257–339**
Vinc101(F)	GCCAGAAACTCAGTTAGCTTCA	65	120–126*
Vinc101(R)	GCAAATGATGCGGAAGATTCT	65	–
Vinc102(F)	GAGCTATAGGTGACACGAGA	62	97–125*
Vinc102(R)	CCTTCTAGTACTTGGGAAGT	62	–
Vinc104(F)	TGCTCCATTGATCACCTACT	59	172–180*
Vinc104(R)	ТААСТГАТСАГААГСТСТГТ	59	150–165**
Vinc107(F)	ССАСТАСГГГААГТАТТСАС	65	287–305*
Vinc107(R)	ССТТТГГАТГГСТГССАААТ	65	–
Vinc118(F)	ГТСТТТТГСААГГАГАТСА	68	167–235*
Vinc118(R)	ГАТГССТСТАТССААТСССА	68	–
Vinc123(F)	СССГТСАТАТТСААСГАГАА	59	127–137*
Vinc123(R)	СГГГАГАГАГАГТГАСТТТТ	59	121–144**
Vinc124(F)	ГАСААААГГГТГАГААГАТА	59	299–399*
Vinc124(R)	ГГТГАТАТАГТГГАГАГАСАГА	59	308–461**

П р и м і т к и: F – пряма послідовність праймера, R – зворотна; * – діапазон довжин фрагментів у *V. atratum*; ** – діапазон довжин фрагментів у українських видів роду *Vincetoxicum*.

Отримані амплікони розділяли у вертикальному неденатуруючому 7%-му поліакриламідному гелі із наступним забарвленням нітратом срібла за модифікованою методикою Т. Бенбуза [14]. В якості стандарта молекулярної ваги використовували ДНК маркер SM1323 O'Range ruler 20 bp (Fermentas). Зображення гелів, отримані за допомогою цифрового фотоапарата або сканера обробляли за допомогою вільно доступної програми «GelAnalyser 2010a» [9] (рис.). Розподільна здатність методу становила близько 1 п.н. Статистичну обробку молекулярно-генетичних даних проводили за допомогою вільно доступного програмного забезпечення «GenAlEx» [15], «PopGen» [20] та в середовищі аналізу даних «R» [16], використовуючи стандартні популяційно-генетичні оцінки [1, 5, 8].

Результати досліджень та їх обговорення

Серед восьми мікросателітних локусів, використаних у роботі, за чотирма локусами не було отримано повноцінного ПЛР-продукту у жодного з аналізованих видів роду *Vincetoxicum*. У *S. acutum* взагалі не утворилося ПЛР-продукту за жодним з SSR локусів, що досліджували. Це може бути пов'язаним з його більш віддаленим систематичним положенням. Разом з тим амплікони за чотирма локусами (Vinc5, Vinc104, Vinc123, Vinc102) було виявлено у більшості аналізованих видів. Ампліконів не було виявлено у *V. donetzicum*, *V. rossicum*, *V. cretaceum* за локусами Vinc5 і Vinc124. Розширивши аналізовану вибірку, можна буде встановити, чи дійсно у цих видів

відсутні два локуси. Загалом для всіх проаналізованих видів за чотирма мікросателітними локусами вдалося ідентифікувати 64 алелі, в середньому 16 алелів на локус. Найменша кількість алелів – 8 спостерігалася за локусом Vinc104, а найбільша – 25 – за локусом Vinc5. Для локусів Vinc123 та Vinc124 було виявлено 11 і 20 алелів відповідно. Результати перенесення відібраних для одного виду мікросателітних локусів на інші, за якого задовільно ампліфікувалися і були поліморфними чотири мікросателітні локуси із восьми випробуваних, можна вважати успішними. Так, в аналогічному дослідженні з міжвидового перенесення 276 мікросателітних локусів у десяти видів роду *Pinus* L. лише 23 (8%) локусів були вдало ампліфіковані у всіх десяти видів, а поліморфними серед них виявилися взагалі п'ять локусів (2%) [18]. У нашому випадку у більшості видів були вдало ампліфіковані і водночас виявилися поліморфними 50% випробуваних локусів.

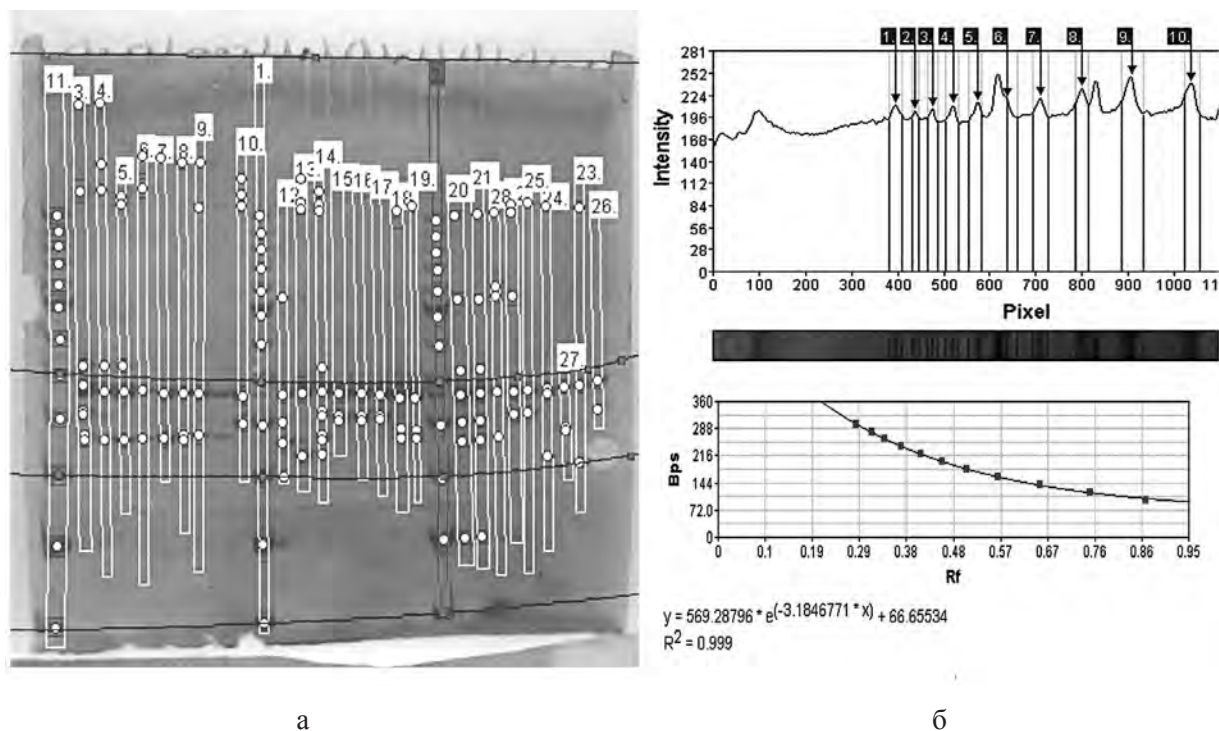


Рис. Результати проведення електрофорезу та їх обробка в програмі «GelAnalyser 2010a»: а) Зображення електрофоретичного гелю в програмі «GelAnalyser 2010a» (доріжки № 1, 2, 11 – маркер молекулярної ваги, інші доріжки – амплікони мультиплекс-ПЛР за локусами Vinc104, Vinc123, Vinc124; горизонтальні лінії – стартова лінія та градування фронту електрофорезу за маркерами молекулярної ваги; крапки – виявлені фрагменти ДНК; б) Стандарт молекулярної ваги та калібрування молекулярної ваги ампліконів на основі відомого стандарту в програмі «GelAnalyser 2010a».

Розміри ампліконів, виявлених за чотирма проаналізованими локусами, не в повній мірі співпадали із наведеними для *V. atratum* (табл. 1). Локуси Vinc5 і Vinc123 характеризувалися більшим розмахом довжин ампліконів (257–339 і 121–144 п.н. порівняно із 273–287 і 127–137 п.н. у *V. atratum* відповідно), локус Vinc104 – меншим розмахом (150–165 п.н., порівняно із 172–180 п.н.), а локус Vinc124 у досліджуваних видів мав амплікони декілька більшої довжини, ніж у *V. atratum* (308–461 п.н. порівняно із 299–399 п.н.). Така картина цілком звичайна при міжвидовому перенесенні мікросателітних локусів. Локусам Vinc104, Vinc123, Vinc124 був властивий розподіл з двома – трьома передомінантними алелями, частоти яких знаходились у межах 0,135–0,230 для менш частих алелів і 0,311–0,474 для більш частих алелів. Натомість, інші алелі за цими трьома локусами зустрічались з частотою не вище 0,095, як правило, – 0,016–0,064 (5 алелів за локусом Vinc104, 8 – за Vinc123 і 18 – за Vinc124). Для локусу Vinc5, навпаки, була характерною відсутність передомінантних алелів. Частота зустрічальності для семи найбільш

частих алелів цього локусу складала 0,065–0,113, а частота інших 18 алелів варіювала від 0,016 до 0,048. Локус *Vinc5* відрізняється характером розподілу частот алелів від інших трьох. Для нього сукупність семи найбільш частих алелів складала 0,581, а для *Vinc124* доля двох преобладаючих алелів в їх загальній сукупності складає 0,517, тоді як за іншими алелями кумулятивна частота становила 0,419 і 0,483 для локусів *Vinc5* і *Vinc124* відповідно.

Таким чином, чотири досліджені мікросателітні локуси є нерівноцінними за показниками варіабельності та мають різний розподіл генетичної мінливості. Це робить їх сукупність придатною і достатньою для аналізу міжвидових відносин видів роду *Vincetoxicum* на території України за умови використання вибірок достатнього обсягу.

Висновки

1. Вперше проведено ПЛР аналіз за вісьмома мікросателітними локусами (*Vinc5*, *Vinc101*, *Vinc102*, *Vinc104*, *Vinc107*, *Vinc118*, *Vinc123*, *Vinc124*) тринадцяти видів роду *Vincetoxicum* з української частини ареалу. Визначено чотири мікросателітні локуси (*Vinc5*, *Vinc104*, *Vinc123*, *Vinc124*), за якими наявний повноцінний ПЛР-продукт.

2. Встановлено розмір ПЛР-продукту та кількість алелів шляхом електрофорезу в поліакриламідному гелі (25 алелів за локусом *Vinc5*, 8 – за локусом *Vinc104*, 11 алелів за локусом *Vinc123*, та 20 алелів за локусом *Vinc124*).

3. Встановлено основні показники поліморфізму мікросателітних локусів *Vinc5*, *Vinc104*, *Vinc123*, *Vinc124* та проведено аналіз розподілу їхньої алельної різноманітності, внаслідок чого виявлено суттєві її відмінності за окремими локусами.

4. Підтверджено придатність мікросателітних локусів *Vinc5*, *Vinc104*, *Vinc123*, *Vinc124* для оцінювання внутрішньо- та міжвидового поліморфізму видів роду *Vincetoxicum* на території України.

1. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях / Юрий Петрович Алтухов. – [3-е изд.]. – М.: Академкнига, 2003. – 431 с.
2. Молекулярно-генетичні маркери в аналізі генетичної структури та філогенетичних зв'язків для збереження рідкісних видів роду *Vincetoxicum* N. M. Wolf / А.С. Демкович, Т.В. Зубцова, С.М. Приваліхін [та ін.] // Перша міжнар. конф. «Біологія рослин та біотехнологія» (м. Біла Церква, 5–7 жовт. 2011 р.). – Біла Церква, 2011. – С. 59.
3. Необходимость использования молекулярно-генетических методов в изучении и сохранении биоразнообразия рода *Vincetoxicum* N.M. Wolf / В.М. Остапко, А.З. Глухов, С.А. Приходько [и др.] // Відновлення порушених природних екосистем: Матер. IV міжнар. наук. конф. (м. Донецьк, 18–21 жовтня 2011 р. – Донецьк, 2011. – С. 423–425.
4. Остапко В.М. Рід *Vincetoxicum* N.M. Wolf на південному сході України / В.М. Остапко // Укр. ботан. журн. – 1995. – Т. 52, №3. – С. 388–394.
5. Хедрик Ф. Генетика популяций: Пер с англ. / Ф. Хедрик. – М.: Техносфера, 2003. – 592 с.
6. Червона книга Донецької області: рослинний світ (рослини, що підлягають охороні в Донецькій області) / [під заг. ред. В.М. Остапка]. – Донецьк.: Новая печать, 2010. – 432 с.
7. Червона книга України. Рослинний світ / [під заг. ред. Я.П. Дідуха]. – К.: Глобалконсалтинг, 2009. – 900 с.
8. Eriksson G. An introduction to forest genetics / G. Eriksson, I. Ekderg, D. Clapham // Swedish Univ. of Agric. Sciences (SLU), Uppsala, Sweden. – 2006. – 186 p.
9. *GelAnalyser* – [ел. рес.]. – Режим доступу: [http://www.GelAnalyser.com /downloads/ users_manual_2010.pdf](http://www.GelAnalyser.com/downloads/users_manual_2010.pdf)
10. Gilbert M.G. Notes on the Asclepiadaceae of China / M.G. Gilbert, W.D. Stevens, P.T. Li // Novon. – 1995. – Vol. 5. – P. 1–16.
11. Liede S. *Cynanchum – Rhodostegiella – Vincetoxicum – Tylophora* (Asclepiadaceae): new considerations on an old problem / S. Liede // Taxon. – 1996. – Vol. 45, № 2. – P. 193–211.
12. Molecular phylogeny of *Vincetoxicum* (Apocynaceae-Asclepiadoideae) based on the nucleotide sequences of cpDNA and nrDNA / [T. Yamashiro, T. Fukuda, J. Yokoyama, M. Maki] // Molecular Phylogenetics and Evolution. – 2004. – Vol. 31. – P. 689–700.
13. Mosyakin S.L. Vascular plants of Ukraine: a nomenclatural checklist / S.L. Mosyakin, M.M. Fedoronchuk; [editor S.L. Mosyakin]. Kiev: M.G. Kholodny Inst. of Botany; Missouri Botan. Gard, 1999. – 346 p.

14. *Optimization* of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels / [H. Benbouza, J.-M. Jacquemin, J.-P. Baudoin, G. Mergeai] // *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* – 2006. – Vol. 10, № 2. – P. 77–81.
15. *Peakall R.* GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research / R. Peakall, P.E. Smouse // *Mol. Ecol. Notes.* – 2006. – Vol. 6. – P. 288–295.
16. *R Development Core Team* (2010). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
17. *Tada F.* Development of microsatellite markers for the endangered grassland perennial herb *Vincetoxicum atratum* (Apocynaceae-Asclepiadoideae) / F. Tada, T. Yamashiro, M. Maki // *Conserv. Genet.* – 2009. – Vol. 10. – P. 1057–1059.
18. *Xiang-Xiang F.* Identification of seeds *Pinus* species by microsatellite markers / F. Xiang-Xiang, S. Ji-sen // *J. For. Res.* – 2005. – Vol. 16, № 4. – P. 281–284.
19. *Yamazaki T.* Asclepiadaceae / T. Yamazaki // *Flora of Japan*, [Iwatsuki, K., Yamazaki T., Boufford. D.E., Ohba, H., (Eds.)]. – Kodansha: Tokyo, 1993. – Vol. 3. – P. 168–182.
20. *Yeh F.C.* PopGene Version 1.31. Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis // F.C. Yeh., T.J.B. Boyle. – 1997. – Vol. 129. – P. 157.

Донецький ботанічний сад НАН України

Надійшла 20.09.2012

УДК 581.522:582.938(477)

ВИКОРИСТАННЯ МІКРОСАТЕЛІТНИХ ЛОКУСІВ В МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОМУ АНАЛІЗІ
ВИДІВ РОДУ *VINCETOXICUM WOLF* ФЛОРИ УКРАЇНИ

А.Є. Демкович

Донецький ботанічний сад НАН України

Проведено ПЛР аналіз восьми мікросателітних локусів (Vinc5, Vinc101, Vinc102, Vinc104, Vinc107, Vinc118, Vinc123, Vinc124) у тринадцяти видів *Vincetoxicum Wolf*, що поширені в Україні. Визначено чотири мікросателітні локуси (Vinc5, Vinc104, Vinc123, Vinc124) за якими наявний повноцінний ПЛР-продукт. Шляхом електрофорезу в поліакриламідному гелі встановлено розмір ПЛР-продукту та кількість алелів (25 алелів за локусом Vinc5, 8 за локусом Vinc104, 11 алелів за локусом Vinc123, та 20 алелів за локусом Vinc124). Підтверджено придатність мікросателітних локусів Vinc5, Vinc104, Vinc123, Vinc124 для оцінювання внутрішньо- та міжвидового поліморфізму видів роду *Vincetoxicum* флори України.

UDC 581.522:582.938(477)

USE OF MICROSATELLITE LOCI IN MOLECULAR-GENETIC ANALYSIS OF *VINCETOXICUM WOLF*
SPECIES OF THE UKRAINIAN FLORA

A.Ye. Demkovych

Donetsk Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Ukraine

A PCR analysis of eight microsatellite loci (Vinc5, Vinc101, Vinc102, Vinc104, Vinc107, Vinc118, Vinc123, Vinc124) in thirteen *Vincetoxicum Wolf* species, spread in Ukraine, has been performed. There were identified four microsatellite loci (Vinc5, Vinc104, Vinc123, Vinc124) which presented complete PCR products. Using polyacrylamide gel electrophoresis, we have measured PCR products sizes and the number of alleles (25 alleles at Vinc5 locus, 8 alleles at Vinc104 locus, 11 alleles at Vinc123 locus, and 20 alleles at Vinc124 locus). The study proved the applicability of Vinc5, Vinc104, Vinc123, Vinc124 microsatellite loci to the assessment of intra- and interspecific polymorphism in *Vincetoxicum* species of Ukrainian flora.