

М. О. Твардовська, Н. М. Страшнюк, В. М. Мельник,
І. І. Конвалюк, член-кореспондент НАН України В. А. Кунах

RAPD-аналіз геномного поліморфізму деяких видів роду *Gentiana* L. флори України

За допомогою RAPD-аналізу виявлено генетичні відмінності між представниками роду *Gentiana* L. флори України. Визначено рівень міжвидового поліморфізму тирличів та встановлено взаємозв'язки між ними. Показано значну генетичну гетерогенність роду та віддаленість окремих його таксонів. Виявлено унікальні амплікони, що можуть бути використані для видової ідентифікації генотипів *Gentiana*.

Тирлич (*Gentiana* L.) — типовий рід родини *Gentianaceae* Juss., який включає близько 400 видів. Його представники є типовими альпійськими рослинами, більшість з яких зустрічається на висоті понад 1000 м, а деякі види зростають виключно на рівнинах [1].

Об'єм і таксономічний рівень різних груп видів роду тирлич до цього часу є предметом протиріч і суперечок. Загальноприйнятої класифікації роду немає, а найбільш відомі відрізняються положенням не лише окремих видів, але й більших систематичних одиниць — секцій. В основу існуючих на сьогодні класифікацій покладено морфологічні, анатомічні, еколого-географічні, онтогенетичні ознаки [2–5]. Проте питання про систематизацію роду залишається відкритим, а взаємозв'язки між видами потребують подальшого вивчення і уточнення.

Для вирішення суперечливих питань класифікації, з'ясування особливостей еволюції та виявлення філогенетичних зв'язків складних у систематичному відношенні таксонів поряд з іншими часто використовують молекулярно-генетичні методи, які характеризуються високою диференційною здатністю і на сьогодні загальноприйняті в таксономії та популяційній генетиці. Останнім часом значного поширення при дослідженні генетичної мінливості рослин набув метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням довільних праймерів, або RAPD-аналіз, який має низку переваг, зокрема дозволяє виявляти поліморфізм генетичних локусів, розсіяних по всьому геному.

У цьому повідомленні наведено результати вивчення міжвидового поліморфізму представників роду *Gentiana* L. флори України за допомогою RAPD-аналізу.

Матеріалом для дослідження були інтактні рослини семи видів тирличу флори України: т. жовтого — *G. lutea*, т. крапчастого — *G. punctata*, т. безстеблового — *G. acaulis*, т. ваточникового — *G. asclepiadea*, т. хрещатого — *G. cruciata*, т. звичайного — *G. pneumonanthe*, т. весняного — *G. verna*.

Виділення ДНК та гель-електрофорез продуктів ампліфікації здійснювали за підібраними раніше методиками [6]. У роботі використано 27 десятинуклеотидних праймерів, послідовності яких наведено у табл. 1.

Ампліфікацію проводили в термоциклері Терцик МС2 (“Биотехнология”, Росія). Реакційна суміш для проведення ПЛР об'ємом 20 мкл містила: 20 нг ДНК, 0,2 мМ dNTP, 1,25 У Таq-полімерази, 0,25 мкМ праймера, 1 × ПЛР-буфер з 1,5 мМ MgCl₂. На реакційну суміш нашаровували 15 мкл мінеральної олії. Як негативний контроль використовували стандартну реакційну суміш без ДНК. Ампліфікацію проводили в такому режимі: 94 °С — 2 хв,

5 циклів (94 °C — 30 с, $t_{\text{гібр}}$ — 30 с, 72 °C — 1 хв), 35 циклів (94 °C — 20 с, $t_{\text{гібр}}$ — 20 с, 72 °C — 40 с), 72 °C — 2 хв 30 с. Температура гібридизації ($t_{\text{гібр}}$) для праймерів A16 та A17 становила 38 °C, для інших — 37 °C.

Реакцію з кожним праймером повторювали щонайменше двічі, враховували тільки добре помітні і відтворювані у повторних реакціях фрагменти. Для позначення амплікона використовували назву праймера, за допомогою якого він був отриманий, і його розмір у парах нуклеотидів (п. н.).

Результати обробки електорофореграм RAPD-продуктів наведено у вигляді бінарної матриці, у якій наявність чи відсутність однакових за розміром ампліконів позначено відповідно “1” або “0”. Поліморфізм спектрів ампліконів оцінювали методом попарного незваженого кластерування з арифметичним усередненням (UPGMA), використовуючи програму POPGENE 1.31 [7]. Дендрограму генетичних відстаней за Неєм, Лі [8] між проаналізованими об’єктами побудовано з використанням програми MEGA 3.1 [9].

Для оцінки міжвидової мінливості геному тирличів було використано 27 десятинуклеотидних праймерів, які ініціювали синтез 844 ампліконів, завдовжки 300–2700 п. н. Зразки характеризувалися специфічними RAPD-спектрами, які відрізнялися за кількістю та розміром фрагментів (рис. 1). Досліджені види відрізнялися і за кількістю унікальних фрагментів — видоспецифічних ампліконів, частка яких коливалася від 13,2% (*G. lutea*) до 25,6% (*G. cruciata*) (табл. 2).

Фрагментів, спільних для усіх досліджених видів тирличу, нами не виявлено. Деякі амплікони були характерними для більшості видів: A01–720 та A19–370 — для усіх, крім *G. verna*, A18–680 — для усіх, крім *G. asclepiadea*, B03–1100 — для усіх, крім *G. acaulis*. Дев’ять спільних фрагментів нами виявлено для чотирьох видів — *G. lutea*, *G. punctata*, *G. acaulis* та *G. asclepiadea*. Найбільшу кількість спільних ампліконів за усіма використа-

Таблиця 1. Нуклеотидні послідовності використаних RAPD-праймерів

Праймер	Нуклеотидна послідовність (5’–3’)	Праймер	Нуклеотидна послідовність (5’–3’)	Праймер	Нуклеотидна послідовність (5’–3’)
A01	CAGGCCCTTC	A11	CAATCGCCGT	B01	GTTCGCTCC
A02	TGCCGAGCTG	A12	TCCGGGATAG	B02	TGATCCCTGG
A03	AGTCAGCCAC	A13	CAGCACCCAC	B03	CATCCCCCTG
A04	AATCGGGCTG	A14	TCTGTGCTGG	B04	GGACTGGAGT
A05	AGGGGTCTTG	A16	AGCCAGCGAA	B05	TGCGCCCTTC
A07	GAAACGGGTG	A17	GACCGCTTGT	B06	TGCTCTGCCC
A08	GTGACGTAGG	A18	AGGTGACCGT	B07	GGTGACGCAG
A09	GGGTAACGCC	A19	CAAACGTCGG	B08	GTCCACACGG
A10	GTGATCGCAG	A20	GTTGCGATCC	B10	CTGCTGGGAC

Таблиця 2. Кількість унікальних ампліконів, виявлених у геномах видів роду *Gentiana*

Вид	Загальна кількість ампліконів	Кількість унікальних ампліконів	Частка унікальних ампліконів, %
<i>G. lutea</i>	242	32	13,2
<i>G. punctata</i>	250	54	21,6
<i>G. acaulis</i>	239	59	24,7
<i>G. asclepiadea</i>	226	51	22,6
<i>G. cruciata</i>	258	66	25,6
<i>G. pneumonanthe</i>	206	46	22,3
<i>G. verna</i>	223	56	25,1

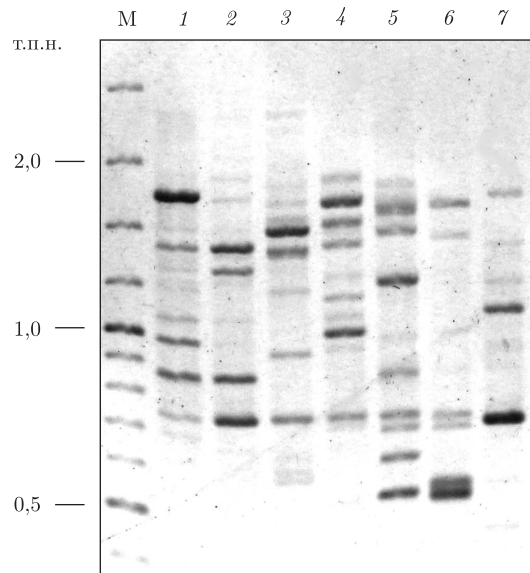


Рис. 1. Міжвидовий поліморфізм RAPD-спектрів тирличів (праймер A01):
 1 — *G. lutea*; 2 — *G. punctata*; 3 — *G. acaulis*; 4 — *G. asclepiadea*; 5 — *G. cruciata*; 6 — *G. pneumonanthe*;
 7 — *G. verna*.
 М — маркер молекулярних мас

ними праймерами виявлено для *G. lutea* та *G. punctata* (121), меншу — для *G. cruciata* та *G. pneumonanthe* (72), *G. lutea* та *G. asclepiadea* (64) і *G. punctata* та *G. acaulis* (64).

На основі результатів проведеного RAPD-аналізу розраховано генетичні відстані (D_{NL}) за Неєм, Лі (табл. 3). Як видно із наведених даних, показник D_{NL} між дослідженими видами варіював у діапазоні 0,35 — 0,62, а середнє значення дорівнювало 0,54. Найбільш близько-спорідненими видами виявились *G. lutea* — *G. punctata* (0,35). Невеликим було значення D_{NL} між *G. asclepiadea* — *G. lutea* (0,48) та *G. pneumonanthe* — *G. cruciata* (0,50). Генетично віддаленими були види *G. asclepiadea* — *G. cruciata* (0,62), *G. lutea* — *G. cruciata* (0,61) та *G. punctata* — *G. cruciata* (0,60) (див. табл. 3).

Генетичні взаємовідношення між дослідженими видами наведено на дендрограмі (рис. 2). Вибірки розподілилися на два основних кластери: один формували *G. cruciata* і *G. pneumonanthe*, інший — решта видів, які, у свою чергу, утворювали два субкластери. До першого з них входили *G. lutea*, *G. punctata* і *G. asclepiadea*, до другого — *G. acaulis* і *G. verna*. Найбільш близькими за топологією були *G. lutea* та *G. punctata*.

Таблиця 3. Генетичні відстані за Неєм, Лі (Nei, Li, 1979) між дослідженими видами роду *Gentiana* за результатами RAPD-аналізу

Вид	№ п/п	1	2	3	4	5	6	7
<i>G. lutea</i>	1							
<i>G. punctata</i>	2	0,3513	—					
<i>G. acaulis</i>	3	0,5376	0,5458	—				
<i>G. asclepiadea</i>	4	0,4843	0,5397	0,5336	—			
<i>G. cruciata</i>	5	0,6069	0,6026	0,5875	0,6157	—		
<i>G. pneumonanthe</i>	6	0,5320	0,5957	0,5740	0,5218	0,4976	—	
<i>G. verna</i>	7	0,5296	0,5499	0,5316	0,5215	0,5875	0,5403	—

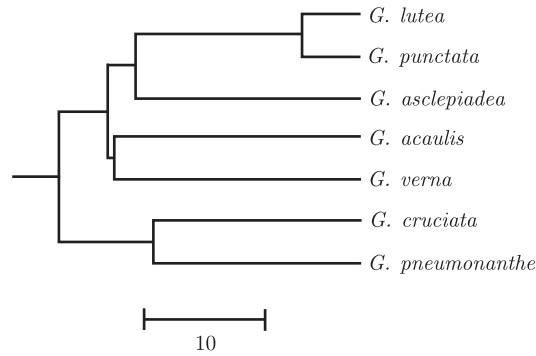


Рис. 2. Дендрограма генетичної подібності тирличів, побудована UPGMA-методом за генетичними відстанями Нея, Лі

Отже, використання методу RAPD-ПЛР дозволило диференціювати на молекулярно-генетичному рівні види тирличів флори України та встановити генетичні взаємозв'язки між ними. Результати дослідження загалом свідчать про віддаленість окремих таксонів роду *Gentiana* L., міжвидова варіабельність у межах якого становила 0,54. Це підтверджується відсутністю фрагментів, спільних для усіх видів, а також невеликою кількістю ампліконів, спільних для певних груп видів у межах дослідженої вибірки. Для порівняння — показники міжвидової варіабельності родів *Lemna* L. та *Irys* L. були меншими і становили 0,37 та 0,33 відповідно [10, 11].

Отримані нами результати оцінки міжвидового поліморфізму представників роду *Gentiana* L. узгоджуються з основними класифікаціями роду, що ґрунтуються на анатомо-морфологічних, онтогенетичних та еколого-географічних критеріях [2–5]. Винятком є розташування на дендрограмі генетичної подібності *G. asclepiadea* (секція *Pneumonanthe*) наближено до видів секції *Gentiana*, а також генетична подібність між видами різних секцій — *G. pneumonanthe* і *G. cruciata* та *G. acaulis* і *G. verna*. Однак ці суперечливі, на перший погляд, результати RAPD-аналізу тирличів підтверджуються даними інших дослідників, отриманими на основі молекулярно-генетичних досліджень різних ділянок ядерного та пластидного геному [12, 13].

Таким чином, нами з використанням RAPD-методу виявлено міжвидовий поліморфізм та встановлено взаємозв'язки між видами *Gentiana* L. флори України. Показано значну генетичну гетерогенність роду та віддаленість його окремих таксонів. Результати RAPD-аналізу тирличів загалом узгоджуються з існуючими класифікаціями та даними інших дослідників. Виявлено унікальні амплікони, що можуть бути використані для видової ідентифікації генотипів *Gentiana*.

1. Страшнюк Н. М., Твардовська М. О., Мельник В. М. Каріологія європейських видів роду *Gentiana* L. // Укр. ботан. журн. – 2008. – **65**, № 6. – С. 836–848.
2. Кузнецов Н. И. Подрод *Eugentiana* Kuhn. рода *Gentiana* Turnefort: систематическая, морфологическая и географическая обработка. – Санкт-Петербург, 1894. – 532 с.
3. Цвелев Н. Н. Семейство *Gentianaceae* // Флора европейской части СССР. – Ленинград: Наука, 1978. – Т. 3. – С. 54–87.
4. Ho T.-N., Liu S.-W. The infrageneric classification of *Gentiana* (*Gentianaceae*) // Bull. Brit. Mus. (Natur. Hist.). Bot. – 1990. – **20**, No 2. – P. 169–192.
5. Tutin T. G. *Gentiana* L. // Flora Europea / Eds. T. G. Tutin, V. H. Heywood et al. – Cambridge: University Press, 1972. – Vol. 3. – P. 59–63.

6. Мельник В. М., Спіридонова К. В., Андреев І. О., Страшнюк Н. М., Кунах В. А. Дослідження геномів деяких видів роду *Gentiana* в природі та в культурі клітин *in vitro* // Цитология и генетика. – 2002. – **36**, № 6. – С. 28–34.
7. Yeh F. C., Rongcai Y., Boyle T. POPGENE. Version 1.31. – Edmonton: Univ. Alberta, 1999.
8. Nei M., Li W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1979. – **76**, No 10. – P. 5269–5273.
9. Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA 3: Integrated software for molecular evolution genetics analysis and sequences alignment // Briefin. Bioinf. – 2004. – **5**. – P. 150–163.
10. Козыренко М. М., Артюкова Е. В., Лауве Л. С., Болтенков Е. В. Аналіз генетической изменчивости каллусных культур некоторых видов рода *Iris* L. // Биотехнология. – 2002. – № 4. – С. 38–48.
11. Мартыросян Е. В., Рыжова Н. Н., Скрябин К. Г. и др. RAPD-анализ геномного полиморфизма у представителей семейства *Letnaceae* (Рясковые) // Генетика. – 2008. – **44**, № 3. – С. 417–422.
12. Gielly L., Taberlet P. A phylogeny of the European gentians inferred from chloroplast *trnL* (UAA) intron sequences // Bot. J. Linn. Soc. – 1996. – **120**. – P. 57–75.
13. Yuan Y.-M., Kupfer Ph., Doyle J. J. Infrageneric phylogeny of the genus *Gentiana* (*Gentianaceae*) inferred from nucleotide sequences of the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA // Amer. J. Bot. – 1996. – **83**, No 5. – P. 641–652.

Інститут молекулярної біології і генетики
НАН України, Київ
Тернопільський національний педагогічний
університет ім. Володимира Гнатюка

Надійшло до редакції 13.10.2008

M. O. Twardovska, N. M. Strashniuk, V. M. Mel'nyk, I. I. Konvaliuk,
Corresponding Member of the NAS of Ukraine **V. A. Kunakh**

RAPD-analysis of the genome polymorphism for some *Gentiana* L. species from Ukrainian flora

*Genetic differences between the members of *Gentiana* L. species from the Ukrainian flora have been found through RAPD-analysis. The level of gentians interspecies polymorphism was determined, and relationships between them were established. The significant genetic heterogeneity of the genus as well as large distances between particular taxa are shown. Unique amplicons valuable for the species identification of *Gentiana* genotypes are detected.*