УДК 582.746.56:595.782:539.107

© 2011

В. Г. Спиридонов, М. Ф. Парій, Ж. В. Вдовиченко, Т. Л. Демчук,
член-кореспондент НАН України **І. П. Григорюк**

Застосування методу поліморфізму довжини ампліфікованих фрагментів для аналізу видів і гібридів роду гіркокаштан (*Aesculus* L.) з різною стійкістю до каштанової мінуючої молі (*Cameraria ohridella* Deschka et Dimiĉ)

Проведено молекулярно-генетичні дослідження довжини ампліфікованих рестрикційних фрагментів видів і гібридів роду гіркокаштан з використанням трьох комбінацій праймерів у селективній полімеразній ланцюговій реакції. Встановлено характерний спектр фрагментів для кожного генотипу гіркокаштана з метою їх ідентифікації. Виявлено фрагменти-кандидати на роль маркера стійкості видів і гібридів роду гіркокаштан до каштанової мінуючої молі.

У міських урбанізованих умовах зелені каштанові насадження є унікальним природним фільтром у доочищенні атмосфери, води і грунту від промислових, побутових та сільськогосподарських забруднень. Вони формують ландшафти, виконують важливу екосферну і естетичну функції, мають вагоме лікувальне, архітектурне та народногосподарське значення [1, 2]. Підраховано, що одне дерево гіркокаштана звичайного віком 25–30 років очищує від автомобільних вихлопних газів 20 тис. м^3 повітря і не втрачає своєї декоративності. Також доведено, що 1 га каштанових зелених насаджень за вегетаційний період поглинає в середньому 5,9–9,5 т вуглекислого газу і виділяє в атмосферу 4,3–6,9 т кисню [3]. Однак деякі види рослин роду гіркокаштан поступово вичерпують свій адаптивний потенціал і нерідко гинуть від промислового забруднення полютантами, посухи, високих температур, хвороб та шкідників.

Нині одним з найагресивніших шкідників, який уражує рослини гіркокаштана звичайного в країнах Європи і в Україні, є каштанова мінуюча міль *(Cameraria ohridella* Deschka et Dimiĉ) [4] — вид метеликів, який належить до ряду лускокрилих (Lepidoptera) та родини молей-строкаток (Gracillariidae). Гусениці каштанової мінуючої молі першого, другого і третього віку проникають під кутикулу в шар клітин верхнього епідермісу листка й живляться лише соком, гусениці четвертого та п'ятого віку — тільки тканинами палісадної паренхіми листкової пластинки рослин [4, 5]. За таких умов відбувається гальмування процесів фотосинтезу, енергозабезпечення, росту і розвитку, біосинтезу хлорофілу, фітогормонів, ліпідів, надходження елементів мінерального живлення з кореневої системи в надземну, що прискорює старіння та зниження продуктивності рослин гіркокаштана звичайного [1]. Наші попередні дослідження показують, що відміни в типі живлення гусениць різного віку залежать від форми і розмірів мін, активності провідних тканин, pH, кількісного та якісного складу клітинного соку, умов зволоження протягом вегетаційного періоду рослин.

Каштанова мінуюча міль — найнебезпечніший, адвентивний і обмежено поширений інвазійний чужорідний вид, для якого характерна наявність достатньої кормової бази, відсутність природних ворогів та висока швидкість розселення ареалу, що завдає значної шкоди

зеленим деревним насадженням гіркокаштана звичайного [5]. Стає очевидним, що значна кількість видів роду гіркокаштан, які зростають у грунтово-кліматичних умовах України, не витримує шкідливого впливу каштанової мінуючої молі, у результаті відбувається розхитування спадковості, що пов'язано з нестабільністю геному рослин. З цієї причини організація і функціонування геному видів та гібридів роду гіркокаштан залишаються недостатньо дослідженими. Це стримує ефективну селекцію та застосування різноманіття генофонду рослин для озеленення міських територій [6–8].

Ступінь вивчення геному гіркокаштана звичайного обумовлений значною мірою наявністю широкого спектра генетичних маркерів, побудованих на їх основі генетичних карт та визначеністю ДНК-послідовності геному конкретного виду рослин. Отже, пошук генетичних маркерів є одним з найпріоритетніших завдань генетики і селекції видів роду гіркокаштан. Останнім часом широкого поширення набули ДНК-маркери, які виявилися зручними, інформативними і надійними, причому дають змогу проводити порівняльну оцінку за бажаними ознаками впродовж онтогенезу рослин. Застосування певного типу ДНК-маркерів обумовлено ступенем вивчення геному рослин. У разі обмежених відомостей щодо нуклеотидної послідовності найвиправданішим є використання методу поліморфізму довжини ампліфікованих фрагментів (Amplified Fragment Length Polymorphism) [9]. Даний тип ДНК-маркерів не вимагає наявності інформації щодо ДНК-послідовності геному і дає змогу з високою точністю оцінювати відмінності між близькоспорідненими організмами, проводити їх ідентифікацію та паспортизацію. Наразі застосування ДНК-маркерів є перспективним для ідентифікації окремих видів, форм і гібридів роду гіркокаштан, які можуть бути тісно зчеплені з генами продуктивності, цінних декоративних ознак, стійкості до хвороб, шкідників та стресових факторів середовища, що робить їх незамінними інструментами в селекції.

У зв'язку з вищесказаним вагомого значення набуває проблема пошуку маркерів генів стійкості видів і гібридів рослин роду гіркокаштан до каштанової мінуючої молі, що потребує тривалого часу. Наявні методи молекулярної біології дають можливість істотно скорочувати етапи відбору і одержання найстійкіших деревних рослин з необхідними ознаками за рахунок використання генетичного маркера цінного гена.

Нами проведено апробацію методу поліморфних ампліфікованих рестрикційних фрагментів ДНК, генотипування і пошук фрагментів-кандидатів на роль маркера гена стійкості видів та гібриду рослин роду гіркокаштан до каштанової мінуючої молі.

Об'єктами дослідження були листки нестійких до каштанової молі рослин гіркокаштана звичайного (*Aesculus hippocastaum* L.) та гіркокаштана звичайного, форма Баумані (*A. hippocastanum*, f. Baumanii C. K. Schneid) і стійких до каштанової молі рослин гіркокаштана восьмитичинкового, або жовтого (*A. octandra* Marsh.), гіркокаштана червоного, або павії (*A. pavia* L.) та гіркокаштана гібридного (*A. hibrida* D. C.) — (*A. hippocastaum* L. x *A. octandra* Marsh.). Для аналізу відбирали листки з нижнього, середнього і верхнього ярусів рослин у фазу повного цвітіння в 2008–2009 рр., які зростають в екологічно чистій зоні на території Національного ботанічного саду ім. М. М. Гришка НАН України.

Виділення ДНК з тканин листків проводили за методом сорбції ДНК на сорбенті SiO_2 [10].

Для одержання поліморфних ампліфікованих фрагментів необхідною умовою є проведення рестрикції геномної ДНК об'єкта, лігування рестрикційних фрагментів з адаптерами (олігонуклеотидами з відомою послідовністю), пре-полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з праймерами, які комплементарні до адапторів з одним додатковим нуклеотидом на $3'$-кінці

та селективної ПЛР з обраними комбінаціями праймерів з трьома додатковими нуклеотидами на 3′-кінці. Один з пари праймерів, що застосовували в селективній ПЛР, був зв'язаний з флуоресцентним барвником. Надалі отримані ампліфіковані фрагменти піддавали фрагментарному аналізу.

Як рестрикційні ендонуклеази застосовували ферменти *Eco RI* і *Mse I*. Ампліфікацію проводили у два етапи: на першому етапі використовували праймери з одним додатковим нуклеотидом на 3′-кінці (Eco RI-basic, Mse I-basic), на другому — з трьома додатковими нуклеотидами, з метою підсилення селективності ПЛР. Наявні такі послідовності адапторів і праймерів:

E-adapter 1	5′-CTC GTA GAC TGC GTA CC-3′
E-adapter 2	5′-AAT TGG TAC GCA GTC TAC-3′
M-adapter 1	5′-GAC GAT GAG TCC TGA G-3′
M-adapter 2	5′-TAC TCA GGA CTC AT-3′
Eco RI-basic	5′-GAC TGC GTA CCA ATT CA-3′
Mse I-basic	5′-GAT GAG TCC TGA GTA AC-3′
Mse I-CAA	5′-GAT GAG TCC TGA GTA ACC AA-3′
Mse I-CAC	5′-GAT GAG TCC TGA GTA ACC AC-3′
Eco RI-AAC-FAM	5′-FAM-GAC TGC GTA CCA ATT CAA AC-3′
Eco RI-AGC-FAM	5′-FAM-GAC TGC GTA CCA ATT CAA GC-3′
Eco RI-AT-Tamra	5′-Tamra-GAC TGC GTA CCA ATT CAA T-3′

Для селективної ПЛР нами застосовано три комбінації праймерів: I — Mse I-CAA + Eco RI-AAC-FAM; II — Mse I-CAA + Eco RI-AGC-FAM; III — Mse I-CAA + Eco RI-AT-Tamra.

Оцінку довжини отриманих фрагментів здійснювали за допомогою капілярного електрофорезу на генетичному аналізаторі Applied Biosystems 3130, а аналіз даних — у програмі Gene Mapper v3.7.

Відомо, що каріотип досліджуваних видів гіркокаштана містить 40 хромосом [11]. Використані нами для селективної ПЛР комбінації праймерів виявили широкий спектр фрагментів ДНК. Зокрема, праймери з двома і трьома додатковими нуклеотидами на 3′-кінці виявились придатними для даного каріотипу (рис. 1).

У проведених дослідженнях зафіксовано спектр фрагментів ДНК (табл. 1, 2, 3), серед яких переважала значна кількість поліморфних, що цілком достатньо для ідентифікації кожного з видів рослин роду гіркокаштан. Загалом для трьох комбінацій праймерів визначено 75 фрагментів, з яких 66 є поліморфними. Для I комбінації праймерів виявлено 20 фрагментів (18 з яких поліморфні), для II — 41 (35 з яких поліморфні), для III — 14 (13 з яких поліморфні). У даному випадку найінформативнішою виявилася комбінація праймерів II (Mse I-CAA + Eco RI-AGC-FAM).

Для рослин гіркокаштана восьмитичинкового, або жовтого, за трьома комбінаціями праймерів встановлено 28 фрагментів (3, 21 і 4 для комбінацій I, II та III), гіркокаштана звичайного — 41 (10, 25 і 6), гіркокаштана звичайного, форма Баумані — 42 (12, 20 і 10), гіркокаштана червоного, або павії — 65 (17, 35 і 13) та гіркокаштана гібридного — 41 (12, 21 і 8). Найінформативнішими застосовані комбінації праймерів виявилися для рослин гіркокаштана червоного, або павії. Відносно невелика кількість фрагментів для рослин гіркокаштана восьмитичинкового, або жовтого, вимагає добору інформативніших комбіна-

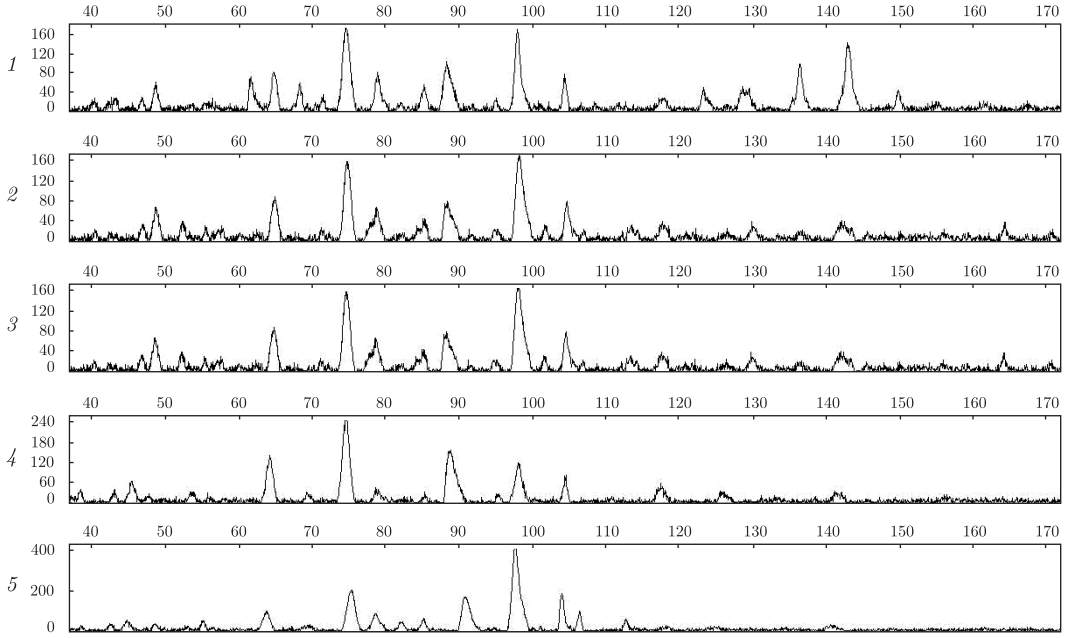

Рис. 1. Електрофореграма видів і гібриду роду гіркокаштан з використанням комбінації праймерів Mse I-CAA + Eco RI-AT-Tamra (III): *1* — гіркокаштан восьмитичинковий, або жовтий; *2* — гіркокаштан звичайний; *3* — гіркокаштан червоний, або павія; *4* — гіркокаштан звичайний, форма Баумані; *5* — гіркокаштан гібридний (гіркокаштан звичайний × гіркокаштан восьмитичинковий, або жовтий)

ції праймерів за умов подальшого дослідження даного виду, в якого не було зафіксовано жодного видоспецифічного фрагмента.

Для рослин гіркокаштана звичайного видоспецифічними виявилися фрагменти завдовжки 116 і 222 п. н. у комбінації праймерів II, водночас у гіркокаштана звичайного, форма Баумані, фрагмента завдовжки 222 п. н. не виявлено. Для гіркокаштана червоного, або павії, видоспецифічними були фрагменти завдовжки 114, 132, 155, 162 і 310 п. н. для комбінації праймерів I; 117, 169, 200, 228, 370 та 376 п. н. для комбінації праймерів II та 275 п. н. для комбінації праймерів III. Значна кількість видоспецифічних фрагментів у рослин гіркокаштана червоного, або павії, свідчить про більшу генетичну відокремленість цього виду від інших, зокрема гіркокаштана восьмитичинкового, або жовтого, та гіркокаштана звичайного, які за спектром ампліфікованих фрагментів найподібніші між собою.

У процесі експерименту нами виділено послідовності ДНК, які характерні лише для стійких до каштанової мінуючої молі рослин видів роду гіркокаштан. Це, наприклад, фрагменти завдовжки 96, 145 і 226 п. н. для комбінації праймерів II та 105 п. н. для комбінації праймерів III. Отже, існує висока імовірність виявлення тісно зчепленого маркера з геном стійкості видів роду гіркокаштан до каштанової мінуючої молі. Однак у разі необхідності можливим є застосування інших комбінацій праймерів з метою отримання більшої кількості поліморфних фрагментів та підвищення ймовірності виявлення тісно зчепленого маркера стійкості рослин до каштанової мінуючої молі. Подальша стратегія пошуку генетичного маркера передбачає отримання гібридних поколінь роду гіркокаштан та оцінку зчепленості поліморфних фрагментів з геном стійкості.

Таким чином, нами проведено молекулярно-генетичні дослідження довжини ампліфікованих рестрикційних фрагментів для видів і гібриду роду гіркокаштан з використанням

Таблиця 1. Спектр ампліфікованих рестрикційних фрагментів, виявлених для комбінації праймерів Mse I-CAA + Eco RI-AAC-FAM (I)

Види та гібрид роду гіркокаштан	Алелі, п. н.																			
Гіркокаштан восьмитичинковий, або жовтий	51	55							79											
Гіркокаштан звичайний	51	55	58	65		71	74	77	79			94		119						
Гіркокаштан червоний, або павія	51	55		65	67	71		77	79	83	86	94	114		125	132	155	162	239	310
Гіркокаштан звичайний, форма Баумані	51	55	58		67	71	74	77	79		86	94		119	125					
Гіркокаштан гібридний (гіркокаштан звичайний × × гіркокаштан восьмитичинковий, або жовтий)	51	55	58		67	71	74	77		83	86	94		119					239	

Таблиця 2. Спектр ампліфікованих рестрикційних фрагментів, виявлених для комбінації праймерів Mse I-CAA + Eco RI-AGC-FAM (II)

Види та гібрид роду гіркокаштан	Алелі, п. н.																				
Гіркокаштан восьмитичинковий, або жовтий	52	54	57	60		67	70				77			86	89	92	96	100		108	
Гіркокаштан звичайний	52	54	57	60	64	67	70		73	75	77	80	81	86	89	92		100		108	
Гіркокаштан червоний, або павія		54	57	60	64	67	70	72	73	75	77	80				92	96	100	105	108	
Гіркокаштан звичайний, форма Баумані		54	57		64	67	70	72	73	75	77	80	81	86	89	92		100	105		
Гіркокаштан гібридний (гіркокаштан звичайний × × гіркокаштан восьмитичинковий, або жовтий)	52	54	57	60	64		70	72		75	77		81			92	96	100	105		
Гіркокаштан восьмитичинковий, або жовтий						133	137	140	142	145	147						226		232		
Гіркокаштан звичайний	113	116		119	122	133	137				147					222					
Гіркокаштан червоний, або павія	113		117	119	122	133	137	140	142	145	147	150	157	169	200		226	228	232	370	376
Гіркокаштан звичайний, форма Баумані		116							142		147	150									
Гіркокаштан гібридний (гіркокаштан звичайний × × гіркокаштан восьмитичинковий, або жовтий)		116				133	137			145	147		157				226				

Таблиця 3. Спектр ампліфікованих рестрикційних фрагментів, виявлених для комбінації праймерів Mse I-CAA + Eco RI-AT-Tamra (III)

Види та гібриди гіркокаштана звичайного	Алелі, п. н.													
Гіркокаштан восьмитичинковий, або жовтий			75			98	105		143					
Гіркокаштан звичайний	63		75	78	85	98		141						
Гіркокаштан червоний, або павія		72	75	78	85	98	105	141	143	193	199	234	253	275
Гіркокаштан звичайний, форма Баумані	63	72	75	78	85	98	105	141				234	253	
Гіркокаштан гібридний (гіркокаштан звичайний × × гіркокаштан восьмитичинковий, або жовтий)	63	72		78	85	98	105			193	199			

трьох комбінацій праймерів у селективній ПЛР. У результаті виявлено характерний спектр фрагментів для кожного з п'яти генотипів роду гіркокаштан, який придатний для їх ідентифікації. Визначено також фрагменти-кандидати на роль молекулярного маркера стійкості видів і гібриду рослин роду гіркокаштан до каштанової мінуючої молі.

1. *Григорюк І. П., Машковська С. П., Яворовський П. П., Колесніченко О. В.* Біологія каштанів. – Київ: Логос, 2004. – 380 с.
2. *Григорюк І. П., Мельничук М. Д., Машковська С. П.* Каштан – історичний символ Києва. – Київ: ПоліграфКонсалтинг, 2006. – 212 с.
3. *Соколов В. Б.* Каштан. – Москва: Лесн. пром-ть, 1984. – 80 с.
4. *Зерова М. Д., Никитенко Г. Н., Нарольский Н. Б. и др.* Каштановая минирующая моль в Украине. – Киев: ТОВ "Велес", 2007. – 87 с.
5. *Трибель С. О., Гаманова О. М., Свєнтославскі Я.* Каштанова мінуюча міль. – Київ: Колобіг, 2008. – 72 с.
6. *David T. T., Adjoa R. A., Charles F. W. et al.* Genetic analysis of a broad hybrid zone in *Aesculus* (Sapindaceae): is there evidence of long-distance pollen dispersal? // Int. J. Plant Sci. – 2008. – **9**, No 5. – P. 647–657.
7. *Harris A. J., Xiang Qiu-Yun, Thomas D. T.* Phylogeny, origin, and biogeographic history of *Aesculus* L. (Sapindales) – an update from combined analysis of DNA sequences, morphology and fossils // Taxon. – 2009. – **58**, No 1. – P. 108–126.
8. *Sarah G., Bridget L., Carl G. F. et al.* Infection of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum*) by Pseudomonas syringae pv. aesculi and its detection by quantitative real-time PCR // Plant Pathology. – 2009. – **58**. – P. 731–744.
9. *Vos P., Hogers R., Bleeker M. et al.* AFLP: a new technique for DNA fingerprinting // Nucl. Acids Res. – 1995. – **23**, No 21. – P. 4407–4114.
10. *Boom R., Sol C. J. A., Salimans M. M. M. et al.* Rapid and simple method for purification of nucleic acids // J. Clin. Microb. – 1990. – **28**, No 3. – P. 495–503.
11. *Хромосомные* числа цветковых растений. – Ленинград: Наука, 1969. – 928 с.

Українська лабораторія якості і безпеки продукції АПК НУБіП України, Київ
Навчально-науковий інститут охорони природи і біотехнологій НУБіП України, Київ

Надійшло до редакції 24.06.2010

V. G. Spyrydonov, M. F. Parii, Zh. V. Vdovychenko, T. L. Demchuk,
Corresponding Member of the NAS of Ukraine **I. P. Grygoryuk**

The method of amplified fragment length polymorphism and its application to the analysis of species and hybrids of *Aesculus* L. with different resistances to *Cameraria ohridella* Deschka et Dimiĉ

The molecular-genetic research of the amplified fragment length polymorphism (AFLP) of species and hybrids of Aesculus L. have been done. The representative spectrum of fragments for each genotype of Aesculus L. has been explored. The fragment-candidate to a molecular marker of the resistance of species and hybrids of Aesculus L. to Cameraria ohridella Deschka et Dimiĉ has been proposed.