

АНАЛІЗ ФІЛОГЕНЕТИЧНИХ ЗВ'ЯЗКІВ РОДУ *AESCULUS* L. ЗА ДОПОМОГОЮ IRAP-PCR

К. Є. ШАВАНОВА, асистент

Д. О. КИСЕЛЬОВ, аспірант*

Т. М. ЧЕЧЕНЄВА, доктор біологічних наук

*Виявлені поліморфні ампліфікони, розраховані показники середньої гетерозиготності, частоти зустрічання алелів, ефективної кількості алелів, інформаційний коефіцієнт Шенона, генетичні дистанції за Неєм свідчать про суттєве розмаїття генетичного матеріалу в межах роду *Aesculus* L. та можливість ефективного ДНК-профілювання генотипів гіркокаштанів за допомогою IRAP-PCR.*

Ключові слова: *Aesculus* L., філогенетичні зв'язки, IRAP, PCR

Сучасне розповсюдження рослин роду *Aesculus* L. охоплює чотири з семи основних центрів походження культурних рослин: Південно-Західний, Південно-Східний, Середземноморський та Центральноамериканський. Рід *Aesculus* L. складається з тринадцяти видів, численних сортів і природних гібридів, поширених у північній півкулі, переважно в районах з помірним кліматом [2].

Нині можна виділити три відокремлених ареали роду *Aesculus* L., кожен з яких має ендемічні види. Перший ареал знаходиться в Середземномор'ї і на Балканському півострові, де зростає тільки один вид – *A. hippocastanum* L., другий – у Східній і Центральній Азії, куди входять *A. punduana* Wall. із Гімалаїв, *A. chinensis* Bl. – Японії, третій – в Північній Америці, де ростуть *A. glabra* Willd., *A. octandra* Marsh., *A. californica* Nutt [7, 8].

* Науковий керівник – доктор біологічних наук Т. М. Чеченєва
«Наукові доповіді НУБіП» 2011-7 (23) http://www.nbu.gov.ua/e-journals/Nd/2011_7/11skegai.pdf

В Україні інтродуковано 10 видів та гібридів гіркокаштанів із Південно-Східної Європи, Північної Америки, Східної Азії і Гімалаїв, які були введені в культуру в період 1557–1913 рр. [2].

Тепер рослини роду *Aesculus* L. використовуються в основному в ландшафтному дизайні, адже належать до кращих декоративних видів, що цвітуть навесні і влітку.

Для роду *Aesculus* L. характерні різні рослинні форми, починаючи з великих дерев, таких як *A. hippocastanum*, *A. turbinata*, *A. indica* та *A. flava* і закінчуючи чагарниковими рослинами *A. parryi*, *A. parviflora*, *A. pavia*. За морфологічними ознаками види об'єднали в п'ять секцій: *Aesculus*, *Calothyrsus*, *Macrothyrsus*, *Parryana*, *Pavia* [5, 7].

Метою роботи було встановлення філогенетичних зв'язків видів у межах роду *Aesculus* L з використанням молекулярно-генетичних методів.

Матеріали і методика дослідження. Філогенетичні взаємозв'язки восьми видів і гібридів роду *Aesculus* L., інтродукованих в Україні, досліджували за допомогою IRAP-PCR з використанням праймера до консервативної ділянки довгих кінцевих повторів (LTRs) соєвого ретротранспозону SIRE-1 [6].

Експерименти проводили на базі Національного університету біоресурсів і природокористування України впродовж 2007-2009 рр.

Вихідним матеріалом для вивчення філогенетичних зв'язків видів і гібридів роду *Aesculus* L. (*A. hippocastanum* Baumannii, *A. hippocastanum* L., *A. carnea* Hayne., *A. pavia* L., *A. octandra* Marsh., *A. parviflora* Walt., *A. glabra* Willd., *A. hybrida* D. C.) був рослинний матеріал зі штучних гіркокаштанових насаджень України (м. Київ, Львів, Ялта) по 30 рослин у вибірці.

ДНК для здійснення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) виділяли з етильованих пагонів гіркокаштанів ЦТАБ методом [3, 4]. Ампліфікацію проводили в 20 мкл реакційної суміші, яка складалася з 10 mM TRIS-HCl, 50 mM KCl, 2,0 mM хлориду магнію (MgCl₂), 2 mM кожного з чотирьох дезоксинуклеотидтрифосфатів (dNTP), 0,2 мкл праймера, 1 од. акт. Taq ДНК «Наукові доповіді НУБіП» 2011-7 (23) http://www.nbu.gov.ua/e-journals/Nd/2011_7/11skegai.pdf

полімерази та 100 – 120 нг геномної ДНК. Умови ПЛР включали початкову денатурацію 95° С – 5 хв і 35 послідовних циклів: 95° С – 30 с, 58° С – 30 с, 72° С – 2 хв 30 с. Кінцева елонгація 72° С – 7 хв.

Продукти ампліфікації геномної ДНК гіркокаштанів аналізували за допомогою електрофорезу в агарозному 2,0 %-вому гелі з додаванням 0,5 мкг/мл бромистого етидію в трис-ацетатному буфері при напрузі електричного поля 2В/см впродовж 7-8 годин [1, 3].

Кожну реакцію ампліфікації проводили в трьох повтореннях для визначення рівня відтворюваності експериментальних даних.

Результати досліджень опрацьовували за допомогою пакета програмного забезпечення TotalLab v2.01 та POPGENE 1.31. При цьому кожний ампліфікаційний фрагмент, який є анонімною геномною послідовністю, фланкованою IRAP-праймером, вважали домінантним алелем окремого локусу, ампліфікаційні фрагменти однакової молекулярної маси, відтворювані в спектрах різних ліній, – ідентичними, відсутність – рецесивним алелем відповідного локусу.

Результати дослідження та їх обговорення. Розміри продуктів ампліфікації варіювали в межах 150 – 2000 п.н. У спектрі ампліфікації спостерігали 25 фрагментів, з яких 70 % поліморфні, що свідчить про молодий вік та високу активність досліджуваного ретротранспозону. Типова електрофореграма IRAP-PCR аналізу показана на рис. 1.

М 1 2 3 4 5 6 7 8

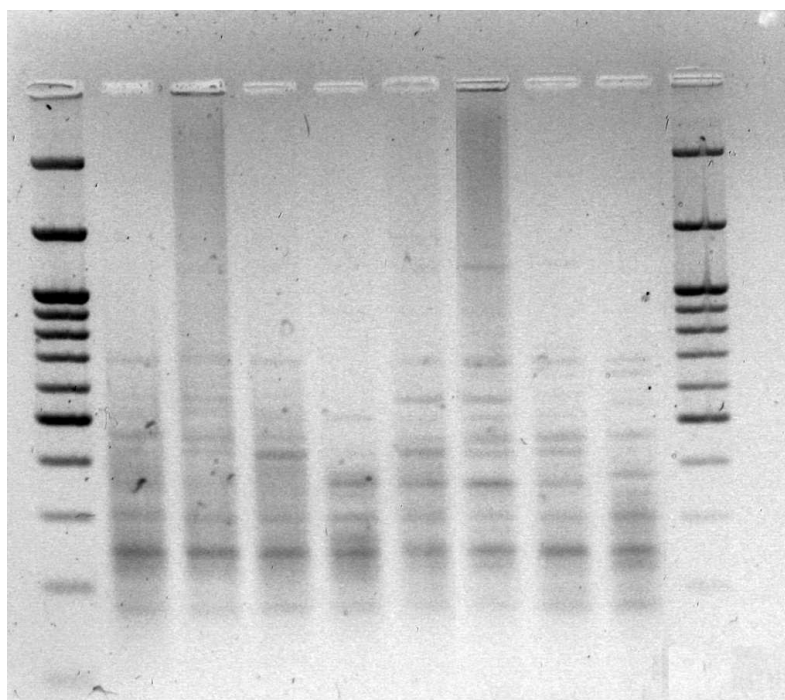


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації різних видів і гібридів гіркокаштанів з праймером SIRE-1: М – маркер молекулярних мас 100 bp + 1,5 Kb + 2 Kb, 1 – *A. hippocastanum* Baumannii, 2 – *A. hippocastanum* L., 3 – *A. carnea* Hayne., 4 – *A. pavia* L., 5 – *A. octandra* Marsh., 6 – *A. parviflora* Walt., 7 – *A. glabra* Willd., 8 – *A. hybrida* D. C.

За результатами аналізу поліморфних IRAP локусів у восьми видів і гібридів гіркокаштанів визначали генетичні дистанції за Неєм та Лі [9]. Цей показник розглядався нами як міра генетичного різноманіття, яка для об'єктів, що вивчалися, становить 0,2231 – 0,6931. Це свідчить про значну генетичну гетерогенність досліджуваного роду. Розрахунки генетичної подібності та дистанцій наведені в табл.

Коефіцієнти генетичної подібності (над діагоналлю) та генетичної дистанції (під діагоналлю) між різними видами гіркокаштанів

Види гіркокаштанів	<i>A. hippocastanum</i> Baumannii	<i>A. hippocastanum</i> L.	<i>A. carnea</i> Hayne.	<i>A. pavia</i> L.	<i>A. octondra</i> Marsh.	<i>A. parviflora</i> Walt.	<i>A. glabra</i> Willd.	<i>A. hybrida</i> D. C.
<i>A. hippocastanum</i> Baumannii	****	0.6500	0.7500	0.6000	0.6000	0.6000	0.5000	0.7000
<i>A. hippocastanum</i> L.	0.4308	****	0.8000	0.5500	0.7500	0.7500	0.7500	0.5500
<i>A. carnea</i> Hayne.	0.2877	0.2231	****	0.6500	0.6500	0.7500	0.7500	0.7500
<i>A. pavia</i> L.	0.5108	0.5978	0.4308	****	0.6000	0.5000	0.6000	0.6000
<i>A. octondra</i> Marsh.	0.5108	0.2877	0.4308	0.5108	****	0.7000	0.8000	0.5000
<i>A. parviflora</i> Walt.	0.5108	0.2877	0.2877	0.6931	0.3567	****	0.8000	0.7000
<i>A. glabra</i> Willd.	0.6931	0.2877	0.2877	0.5108	0.2231	0.2231	****	0.6000
<i>A. hybrida</i> D. C.	0.3567	0.5978	0.2877	0.5108	0.6931	0.3567	0.5108	****

Аналіз розрахованих генетичних дистанцій за Nei, проведений методом незваженого парногрупового кластерного аналізу (UPGMA), дозволив систематизувати досліджувані зразки (рис. 2).

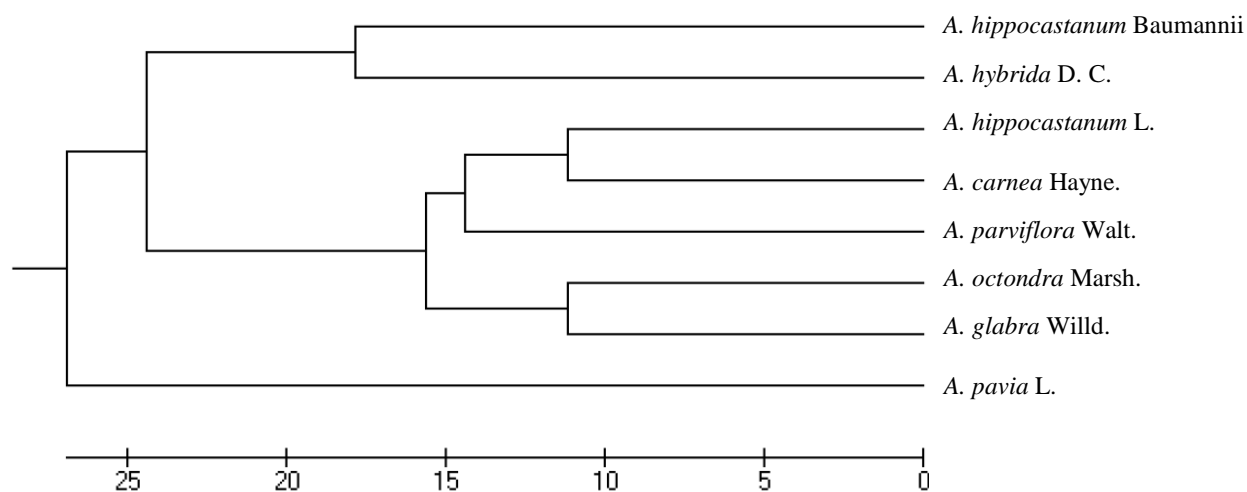


Рис. 2. Дендрограма філогенетичних зв'язків між видами і гібридами роду *Aesculus* L., побудована на основі даних IRAP-PCR аналізу.

Як видно з результатів проведеного кластерного аналізу та дендрограми філогенетичних зв'язків, генетично найвіддаленішими серед досліджуваних видів і гібридів виявилися *A. glabra* Willd. і *A. hippocastanum* Baumannii, *A.*

parviflora Walt. та *A. pavia* L., *A. hybrida* D. C. і *A. octonadra* Marsh., найспорідненішими – *A. carnea* Hayne. і *A. hippocastanum* L., *A. glabra* Willd. та *A. octonadra* Marsh., *A. glabra* Willd. і *A. parviflora* Walt, що підтверджує розподіл видів за ареалами походження і розповсюдження.

Для оцінки алельної різноманітності локусів використано показники частоти зустрічання алелів ($n_a=1,8$) та ефективної кількості алелів ($n_e=1,5106$). Зважаючи на те, що максимальна кількість алелів на локус для методу IRAP-PCR становить два, отримані показники свідчать про досить високий рівень алельного варіювання у вибірці. Інформаційний коефіцієнт Шенона для цієї маркерної системи становить $I=0,4414$, що свідчить про досить високу інформативність використаного маркера. Це доводить можливість ефективного ДНК-профілювання генотипів гіркокаштанів досліджуванним методом.

Для оцінки генетичної різноманітності восьми видів і гібридів роду *Aesculus* L. розрахували середню гетерозиготність, яка дорівнювала 0,2969, а середня очікувана гетерозиготність – 0,341. Це свідчить про те, що від 29,7% до 34,1% виявлених локусів знаходяться в гетерозиготному стані.

Висновки. Встановлено, що у вибірці з восьми видів і гібридів роду *Aesculus* L., інтродукованих в Україні, рівень генетичного різноманіття, визначений за допомогою IRAP-PCR (праймер SIRE-1), досить високий, що свідчить про перспективність подальшого використання цього методу для уточнення систематики гіркокаштанів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Анализ генома. Методы; [пер. с англ.] / Под ред. К. Девиса. – М.: Мир, 1990. – 246 с.
2. Григорюк І. П. Біологія каштанів / І. П. Григорюк, С.П. Машковська, П. П. Яворовський – К.: Логос, 2004. – 380 с.
3. Сиволап Ю.М. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях / Ю.М. Сиволап – К.: Аграрна наука, 1998. – 156 с.

4. Шаванова К.Є. Оптимізація умов екстракції та ампліфікації ДНК гіркокаштанів (рід *Aesculus L.*) ISSR-методом / К.Є. Шаванова, Д.О. Кисельов, Т.М. Чеченева // Физиология и биохимия культурных растений. – 2010. – Т. 42, №3. – С. 251 – 255.

5. Шаванова К.Є. Аналіз філогенетичних зв'язків роду *Aesculus L.* / К.Є. Шаванова, Д.О. Кисельов, Т.М. Чеченева // Сучасна біотехнологія сільськогосподарських рослин та біобезпека (Геном рослин VI): тези VI Міжнародної конференції (Одеса, 7-10 вересня, 2010 р.). – Одеса, 2010 – С. 66.

6. Bhat K.V. Molecular markers for characterization and identification of genetic resources of perennial crops / K.V. Bhat, S. Lakhanpaul, N. Chandel // Molecular genetic techniques for plant genetic resources. IPRGI report. – 1997. – P. 107 – 117.

7. Hardin J. Species of the old world. Studies in the Hippocastanaceae. / J. Hardin. Brittonia. – 1960. – P. 26 – 38.

8. Lewontin Richard C. The Genetic Basis of Evolutionary Change. / Lewontin Richard C. Columbia University Press, 1974. – 425p.

9. Nei M. Molecular population genetics and evolution / M. Nei – Amsterdam: North-Holland, Publ.Comp., 1975. – 360p.

АНАЛИЗ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИХ СВЯЗЕЙ РОДА *AESCULUS L.* ПРИ ПОМОЩИ IRAP-PCR

Е. Е. Шаванова, Д. А. Киселёв, Т. Н. Чеченева

*Обнаруженные полиморфные ампликоны, рассчитанные показатели средней гетерозиготности, частоты встречаемости аллелей, эффективного количества аллелей, информационный коэффициент Шеннона, генетические дистанции по Ню свидетельствуют о существенном генетическом разнообразии генетического материала в роде *Aesculus L.* и возможности эффективного ДНК-профилирования генотипов каштана конского при помощи IRAP-PCR.*

Aesculus L., филогенетические связи, IRAP, PCR

**ANALYSIS OF PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS OF THE GENUS
AESCULUS L. BY IRAP-PCR**

K. E. Shavanova, D. O. Kiselev, T. N. Checheneva

Identified polymorphic amplifcons, calculated index of average heterozygous, observed number of alleles, effective number of alleles, Shannon's information index, Nei's genetic distance indicate significant diversity of genetic material in the genus Aesculus L. and opportunities for effective DNA- profiling of horse chestnut genotypes by IRAP-PCR.

Aesculus L., phylogenetic relationships, IRAP, PCR