

**BONDUS R.O., KHARCHENKO YU.V.**

*Ustimivka Experimental Station of Plant Production Plant Production Institute nd. a. V.Y. Yuriev NAASU Ukraine, 39074, Poltava region, Globyno district, v. Ustimivka, e-mail: udsr@ukr.net*

#### **ANALYSIS AND EVALUATION OF GENETIC RESOURCES POTATO ON USTIMOVKA EXPERIMENTAL STATION OF PLANT PRODUCTION**

**Aims.** Storing, updating and genetic study of a collection of potatoes. Vyd-ing sources of agronomic traits, forming attribute and other collective practical selection for this use. **Methods.** Learning and maintaining co-lecture samples potatoes in a state of viability and genetic authenticity conductivity reproduced by conventional methods in potato. Information system (IS) «Gene pool plant» provides online access to information about users of the genetic diversity of plants, including potatoes, which is Ustimovka Experimental Station of Plant Production and NCPGRU entre. **Results.** Variety collection potatoes Ustimovka Experimental Station of Plant Production presented samples of 30 countries. For biological status of potato samples to share yutsya local and selected varieties. The whole volume collection of potatoes (620 samples) SFO-rmovana passport database. **Conclusions.** Formed and registered in NCPGRU 5 feature collections and 11 valuable samples isolated source of agronomic traits that are transmitted to the scientific institutions of Ukraine with a view to their inclusion in breeding programs potato.

**Key words:** potato gene pool of plants, collection, introduction, varieties, sources of state-implicitly-valuable traits.

**БУБЛИК О.М., АНДРЕЄВ І.О., ПАРНІКОЗА І.Ю., ТРОЇЦЬКА Т.Б., КУНАХ В.А.**

*Інститут молекулярної біології і генетики НАН України*

*Україна, 03680, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 150, e-mail: o.m.bublyk@imbg.org.ua*

#### **КОМПЛЕКСНА ОЦІНКА СТАНУ ПОПУЛЯЦІЙ *IRIS PUMILA* L. УКРАЇНИ**

*Iris pumila* L. (*Iridaceae*) – декоративний та селекційно-цінний вид, типовий степовий ксерофіт флори України, первинний ареал якого на території України, ймовірно, охоплював всю степову і південь лісостепової зони, а також гірського Криму. Внаслідок тотального розорювання степів (кінець XVIII ст.) ареал виду зазнав значного скорочення і фрагментації. Наразі популяції виду піддаються значному антропогенному навантаженню, що за останні десятиріччя викликало зменшення чисельності окремих локалітетів. *I. pumila* охороняється на території ряду областей України.

Метою роботи було вивчення наслідків фрагментації ареалу та ізоляції для популяцій

*I. pumila* та визначення показників, які можуть стати своєчасним сигналом загрози зникнення виду. Сучасний підхід до оцінки загрози генетичної ерозії поряд із аналізом низки таких традиційних показників як рівень внутрішньовидової диференціації (наявність рас, екотипів або підвидів); розмір популяцій, їх кількість та ізоляція; екологічна амплітуда; частота статевого розмноження, передбачає також безпосередній аналіз генетичного поліморфізму за маркерними локусами (ізоферментними або ДНК) [1]. Тому для характеристики стану природних популяцій *I. pumila* ми поєднали еколого-популяційні дослідження разом із ISSR-аналізом генетичного різноманіття.

#### **Матеріали і методи**

Об'єкт дослідження – чотири популяції *I. pumila* з території України (рис.1). Три з них розташовані в степовій зоні (Миколаївська обл.): 1) місцезростання в умовах виходів гранітів на ділянці ковилово-різнотравного степу (околиці с. Мигія, Первомайський район); 2) місцезростання в умовах ковилово-кринітарієвого степу, схил західної експозиції (10°) надзаплавної тераси р. Інгул (півострів Аляуди м. Миколаїв); 3) місцезростання в умовах ковилово-злаково-

різнотравного степу, верхня частина схилу степової балки північної експозиції, 15° (ок. с. Коларово, Жовтневий р-н). Четверта популяція знаходилася на південному краю лісостепової зони і зростала на ділянці лучного степу за участі ковили волосистої, верхня третина схилу річкової пойми південно-східної експозиції 10-15° (ок. с. Андріївка, Полтавський р-н, Полтавська обл.).



Рис. 1. Місце локалізації досліджених популяцій *I. pumila*:

- 1 – околиці с. Мигія (Первомайський район Миколаївської обл.);
- 2 – півострів Аляуди (м. Миколаїв);
- 3 – околиці с. Коларово (Жовтневий р-н Миколаївської обл.);
- 4 – околиці с. Андріївка (Полтавський р-н Полтавської обл.)

Вивчали показники, що можуть свідчити про розвиток генетичної ерозії у виду: зокрема таксономічну цілісність *I. pumila* та еколого-популяційні показники, що характеризують стан популяцій. Серед популяційних показників вивчали чисельність, вікову структуру популяцій з використанням підходів [2] та наявність насінневого та вегетативного поновлення. Особливу увагу звертали на наявність несприятливих факторів довкілля: випасу, палу, викопування окремих рослин.

Для молекулярно-генетичного аналізу використали 40 рослин *I. pumila* (по 9-11 рослин з популяції). ДНК виділяли із сухого матеріалу за допомогою ЦТАБ за [3]. Для ПЛР-аналізу застосували 7 ISSR-праймерів: ISSR-03 – (AC)<sub>8</sub>TT; ISSR-05 – (AC)<sub>8</sub>TG; ISSR-59 – (AG)<sub>8</sub>GC; UBC#810 – (GA)<sub>8</sub>T; UBC #811 – (GA)<sub>8</sub>C; UBC #835 – (AG)<sub>8</sub>YC; UBC #840 – (GA)<sub>8</sub>YT (Y=C,T). Реакційна суміш для ПЛР об'ємом 20 мкл містила: 20 нг ДНК, 0,2 мМ дНТФ, 1,25 U Taq-полімерази, 1 × (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> буфер (Fermentas, Литва), 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мкМ праймера, 15 мкл мінеральної олії. Як негативний контроль використовували стандартну реакційну суміш без ДНК. ПЛР проводили в термоциклері Терцик МС2 («Біотехнологія», Росія) за такого режиму: 95°C

### Результати та обговорення

*I. pumila* має значну варіабельність за кольором квітки та морфологією рослини, зустрічаються особини з вужчими та ширшими листками, більш ранньо- і пізньо-квітучі форми. Однак, незважаючи на спроби виділити у виду форми або раси, ступінь їх відмінностей та відповідність таксономічній категорії рангу підвиду викликає питання. На території України виділяють підвиди *I. pumila* ssp. *taurica* (Lodd.) Rodion. et Schewcz в Криму та *I. pumila* ssp. *aequiloba* (Ledeb.) Baker на решті території. Але на прак-

– 2 хв., 35 × (94°C – 20 с, 53°C – 30 с, 72°C – 90 с), 72°C – 5 хв.

Продукти ПЛР фракціонували електрофорезом в 1,5 % агарозному гелі в буфері 0,5×TBE і візуалізували забарвленням бромистим етидієм. Електрофореграми представляли у вигляді бінарних матриць, на основі яких з використанням програм FAMD та GenAlEx розраховували генетичні відстані Жакарда між рослинами, частку поліморфних ампліконів (P), індекс Шеннона (S), генну різноманітність Нея (очікувану гетерозиготність Ne), а також генетичні відстані між популяціями за Неєм. Генетичну структуру популяцій аналізували в програмі Structure 2.3.4 за моделлю, що допускає змішане походження особин і передбачає кореляцію частот алелей у батьківських популяціях (K), та без урахування приналежності особин до географічних популяцій. Для визначення найбільш вірогідного числа K виконали серію аналізів з K від 1 до 7 (20 повторностей на K), з періодом припрацювання 50000 і 300000 ітераціями. Розподіл загальної генетичної мінливості між регіонами (Миколаївська та Полтавська обл.), популяціями та в їх межах вивчали методом аналізу молекулярної дисперсії (AMOVA).

тиці в ботанічних роботах для цього регіону вид зазвичай подають просто як *Iris pumila*. Так само цей вид проходить у конспекті рослин Криму [4]. Це дає підставу стверджувати про низький рівень внутрішньовидової диференціації.

Ще одним показником успішності виду може слугувати ступінь фрагментованості ареалу. Ареал *I. pumila* на сьогодні представлений степовими ділянками різного розміру, які відділені одна від одної інколи значними проміжками. Це добре ілюструють популяції у с. Коларо-

во та на півострові Аляуди, які є фрагментами колишнього суцільного поширення виду на надзаплавних терасах р. Інгул. Популяція в районі с. Андріївка є одним з останніх локалітетів виду в межах Лісостепу.

Популяційне дослідження показує викликане поступовим звуженням зони поширення зменшення кількості особин у популяціях. Популяції Аляуди та Коларово наразі малочисельні, представлені кількома десятками екземплярів. Подібною є і популяція в околицях с. Андріївка. Популяція с. Мигія за рахунок розташування в умовах розсіченого рельєфу та виходів граніту нараховує більше 1000 особин, але господарська діяльність викликала зменшення і цього локалітету.

Аналіз вікового складу свідчить про переважання в популяціях зрілих генеративних особин. Генеративне відновлення, очевидно, залежить від умов і спостерігається лише в сприят-

ливих періодах, що значно обмежує можливість поновлення популяції молодими особинами. Таким чином, стратегія популяції виду спрямована на тривале переважання генеративних особин із спорадичним генеративним поновленням у сприятливих роках.

Серед антропогенних факторів, під впливом яких знаходяться популяції *I. pumila*, слід перш за все відзначити весняні пали і випас, які діють на популяції виду регулярно. Особливо небезпечним є весняний пал. Дана обставина також пояснює раніше вказану особливість вікового спектру популяції виду.

Для генетичного аналізу рослин *I. pumila* використали підібрані раніше ISSR-праймери, які давали багаті високополіморфні спектри продуктів ампліфікації. На рис. 2 як приклад наведено типову електрофореграму, що демонструє різноманіття профілів ПЛР-продуктів окремих рослин.

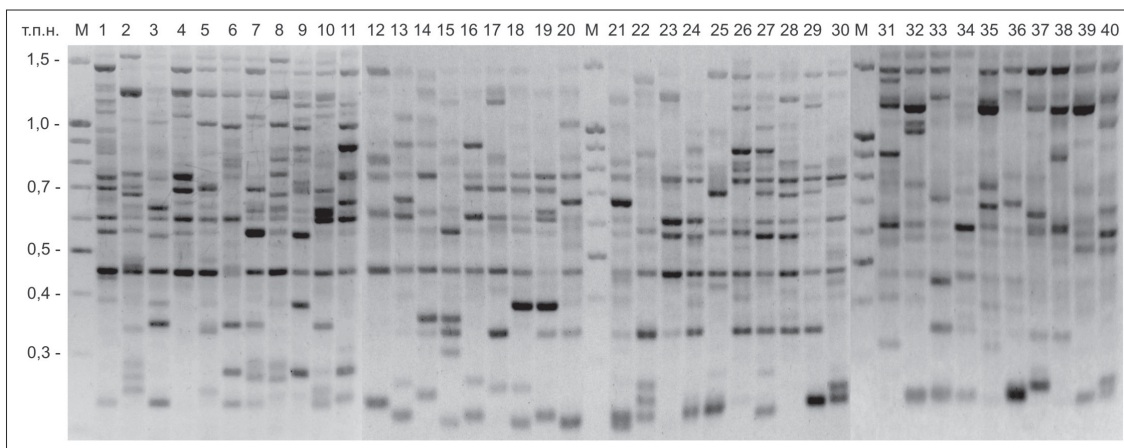


Рис. 2. Поліморфізм спектрів ПЛР-продуктів *I. pumila* (ISSR-праймер UBC #840): 1–11 – рослини з популяції «Мигія»; 12–20 – «Аляуди»; 21–30 – «Коларово»; 31–40 – «Андріївка»; М – маркер молекулярної маси «100 bp Ladder»

Для загальної вибірки рослин з усіх популяцій було враховано 194 фрагменти, 97,9 % з них були поліморфними у межах всієї вибірки, для окремих популяцій цей показник коливався від 48,5 % (Коларово) до 63,4 % (Мигія) (табл.). На підставі отриманої бінарної матриці розраховували основні показники генетичного поліморфізму популяцій *I. pumila* (таблиця). Їх значення були досить високими і виявилися близькими для окремих популяцій. Порівняння власних та літературних даних показало, що рівень генетичного різноманіття у *I. pumila* подібний або перевищує такий у інших видів роду [5, 6]. Це може свідчити про відсутність наближеної загрози втрати генетичного різноманіття.

Популяція поблизу с. Мигія має дещо ви-

щі значення показників генетичного поліморфізму. Можливо це пов'язано з більшим розміром цієї популяції – понад тисячу особин, тоді як у решті розмір становить лише 40–200 особин. Відомо, що рівень генетичного поліморфізму позитивно корелює з розміром популяції. Разом з тим, за нашими даними, навіть малочисельні популяції *I. pumila* з обмеженим ареалом зберегли високий рівень генетичного поліморфізму.

Популяція в околицях с. Андріївка знаходиться практично на північній межі ареалу виду в Україні. За існуючими уявленнями, генетичний поліморфізм в периферичних популяціях може бути нижчим, порівняно з центральними, за рахунок менш сприятливих умов для розмноження і виживання та генетичного дрейфу.

Таблиця. Основні показники генетичного поліморфізму популяцій *I. pumila* за даними ISSR-аналізу

Популяція	Враховано ампліконів, шт.	Частка поліморф-них ампліконів (P), %	Незміщена генна різноманітність Нея (очікувана гетерозиготність $H_e$ )	Індекс Шеннона (S)	Генетичні відстані між рослинами за Жакардом ( $D_j$ ), %	Середня генетична відстань між рослинами за Жакардом ( $D_j$ ), %
Мигія	135	63,4	$0,171 \pm 0,012$	$0,261 \pm 0,017$	43,5 – 75,6	61,2
Аляуди	112	50,5	$0,135 \pm 0,012$	$0,205 \pm 0,017$	44,1 – 70,4	57,5
Коларово	113	48,5	$0,122 \pm 0,012$	$0,189 \pm 0,016$	38,3 – 63,5	51,5
Андріївка	107	49,5	$0,127 \pm 0,012$	$0,195 \pm 0,017$	43,8 – 72,1	60,0
У середньому	117	52,9	$0,139 \pm 0,006$	$0,212 \pm 0,008$	38,3 – 75,6	57,6
Сумарна матриця	194	97,9	$0,171 \pm 0,011$	$0,287 \pm 0,014$	38,3 – 83,8	69,2

Ці популяції часто менші за розміром, фрагментовані, ізольовані, генетично диференційовані між собою. З іншого боку, дестабілізуючий добір, обумовлений підвищеною мінливістю умов довкілля на краю ареалу, може інколи підвищувати генетичну мінливість граничних популяцій [7]. Незважаючи на це, нам не вдалося виявити відмінностей популяції «Андріївка» від популяцій із центральної частини ареалу за рівнем генетичного поліморфізму.

Рослини з популяцій «Аляуди» та «Коларово» виявилися спорідненими за генетичними відстанями Жакарда – на дендрограмі вони увійшли до одного кластера, тоді як рослини з популяцій «Мигія» та «Андріївка» сформували окремі кластери. Популяції «Аляуди» і «Коларово» також найбільш подібні за частотами алелів, генетична відстань за  $H_e$  між ними має найменше значення. Це свідчить про позитивну залежність генетичної подібності популяцій від просторового розміщення (відстань між «Аляуди» та «Коларово» 1,5 км, решта попарних географічних відстаней вимірюються в сотнях кілометрів). Очевидно, лише на такій відстані можливий активний обмін генетичним матеріалом між популяціями шляхом перезапилення комахами та поширення насіння. Аналіз генетичної структури популяції підтвердив спільне походження популяцій «Аляуди» і «Коларово», а також виявив у них дві особини, що містять у досить високій кількості генетичний матеріал з популяції «Мигія» (8,5 і 5,4 %), а також присутність в популяції «Мигія» особини, фракція геному якої розміром 14,0 % належала генофонду об'єднаної популяції «Аляуди-Коларово». Популяція «Андріївка» була більш обособленою (одна особина містила 2,9 % генетичного матеріалу з «Мигії»), що підтверджує позитивну за-

лежність генетичної та географічної близькості популяцій. Разом з тим, слід зауважити, що генетичний матеріал спільного походження в залишкових кількостях містили всі особини. Це може свідчити про вільний обмін генетичною інформацією у минулому, до фрагментації ареалу.

Генетична мінливість *I. pumila* зосереджена головним чином всередині популяцій, диференціація між популяціями та регіонами є порівняно низькою, незважаючи на значні географічні відстані між ними. За результатами AMOVA, на відмінності між популяціями припадає лише 21 % загальної генетичної мінливості, тоді як внутрішньопопуляційний поліморфізм становить 79 %. Такий розподіл є типовим для перехреснозапильних видів, до яких належить *I. pumila*. В іншому ієрархічному аналізі, при додатковому врахуванні двох регіонів: Миколаївської та Полтавської областей, генетичне різноманіття розподілилося наступним чином: між регіонами – 8 %, між популяціями – 17 %, у межах популяцій – 75 %.

Виявлена різниця в результатах вивчення популяційно-екологічних параметрів, за якими *I. pumila* проявляє ознаки генетичної ерозії, та молекулярно-генетичного дослідження, що свідчать про високе генетичне різноманіття виду та слабку дивергенцію віддалених ізольованих популяцій, в тому числі і периферичних, може мати логічне пояснення. Фрагментація та скорочення ареалу *I. pumila* відбувалися досить швидко, впродовж одного-двох століть від початку інтенсивного господарського освоєння півдня України в другій половині XVIII ст. Цілком можливо, що цього часу виявилось недостатньо для втрати сучасними ізольованими популяціями генетичного різноманіття і їхньої диверген-

ції. В такому випадку, виявлений нами високий рівень генетичного поліморфізму найвірогідніше зберігся з часів існування єдиного ареалу виду. Збереження генетичного різноманіття малочисельними ізольованими популяціями *I. pumila* свідчить про те, що вид поки що має генетичні ресурси, здатні забезпечити відновлення популяцій у разі створення сприятливих умов. Однак, подальше скорочення ареалу та збільшення антропогенного тиску безперечно

### Висновки

Аналіз низки таких показників загрози генетичної ерозії, як рівень внутрішньовидової диференціації; розмір популяцій, їх кількість та ізоляція; екологічна амплітуда; частота статевого розмноження, свідчить про те, що *I. pumila* на території України можна віднести до регресуючого виду, якому загрожує генетична ерозія. Поряд з цим, результати ISSR-аналізу чотирьох популяцій з Миколаївської та Полтавської областей виявили достатньо високий рівень генетич-

рано чи пізно призведе до значного скорочення чисельності виду на території України.

У цілому ж проведено дослідження свідчить про необхідність застосування до оцінки загрози зникнення конкретного виду комплексного підходу, який крім популяційно-екологічних показників включає оцінку генетичного різноманіття з використанням молекулярних маркерів.

ного різноманіття навіть в малочисельних популяціях та слабку дивергенцію віддалених ізольованих популяцій. Отримані дані свідчать про те, що скорочення та фрагментація ареалу *I. pumila* в першу чергу супроводжуються погіршенням еколого-популяційних показників, а збіднення генофонду популяцій відбувається повільніше. Отже, ефективне визначення загрози генетичної ерозії потребує оцінки комплексу параметрів.

### Література

1. Brown A.H.D., Brubaker C.L. Indicators for sustainable management of plant genetic resources: How well are we doing? / Engels J.M., Ramanatha Rao V., Brown A.H.D., Jackson M.T. (eds.) *Managing Plant Genetic Diversity*. – Wallingford, UK: CABI Publishing, 2002. – P. 249–262.
2. Діденко І.П., Швець Т. А. Особливості онтогенезу *Iris pumila* L. / *Мат. наук. конф. «Біологія: від молекули до біосфери»*. – Харків, 2009. – С. 246–247.
3. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // *Phytochem. Bull.* – 1987. – Vol. 19. – P. 11–15.
4. Ена А. В. Природная флора Крымского полуострова. – Симферополь: Н.Орианда, 2012. – 232 с.
5. Wroblewska A., Brzosko E. The genetic structure of the steppe plant *Iris aphylla* L. at the northern limit of its geographical range // *Bot. J. Linn. Soc.* – 2006. – Vol. 152, N2. – P. 245–255.
6. Kozyrenko M.M., Artyukova E.V., Zhuravlev Yu.N. Independent species status of *Iris vorobievii* N.S. Pavlova, *Iris mandshurica* Maxim., and *Iris humilis* Georgi (Iridaceae): Evidence from the nuclear and chloroplast genomes // *Russ. J. Genet.* – 2009. – Vol. 45, N 11. – P. 1394–1402.
7. Safriel N.U., Volis S., Kark S. Core and peripheral populations and global climate change // *Isr. J. Plant Sci.*. – 1994. – Vol. 42. – P. 331–345.

**BUBLYK O.M., ANDREEV I.O., PARNIKOZA I.Yu., TROICKA T.B., KUNAKH V.A.**

*Institute of Molecular Biology and Genetics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine*

*Ukraine, 03680, Kyiv, Akad. Zabolotnoho str., 150, e-mail: o.m.bublyk@imbg.org.ua*

### COMPREHENSIVE EVALUATION OF *IRIS PUMILA* L. POPULATIONS STATUS IN UKRAINE

**Aims.** *Iris pumila* L. (Iridaceae), typical steppe xerophyte, which is protected in several regions of Ukraine. Area of the species range has suffered a significant decline and fragmentation over the recent centuries. The comprehensive population studies were conducted to elucidate the effects of these processes and determine the indices that can be used as well-timed signals of species extinction risk. **Methods.** Ecological and population studies were combined with ISSR-analysis of genetic diversity to characterize the populations of *I. pumila*. **Results.** A number of population and ecological indicators suggests that *I. pumila* in Ukraine may be referred to regressive species threatened by genetic erosion. Moreover, the results of ISSR-analysis of plants from four populations in Mykolayiv and Poltava regions showed relatively high levels of the species genetic diversity and weak divergence of isolated populations. **Conclusions.** The reduction and fragmentation of *I. pumila* habitat first of all is accompanied by decline in ecological and population indicators, but depletion of the populations' gene pool occurs much slower. To adequately determine the risk

of genetic erosion in particular species, apart from assessment of population and ecological indicators, evaluation of species genetic resources using molecular markers is needed.

*Keywords:* genetic resources, *Iris pumila* L., population studies, PCR markers, threatened species.

## **ВАСИЛЬЕВ В.С.**

*Харьковская государственная зооветеринарная академия*

*Украина, 62341, Харьковская обл., Дергачевский р-н, п. Малая Даниловка, ул. Академическая 5,*

### **ОЦЕНКА КАЧЕСТВА СПЕРМЫ МЕТОДАМИ ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ**

Широкомасштабная селекция животных, с необходимыми хозяйственно полезными признаками, в современных условиях не возможна без вспомогательных репродуктивных технологий [1]. Важное значение в воспроизведении животных имеет объективная оценка качества спермы. Для этих целей наиболее перспективно применение методов интерференционной микроскопии. Интерференционный биологический микроскоп позволяет наблюдать живые, не ок-

рашенные клетки с хорошим контрастом и проводить количественные измерения концентрации вещества, определять различные дефекты строения клеток, сухую массу, количество ДНК, белка в них [2]. Низкое качество спермы, снижение подвижности спермиев, как правило, связано с дефектами шейки, средней части, хвоста спермиев и т.д. [3]. Изучение различных дефектов клеток в эякулятах позволяет объективно оценивать качество спермы.

#### **Материалы и методы**

Исследовали нативную и технологически обработанную (криоконсервация, лазерное облучение) сперму быков, хряков, баранов, других животных и птиц и, в сравнительном аспекте, сперму человека. Определяли традиционными методами объем, активность, концентрацию, цвет, биохимические и другие показатели, для спермы человека определяли число активно-подвижных, подвижных, местно-качающихся и неподвижных спермиев в каждом эякуляте [2, 4].

#### **Результаты**

Хорошие условия для наблюдения под микроскопом образцов нативной или технологически обработанной спермы, мазков спермы создает дифференциальный интерференционный контраст (ДИК) при увеличении в 200–400 раз в однородном интерференционном сером, желто-коричневом или голубом цветах. На рис. 1 представлено изображение образца нативной спермы хрякав ДИК на сером фоне. Небольшое раздвоение изображений в доли микрометра, создает стереоэффект, оттеняющий изображение каждой клетки и позволяющий с хорошей контрастностью изучать нормальные и патологические формы спермиев.

С помощью интерференционной микроскопии определяли частоту различных дефектов в строении спермиев, измеряли размеры, сухую массу головок спермиев, количество ДНК и белков в них [2]. Учитывались возраст, порода животных, влияние генотипических и фенотипических факторов на качество спермы. Воспроизводительные способности племенных быков оценивали по результатам оплодотворения коров после первого осеменения.

В случае большого раздвоения (рис. 2), изображения каждой клетки, в которых фазы колебаний световых волн сдвинуты относительно фона на одинаковые величины, окрашены в разные интерференционные цвета. Сдвиг фазы в изображении тем больше, чем больше толщина и концентрация вещества в клетке. Измеряя сдвиг фазы световых волн, прошедших через клетку, зная размер клетки можно рассчитать сухую массу клетки, распределение концентрации вещества в клетке, показатель преломления и другие количественные характеристики клеток [2].