

БІЛОНОЖКО Ю. О.[✉], РАБОКОНЬ А. М., ПОСТОВОЙТОВА А. С., КАЛАФАТ Л. О., ПРИВАЛІХІН С. М., ПІРКО Н. М., ДЕМКОВИЧ А. Є., БЛЮМ Я. Б., ПІРКО Я. В.

Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України,
Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а

[✉] tkacheva_ua@ukr.net

ГЕНЕТИЧНЕ ПРОФІЛЮВАННЯ ОМЕЛИ БІЛОЇ (*VISCUM ALBUM L.*) З ВИКОРИСТАННЯМ RAPD-АНАЛІЗУ

Мета. Генетичне профілювання та встановлення генетичних відмінностей між рослинами *V. album*, що зростають на листяних та хвойних породах деревних рослин, із застосуванням RAPD-маркерів. **Методи.** Застосовували метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з довільними праймерами (Random Amplified Polymorphic DNA – RAPD). Ампліфіковані фрагменти розділяли за допомогою електрофорезу у неденатуруючому поліакриламідному гелі. Смуги ДНК візуалізували шляхом фарбування гелів нітратом срібла. **Результати.** Аналіз поліморфізму фрагментів ДНК за використання RAPD дозволив диференціювати всі досліджені зразки омели білої, отримавши їх унікальні молекулярно-генетичні профілі. Виявлено 241 амплікон в діапазоні від 200 до 2000 п. н., 152 (63 %) з яких є поліморфними. При цьому зразки розподілилися на дві окремі групи залежно від виду рослини-господаря. **Висновки.** Той факт, що зразки формують дві окремі клади, підтверджує припущення, що омела, яка зростає на сосні, і та, яка зростає на клені, є двома окремими підвидами виду *V. album*.

Ключові слова: *Viscum album L.*, молекулярно-генетичні маркери, поліморфізм, RAPD.

Омела біла (*Viscum album L.*) – вічнозелена напівпаразитарна рослина, зростає на гілках та стовбурах дерев. Як напівпаразит вона водні розчини мінеральних речовин отримує з рослини-господаря, однак здатна самостійно синтезувати органічні речовини [1, 2]. Велика кількість різноманітних деревних порід може бути заражена омелою білою. При цьому деякі її підвиди здатні проявляти високу специфічність до виду рослини-господаря [3].

На сьогодні визначають три підвиди омели білої, що відрізняються за спеціалізацією до рослини-господаря: *V. album ssp. abietis* (Wiesb.)

Abromeit, яка трапляється на ялиці (*Abies spp.*); *V. album ssp. austriacum* (Wiesb.) Vollmann – селиться переважно на соснах (*Pinus spp.*) і *V. album ssp. album L.*, яка росте на різноманітних листяних породах дерев. Однак основні докази, що підтверджують відмінність цих трьох підвидів *V. album*, ґрунтуються на результатах біохімічних досліджень. З'ясовано, що омела з різних рослин-господарів відрізняється за складом віскотоксину [4]. Водночас за результатами генетичних досліджень трьох підвидів (*V. album ssp. album*, *V. album ssp. abietis* та *V. album ssp. austriacum*) за допомогою 21-го ізозимного локусу була виявлена чітка різниця між підвидами, що дозволило авторам цієї роботи віднести наявні підвиди до рангів окремих видів: *V. album L.*, *V. abietis* Beck та *V. laxum* Boiss. et Reut [5]. Крім того, деякі дослідники виділяють четвертий підвид *V. album ssp. creticum* N. Bohling, який трапляється на різних видах хвойних [1].

Отже, зважаючи на те, що питання філогенії підвидів омели білої не є загально визначеним, а також через відсутність достатньої кількості інформації щодо генетичної диференціації цього виду доцільним є дослідження *V. album*, що зростає на різних видах рослин-господарів, із застосуванням молекулярно-генетичних маркерів. У разі дослідження близькосторідних видів чи навіть рослин одного виду часто застосовується метод ампліфікації ДНК-фрагментів із використанням випадкових коротких праймерів (приблизно 10 нуклеотидів) – Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) [6, 7], який дозволяє виявити специфічні амплікони для кожного організму. RAPD-аналіз знайшов широке застосування у дослідженнях генетичної різноманітності на міжвидовому та внутрішньовидовому рівнях, а також під час генотипування та встановлення філогенетичних зв'язків [7, 8].

© БІЛОНОЖКО Ю. О., РАБОКОНЬ А. М., ПОСТОВОЙТОВА А. С., КАЛАФАТ Л. О., ПРИВАЛІХІН С. М., ПІРКО Н. М., ДЕМКОВИЧ А. Є., БЛЮМ Я. Б., ПІРКО Я. В.

Тому мета роботи полягала у встановленні генетичних відмінностей *V. album*, що зростає на листяних та хвойних породах дерев, із застосуванням RAPD-маркерів.

Матеріали і методи

Як рослинний матеріал використовували фрагменти листа рослин *V. album*, зібраних з 10 дерев клена сріблястого (*Acer saccharinum* L.), що зростає в Подільському районі м. Києва, та з 10 дерев сосни звичайної (*Pinus sylvestris* L.) з лісництва Пуща-Водиця, Київська область.

Геномну ДНК екстрагували за допомогою ЦТАБ-методу [9]. Якість і кількість ДНК перевіряли за допомогою електрофорезу в 1,5 %-ному агарозному гелі і спектрофотометрично на біофотометрі «Eppendorf» з визначенням концентрації та ступеня чистоти ДНК. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили в ампліфікаторі Thermal Cycler 2720 («Applied Biosystems», США). Реакційна суміш (об'ємом 10 мкл) містила п'ятикратний ПЛР-буфер із сульфатом амонію, 2,5 ммоль $MgCl_2$, 50 нг рослинної ДНК, 1 мкМ кожного з праймерів, 0,2 мм кожного дНТФ, 0,5 од. Таq полімерази. Для ампліфікації фрагментів ДНК використовували 6 праймерів: OPP-01 (TTCCGAGCCAG), OPP-02 (GTGAG-GCGTC), OPP-03 (GGGGGTCTTT), OPP-07 (GTCCCGACGA), OPP-09 (CTCACCGTCC), OPP-15 (GACGGATCAG) [10]. Ампліфікацію проводили за таким протоколом: початкова денатурація (95 °C) – 5 хв; 40 циклів ампліфікації (95 °C – 1 хв, 39,5/43 °C – 1 хв, 72 °C – 2 хв); кінцеве подовження за 72 °C протягом 7 хв, утримання за 15°C [10]. Продукти ампліфікації розділяли за допомогою електрофорезу в 6 %-ному неденатуруючому поліакриламідному гелі в 1x TBE-буфері. Візуалізацію фрагментів ДНК проводили шляхом фарбування нітратом срібла. Після електрофорезу гель фотографували у видимому світлі. Аналіз зображень електрофоретичних гелів проводили в програмі GelAnalyzer (<http://www.gelanalyzer.com/>). Довжину відтворюваних і чітких бендів визначали за допомогою маркера довжини ДНК (O'Gene Ruler™ 100bp Plus DNA Ladder, ready-to-use; «Fermentas», Литва) [11, 12]. Коефіцієнт подіб-

ності Нея та Лі [13] між генотипами визначали, використовуючи програму FreeTree [14], на підставі аналізу наявності/відсутності ампліфікованих фрагментів у проаналізованих зразках. Значення подібності були використані для кластерного аналізу, який проводили за допомогою методу UPGMA з використанням тієї ж програми. Для оцінки достовірності побудованих дерев було проведено бутстреп (bootstrap) аналіз [15] для 1000 повторностей. Отримані дендрограми візуалізували за допомогою програми FigTree v1.4.2 [16].

Результати та обговорення

Під час аналізу зразків омели білої, що зростають на сосні та клені, за допомогою 6-ти RAPD-праймерів було виявлено 241 чіткий ампліфікований фрагмент, із яких 152 (63 %) були поліморфними (табл. 1). Варто зазначити, що ДНК-профілі зразків омели з сосни та клена відрізняються між собою, однак при цьому мають спільні фрагменти, які можна вважати ДНК-маркерами роду *Viscum*. Важливо, що більшість з цих спільних фрагментів є мономорфними. Загалом, окремо за кожним RAPD-праймером отримано від 20 до 31 фрагментів ДНК. Як видно з електрофореграм, більшість фрагментів були в межах від 200 до 2000 п. н. (рис. 1).

Характерним є те, що кожен із досліджуваних зразків за всіма праймерами має унікальні фрагменти, і, відповідно, за сукупності всіх праймерів у зразках формується свій молекулярний ДНК-профіль, відмінний від усіх інших.

На основі матриці коефіцієнтів подібності Нея та Лі незваженим парно-груповим методом кластерного аналізу з арифметичним усередненням (UPGMA) була побудована дендрограма генетичної подібності між дослідженими зразками омели (рис. 2). У всіх випадках проаналізовані зразки омели чітко розділилися на два кластери зі 100 % значенням будстреп-підтримки. В один увійшли всі зразки омели, що зростають на сосні, а в інший – зразки омели з клена. До того ж за кожним окремим RAPD-праймером зразки також групуються у дві окремі групи: омела з сосни та омела з клена.

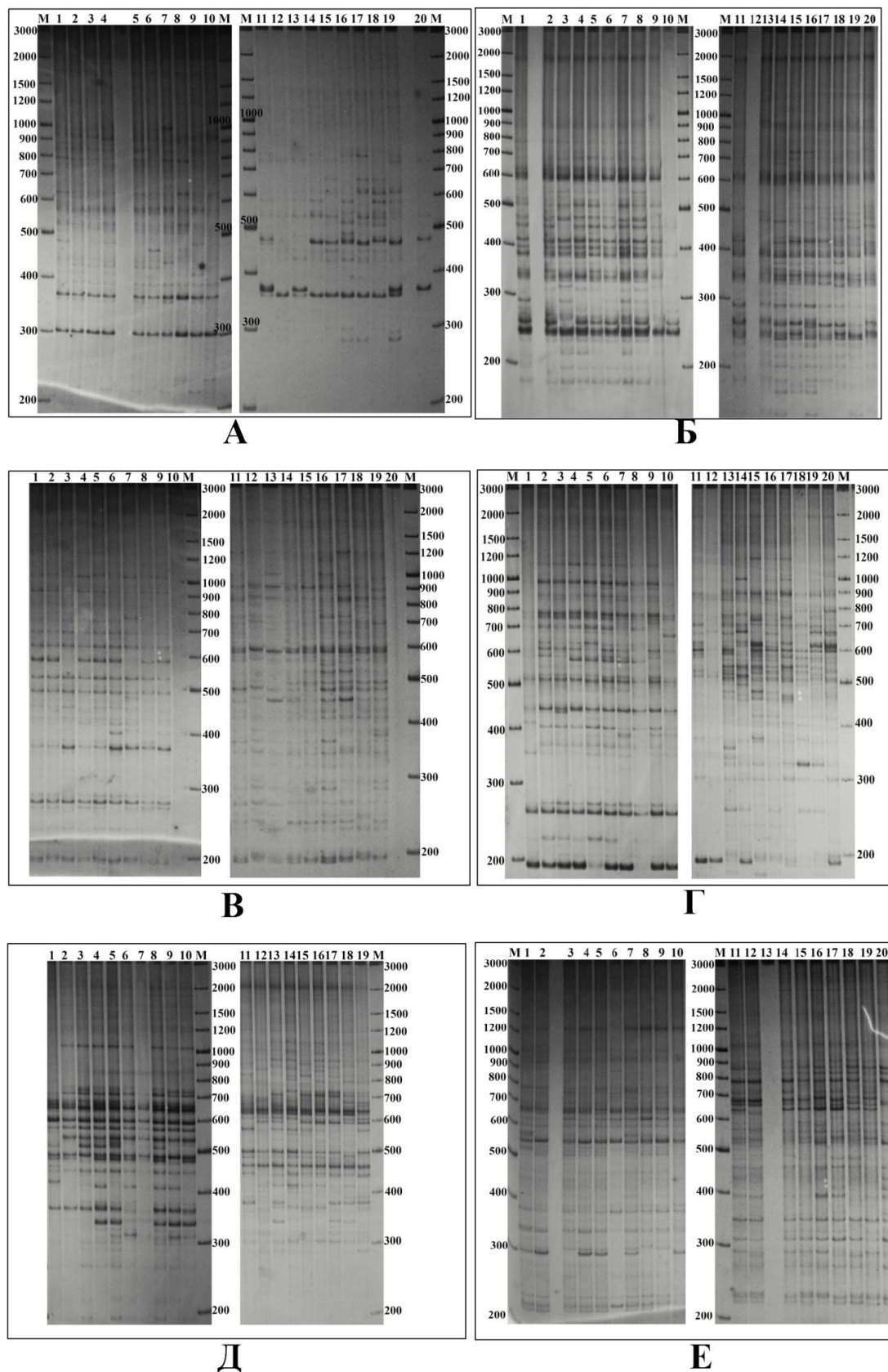


Рис. 1. Молекулярні ДНК-профілі *V. album*, отримані за допомогою RAPD-аналізу з використанням праймерів OPC-01 (А), OPC-02 (Б), OPC-03 (В), OPC-07 (Г), OPC-09 (Д) та OPC-15 (Е). 1–10 – номери зразків омели з сосни, 11–20 – номери зразків омели з клена, М – ДНК-маркер «100bp Ladder».

Таблиця 1. Кількість смуг RAPD-фрагментів, ідентифікованих у досліджуваних зразках *V. album*, що зростають на сосні та клені

Кількість фрагментів ДНК за кожним з RAPD-праймерів	Зразки омели		Загалом фрагментів для усіх зразків (1-20)
	з сосни (1-10)	з клену (11-20)	
ОРС-01: всього/поліморфних	21/10	20/12	35/22
спільних	6		
ОРС-02: всього/поліморфних	25/14	23/16	38/30
спільних	10		
ОРС-03: всього/поліморфних	20/7	26/13	37/20
спільних	9		
ОРС-07: всього/поліморфних	29/14	28/15	45/29
спільних	12		
ОРС-09: всього/поліморфних	24/14	31/15	44/29
спільних	11		
ОРС-15: всього/поліморфних	25/10	27/12	42/22
спільних	10		
Всього	144	155	241

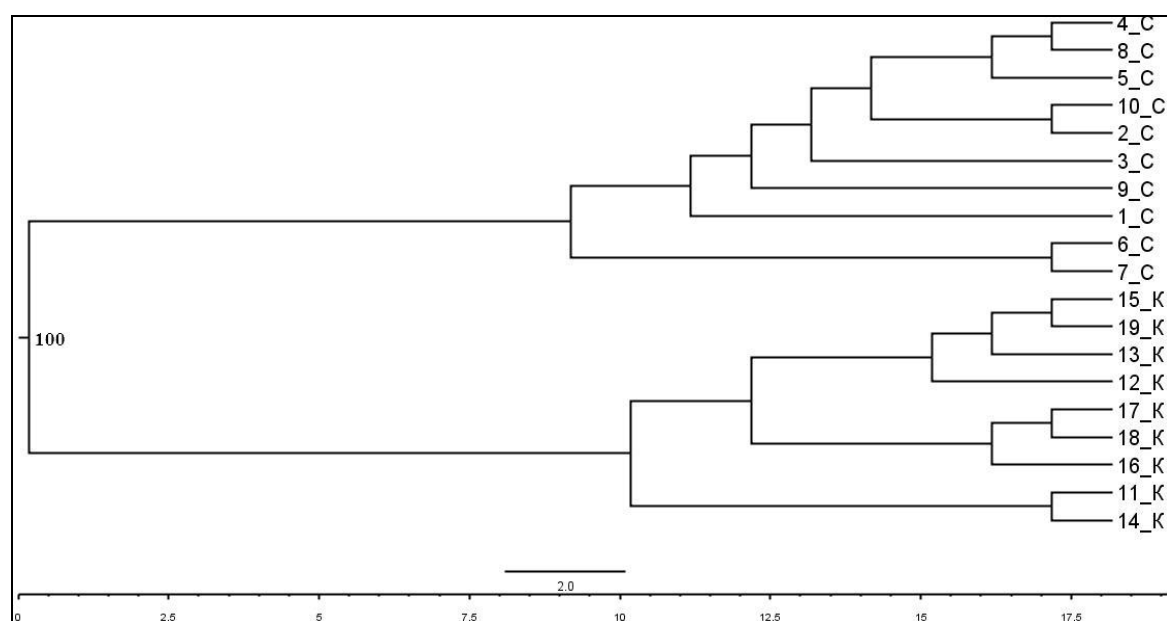


Рис. 2. Дендрограма генетичної схожості зразків *V. album*, побудована на основі результатів RAPD-аналізу (с – зразки, зібрані з *P. sylvestris*, к – зразки, зібрані з *A. saccharinum*).

Висновки

Таким чином, за допомогою RAPD-аналізу з обраними праймерами вдалося диференціювати один від одного всі залучені до аналізу зразки омели, отримавши їх унікальні ДНК-профілі. Крім того, зразки формують дві окремі клади залежно від рослини-господаря. Цей факт підтверджує припущення, що омела, яка зростає

на *P. sylvestris* та на *A. saccharinum*, представляє собою два окремих підвиди виду *V. album*.

Робота виконана за підтримки Національної академії наук України, в рамках науково-дослідної роботи «Популяційна біологія і генетика *Viscum album* L. в Україні» (2018–2022 рр.) №ДР 0118U004067.

References

1. Kolodziejek J., Patykowski J., Kolodziejek R. Distribution, frequency and host patterns of European mistletoe (*Viscum album* subsp. *album*) in the major city of Lodz. *Poland Biologia*. 2013. Vol. 68 (1). P. 55–64. doi: 10.2478/s11756-012-0128-4.
2. Kim Ch.S., Kim S.Y., Sun B.Y., Yi J.S. A review of the taxonomic and ecological characteristics of Korean mistletoe types (*Viscum*, *Korthalsella*, *Loranthus* and *Taxillus*). *Korean J. Pl. Taxon.* 2013. Vol. 43 (2). P. 81–89. doi.org/10.11110/kjpt.2013.43.2.81.
3. Ahmed Z., Dutt H.C. Restriction of *Viscum album* to few phorophytes in a habitat with diverse type of tree species. *Austin J Plant Biol.* 2015. Vol. 1 (2). P. 101–105.
4. Schaller G., Urech K., Grazi G., Giannattasio M. Viscotoxin composition of the three European subspecies of *Viscum album*. *Planta Medica*. 1998. Vol. 64. P. 677–678. doi: 10.1055/s-2006-957553.
5. Mejnartowicz L. Relationship and genetic diversity of mistletoe (*Viscum album* L.) subspecies. *Acta Soc. Bot. Poloniae*. 2006. Vol. 75 (1). P. 39–49. doi: 10.5586/asbp.2006.007.
6. Bishoyi A.K., Sharma A., Kavane A., Geetha K.A. Varietal discrimination and genetic variability analysis of Cymbopogon using RAPD and ISSR markers analysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2016. Vol. 179 (4). P. 659–670. doi: 10.1007/s12010-016-2022-y.
7. Kalkəs O., Okcu M., Okcu Z., Karabulut B. et al. Relationships among some pears genotypes (*Pyrus communis* L.) based on ISSR and RAPD analysis. *Erwerbs-Obstbau*. 2016. Vol. 58 (4). P. 259–264. doi: 10.1007/s10341-016-0287-5.
8. Sunar S., Yildirim N., Sengul M., Agar G. Genetic diversity and relationships detected by ISSR and RAPD analysis among *Aethionema* species growing in Eastern Anatolia (Turkey). *C.R. Biol.* 2016. Vol. 339. P. 147–151. doi: 10.1016/j.crv.2016.02.006.
9. Green M.R., Sambrook J. Molecular cloning. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012. 1890 p.
10. Orlovskaya O.A., Koren L.V., Khotyleva L.V. Evaluation of genetic polymorphism of spring triticale accessions (\times *Triticosecale* Wittmack) based on RAPD and ISSR markers. *Vavilov J. Genetics Breeding*. 2012. Vol. 16, № 1. С. 279–284. [in Russian]. / Орловская О.А., Корень Л.В., Хотылева Л.В. Оценка генетического полиморфизма образцов яровой тритикале (\times *Triticosecale* Wittmack) посредством RAPD- и ISSR-маркеров. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2012. Т. 16, № 1. С. 279–284.
11. Sambrook J., David W.R. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. NY: Cold Spring Harbor, 2001. Vol. 2.
12. Benbouza H., Jacquemin J.-M., Baudoin J.-P., Mergeai G. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gel. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2006. Vol. 10 (2). P. 77–81.
13. Nei M., Li W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979. Vol. 76. P. 5269–5273. doi: 10.1073/pnas.76.10.5269.
14. Pavlicek A., Hrda S., Flegl J. FreeTree – Freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of the genus *Frenkelia*. *Folia Biol.* 1999. Vol. 45. P. 97–99.
15. Hillis D.M., Bull J.J. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biol.* 1993. Vol. 42. P. 182–192. doi: 10.1093/sysbio/42.2.182.
16. Rambaut A. FigTree, a graphical viewer of phylogenetic trees. URL: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.2009 (дата звернення: 15/03/2020).

BILONozhko Yu.O., RABOKON A.M., POSTOVOITOVA A.S., KALAFAT L.O., PRIVALIKHIN S.M., PIRKO N.M., DEMKOVYCH A.Ye., BLUME Ya.B., PIRKO Ya.V.

Institute of Food Biotechnology and Genomics, Nat. Acad. of Sci. of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Osypovskoho str., 2A, e-mail: tkacheva_ua@ukr.net

GENETIC PROFILING OF MISTLETOE (*VISCUM ALBUM* L.) USING RAPD-ANALYSIS

Aim. The aim of this research was genetic profiling and identification of genetic differences between *V. album* specimens, growing on deciduous and coniferous species of woody plants using RAPD markers. **Methods.** The method of polymerase chain reaction (PCR) with random primers (Random Amplification of Polymorphic DNA - RAPD) was used. Amplified DNA fragments were fractionated by electrophoresis in non-denaturing polyacrylamide gel. DNA bands were detected using the staining with silver nitrate. **Results.** All the studied mistletoe samples were differentiated from each other, and their unique molecular genetic profiles were obtained. 241 amplified DNA fragments were detected in the range from 200 to 2000 bp, 152 fragments (63%) were polymorphic. The samples were divided into two separate groups depending on the type of host plant. **Conclusions.** The fact that the samples formed two separate clades confirms the assumption that mistletoe, which grow on pine and grow on maple, represents two separate subspecies of *V. album*.

Keywords: *Viscum album* L., molecular genetic markers, polymorphism, RAPD.