

## ВИКОРИСТАННЯ МОЛЕКУЛЯРНИХ МАРКЕРІВ НА ОСНОВІ ГЕНІВ ВІДПОВІДІ НА СТРЕС ДЛЯ АНАЛІЗУ ГЕНЕТИЧНОГО РІЗНОМАНІТТЯ *GENTIANA LUTEA* L.

Прикладом виду, популяції якого зростають у відмінних еколого-географічних умовах та зазнають впливу пасквальних факторів, є цінний лікарський рідкісний високогірний вид тирлич жовтий (*Gentiana lutea* L.). *G. lutea* відноситься до категорії вразливих і потребує охорони та відновлення популяцій [1]. За період від початку ХХ століття і до сьогодні загальна площа природних популяцій *G. lutea* в Українських Карпатах зменшилася майже на 20 %, що у найбільшій мірі спричинено негативним антропогенним впливом. Тирлич жовтий належить до категорії стенобіонтних видів і характеризується вузьким діапазоном толерантності до змін екологічних факторів. Очевидно, недостатня пластичність геному і є причиною того, що чисельність популяцій цього виду поступово зменшується як в Україні, так і в Європі. Дослідження генофонду популяцій тирличу жовтого дозволить прогнозувати перспективи їх існування і розвитку за умови дії на них певного поєднання різних зовнішніх чинників.

В умовах дії стресових факторів абіогенної та біогенної природи у багатьох рослин визначено гени, які за це відповідають, їх послідовність та протеїнові профілі. На основі цього створено метод ПЛП з CDDP-праймерами (conserved DNA-derived polymorphism), які можуть бути безпосередньо пов'язані з кодувальними ділянками функціонально важливих генів, що беруть участь у реакції на абіотичні, біотичні стреси чи відповідають за регуляцію росту рослини. Ці маркери є зручними для оцінки рівня внутрішньо- та міжпопуляційного генетичного поліморфізму.

Мета роботи: дослідити генетичний поліморфізм популяцій *G. lutea* з Українських Карпат за допомогою CDDP-маркерів.

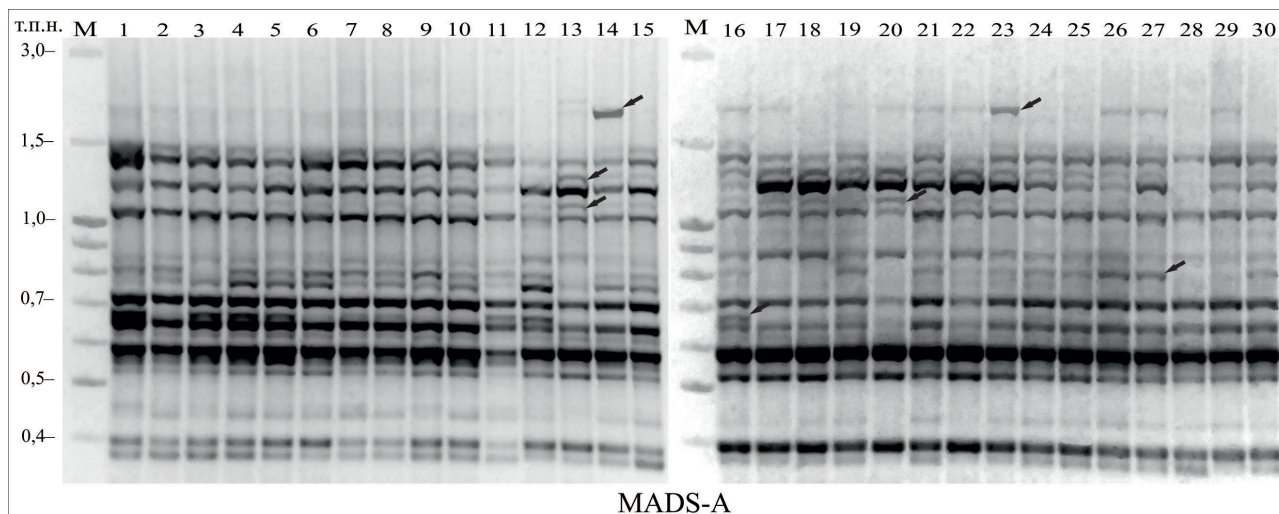
### Матеріали і методи

Матеріалом для досліджень були зразки листових пластинок рослин *G. lutea* з шести карпатських популяцій: 4 з хребта (хр.) Чорногора – гутин-томнатиська (НТ, гора (г.) Гутин Томнатик),

лемська (Лем, полонина (пол.) Лемська), шешульська (Sh, гори (гг.) Шешул-Павлик), пожижевська (Pozh, гора Пожижевська) та 2 з хр. Свидовець – трояська (Tr, гори Трояска-Татарука), крачунська (Кг, полонина Крачунська). Із різних частин кожної популяції відібрано по 15 зразків, за виключенням популяції з г. Гутин Томнатик, з якої відібрано – 11. Популяція з г. Пожижевська є штучно створеною (агропопуляція) із рослин шешульської у 70-х роках ХХ століття [2].

ДНК зі свіжих молодих листків виділяли згідно загальноприйнятої методики з деякими модифікаціями [3]. Із 12 протестованих CDDP-праймерів відібрано 6, які давали чіткі відтворювальні амплікони: WRKY-A-R (5' GTGGTTGTGCTTGCC 3'), WRKY-B (5' GCCCTCGTASGTSGT 3'), MYB (5' GGCAAGGGCTGCCGC 3'), ERF-F (5' CACTACCGCGSCTSCG 3'), MADS-A (5' ATGGGCCGSGGCAAGGTGC 3'), ABP1-2 (5' ACSCSATCCACCGC 3'). Склад реакційної суміші для ПЛП та температурний режим наведено у роботі [4].

Електрофореграми представляли у вигляді бінарних матриць, статистичну обробку яких проводили як наведено у [5, 6] Рівень генетичного поліморфізму популяцій оцінювали за наступними параметрами: частка поліморфних ампліконів (P), індекс Шеннона (S), очікувана гетерозиготність (He), потік генів ( $N_m$ ), генетичні відстані між популяціями за  $He_i$  ( $D_N$ ) та Жакардом ( $D_j$ ). На основі  $D_N$  методом незваженої парно-групової кластеризації (UPGMA) побудовано дендрограму генетичної подібності популяцій. Генетичну структуру популяцій аналізували за допомогою програми Structure 2.3.4. (адаптованої для домінантних маркерів). Для встановлення оптимального значення K (кількості батьківських популяцій) використано метод Evanno [7]. Для визначення K виконано серію аналізів від 1 до 9 (20 повторностей на K), з періодом працювання 50000 і 300000 ітерацій [8, 9]. Розподіл загального генетичного поліморфізму між



**Рис. 1.** Електрофореграми продуктів ампліфікації ДНК досліджених зразків *G. lutea* з використанням CDDP-маркерів (праймер MADS-A): 1–15 – зразки Tr, 16–30 – зразки Кг; М – маркер молекулярних мас; стрілками позначені поліморфні амплікони

популяціями та в їхніх межах вивчали методом аналізу молекулярної дисперсії (AMOVA).

### Результати та обговорення

Використання відібраних праймерів для молекулярного CDDP-аналізу 86 зразків тирличу жовтого, дозволило детектувати 120 ампліконів розміром від 110 до 2800 п.н., з яких 115 були поліморфними (рис. 1).

Кількість фрагментів на доріжці, залежно від праймера, варіювала від 15 (WRKY-B) до 23 (ERF-F), і в середньому становила 20. Кожен зразок був охарактеризований унікальним набором CDDP-ампліконів. При цьому ідентифіковано фрагменти, специфічні як для окремих генотипів (рослин), так і для різних популяцій *G. lutea*. Встановлено, що п'ять фрагментів були монорфними, характерними для зразків усіх дослідже-

них популяцій. Частка унікальних ампліконів у середньому для шести популяцій становила 6 %, частка поліморфних фрагментів – 31 % (табл. 1).

Встановлено рівень різноманітності популяцій тирличу жовтого за показниками генетичного поліморфізму. Із представлених у таблиці 1 даних видно, що значення основних параметрів для різних популяцій суттєво варіюють. Наприклад, відмінності  $D_j$  між окремими популяціями досягали 25 %. У таблиці 2 представлені значення генетичних відстаней  $Ne_i$  між популяціями *G. lutea*. Відмінності у дистанціях між вибірками досить великі. Генетично найближчими були популяції із пари Lem – HT ( $D_N = 0,201$ ), а генетично найвіддаленішими – Sh – Kг ( $D_N = 0,377$ ) (табл. 2). На основі генетичних відстаней  $Ne_i$  методом UPGMA побудовано дендрограму генетичної подібності, яка відображає генетичні зв'язки між популяціями (рис. 2).

Таблиця 1

**Значення показників генетичного поліморфізму популяцій *G. lutea* за даними CDDP-ПЛР**

Умовне позначення популяції	у.а., %	P, %	Ne	S	$D_j$ , %
Lem	6,4	45,0	0,152±0,018	0,229±0,025	27,9
HT	5,9	45,0	0,172±0,019	0,253±0,027	36,0
Pozh	2,9	18,3	0,056±0,012	0,089±0,018	10,9
Sh	0	27,5	0,110±0,017	0,160±0,025	22,0
Kг	13,1	24,2	0,095±0,016	0,139±0,023	19,5
Tr	3,2	25,8	0,089±0,015	0,134±0,022	19,3
Середнє	6,0	31,0	0,112±0,007	0,167±0,010	22,6
СВ	-	95,8	0,274±0,015	0,423±0,019	53,4

Примітки: у.а. – частка унікальних ампліконів, P – частка поліморфних ампліконів, Ne – очікувана гетерозиготність, S – індекс Шеннона,  $D_j$  – середнє значення генетичних дистанцій між рослинами за Жакардом, СВ – сумарна вибірка.

Таблиця 2

Значення генетичних дистанцій  $D_N$  між популяціями *G. lutea*

Lem	HT	Pozh	Sh	Kr	Tr	
0						Lem
0,201	0					HT
0,239	0,306	0				Pozh
0,294	0,218	0,314	0			Sh
0,336	0,342	0,301	0,377	0		Kr
0,267	0,220	0,278	0,285	0,355	0	Tr

Примітка: жирним шрифтом відзначено найбільше і найменше значення показника  $D_N$ .

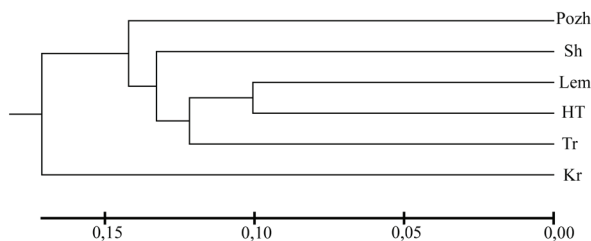


Рис. 2. UPGMA-дендрограма генетичних зв'язків між популяціями *G. lutea*, побудована на основі генетичних відстаней  $D_N$

На дендрограмі спостерігається формування кластеру, в який увійшли п'ять популяцій *G. lutea*, за винятком крачунської. У межах отриманого кластеру найбільш віддаленою виявилась пожижевська агропопуляція.

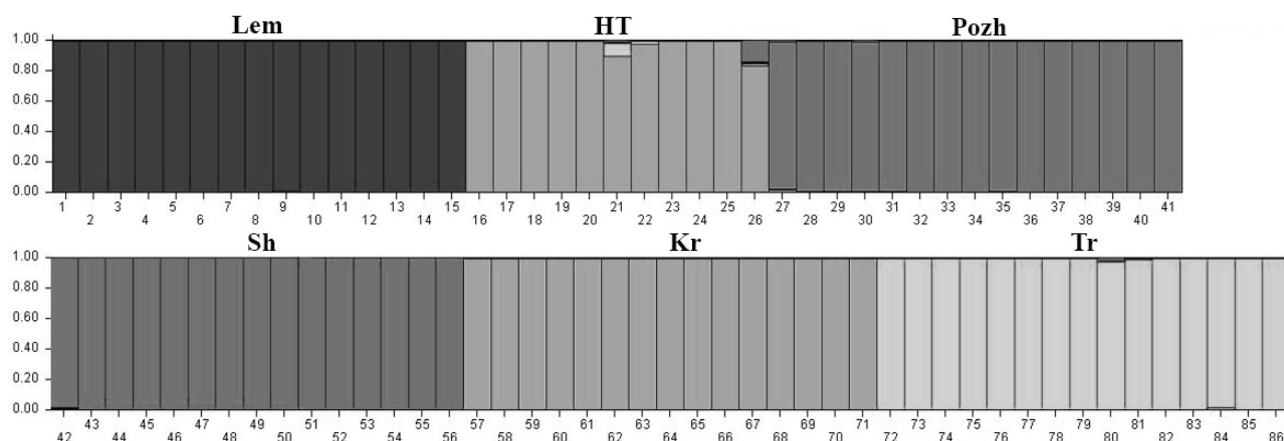
Для пари гутин-томнатиської та лемської популяцій характерним було найбільше значення генного потоку ( $N_m = 1,061$ ). Цей показник для інших груп популяцій був у два рази меншим (у середньому  $N_m = 0,496$ ). Кластеризацію Lem – HT разом, очевидно, можна пояснити потоком генів між близько розташованими популяціями. Показники генетичної гетерогенності гутин-томнатиської популяції – найменшої із досліджених нами популяцій *G. lutea* з Українських Карпат, – були високими, подібними до показників лемської популяції. Ці дані підтверджуються раніше отриманими нами результатами дослідження генетичної структури популяцій тирличу жовтого з використання RAPD- та ISSR-ПЛР, згідно яких популяція HT характеризувалася високими показниками генетичної різноманітності, незважаючи на низькі значення показників оцінки її екологічних параметрів [10]. Очевидно, розмежування популяцій Lem і HT невисоким відрогом гори та розташування на відстані лише 3 км одна від одної не перешкоджає вільному обміну генетичною інформацією між ними.

Найменш поліморфною виявилась агропопуляція з гори Пожижевська ( $H_e = 0,056 \pm 0,012$ ,  $S = 0,089 \pm 0,018$ ,  $P = 18,3\%$ ,  $D_j = 10,9\%$ ) (табл. 1). Подібні значення генетичного поліморфізму були встановлені за використання RAPD-, ISSR, IRAP- та RGAP-маркерів [4–6]. На протигагу генетичним характеристикам, за екологічними показниками ця популяція є повночленною з ліво-стороннім віковим спектром, пік чисельності якої припадає на молоді генеративні, віргінільні та іматурні особини; характеризується процвітаючою віталітетною структурою та конкурентною стратегією [10]. Виходячи із аналізу екологічної структури цієї популяції та зважаючи на те, що особинам виду *G. lutea* притаманний тривалий онтогенез (50–100 років) та довгий прегенеративний період (12–15 років), а вік існування вивченої популяції становить лише 40 років, необхідним є проведення динамічного моніторингу її стану. Це дозволить з'ясувати особливості формування генофонду інтродукованих популяцій та визначити перспективність використання штучних насаджень тирличів з метою підтримання генетичного різноманіття.

За результатами CDDP-аналізу встановлено, що природні популяції *G. lutea* з різних гірських масивів Українських Карпат суттєво відрізняються за рівнем генетичного поліморфізму (табл. 1). Наприклад, середнє значення генетичних дистанцій між рослинами за Жакардом для природних популяцій з хр. Чорногора становило в середньому 38,6 %, хр. Свидовець – 19,4 %. Як відомо з літературних даних, популяції *G. lutea* зі Свидовця не витримують конкуренції з високими чагарниками у фітоценозі, у них порушена вікова структура і знижена життєздатність особин [10]. Популяції з чорногірського масиву зростають в умовах заповідання, на відміну від свидовецьких, які зазнають значного пасторального навантаження. Усе вище згадане в сукупності обумовлює нижчий рівень генетичної мінливості трояської і крачунської популяцій і спричинює зміну їх загальної генетичної структури та зменшення стабільності. Також відомо, що рослинам *G. lutea* з хр. Чорногора властивий переважно генеративний спосіб розмноження, тоді як з хр. Свидовець – вегетативний. Оскільки, більша генетична різноманітність характерна для тих видів рослин, які розмножуються генеративно, а повний або частковий перехід до вегетативного розмноження призводить до збіднення генофонду, то це, поряд з іншими чинниками, забезпечує відносно високий рівень генетичної гетерогенності популяцій *G. lutea* з Чорногори [11–13].

Аналіз популяційно-генетичної структури тирличу жовтого за допомогою програми клас-





**Рис. 3.** Структура генетичної різноманітності *G. lutea*, встановлена на основі результатів CDDP-аналізу з використанням програми Structure 2.3.4.

терного аналізу Structure, яка ґрунтується на ймовірнісній моделі Байеса дозволив встановити, що найбільш імовірне значення  $K$  дорівнює шести, що й відповідає географічним локалітетам зростання *G. lutea* (рис. 3).

Найбільш відособленими виявилися лемська, крачунеська і шешульська популяції. Особини гутин-томнатиської популяції містили 1–13,7 % генетичного матеріалу спільного походження від інших популяцій. У трояській та пожижевській популяціях частка спільного генетичного матеріалу не перевищувала 2 % (рис. 3).

На основі результатів AMOVA встановлено, що на відмінності між популяціями припадає 71 % загальної генетичної мінливості, тоді як внутрішньопопуляційний поліморфізм становить 29 %, що є свідченням значної генетичної ізоляції популяцій *G. lutea*. Високий рівень генетичної диференціації часто пояснюється дрейфом генів та фрагментацією місць зростання, що призводить до генетичної ізоляції популяцій [14]. Антропогенний вплив є основним фактором, що спричинює фрагментацію середовища існування, зменшення розмірів популяцій, і відповідно обмеження потоку генів [15]. Для тирличу жовтого, як і для більшості рідкісних, зникаючих видів рослин, властива значна генетична диференціація [16–19].

Загалом, особливості генетичної структури популяцій *G. lutea* свідчать про необхідність проведення природоохоронних заходів з метою збереження та відновлення популяцій цього виду. Зокрема, у зв'язку із значною диференціацією

популяцій тирличу жовтого, можна рекомендувати підсів насіння або висадження рослин (наприклад, вирощених *in vitro*) з інших популяцій. У результаті цього, збагачення генетичним матеріалом генофонду будь-якого локалітету *G. lutea* повинно привести у майбутньому до збільшення його (локалітету) генетичного поліморфізму. Такі заходи є особливо актуальними для пожижевської та свидовецьких популяцій, які характеризувалися найнижчими показниками генетичної мінливості.

### Висновки

За допомогою CDDP-маркерів досліджено генетичну різноманітність п'яти природних та однієї штучно створеної популяцій *G. lutea*. Отримані дані свідчать про значну дивергенцію популяцій тирличу жовтого. Генетичний поліморфізм популяцій з хр. Чорногора був вищим у порівнянні зі свидовецькими популяціями. Агропопуляція з г. Пожижевська характеризувалася найнижчими показниками генетичної різноманітності. З метою збереження та відновлення генофонду окремих локалітетів *G. lutea* пропонується збагатити їх генетичним матеріалом з інших популяцій, яким характерний високий рівень генетичної різноманітності.

Робота виконана при фінансовій підтримці Міністерства освіти і науки України в межах проекту «Оцінка еколого-генетичного потенціалу рідкісних видів роду Тирлич (*Gentiana* L.) в Українських Карпатах».

### ЛІТЕРАТУРА

1. Червона книга України. Рослинний світ / [відп. ред. Ю.Р. Шеляг-Сосонко]. – К.: УЕ ім. М.П. Бажана, 1996. – 608 с.
2. Бедей М.І., Кризь О.П., Волощук М.І., Маханець І.А. Тирлич жовтий (*Gentiana lutea* L.) в Українських Карпатах. – Ужгород, 2010. – 134 с.

3. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh herbarium and mummified plant tissues // *Plant Mol. Biol.* – 1985. – 5. – P. 69–76.
4. Мосула М.З., Конвалюк І.І., Мельник В.М., Андрєєв І.О., Бублик О.М., Дробик Н.М., Кунах В.А. Генетичне різноманіття популяцій *Gentiana lutea* L. з хребта Свидівець Українських Карпат // *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів.* – 2013. – 11, № 2. – С. 250–259.
5. Mosula M.Z., Konvalyuk I.I., Mel'nyk V.M., Drobyk N.M., Tsaryk Y.V., Nesteruk Yu.Y., Kunakh V.A. Genetic polymorphism of *Gentiana lutea* L. (Gentianaceae) populations from the Chornohora ridge of the Ukrainian Carpathians // *Cytology and Genetics.* – 2014. – 48, N 6. – P. 371–377.
6. Мосула М.З., Конвалюк І.І., Мельник В.М., Бублик О.М., Андрєєв І.О., Дробик Н.М., Кунах В.А. Аналіз генетичної різноманітності популяцій *Gentiana lutea* L. методом маркування міжретротранспозонних послідовностей (IRAP-ПЛІП) // *Фізіологія растений и генетика.* – 2014. – 46, № 1. – С. 45–55.
7. Evanno G., Regnaut S., Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study // *Molecular Ecology.* – 2005. – 14, Issue 8. – P. 2611–2620.
8. Falush D., Stephens M., Pritchard J. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles // *Mol. Ecol. Notes.* – 2007. – 7, N 4. – P. 574–578.
9. Pritchard J., Stephens M., Donnelly P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data // *Genetics.* – 2000. – 155. – P. 945–959.
10. Мосула М.З., Майорова О.Ю., Грицак Л.Р., Мельник В.М., Дробик Н.М., Кунах В.А. Еколого-генетичний аналіз популяцій *Gentiana lutea* L. в Українських Карпатах // *Ecology and noospherology.* – 2014. – 25, № 3–4. – P. 5–13.
11. Nybom H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants // *Molecular Ecology.* – 2004. – N 13. – P. 1143–1155.
12. Kery M., Matthies D., Spillmann H.-H. Reduced fecundity and offspring performance in small populations of the declining grassland plants *Primula veris* and *Gentiana lutea* // *J. of Ecology.* – 2000. – 88. – P. 17–30.
13. Bushakra J.M., Hodges S.A., Cooper J.B., Kaska D.D. The extent of clonality and genetic diversity in the Santa Cruz Island ironwood, *Lyonothamnus floribundus* // *Molecular Ecology.* – 1999. – 8, N 3. – P. 471–475.
14. Hogbin P.M., Peakall R. Evaluation of the contribution of genetic research to the management of the endangered plant *Zieria prostrata* // *Conserv. Biol.* – 1999. – 13. – P. 514–522.
15. Qian X., Wang C.X., Tian M. Genetic diversity and population differentiation of *Calanthe tsoongiana*, a rare and endemic orchid in China // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – 14. – P. 20399–20413.
16. Gonzalez-Astorga J., Cruz-Angon A., Flores-Palacios A., Vovides A.P. Diversity and genetic structure of the Mexican endemic epiphyte *Tillandsia achyrostachys* E. Morr. ex Baker var. *achyrostachys* (Bromeliaceae) // *Ann. Bot.* – 2004. – 94. – P. 545–551.
17. Xie G.W., Wang D.L., Yuan Y.M., Ge X.-J. Population genetic structure of *Monimopetalum chinense* (Celastraceae), an endangered endemic species of eastern China // *Ann. Bot.* – 2005. – 95. – P. 773–777.
18. Gonzalez-Lopez O., Polanco C., Gyurgy Z., Pedryc A., Casquero P.A. Genetic variation of the endangered *Gentiana lutea* L. var. *aurantiaca* (Gentianaceae) in populations from the Northwest Iberian Peninsula // *Int. J. Mol. Sci.* – 2014. – 15. – P. 10052–10066.
19. Crawford D.J., Ruiz E., Stuessy T.F., Tepe E., Aqeveque P., Gonzalez F., Jensen R.J., Anderson G.J., Bernardello G., Baeza C.M., Swenson U., Silva O.M. Allozyme diversity in endemic flowering plant species of the Juan Fernandez Archipelago, Chile: ecological and historical factors with implications for conservation // *Am. J. Bot.* – 2001. – 88. – P. 2195–2203.

**MOSULA M.Z.<sup>1</sup>, MEL'NYK V.M.<sup>2</sup>, KONVALYUK I.I.<sup>2</sup>, KASPRUK N.G.<sup>1</sup>, DROBYK N.M.<sup>1</sup>, KUNAKH V.A.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Volodymyr Hnatiuk Ternopil National Pedagogical University,

Ukraine, 46027, Ternopil, M. Kryvonis str., 2, e-mail: maryanamosula@gmail.com

<sup>2</sup> Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine,

Ukraine, 03680, Kyiv, Akademika Zabolotnogo str., 150, e-mail: v.m.melnyk@imbg.org.ua

### **THE USE OF RESISTANCE GENE-ANALOG POLYMORPHISM MARKERS TO ANALYZE GENETIC DIVERSITY OF *GENTIANA LUTEA* L.**

The **aims** of the work was to determine the level of genetic diversity of *G. lutea* populations from two mountain ranges (Chornogora, Svydovets) of Ukrainian Carpathians. **Methods.** Genetic variability of 86 plants from six populations was assessed using CDDP fingerprinting with 6 primers. To evaluate the genetic polymorphism, the percentage of polymorphic loci (P), Shannon's information index (S), expected heterozygosity (He), gene flow ( $N_m$ ), Jaccard's ( $D_j$ ) and Nei's ( $D_N$ ) genetic distances were calculated. **Results.** Using CDDP primers, 120 bands were generated, and 95.8 % of those were polymorphic. The relatively high level of genetic diversity was revealed in *G. lutea* populations (P = 31 %, S = 0.167, He = 0.112). According to the Bayesian analysis, the populations were clustered in six different groups. Analysis of molecular variance (AMOVA) showed that the differences between populations account for 71 % of total genetic variation, whereas only 29 % of it were resided within populations. Agropopulation from Pozhyzhevsk Mountain had low values of genetic polymorphism (He = 0.056, S = 0.089, P = 18.3 %,  $D_j$  = 10.9 %). **Conclusions.** The obtained results of AMOVA indicate significant genetic isolation and differentiation of *G. lutea* populations. Comparison of *G. lutea* populations from Chornogora and Svydovets ranges showed that the former have a higher level of genetic heterogeneity. The low level of genetic diversity of Svydovets populations makes it necessary to protect them to ensure their survival.

**Keywords:** *Gentiana lutea* L., genetic polymorphism, CDDP-PCR, differentiation of populations.