

УДК 575.2:577.21

## ОЦІНКА ГЕНЕТИЧНОЇ РІЗНОМАНІТНОСТІ РІЗНИХ ВИДІВ ДЕРЕВНИХ РОСЛИН ЗА ДОПОМОГОЮ ПОЛІМОРФІЗМУ ІНТРОНІВ ГЕНІВ $\beta$ -ТУБУЛІНУ

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

Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України  
 Україна, 04123, Київ, вул. Осиповського, 2а  
 e-mail: kalafatlubov@gmail.com

**Мета.** Проаналізувати ефективність застосування методу аналізу поліморфізму довжини інтронів генів  $\beta$ -тубуліну (ТВР-метод) для оцінки генетичного різноманіття видів деревних рослин шляхом апробації метода на широкій вибірці рослин різного таксономічного положення.

**Метод.** Аналіз поліморфізму довжини інтронів генів  $\beta$ -тубуліну (ТВР-метод). **Результати.** На підставі аналізу поліморфізму довжини інтронів генів  $\beta$ -тубуліну у *Quercus robur* L., *Populus tremula* L., *Fagus sylvatica* L., *Fagus sylvatica* f. *salicifolia*, *Robinia pseudoacacia* L., *Morus alba* L., *Ulmus glabra* Huds. *Betula pendula* Roth. *Acer platanoides* L., *Acer negundo* L., *Acer saccharinum* Marshall, *Catalpa bignonioides* Walter, *Tilia cordata* Mill., *Tilia platyphyllos* Scop., *Aesculus hippocastanum* L., *Populus nigra* L., *Juglans regia* L., *Fraxinus excelsior* L., *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn., *Ginkgo biloba* L. створено молекулярно-генетичні профілі та ідентифіковано унікальні патерни для кожного з досліджених видів. Знайдено певні спільні фрагменти, притаманні окремим родам в межах родини. **Висновки.** ТВР-метод виявився зручним та досить надійним для молекулярно-генетичного маркування і для оцінки внутрішньо- та міжвидового поліморфізму господарчо-цінних, садово-паркових і лісоутворюючих видів.

**Ключові слова:** ТВР-метод, інтрони  $\beta$ -тубуліну, деревні рослини, генетичне різноманіття.

**Вступ.** У сучасних дослідженнях для вирішення багатьох проблем генетики, селекції та збереження біорізноманіття застосовується широкий спектр маркерних систем, зокрема, ДНК-маркери [1, 2]. Успішність будь-якого генетичного дослідження полягає у якісному підборі інформативних генетичних маркерів. Раніше в якості генетичних маркерів використовували морфологічні ознаки, однак кількість їх обмежена. Крім того, морфологічні ознаки можуть мати складний характер спадкування та частіше за все залежать від умов навколишнього середовища [3, 4]. Розвиток молекулярних методів дослідження зробив можливим створення нових тест систем, які дозволили аналізувати генетичний поліморфізм на рівні продуктів генів (білковий та біохімічний поліморфізм) та використовувати генетичний матеріал клітини для оцінки ДНК поліморфізму за допомогою анонімних послідовностей ДНК (ISSR, RAPD, SSR) [3, 5]. Розвиток більш досконалих підходів, які б орієнтувались на цільові послідовності генів привів до виникнення цілого спектру нових маркерних систем, одна з яких заснована на знаннях щодо структури генів, таких як метод оцінки поліморфізму довжини інтронів  $\beta$ -тубуліну: ТВР (tubulin base polymorphism). Цей метод, заснований на поліморфізмі довжини інтронів генів  $\beta$ -тубуліну, вперше був запропонований Д. Брев'єріо та співавт. [1, 2, 6–8]. ТВР-метод ґрунтується на тому, що інтрони в геномі присутні в чітко визначених кластерах, перший інтрон гена  $\beta$ -тубуліну починається з 397-го нуклеотиду після стартового коду ATG; більшість вивчених рослин мають 2 інтрони гена  $\beta$ -тубуліну, за винятком кукурудзи (*Zea mays* TUB1) і рису (*Oryza* TUB2) [9, 10], в яких відсутній другий інтрон. Варіабельні за своєю довжиною інтрони оточені консервативними ділянками екзонів, підібравши до яких праймери, можна за допомогою всього лише однієї ПЛР отримати копії багатьох ділянок, що перебувають між ними, тобто інтронів [6, 11, 12].

Важливим етапом генетичних досліджень із застосуванням нових маркерів є оцінка генетичного поліморфізму та патернів мінливості на видовому рівні. Наявність попередньої інформації такого плану є запорукою успішного використання цього методу в прикладному застосуванні, наприклад, оцінки біорізноманіття, ступеня клональності та ін. Раніше TBP-метод було вдало апробовано у деяких видів родів *Brassica* L., *Lotus* L., *Coffea* L., *Eleusine Gaertn.*, *Rosa* L., *Pinus* L., *Abies* Mill., *Quercus* L., *Populus* L., *Picea* A. Dietr. тощо [10, 13–16]. У той же час інформація по застосуванню TBP-методу для диференціації деревних рослин та оцінки їх поліморфізму є вкрай неповною.

Метою роботи було проаналізувати ефективність застосування методу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів  $\beta$ -тубуліну для аналізу генетичного різноманіття та поліморфізму деревних рослин шляхом апробації його для широкої вибірки деревних рослин різного таксономічного положення.

#### Матеріали і методи

Для виділення ДНК та подальшої оцінки генетичного поліморфізму інтронів генів  $\beta$ -тубуліну використовували вегетативний матеріал (термінальні бруньки із фрагментами пагонів та листові пластинки), зібраний в садово-паркових насадженнях різних районів Києва:

Матеріал *Quercus robur* L. зібрано на території «Голосіївська пустинь», локалітети *Populus tremula* L. досліджено на території «Лиса Гора», рослини *Fagus sylvatica* L., *Fagus sylvatica* f. *salicifolia*, *Robinia pseudoacacia* L., *Morus alba* L., *Ulmus glabra* Huds., *Betula pendula* Roth, *Acer platanoides* L., *Acer negundo* L., *Acer saccharinum* Marshall, *Catalpa bignonioides* Walter, *Tilia cordata* Mill., *Tilia platyphyllos* Scop., *Aesculus hippocastanum* L., *Populus nigra* L., *Juglans regia* L., *Fraxinus excelsior* L., *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn., *Ginkgo biloba* L. було зібрано на території «Гірка Крістера».

Досліджені рослини відносяться до дев'яти порядків, 12 родин, 15 родів. Кількість дерев у вибірках не перевищувала десяти рослин.

Геномну ДНК екстрагували з вегетативного матеріалу за допомогою ЦТАБ-методу [17]. Якість і кількість ДНК перевіряли за допомогою електрофорезу в 1,5 % агарозному гелі і спектрофотометрично на біофотометрі «Erppendorf» з визначенням концентрації і ступеня забруднення ДНК. Зразки ДНК зберігали при  $-20^{\circ}\text{C}$ . TBP-

аналіз проводили згідно з Бревіаріо та ін. [2]. Послідовності праймерів були наступними [10]: TBP-F:5' -AACTGGGCAARGGNCAYTAYAC-3'; TBP-R: 5'-ACCATRCAYTCRTCDGCRTTYTC-3'. ПЛР проводили на ампліфікаторі Thermal Cycler 2720 («Applied Biosystems», США). Реакційна суміш (об'ємом 10 мкл) містила п'ятикратний ПЛР буфер з сульфатом амонію, 2,5 ммоль  $\text{MgCl}_2$ , 50 нг рослинної ДНК, 1  $\mu\text{M}$  кожного з праймерів, 0,2 мм кожного dNTPs, 0,5 од. Таq-полімерази («Fermentas», Литва). Ампліфікацію проводили за наступним протоколом: початкова денатурація ( $94^{\circ}\text{C}$ ) — 3 хв, 35 циклів ампліфікації (денатурація  $94^{\circ}\text{C}$  — 30 с, відпал праймерів  $55^{\circ}\text{C}$  — 40 с, подовження  $72^{\circ}\text{C}$  — 1,5 хв), кінцеве подовження  $72^{\circ}\text{C}$  — 8 хвилин,  $15^{\circ}\text{C}$  — утримання [2].

Кожну ПЛР-реакцію проводили як мінімум в триразовій повторності з використанням негативного контролю, щоб при подальшому електрофоретичному аналізі мати можливість виявити неспецифічні продукти ампліфікації. Продукти ПЛР (0,5 мкл) розділяли за допомогою електрофорезу в 6 %-вому неденатуруючому поліакриламідному гелі в 1x TBE-буфері [13] при 300 В протягом 4 год проти ДНК-маркеру (O'Gene Ruler™ 100bp Plus DNA Ladder, ready-to-use; «Fermentas», Литва). Візуалізацію фрагментів проводили шляхом фарбування гелів нітратом срібла [18, 19]. Після електрофорезу та проявлення гелю фотографували у видимому світлі та отримані зображення піддавали подальшому аналізу.

Аналіз зображень електрофоретичних гелів та визначення довжини відтворюваних і чітких фрагментів визначали за допомогою програми GelAnalyzer: (<http://www.gelanalyzer.com/>).

Рівень поліморфізму TBP-маркерів оцінювали за допомогою показника PIC (Polymorphism Information Content) за формулою:

$$\text{PIC} = \frac{\sum_{i=1}^n (1 - f_{ai}^2 - f_{bi}^2)}{n},$$

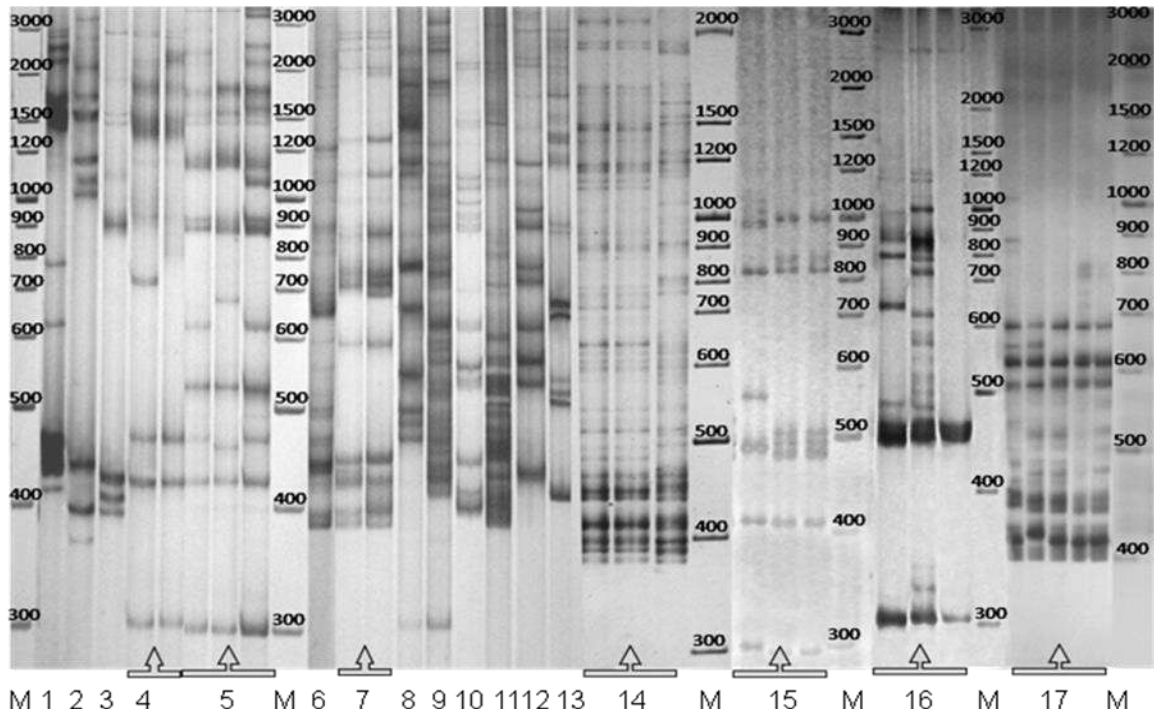
де  $n$  — загальна кількість фрагментів, що були оцінені,  $f_a$  частота випадків (організмів) у яких був відсутній  $i$ -й фрагмент та  $f_b$  частота організмів, у яких цей фрагмент був присутній [10, 20].

#### Результати та обговорення

Проведений аналіз двадцяти видів деревних рослин за допомогою TBP методу показав,

що основна область розподілення ампліконів знаходилась в межах від 275 п.н. до 1500 п.н. (рис. 1). У досліджених видів рослин всього було зафіксовано 275 ампліфікованих фрагмента різної довжини. Найменшу кількість ампліконів мали *Robinia pseudoacacia* (306 п.н. — 871 п.н., вісім ампліконів), а найбільшу — *Tilia cordata* (55 ампліконів), довжина яких варіювала

в межах від 366 п.н до 1352 п.н. Загальна структура бендів, виявлених в результаті електрофорезу ампліконів від кожної рослини, дуже поліморфна у межах одного роду, однак має характерні ознаки для кожного з родів, що пов'язано із високим поліморфізмом інтронів  $\beta$ -тубуліну.



**Рис. 1.** Електрофореграми з ампліконами інтронів генів  $\beta$ -тубуліну у окремих видів рослин: 1 — робінія звичайна (*Robinia pseudoacacia*), 2 — шовковиця біла (*Morus alba*), 3 — в'яз шорсткий (*Ulmus glabra*), 4 — береза повисла (*Betula pendula*), 5 — бук звичайний (*Fagus sylvatica*), 6 — клен сріблястий (*Acer saccharinum*), 7 — клен гостролистий (*Acer platanoides*), 8 — катальпа бігніонієподібна (*Catalpa bignonioides*), 9 — липа серцелиста (*Tilia cordata*), 10 — гірकोкаштан звичайний (*Aesculus hippocastanum*), 11 — тополя чорна (*Populus nigra*), 12 — горіх волоський (*Juglans regia*), 13 — ясен звичайний (*Fraxinus excelsior*), 14 — осика звичайна (*Populus tremula*), 15 — дуб черешчатий (*Quercus robur*), 16 — вільха чорна (*Alnus glutinosa*), 17 — клен ясенелистий (*Acer negundo*), М — маркер.

Рослини порядку Fagales поширені в Азії, Європі та Північній Америці, де вони створюють великі неперервні ліси, слугуючи важливими природними ресурсами. Окрім вкладу в економіку вони є ключовими видами лісових екосистем і основними генераторами лісового біорізноманіття. Разом з тим, ступінь використання для їх вивчення генетичних маркерів набагато нижче ніж для хвойних, що пов'язано із певними біологічними обмеженнями для застосування багатьох методів (зокрема високим віком покоління та довговічністю рослин) [21]. Проаналізовані представники п'яти родів порядку (*Betula*

*pendula*, *Alnus glutinosa*, *Quercus robur*, *Fagus sylvatica*, *Fagus sylvatica* f. *salicifolia* та *Juglans regia*) мали різну кількість ампліфікованих фрагментів. У *Betula pendula* з 15 проаналізованих фрагментів різної довжини спостерігалися спільні для всіх зразків в межах виду фрагменти з приблизною довжиною 300 п.н., 425 п.н. та 465 п.н., у *Alnus glutinosa* — з 19 виявлених довжин ампліконів, спільні фрагменти були з приблизною довжиною ампліконів 300 п.н. та 460 п.н. Оцінка рівня поліморфізму PIC у даних видів склала 0,319 та 0,380, що є досить висо-

ким значенням, оскільки максимальна оцінка PIC складає 0,5 [22].

У *Quercus robur* виявлено 19 фрагментів, з яких спільними для рослин виду були фрагменти з приблизною довжиною ампліконів 500 п.н., 880 п.н., 1100 п.н. Значення PIC у даного виду дорівнювало 0,295.

При порівнянні дерев різних форм роду *Fagus* (*Fagus sylvatica* та *Fagus sylvatica* f. *Salicifolia*) з 16 ампліфікованих фрагментів було виявлено спільні для представників виду бенди з приблизною довжиною 300 п.н., 535 п.н., 1150 п.н. та 1435 п.н. Значення PIC у даного виду склало 0,375.

Рослини *Juglans regia* мали дев'ять ампліфікованих фрагментів, з яких усі були мономорфними, що може бути пов'язане як із малими об'ємами вибірок, так і клональною природою рослин.

Слід зауважити, що при порівнянні електрофоретичних профілів представників порядку Fagales між собою, зокрема, *Betula pendula*, *Fagus sylvatica*, *Alnus glutinosa* та *Quercus robur*, можна спостерігати спільний мажорний фрагмент, вага якого, варіювала в межах 290–305 п.н. Для дерев *Betula pendula* та *Fagus sylvatica* можна було відмітити ще два фрагменти, які знаходились в межах 400–500 п.н. (див. рис. 1). Із всіх досліджуваних представників порядку Fagales лише *Juglans regia* мав відмінний від усіх профіль.

Роди *Acer* L. та *Aesculus* L. відносяться до порядку Sapindales, вони цікаві в якості декоративних садово-паркових рослин. Аналіз видів роду *Acer* за допомогою ТВР маркерів виявив у *A. negundo* та *A. saccharinum* 20 фрагментів з яких у *A. negundo* шість були мономорфними (приблизно 400 п.н., 435 п.н., 530 п.н., 640 п.н., 685 п.н., 770 п.н.), а у *A. saccharinum* — 10 мономорфних (приблизно 380 п.н., 390 п.н., 415 п.н., 425 п.н., 440 п.н., 465 п.н., 490 п.н., 500 п.н., 555 п.н., 595 п.н.). У *A. platanoides* — 14 бендів, з них 9 — мономорфних (приблизно 390 п.н., 400 п.н., 425 п.н., 450 п.н., 595 п.н., 865 п.н., 1000 п.н., 1100 п.н., 1295 п.н.). Значення PIC у даних видів склали 0,251, 0,262 та 0,179, відповідно.

У рослин *Aesculus hippocastanum* спостерігалось 14 фрагментів, серед яких п'ять бендів були мономорфними (приблизно 400 п.н., 415 п.н., 445 п.н., 530 п.н., 995 п.н.). Оцінка рівня поліморфізму PIC у даного виду склала 0,321. Середнє значення PIC при аналізі двох

видів роду *Aesculus* L. з Чехії за мікросателітними локусами склало 0,43 [23].

При порівнянні молекулярних профілів для всіх проаналізованих видів порядку Sapindales також спостерігалась певна схожість фрагментів у межах близько 400 п.н., зокрема *Acer saccharinum*, *Acer platanoides* та *Aesculus hippocastanum* (див. рис. 1).

Аналіз рослин порядку Rosales (*Morus alba* та *Ulmus glabra*) показав 11 ампліфікованих фрагментів у даних видів, з яких у *M. alba* мономорфними були три (довжиною приблизно 380 п.н., 405 п.н., 430 п.н.) та у *U. glabra* — один фрагмент (з довжиною приблизно 420 п.н.). Електрофоретичні профілі *M. alba* та *U. glabra* в значному ступені відрізняються, хоча ці види і знаходяться в межах одного порядку. Оцінка PIC для кожного з цих видів становила 0,364. Для *M. alba* інформаційний індекс Шеннона за ТВР склав 0,44, що вище у два рази відносно рівня оцінок отриманих за іншими (SRAP) маркерами для цього виду ( $I = 0,22$ ) [24]. Для *U. glabra* значення PIC, оцінене за допомогою ТВР маркерів, знаходиться на рівні оцінок поліморфізму отриманих за SSR маркерами (PIC = 0,141–0,899) у представників цього виду Іберійського півострова [25].

У дерев *Populus tremula* було виявлено 49 ампліфікованих фрагментів. Спільними для проаналізованих рослин були п'ять фрагментів з довжиною приблизно 365 п.н., 375 п.н., 670 п.н., 1100 п.н., 1130 п.н. Оцінка рівня поліморфізму PIC для цього виду склала 0,346.

У видів роду *Tilia* L. (*T. cordata* та *T. platyphyllos*) було детектовано 55 фрагментів (максимальне число серед всіх проаналізованих видів деревних рослин), з яких тільки три були спільними з довжиною приблизно 415 п.н., 430 п.н. та 460 п.н. Значення PIC у *T. cordata* склало 0,343.

До порядку Laminales відносяться роди *Fraxinus* L., *Catalpa* Scop. До роду *Fraxinus* відноситься *Fraxinus excelsior*, у дерев цього виду спостерігався один мономорфний локус (біля 520 п.н.) з 30 досліджених. Значення PIC — 0,430, максимальне серед інших досліджених видів. При мікросателітному аналізі, який було виконано, наприклад, для північних популяцій *Fr. excelsior* аналогічно спостерігається дуже високий внутрішньовидовий поліморфізм ( $H_O = 0,730$ ,  $H_E = 0,871$  та від 18 до 52 алелів на локус) [26].

Рослини з найменшою кількістю ампліконів відносяться до різних порядків Laminales (*Catalpa bignonioides*) — 9 фрагментів та Fabales (*Robinia pseudoacacia*) — 8 фрагментів мали три (приблизно 540 п.н., 650 п.н., 780 п.н.) та п'ять (приблизно 420 п.н., 440 п.н., 460 п.н., 675 п.н., 870 п.н.) мономорфних фрагмента. Значення PIC у *Catalpa bignonioides* та *Robinia pseudoacacia* дорівнювало 0,333 та 0,188, відповідно. Цікаво, що середнє значення PIC для нещодавно розроблених праймерів до EST-SSR *R. pseudoacacia* було вище приблизно в 2 рази, складаючи 0,397 з ефективною кількістю алелів 2,123 та середньою кількістю алелів на локус 4,267 [27].

Нижчий поліморфізм за TBP *R. Pseudoacacia*, відносно оціненого для неї за допомогою щойно розроблених EST-SSR маркерів можна пов'язати із тим, що матеріал відібраний нами було отримано з близькоспоріднених (в умовах інтродукції) рослин.

Для аналізу, проведеного за допомогою EST-SSR праймерів, щойно підібраних до інших видів роду *Catalpa* Scop. (*C. bungei*, *C. fargesii*, *C. Duclouxii*, *C. ovata*), середня кількість алелів на локус також була досить невисокою і стано-

вила біля семи, а  $H_o$ ,  $H_e$  — 0,53 та 0,75 відповідно [28].

Необхідно зауважити, що високий рівень значень PIC багатьох проаналізованих представників досліджуваних видів, може бути пов'язаний як з малими об'ємами вибірок для окремих видів, що вивчалися, так і з окремими продуктами ПЛР (окремими випадковими фрагментами ДНК, рослинними вторинними продуктами та інш.). Однак це не вплинуло на можливість за допомогою TBP маркерів розрізняти окремі види, форми, родини. Отримана оціночна інформація про характер поліморфізму TBP локусів окремих видів є базовою для подальшого використання TBP-метода в генотипуванні та популяційних дослідженнях.

Згідно з рисунком 2, видно, що такі показники поліморфізму як інформаційний індекс Шенона ( $H_e$ ), очікувана гетерозиготність ( $H_e$ ) та ефективна кількість алелів на локус ( $I$ ) найбільші у *Fagus sylvatica* (0,503; 0,343 та 1,603) та *Fraxinus excelsior* (0,524; 0,348 та 1,574), а найменші у *Acer platanoides* (0,242; 0,166 та 1,283) та *Robinia pseudoacacia* (0,227; 0,155 та 1,265), прямо корелюють із значеннями PIC, при цьому PIC є трохи більш чутливою оцінкою.

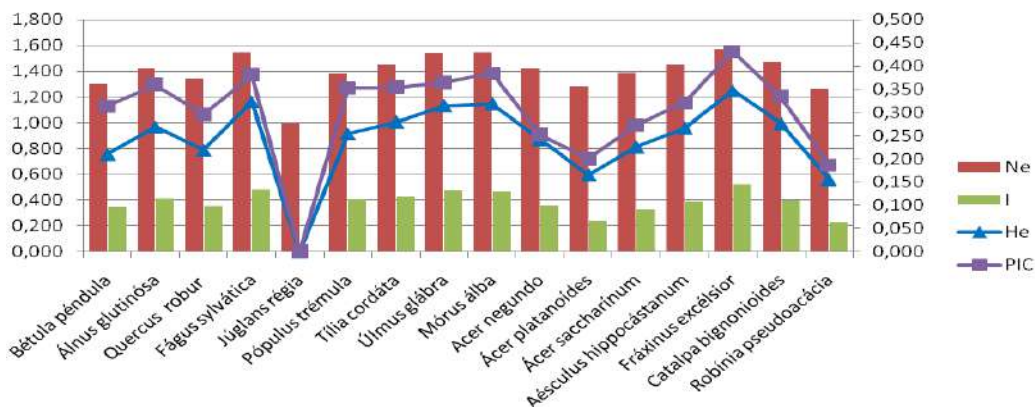


Рис. 2. Основні параметри генетичного різноманіття видів деревних порід за TBP-маркерами.

При порівнянні електрофоретичних профілів, отриманих на основі TBP-методу для досліджених представників різних видів, можна відмітити, що види рослин відрізняються за кількістю ампліконів та їх розподілом за розмірами. Ці висновки погоджуються з UPGMA дендрограмою, отриманою на основі матриці генетичних відмінностей (DN) [29] за даними

TBP (1000 бутстрепів), котра відокремлює рослини на рівні видів та родів, в деяких випадках і родин (рис. 3). Треба відмітити, що на високому таксономічному рівні розподільна здатність TBP-методу досить невисока, як видно із зниження значень бутстреп підтримки з переходом з рівня видів і родів до рівня родин.

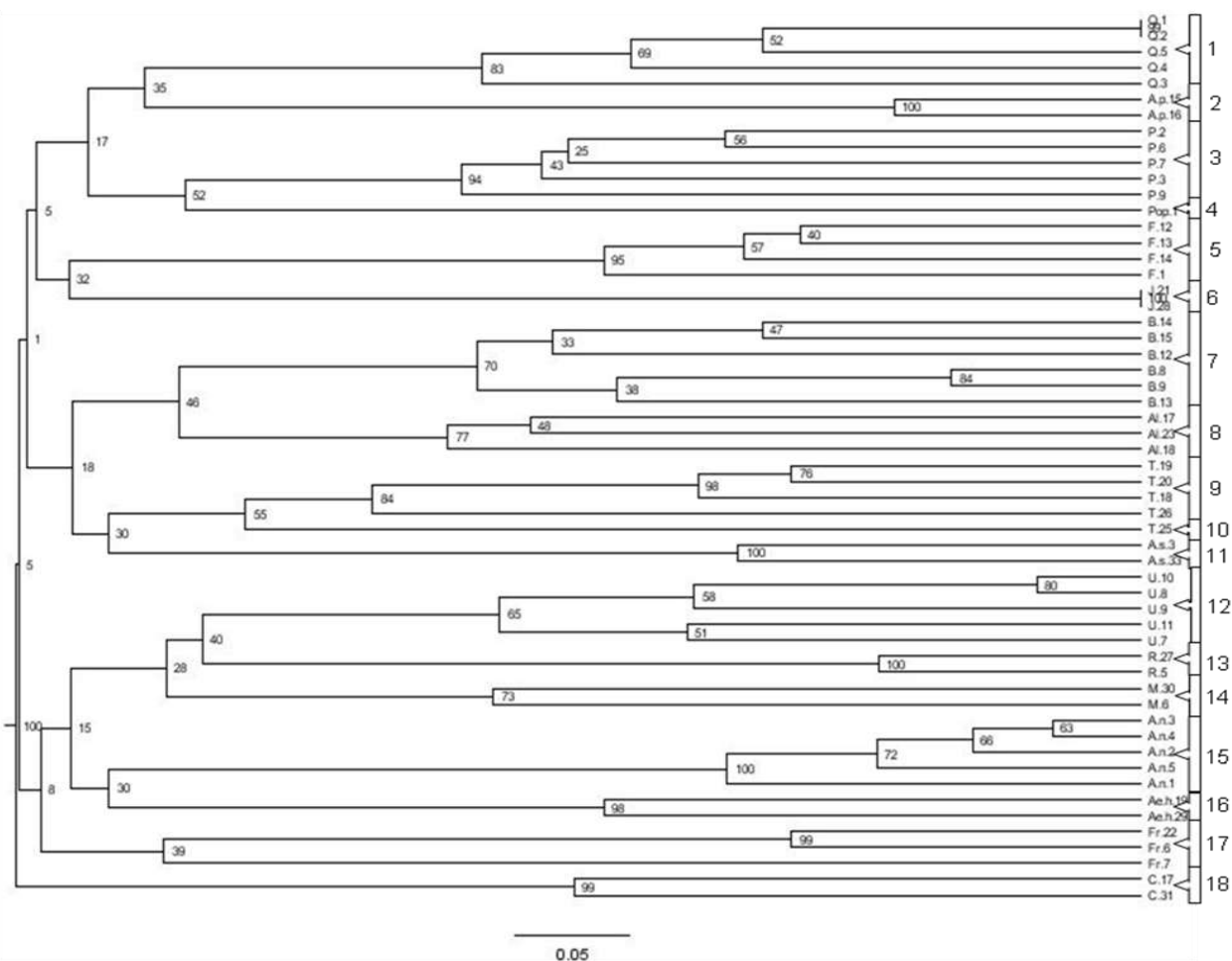


Рис. 3. UPGMA аналіз видів деревних рослин: 1 — *Quercus robur*, 2 — *Acer platanoides*, 3 — *Populus tremula*, 4 — *Populus nigra*, 5 — *Fagus sylvatica*, 6 — *Juglans regia*, 7 — *Betula pendula*, 8 — *Alnus glutinosa*, 9 — *Tilia cordata*, 10 — *Tilia platyphyllos*, 11 — *Acer saccharinum*, 12 — *Ulmus glabra*, 13 — *Robinia pseudoacacia*, 14 — *Morus alba*, 15 — *Acer negundo*, 16 — *Aesculus hippocastanum*, 17 — *Fraxinus excelsior*, 18 — *Catalpa bignonioides*.

Застосований метод, який заснований на аналізі поліморфізму довжин інтронів генів  $\beta$ -тубуліну, дозволяє чітко диференціювати види одного роду між собою, отримувати інформацію про індивідуальні поліморфізми рослин. Це має велике значення для екологічних досліджень, при аналізі популяційної динаміки деревостанів, швидкій діагностиці випадків гібридогенного походження, поліплоїдії рослин [30].

Встановлено, що ТВР метод є слабко придатним для порівняльного аналізу на високому таксономічному рівні. Основною причиною цього є значна доля шумової компоненти мінливості ТВР на рівні родини та вище, що виникає за рахунок високої швидкості змін у інтронах генів тубулінів, яка співставна із швидкістю еволюції на рівні родин. Відповідно

досить висока кількість поліморфізмів на високих таксономічних рівнях не є спільною для всіх його представників, а виникла і щезала неодноразово за різних обставин і у різних представників таксону. Водночас на нижчих таксономічних рівнях, навпаки, значна частина поліморфізмів має спільне походження в межах таксону, що і дозволяє вдало ідентифікувати види та роди рослин і вивчати внутрішньовидову мінливість. В цілому, за допомогою ТВР-методу вдалося ідентифікувати унікальні патерни для 20 деревних видів рослин та створити молекулярні профілі кожного з цих видів, знайти деякі спільні фрагменти, які притаманні окремим родам в межах родини.

## Висновки

Таким чином, ТВР метод виявився зручним та досить надійним як для молекулярно-генетичного маркування деревних рослин, так і для вивчення окремих аспектів внутрішньовидового поліморфізму господарчоцінних, садово-паркових та лісоутворюючих деревних рослин.

## Перелік літератури

1. *Braglia L., Manca A., Mastromauro F., Breviario D.* cTBP: a successful intron length polymorphism (ILP)-based genotyping method targeted to well defined experimental needs. *Diversity*. 2010. Vol. 2. P. 572–585.
2. *Bardini M., Lee D., Donini P. et al.* Tubulin-based polymorphism (TBP): a new tool, based on functionally relevant sequences, to assess genetic diversity in plant species. *Genome*. 2004. Vol. 47. P. 281–291.
3. *Sulimova G. E.* DNA-markers in genetic studies: types of markers, their properties and field of application. *Usp. Sovr. Biol.* 2004. Vol. 124, No. 3. P. 260–271 (in Russ.).
4. *Khlestkina E. K.* Molecular markers in genetic studies and breeding. *Vavilov. Zh. Genet. i Selek.* 2013. Vol. 17, No. 4/2. P. 1044–1054 (in Russ.). <http://vavilov.elpub.ru/jour/article/view/220/221>.
5. *Rabokon A. N., Demkovich A. E., Pirko Ya. V., Blume Ya. B.* Studing of b-tubulin gene intron length polymorphism of *Triticum aestivum* L. and *Hordeum vulgare* L. varieties. *Faktors Exp. Evol. Org.* 2015. Vol. 17. P. 82–86 (in Ukr.).
6. *Le Hir H., Nott A., Moore M. J.* How introns influence and enhance eukaryotic gene expression. *Trends Biochem. Sci.* 2003. Vol. 28, No. 4. P. 215–220.
7. *Li S.-C., Tang P., Lin W.-C.* Intronic MicroRNA: discovery and biological implications. *DNA and Cell Biol.* 2007. Vol. 26, No. 4. P. 195–207.
8. *Morello L., Breviario D.* Plant spliceosomal introns: not only cut and paste. *Curr. Genomics*. 2008. Vol. 9, No. 4. P. 227–238.
9. *Aldrich P. R., Jagtap M., Michler C. H., Romero-Severson J.* Amplification of north american red oak microsatellite markers in european white oaks and chinese chestnut. *Silvae Genetica*. 2003. Vol. 52, No. 3–4. P. 176–179.
10. *Breviario D., Baird W. V., Sangoi S. et al.* High polymorphism and resolution in targeted fingerprinting with combined  $\beta$ -tubulin introns. *Mol. Breed.* 2007. Vol. 20, No. 3. P. 249–259.
11. *Gerber S., Chadouf J., Gugerli F. et al.* High rates of gene flow by pollen and seed in oak populations across Europe. *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9, No. 1. p. e85130. Doi:10.1371/journal.pone.0085130.
12. *Sakurai A., Fujimori S., Kochiwa H. et al.* On biased distribution of introns in various eukaryotes. *Gene*. 2002. Vol. 300, No. 1–2. P. 89–95.
13. *Pirko N. N., Demkovych A. Ye., Kalafat L. O. et al.* Intron length polymorphism of  $\beta$ -tubulin genes in different representatives of Pinaceae Lindl. family. *J. Bot.* 2016. Vol. VIII, No. 2 (13). P. 5–9.
14. *Frouz J., Vobořilová V., Janoušová I. et al.* Spontaneous establishment of late successional tree species English oak (*Quercus robur*) and European beech (*Fagus sylvatica*) at reclaimed alder plantation and unreclaimed post mining sites. *Ecol. Engineering*. 2015. Vol. 77. P. 1–8.
15. *Petit R. J., Csaikl U. M., Bordács S. et al.* Chloroplast DNA variation in European white oaks. *Forest Ecol. Management*. 2002. Vol. 156, No.1–3. P. 5–26.
16. *Neophytou C., Aravanopoulos F., Fink S., Dounavi A.* Detecting interspecific and geographic differentiation patterns in two interfertile oak species (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Q. robur* L.) using small sets of microsatellite markers. *Forest Ecol. Management*. 2010. Vol. 259, No. 10. P. 2026–2035.
17. *Green M. R., Sambrook J.* Molecular cloning. *Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press*. 2012. 1890 p.
18. *Benbouza H., Jacquemin J.-M., Baudoin J.-P., Mergeai G.* Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silverstaining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2006. Vol. 10, No. 2. P. 77–81.
19. *Rahman M. H., Jaquish B., Khasa P. D.* Optimization of PCR protocol in microsatellite analysis with silver and SYBR® stains. *Plant Mol. Biol. Rept.* 2000. Vol. 18, No. 4. P. 339–348.
20. *Hongtrakul V., Huestis G. M., Knapp J.* Amplified fragment length polymorphisms as a tool for DNA fingerprinting sunflower germplasm: genetic diversity among oilseed inbred lines. *Theor. Appl. Genetics*. 1997. Vol. 95, No. 3. P. 400–407.
21. *Kremer A., Abbott A. G., Carlson J. E. et al.* Genomics of Fagaceae. *Tree Genetics Genomes*. 2012. Vol. 8, No. 3. P. 583–610.
22. *Hongtrakul V., Huestis G. M., Knapp S. J.* Amplified fragment length polymorphisms as a tool for DNA fingerprinting sunflower germplasm: genetic diversity among oilseed inbred lines. *Theor. Appl. Genetics*. 1997. Vol. 95, No. 3. P. 400–407.
23. *Vyhnánek T., Bačovský V., Vlašínová H. et al.* The study of genetic variability in the genus *Aesculus* L. by SSR markers. *Zprávy Lesnického Výzkumu*. 2013. Vol. 58, No. 3. P. 244–249.
24. *Bajpai P. K., Warghat A. R., Sharma R. K. et al.* Structure and genetic diversity of natural populations of *Morus alba* in the Trans-Himalayan Ladakh region. *Biochem. Genetics*. 2014. Vol. 52, No. 3. P. 137–152.
25. *del Puerto M. M., García M. F., Mohanty A., Martín J.* Genetic diversity in relict and fragmented populations of *Ulmus glabra* Hudson in the central system of the Iberian peninsula. *Forests*. 2017. Vol. 8, No. 5. P. 143. doi: 10.3390/f8050143.

26. Tollefsrud M. M., Myking T., Sønstebo J. H. et al. Genetic Structure in the Northern Range Margins of Common Ash, *Fraxinus excelsior* L. *PLoS ONE*. 2016. Vol. 11, No. 12. DOI: 10.1371/journal.pone.0167104.
27. Guo Q., Wang J.-X., Su L.-Z. et al. Development and evaluation of a novel set of EST-SSR markers based on transcriptome sequences of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) *Genes*. 2017. Vol. 8, No. 7. P. 177. DOI: 10.3390/genes8070177.
28. Wang P., Ma Y., Ma L. et al. Development and Characterization of EST-SSR Markers for *Catalpa bungei* (Bignoniaceae). *Appl. Plant Sci*. 2016. Vol. 4, No. 4. P. 1500117. DOI: 10.3732/apps.1500117.
29. Nei M, Li W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979. Vol. 76, No. 10. P. 5269–5273.
30. Guo W., Hou J., Yin T., Chen Y. An analytical toolkit for polyploid willow discrimination. *Sci. Repts*. 2016. Vol. 6. P. 37702.

Представлено В. А. Кунахом  
Надійшла 01.11.2017

#### ESTIMATION OF GENETIC DIVERSITY FOR DIFFERENT SPECIES OF WOODY PLANTS BY INTRON LENGTH POLYMORPHISM OF $\beta$ -TUBULIN GENES

L. O. Kalafat, N. N. Pirko, A. Ye. Demkovych, S. N. Privalikhin, A. N. Rabokon, Ya. V. Pirko, Ya. B. Blume

Institute of Food Biotechnology and Genomics NAS of Ukraine  
Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2A  
e-mail: kalafatlubov@gmail.com

**Purpose.** The effectiveness of using the method of intron length polymorphism of  $\beta$ -tubulin genes is analyzed to evaluate the genetic diversity and polymorphism of tree plants by approbating it for a broad sample of tree plants of different taxonomic positions. **Method.** The method of estimation intron length polymorphism of  $\beta$ -tubulin (tubulin base polymorphism — TBP-method) has been tested. **Results.** The molecular genetic profiles and the unique patterns for the *Quercus robur* L., *Populus tremula* L., *Fagus sylvatica* L., *Fagus sylvatica f. salicifolia*, *Robinia pseudoacacia* L., *Morus alba* L., *Ulmus glabra* Huds., *Betula pendula* Roth., *Acer platanoides* L., *Acer negundo* L., *Acer saccharinum* Marshall, *Catalpa bignonioides* Walter, *Tilia cordata* Mill., *Tilia platyphyllos* Scop., *Aesculus hippocastanum* L., *Populus nigra* L., *Juglans regia* L., *Fraxinus excelsior* L., *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn., *Ginkgo biloba* L. have been created. Some common fragments inherent in individual genera within the family have been found. **Conclusions.** TBP-method is rather convenient and reliable. It can be used both for molecular genetic marking and for the study of intra- and interspecific polymorphism of economically valuable, horticultural and forest trees.

**Keywords:** TBP-method,  $\beta$ -tubulin introns, tree plants, genetic diversity.