

А.Є. Демкович¹, О.А. Мудрик², Н.М. Трубнікова³, Д.В. Політов²**ВИКОРИСТАННЯ МІКРОСАТЕЛІТНИХ ЛОКУСІВ
В ПОПУЛЯЦІЙНО-ГЕНЕТИЧНОМУ АНАЛІЗІ *PINUS SYLVESTRIS* L.**ДНК-маркери, SSR, мікросателіти, *Pinus sylvestris* L.**Вступ**

Розробка і впровадження обґрунтованої з популяційно-генетичних засад системи лісовідновлення та лісорозведення є одними з головних завдань сучасної природоохоронної генетики [3]. Створення постійної лісонасінної бази головних лісоутворюючих видів на генетико-селекційних засадах – запорука вирощування високопродуктивних якісних і стійких лісів [4,7–9,12,15]. Довгострокові та широкомасштабні роботи зі створення і підвищення ефективності генетико-селекційного комплексу лісових ресурсів потребують оцінки генетичного поліморфізму, а надалі генетичної паспортизації, визначення походження тих чи інших дерев або насаджень [9]. Роботи, що провадяться в цьому напрямку, пов'язані з аналізом поліморфізму фенотипічних [13,14] або генетичних [1,5,7,11,12,15] ознак. Найпоширенішими маркерами для популяційно-генетичних оцінок є ізоферменти, які, завдяки невисокому поліморфізму, традиційно використовуються з метою районування та аналізу генетичної різноманітності насаджень, але малоприматні для ідентифікації потомств та генетичної паспортизації рослин [18]. В останні десятиріччя інтенсивного світового розвитку набувають маркери, пов'язані з поліморфізмом ДНК. В Україні перші дослідження поліморфізму ДНК однієї з головних господарсько-цінних порід хвойних сосни звичайної (*Pinus sylvestris* L.) проведені за допомогою RAPD та ISSR маркерів [5], широкому застосуванню яких в популяційно-генетичних дослідженнях перешкоджають їх неспецифічність та домінантність. Тому актуальним завданням сучасної генетики лісів є впровадження маркерів «нового покоління», придатних для масового використання і вирішення широкого кола завдань. Саме такими невибагливими та достатньо добре розробленими для хвойних є мікросателітні локуси (SSR - simple sequence repeats – прості багаторазові повтори ДНК некодуєчої частини геному). Кодомінантні за характером успадкування та гіперваріабельні завдяки високій частоті мутацій, SSR-маркери успішно використовуються у дослідженнях індивідуальної мінливості особин. Методично вони потребують лише проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) мають високу відтворюваність результатів і розподільну здатність [17,19, 24, 25]. Відносно аборигенних видів хвойних в Україні та Росії такі дослідження тільки розпочинаються [2,10]. Зокрема, розроблено методику використання SSR-маркерів для генетичної паспортизації лісонасінних плантацій сосни звичайної єдиного генетико-селекційного комплексу Росії [9]. В Україні цей підхід раніше застосовувався лише в генетичних дослідженнях до рослин антропогенно порушених територій [25].

Мета і завдання досліджень

Нашим завданням стала апробація, модифікація та впровадження методики мікросателітного аналізу сосни звичайної в науково-дослідницькій роботі на базі ресурсів Донецького ботанічного саду НАН України та Інституту невідкладної і відновлювальної хірургії ім. В.К. Гусака АМН України. Основними етапами опрацювання методики були збір рослинного матеріалу, виділення ДНК, підбір умов ПЛР для тестування локусів, електрофоретичне розділення продуктів ПЛР, забарвлення ампліконів та ідентифікування генотипів дерев.

Об'єкти та методи досліджень

Збір рослинного матеріалу для подальшого виділення ДНК проводили наприкінці лютого 2009 р. у 30-річному штучному насадженні *P. sylvestris*. Зрізали вегетативні бруньки із залишками пагонів довжиною 5–10 см та шишки, з яких потім видобували насіння. Частина бруньок з гілками зберігали у вологій обгортці при +7 °С. Іншу частину бруньок відокремили від гілок і зберігали при –20 °С. Хвою (по 5 цьогорічних хвоїнок з рослини) висушували в сушильній шафі при температурі +35 °С. Виділення ДНК проводили за допомогою набору «Diatom DNA prep» (Изоген).

© А.Є. Демкович, О.А. Мудрик, Н.М. Трубнікова, Д.В. Політов

В якості матеріалу для екстракції ДНК використовували очищений від захисних лусок внутрішній вміст бруньки, ендосперми та зародки насінин, висушену хвою. Наявність тотальної ДНК перевіряли на агарозному гель-електрофорезі з трис-ацетатним буфером [6] в камері «Mini-Sub Cell GT» (Bio-Rad), джерело живлення - «PoverPack» (Bio-Rad) або «Ельф-4» (ДНК-Технология). Забарвлення проводили бромистим етидієм. Результати електрофорезу оцінювали на транслюмінаторі «TCP-20 LC» (Vilber Lourmat). Ампліфікацію SSR-локусів проводили з використанням наборів «GenePak PCR Core» (Изоген) на приладі «GeneAmp PCR System 2400» (Perkin Elmer). Тестували два високомінливі за літературними даними мікросателітні локуси *Spac 11.8* [23] та *Pttx2146* [20] (таблиця).

Таблиця. Результати аналізу SSR локусів *Pinus sylvestris* L.

Локус	Нуклеотидна послідовність праймера 5' → 3'	Температура віджигу, °C	Кількість циклів ПЛР	Розмір отриманих фрагментів (пар нуклеотидів, п.н.)	Кількість алелів (за літературними даними/в даному дослідженні)
<i>Pttx2146</i>	F: CCTGGGGATTGGATTGGGTATTTG R: ATATTTTCCCTGCCCTCCAGACA	57	25	біля 600 168-260 90-110 60-70	– 13/13 –/3 –/1
<i>Spac 11.8</i>	F: AGGGAGATCAATAGATCATGG R: CAGCCAAGACATCAAAAATG	51	25	124-200	17/11

Примітка. Знак «–» вказує на відсутність даних.

Для електрофорезу ампліконів застосовували неденатуруючий 6% вертикальний поліакриламідний гель та трис-боратний електродний буфер [21]. Електрофорез проводили зі сталюю напругою 400 В на гелі розміром 1,5*200*200 мм в камері «VE-3» (Helicon) або в її саморобному аналозі. Забарвлення ампліконів здійснювали двома методами – бромистим етидієм [6] або нітратом срібла [21]. Для реєстрації результатів використовували цифровий фотоапарат «PoverShot a530» (Canon).

Результати досліджень та обговорення

При виділенні ДНК з зелених тканин (бруньок та хвої) для сорбції фенольних сполук до кожного зразка (5–10 мг тканини) додавали 25 мкл 7%-го розчину полівінілпіролідону «K90» (AppliChem). Подальші операції виконували згідно протоколу виробника набору, лише проміжні центрифугування в процесі очищення ДНК від сторонніх речовин для запобігання злипанню сорбента робили при меншому за рекомендоване прискоренні (3 тис. g.). Виявилось, що достатню для ПЛР якість ДНК можна отримати, використовуючи в два рази меншу кількість реактивів, тобто можливо в два рази знизити вартість виділення ДНК. При цьому навіть з хвої була отримана ДНК в кількості та якості, достатніх для проведення десятків ПЛР. Водночас, великий вплив на якість виділення чинить якість матеріалу. Так, на п'ятому місяці зберігання бруньок в вологій обгортці при +7 °C був зафіксований 50%-ий неуспіх при виділенні з них ДНК. З іншого боку, у бруньок, що зберігалися при –20 °C, насінин та висушеної хвої, що зберігалися за кімнатних умов, за цей строк не було помічено погіршення якості.

Продукти ПЛР зберігалися при –20 °C, якість електрофорезу та забарвлення при цьому не погіршувалися протягом місяців. Метод забарвлення нітратом срібла виявився набагато чутливішим, ніж забарвлення бромистим етидієм. Приблизно однакова інтенсивність забарвлення ампліконів досягалася при електрофорезі та забарвленні 2,5 мкл зразка для бромистого етидію, чи 0,5 мкл зразка для нітрату срібла, тобто при п'ятикратному розведенні (рисунок). Великою перевагою забарвлення за допомогою нітрату срібла є більша інтенсивність забарвлення низькомолекулярних ампліконів і можливість фіксувати результати без транслюмінатора.

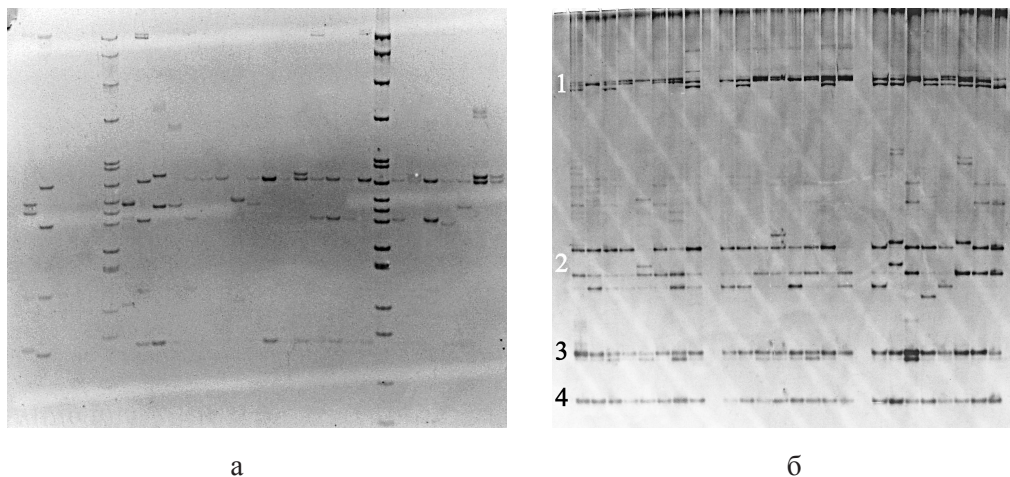


Рис. Электрофореграммы ампликонов за локусом *Pttx2146*:
 а – при забарвленні бромистим етидієм (зразок – 2,5 мкл, негативне зображення); б – при забарвленні нітратом срібла (зразок – 0,5 мкл). 1 – амплікони довжиною ~ 600 п.н.; 2 – 168–260 п.н.; 3 – 90–110 п.н.; 4 – 60–70 п.н.

За обома аналізованими локусами було виявлено поліморфізм. По локусу *Spac 11.8* (див. таблицю) довжина ампліконов варіювала в межах 124–200 п.н., було виявлено нуль алель. Для *Pttx2146* виявлено декілька послідовностей, що ампліфікувалися. Алелі добре інтерпретованого та високополіморфного локусу знаходились в межах 168–260 п.н (див. таблицю). Було виявлено велику кількість ампліконов довжиною біля 600 п.н., що ймовірно являють собою ще один, більш довгий повтор, ампліфікований за допомогою праймерів *Pttx2146*. На жаль, наявний матеріал не дав змогу однозначно інтерпретувати цей локус. Ще один низьковаріабельний, з трьома алелями, локус для праймерів *Pttx2146* було відмічено біля 90–110 п.н. та один мономорфний локус біля 60–70 п.н. Для з'ясування природи додатково виявлених за *Pttx2146* локусів потрібне секвенування.

Висновки

Використання фірмових наборів із запропонованими модифікаціями дозволяє з невеликими витратами отримувати придатну для ПЛР ДНК. Методика забарвлення продуктів ПЛР нітратом срібла надає можливість проводити аналіз за відсутності трансільюмінатора і підвищує чутливість аналізу, а застосовані SSR-маркери є високоваріабельними, стабільними та відтворюваними при аналізі рослин *P. sylvestris* української частини ареалу. Збільшення кількості мікросателітних локусів в подальшому дозволить застосовувати ці молекулярно-генетичні маркери як для аналізу генетичної різноманітності, диференціації природних популяцій та генетично-селекційних об'єктів, так і для генетичної паспортизації дерев та насаджень, сертифікації партій насіння та уточнення меж лісонасінних районів.

Робота виконана за підтримки програм фундаментальних досліджень Президії РАН «Генофонди та генетична різноманітність» і «Походження біосфери та еволюція гео-біологічних систем», ВБН РАН «Біоресурси Росії: Оцінка стану та фундаментальні основи моніторингу», та Госконтракту ФЦП 02.740.11.0281 «Науково-педагогічні кадри інноваційної Росії» (напрямок 1.1).

1. *Великоридько Т. І.* Стійкість та мінливість сосни звичайної (*Pinus sylvestris* L.) в техногенно забруднених умовах південного сходу України : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : спец. 03.00.16 - "Екологія" / Татьяна Ивановна Великоридько. – Донецьк, 2002. – 20 с.
2. *Генетическая изменчивость ели европейской по данным микросателлитных локусов* / Е. А. Мудрик, Д. В. Политов, М. М. Белоконов, С. Н. Привалихин // Биосфера Земли: прошлое, настоящее и будущее: Матер. конф. мол. ученых, 21–25 апреля 2008 г. / ИЭРиЖ УрО РАН. – Екатеринбург: – Изд-во «Гюшицкий», 2008. – С. 154–157.
3. *Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях* / Ю. П. Алтухов, Е. А. Салменкова, О. Л. Курбатова и др. ; под ред. Ю. П. Алтухова. – М. : Наука, 2004. – 619 с.

4. *Збірник рекомендацій УкрНДІґрліс: Наукові основи ведення багатощільового лісового господарства у Карпатському регіоні* / В. Парпан. – Івано-Франківськ : «Екор», 2001. – 246 с.
5. Зелена Л. Б. Молекулярно-біологічні аспекти змін формотворення у сосни звичайної, індукованих хронічним випромінюванням : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : спец. 03.00.15 - «Генетика» / Любов Борисівна Зелена. – К., 2008. – 24 с.
6. *Маниатис Т. Молекулярное клонирование* / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. – М. : Мир, 1984. – 480 с.
7. *Мудрик О. А. Динаміка генетичної структури природних популяцій деяких видів родини Pinaceae Lindl. в Україні* : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : спец. 03.00.15 – «Генетика» / Олена Анатоліївна Мудрик. – К., 2006. – 20 с.
8. *Падутов В. Е. Генетические ресурсы и таксономические взаимоотношения основных лесобразующих хвойных видов Восточной Европы, Сибири и прилегающих регионов (на примере родов Picea и Pinus)* : автореф. дис. на соискание уч. степени доктора биол. наук : спец. 03.00.15 – «Генетика» / Владимир Евгеньевич Падутов. – Минск, 2002. – 37 с.
9. *Применение ДНК-маркеров для паспортизации ЛСП и сертификации семян хвойных пород* Ю. С. Белоконь, Н. В. Гордеева, Н. Ю. Гордон и др. // Лесохозяйственная информация. – 2008. – № 3–4. – С. 35–38.
10. *Применение микросателлитных маркеров в геногеографических исследованиях хвойных* / Е. А. Мудрик., М. М. Белоконь, С. Ю. Белоконь, Д. В. Политов // Организмы, популяции, экосистемы: проблемы и пути сохранения биоразнообразия. Матер. Всерос. конф. “Водные и наземные экосистемы: проблемы и перспективы исследований” (г. Вологда, 24–28 ноября 2008 г.). – Вологда, 2008. – С. 78–81.
11. *Политов Д. В. Генетика популяций и эволюционные взаимоотношения видов сосновых (сем. Pinaceae) северной Евразии* : автореф. дис. на соискание уч. степени доктора биол. наук : спец. 03.00.15 – «Генетика» / Дмитрий Владиславович Политов. – М., 2007. – 47 с.
12. *Приваліхін С. М. Популяційно-генетичне різноманіття ялини європейської (Picea abies (L.) Karst.) в Українських Карпатах* : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : спец. 03.00.15 – «Генетика» / Сергій Миколайович Приваліхін. – К., 2008. – 21 с.
13. *Терещенко Л. І. Внутрішньовидова мінливість та успадкування ознак плюсових дерев сосни звичайної у Харківській області* : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. с.-г. наук : спец. 06.03.01 - «Лісові культури та фітомеліорація» / Лариса Іванівна Терещенко. – Харків, 2006. – 18 с.
14. *Юркевич О. О. Селекційні основи підвищення продуктивності соснових насаджень Рівненщини* : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. с.-г. наук : спец. 06.03.01 – «Лісові культури та фітомеліорація» / Олег Олександрович Юркевич. – Харків, 2003. – 18 с.
15. *Янбаев Ю. А. Анализ генетической структуры природных популяций сосны обыкновенной Южного Урала* : автореф. дис. на соискание уч. степени канд. биол. наук : спец. 03.00.15 – «Генетика» / Юлай Аглямович Янбаев. – Минск, 1989. – 16 с.
16. *Яцик Р. М. Розвиток і результати генетико-селекційних досліджень лісових видів у карпатському регіоні* / Р. М. Яцик, В. І. Парпан // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть: У 4. т. – Т. 3. – К. : Логос, 2001. – С. 472–479.
17. *Developmental and genetic variation in nuclear microsatellite stability during somatic embryogenesis in pine* / K. Burg, A. Helmersson, P. Bozhkov, S. v. Arnold // Journal of Experimental Botany. – 2007. – Vol. 58, № 3. – P. 687–698.
18. *Geburek T. Isozymes and DNA markers in gene conservation of forest trees* / T. Geburek // Biodiversity and Conservation. – 1997. – Vol. 6. – P. 1639–1654.
19. *Genetic diversity within and among Pinus pinaster populations: comparison between AFLP and microsatellite markers* / S. Mariette, D. Chagne, C. Lezier et al. // Heredity. – 2001. – Vol. 86. – P. 469–479.
20. *Low-copy microsatellite markers for Pinus taeda L.* / C. G. Elsik, V. T. Minihan, S. E. Hall et al. // Genome. – 2000. – Vol. 43. – P. 550–555.
21. *Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels* / H. Benbouza, J.-M. Jacquemin, J.-P. Baudoin, G. Mergeai // Biotechnol. Agron. Soc. Environ. – 2006 – Vol. 10 №2. – P. 77–81.
22. *Semagn K. An overview of molecular marker methods for plants* / K. Semagn, Å. Bjørnstad, M. N. Ndjondjop // African Journal of Biotechnology. – 2006. – Vol. 5, № 25. – P. 2540–2568.
23. *Soranzo N. Characterization of microsatellite loci in Pinus sylvestris L.* / N. Soranzo, J. Provan, W. Powell // Molecular Ecology. – 1998. – Vol. 7. – P. 1247–1263.
24. *SSR markers as tools to reveal mutation events in Scots pine (Pinus sylvestris L.) from Chernobyl* / B. Vornam, O. Kuchma, N. Kuchma et al. // Eur. J. Forest. Res. – 2004. – Vol. 123. – P. 245–248.

25. Walter R. Microsatellite analysis of spatial structure among seedlings in population of *Pinus strobus* (Pinaceae) / R. Walter, B. K. Epperson // Amer. J. of Bot. – 2004. – Vol. 91, № 4. – P. 549–557

¹ Донецький ботанічний сад НАН України

Надійшла 27.08.2009

² Інститут загальної генетики ім. Н.І. Вавилова РАН

³ Інститут невідкладної і відновлювальної хірургії ім. В.К. Гусака АМН України

УДК 575.22:582.475.4

ВИКОРИСТАННЯ МІКРОСАТЕЛІТНИХ ЛОКУСІВ В ПОПУЛЯЦІЙНО-ГЕНЕТИЧНОМУ АНАЛІЗІ
PINUS SYLVESTRIS L.

А.Є. Демкович¹, О.А. Мудрик², Н.М. Трубнікова³, Д.В. Політов²

¹ Донецький ботанічний сад НАН України

² Інститут загальної генетики ім. Н.І. Вавилова РАН

³ Інститут невідкладної і відновлювальної хірургії ім. В.К. Гусака АМН України

Вперше апробовано та модифіковано методику мікросателітного аналізу *Pinus sylvestris* L. української частини ареалу. Оцінено поліморфізм локусів *Spac 11.8* та *Pttx2146*.

UDC 575.22:582.475.4

THE USE OF MICROSATELLITE LOCI IN THE POPULATION AND GENETIC ANALYSIS OF
PINUS SYLVESTRIS L.

A.E. Demkovich¹, O.A. Mudrik², N.M. Trubnikova³, D.V. Politov²

¹ Donetsk Botanical Garden, National Academy of Sciences of Ukraine

² N.I. Vavilov Institute of General Genetics, Academy of Sciences of Russia

³ V.K. Gusak Institute of Emergency and Rehabilitation Surgery, Academy of Medical Sciences of Ukraine

For the first time methods of the microsatellite analysis of *Pinus sylvestris* L. of the Ukrainian part of the areal have been approbated and modified. Polymorphism of the loci *Spac 11.8* and *Pttx2146* has been estimated.