

УДК 575.8: 582.632.2

Р.Т. ГУТ, М.В. РАДЧЕНКО, Г.Т. КРИНИЦЬКИЙ

Український державний лісотехнічний університет, Львів  
e-mail: gut@forest.lviv.ua

## ВИКОРИСТАННЯ ISSR-МАРКЕРІВ ДЛЯ ВСТАНОВЛЕННЯ КОНВЕРГЕНТНИХ ЕВОЛЮЦІЙНИХ ЗВ'ЯЗКІВ РОДУ *FAGUS*



За допомогою ISSR-маркерів та реакції ампіліфікації оцінено генетичні взаємозв'язки членів роду *Fagus*. Чіткіше встановлено таксономічну позицію між видами *Fagus sylvatica* L. та *Fagus orientalis* LYPSKY в Україні. Проведено порівняння міжвидових та внутривидових основних генетичних відстаней за Нетт та Лі і побудовано відповідні дендрограми методом повного зчеплення.

© Р.Т. ГУТ, М.В. РАДЧЕНКО, Г.Т. КРИНИЦЬКИЙ, 2004

**Вступ.** Бук європейський (*Fagus sylvatica* L.) є однією з найважливіших листяних деревних порід на теренах Європи. Сучасний його ареал охоплює значну частину Західної, Центральної та Південної Європи (рис. 1, А) [1]. Всього площа букових лісів у Європі нині складає близько 19,5 млн гектарів. Південна межа бука європейського проходить через Балканський півострів від Бургаської затоки через південну частину Болгарії, центр Греції і далі вздовж Адріатичного узбережжя Албанії, Югославії, Італії доходить до північно-східної частини Сицилії, охоплює острів Корсику і північну частину Іспанії. На заході ареал бука обмежується узбережжям Франції. Північно-західна його межа проходить через південь Англії, узбережжя Бельгії, Нідерландів, Данії та Німеччини і досягає Скандинавських країн. На півночі ареал бука охоплює берегові райони Норвегії і південної частини Швеції. Східна частина ареалу бука у Європі пролягає від Калінінграда через західну частину Польщі до Рави-Руської, через південно-західні райони України до міста Кам'янця-Подільського і далі через східну частину Румунії доходить до Болгарії (рис. 1, А, Б) [1–3].

Рівень мінливості бука європейського у Західній Європі не ускладнюється існуванням інших видів роду *Fagus*. В Україні ситуація трохи інша. У Закарпатті, Карпатах, Прикарпатті, на півдні Малого Полісся та Західному Поділлі поширений вид *Fagus sylvatica* L. [3], а в Криму зростає систематично окремий вид *Fagus orientalis* LYPSKY [3]. Окремі вчені, зокрема Г.І. Поплавська у 1925–1927 рр., на основі морфологічних відмінностей виділили ще один вид — бук кримський (*Fagus taurica* Popl.) [4], однак загального визнання цей вид не отримав. Грунтовні генетико-біохімічні дослідження щодо систематичного положення бука кримського провів Швадчак та ін. [2, 5, 6]. Ним проаналізовано сім популяцій бука з Кримського півострова з використанням 12 ізозимних локусів. Результати досліджень свідчили, що бук кримський більш подібний до бука східного, ніж до бука європейського. Розрахунок генетичних відстаней між видами дозволив припустити, що бук кримський є географічною расою *Fagus orientalis* LYPSKY.

Як відомо, ізоферментний метод обмежує підходи до вивчення генетичного різноманіття, оскільки при цьому аналізують лише

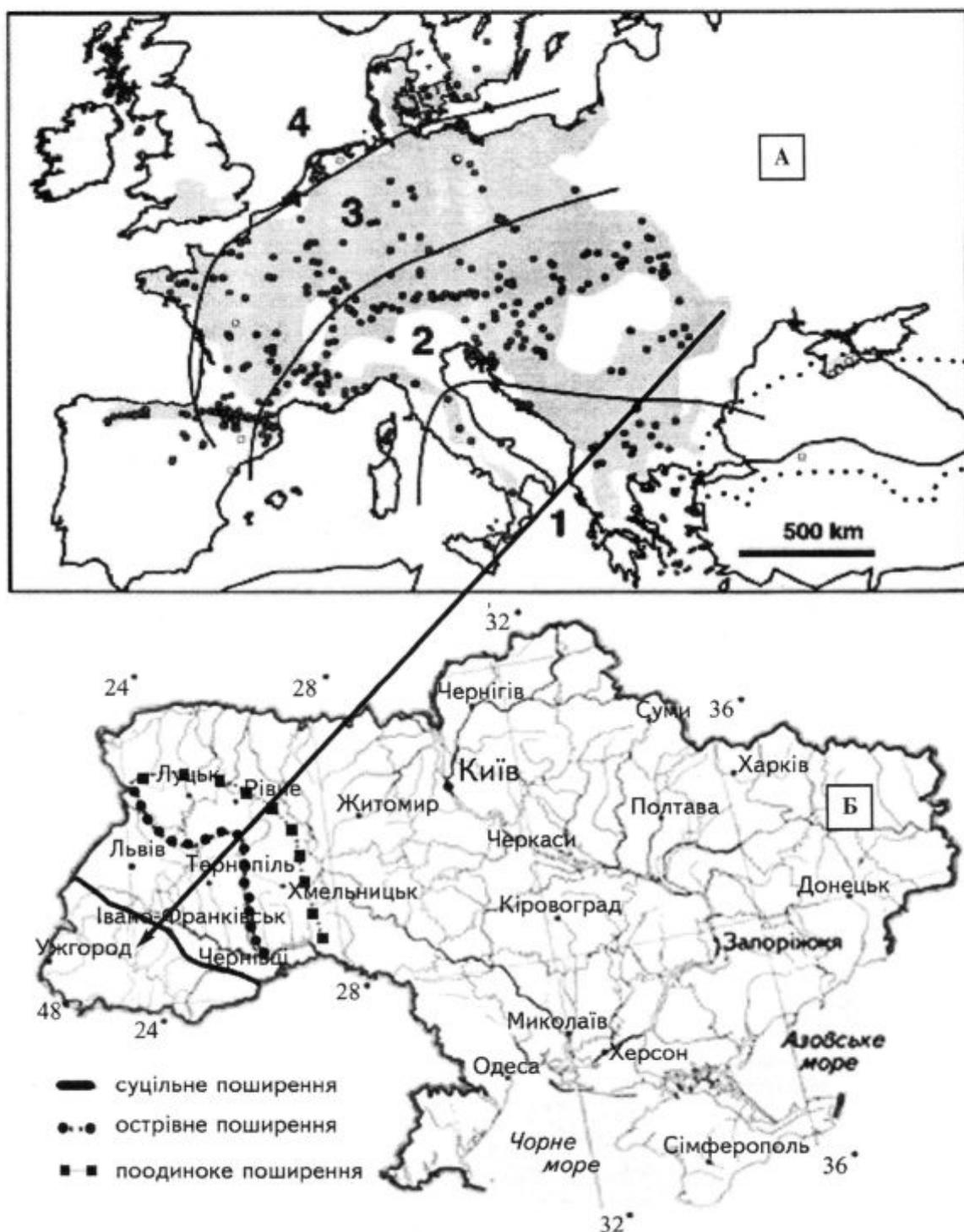


Рис. 1. А. Поширення бука європейського та східного. Затінена зона відображає поширення бука європейського (*F. sylvatica* L.), а точкова лінія — поширення бука східного (*F. orientalis* LYPSKY). Виділено чотири зони, які відповідають історії колонізації. Зона 1 — поширення бука на протязі останнього льодянникового періоду, за свідченням викопних решток пилку; зона 2 — букові ліси старші 4000 років; зона 3 — букові ліси, молодші 4000 років; зона 4 — площа найбільш ранньої колонізації (менше 2000 років). Незамкнені кільця свідчать про недостатню кількість даних, які б дозволили віднести букові популяції до певної зони [6]. Б. Границі суцільного, острівного та поодинокого поширення бука європейського (*F. sylvatica* L.) на території України [4]

кілька фрагментів із геному, використовуючи невелику кількість локусів [7]. Тому метою нашої роботи було встановлення чіткої систематичної позиції видів *Fagus sylvatica* L. та *Fagus orientalis* LYPSKY з використанням ISSR-аналізу. Це дозволить у майбутньому з'ясувати таксономічне положення усіх видів роду *Fagus* в Україні.

**Матеріали та методи.** *Рослинний матеріал.* Проаналізовано два види бука — *Fagus sylvatica* L. та *Fagus orientalis* LYPSKY. Для порівняння взято ще два види родини *Fagaceae* — *Quercus robur* L. і *Castanea sativa* Mill. Зразки *Fagus sylvatica* L. та *Quercus robur* L. були відібрані з популяцій природного заповідника «Розточчя» Верещицького лісового масиву, зразки *Castanea sativa* Mill. — з популяції пригреського району Закарпаття Дубриничського лісгоспу, а зразки *Fagus orientalis* LYPSKY. — з популяції гірського району Криму. У кожній популяції було випадково взято по п'ять дорослих особин, у яких відібрано свіжі зразки листків і бруньок. Зразки були очищенні від контамінації, заморожені у рідкому азоті та зберігалися в кельвінаторі при температурі  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**Виділення сумарної ДНК** проводили, використовуючи комерційний набір «Qiagen DNeasy Plant Mini Kit» фірми «Qiagen» та за методом Галлоїса та ін. [8]. Для виділення та розділення сумарної ДНК методом Галлоїса та ін. [8] використовували бромід цетилтриметиламоній (ЦТМБ) фірми «Sigma» (США),  $\beta$ -меркаптоанол фірми «Ferak» (Німеччина), EDTA фірми «Sigma», тріс-HCl фірми «Helena bioscience», NaCl фірми «Fluka», PVP40 фірми «Loba» (Австрія), DIECA фірми «Sigma», протеїназу K фірми «Merck», аскорбінову кислоту фірми «Sigma», ізопропанол фірми «Реахим», етанол фірми «Sigma» (США), хлороформ фірми «Merck», агарозу для електрофорезу фірми «Lachema» (Чехословаччина).

**Ампліфікація ДНК.** Для ПЛР використовували реагенти фірми «Fermentas» (Литва): dATP, dGTP, dCTP, dTTP або dNTP set, MgCl<sub>2</sub>, 10 × ПЛР буфер без MgCl<sub>2</sub>, 10 × ПЛР буфер з (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Таq ДНК-полімеразу; легке мінеральне масло фірми «Fluka» (Німеччина), ISSR-праймери CR-212; CR-213; CR-214; CR-215; CR-216; CR-217; CR-218; CR-231; CR-232; CR-234; CR-235; CR-236; CR-237; CR-238;

CR-248; CR-249; CR-250; CR-251; CR-252; CR-253 фірми «Sigma» (США). Для ампліфікації ДНК використовували прилад Proteus (модель FPROGO5H). Ампліфікацію сумарної ДНК з ISSR-праймерами проводили, дотримуючись наступних умов: 1 × ПЛР буфер без MgCl<sub>2</sub>, 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,3 мкМ ISSR-праймера, 0,2 mM dNTPs, 1 од. Таq-полімерази, 20 нг сумарної ДНК у кінцевому обсязі 20 мкл. У пробірки поверх реакційної суміші нашаровували рівний об'єм мінерального масла. Програма для ПЛР ампліфікації: первинна денатурація — 4 хв при  $94^{\circ}\text{C}$ ; 60 циклів ампліфікації у режимі: денатурація  $92^{\circ}\text{C}$  — 1 хв, відпалювання — від 37,4 до 62,29 °C — 1,5 хв, елонгація —  $70^{\circ}\text{C}$  2 хв; останній цикл елонгації —  $72^{\circ}\text{C}$  — 5 хв. Продукти ампліфікації фракціонували, використовуючи 2%-ний агарозний гель та 1 × TAE-буфер, профарбовували бромистим етидієм та фотографували на цифрову фотокамеру Samsung 340. Усі результати реакцій ампліфікації перевіряли двічі.

Оптимальну температуру гібридизації праймерів з ДНК матрицею розраховували за формулою, запропонованою Річлік та ін. [9].

**Математичний та статистичний аналіз отриманих результатів.** ISSR-продукти сумарних ДНК *Fagus sylvatica* L. та *Fagus orientalis* LYPSKY отримували в результаті спільної ампліфікації з використанням одного праймеру та загальної ПЛР реакційної суміші. Електрофоретичний аналіз продуктів ПЛР проводили на одній агарозній пластинці. Дляожної особини у популяції та для кожного праймеру продукти ампліфікації розглядали як присутні (1) чи відсутні (0). Попарне порівняння усіх генотипів, що вивчалися для кожного виду, використовували для оцінки генетичної відстані за Неї та Лі [10]. Для підтвердження генетичної віддаленості популяцій внутріпопуляційну відаль порівнювали з міжпопуляційною, використовуючи статистичний t-тест. Дендрограми були збудовані методом повного об'єднання (Statistic 6).

**Відбір праймерів** базувався на двох критеріях, запропонованих Мюрей [11]: праймери повинні призводити до утворення «дискретних фрагментів»; відбирати необхідно праймери, що призводять до утворення найбільш «дискретних фрагментів». При аналізі популяцій (*a*)

та (b) «дискретними фрагментами» ми називали фрагменти, для яких:  $|n_a - n_b| \geq 4$ , де  $n_a$  — це кількість індивідуумів популяції (a), які володіють фрагментом,  $n_b$  — кількість індивідуумів популяції (b), володіючих фрагментом.

**Результати досліджень та їх обговорення.** На першому етапі досліджень нами були вивчені стандартні умови ISSR-аналізу, які дозволили достовірно розділити віддалені види родини *Fagaceae* — *Quercus robur L.*, *Castanea sativa Mill.* та *Fagus sylvatica L.* (таблиця, рис. 2).

З цією метою ми протестували 21 ISSR-праймер, з яких 20 призводили до утворення чітких продуктів ампліфікації в усіх 15 деревах. Типовий зразок ампліфікації поданий на рис. 2. Спостерігається висока спорідненість продуктів ампліфікації між індивідуумами

одного виду та велика міжвидова відмінність, яка дозволяє навіть без побудови відповідних дендрограм ідентифікувати особини одного роду.

З метою вивчити міжвидові генетичні взаємоз'язки *Quercus robur L.*, *Castanea sativa Mill.* та *Fagus sylvatica L.* ми проаналізували дані, накопичені в результаті використання 20 праймерів, що призводили до утворення 270 фрагментів ампліфікації (таблиця). Серед них 1 (0,4 %) мономорфний та 58 (21,5 %) видоспецифічні. Виду *Fagus sylvatica L.* специфічний 21 фрагмент (7,8 %), виду *Castanea sativa Mill.* — 20 фрагментів (7,4 %) та виду *Quercus robur L.* — 17 фрагментів (6,3 %). Міжвидові генетичні відстані становлять від  $0,719 \pm 0,019$  до  $0,771 \pm 0,021$ , тому усі три популяції можуть розглядатися як значно відмінні у генетичному відношенні, що добре відображене на дендрограмі (рис. 3).

На другому етапі досліджень ми вивчили внутрівидовий та міжвидовий генетичний поліморфізм та генетичне взаємовідношення *Fagus sylvatica L.* та *Fagus orientalis LYPSKY* для з'ясування чіткішої систематичної позиції цих видів. Тестовано 21 ISSR-праймер, з яких 20

#### Внутрівидові та міжвидові значення генетичної відстані

Вид	Значення генетичної відстані ( $\pm SD$ )	Кількість використаних праймерів
<i>Quercus robur L.</i>	$0,227 \pm 0,027$	20
<i>Castanea sativa Mill.</i>	$0,171 \pm 0,022$	20
<i>Fagus sylvatica L.</i>	$0,199 \pm 0,043$	20
<i>Fagus orientalis LYPSKY</i>	$0,111 \pm 0,044$	20
<i>Quercus robur L./Castanea sativa Mill.</i>	$0,719 \pm 0,023$	20
<i>Quercus robur L./Fagus sylvatica L.</i>	$0,771 \pm 0,018$	20
<i>Castanea sativa Mill./Fagus sylvatica L.</i>	$0,756 \pm 0,019$	20
<i>Fagus sylvatica L./Fagus orientalis LYPSKY</i>	$0,466 \pm 0,031$	20

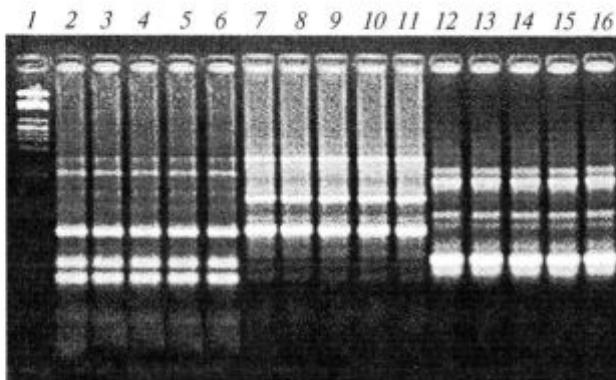


Рис. 2. Зразки ампліфікації сумарної ДНК різних видів з ISSR-праймером CR-232: 1 — 1 kb Gene Ladder; 2–6 — сумарна ДНК букі; 7–11 — сумарна ДНК дуба; 12–16 — сумарна ДНК каштана

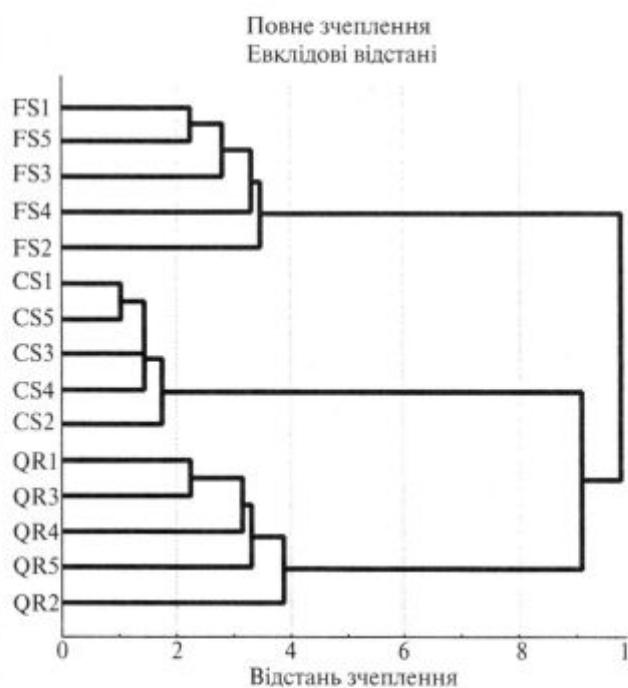


Рис. 3. Дендрограма генетичних взаємоз'язків між видами *Quercus robur L.* (QR), *Castanea sativa L.* (CS) та *Fagus sylvatica L.* (FS)

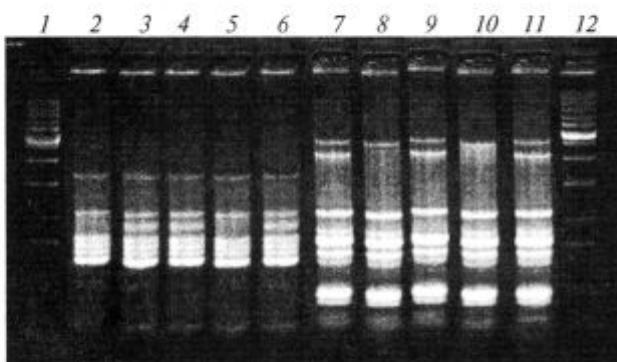


Рис. 4. Зразок ампіліфікації сумарної ДНК видів *Fagus sylvatica* L. та *Fagus orientalis* LYP SKY з ISSR-праймером CR-237: 1, 12 — 1kb Gene Ladder; 2–6 — сумарна ДНК *Fagus sylvatica* L.; 7–11 — сумарна ДНК *Fagus orientalis* LYP SKY

призвели до утворення чітких продуктів ампіліфікації в усіх 10 деревах. Типовий зразок ампіліфікації поданий на рис. 4. Спостерігається висока спорідненість продуктів ампіліфікації між індивідуумами одного виду та значна міжвидова відмінність. Дані, накопичені в результаті використання 20 праймерів, призвели до утворення 180 фрагментів ампіліфікації, з яких 85 (47 % від загальної кількості) — продукти ампіліфікації *Fagus sylvatica* L., а 95 (53 % від загальної кількості) — *Fagus orientalis* LYP SKY. Слід зауважити, що 104 продукти ампіліфікації (57 % від загальної кількості) були мономорфними, а 33 продукти ампіліфікації (18 % від загальної кількості) *Fagus sylvatica* L. та 43 продукти ампіліфікації (24 % від загальної кількості) *Fagus orientalis* LYP SKY — видоспецифічними (таблиця). Міжпопуляційна генетична відстань становить  $0,466 \pm 0,031$  (таблиця), а внутріпопуляційна —  $0,111 \pm 0,044$  для *Fagus orientalis* LYP SKY та  $0,199 \pm 0,043$  для *Fagus sylvatica* L., тобто утворюються дві відокремлені групи, відображені на дендрограмі (рис. 5).

**Висновки.** ISSR-метод дозволив легко розрізняти на генетичному рівні види трьох різних родів з використанням незначної кількості праймерів та з'ясувати їх генетичне взаємовідношення, чітко встановити таксономічну позицію *Fagus sylvatica* L. та *Fagus orientalis* LYP SKY, порівняти міжвидові та внутривидові основні генетичні відстані за Неї та Лі і побудувати відповідні дендрограми методом повного зчеплення. Базуючись на одержаних

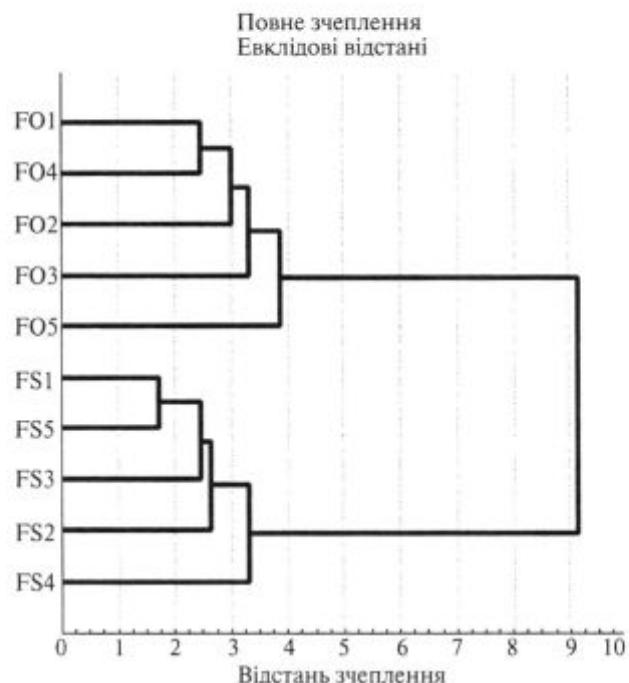


Рис. 5. Дендрограма генетичних взаємозв'язків між видами *Fagus sylvatica* L. (FS) та *Fagus orientalis* LYP SKY (FO)

даних можна стверджувати, що у генетичному відношенні види *Fagus sylvatica* L. та *Fagus orientalis* LYP SKY є близькими один до одного у порівнянні з іншими видами родини *Fagaceae*. Залишається необхідним встановити генетичні відстані між окремими популяціями пралісових екосистем *Fagus sylvatica* L. та систематичне положення *Fagus taurica* Popl. для отримання чіткіших результатів.

**SUMMARY.** Genetic relationships between members of *Fagus* genus were assessed using ISSR markers and amplification. The taxonomic status of *Fagus sylvatica* L. and *Fagus orientalis* LYP SKY species in Ukraine has been ascertained more precisely. Intraspecific mean genetic distances were compared according to Nei & Li and respective dendrogram was constructed with the complete joining method.

**РЕЗЮМЕ.** С использованием ISSR-маркеров и реакции амплификации оценены генетические взаимосвязи членов рода *Fagus*. Более четко установлена таксономическая позиция между видами рода *Fagus sylvatica* L. и *Fagus orientalis* LYP SKY в Украине. Проведено сравнение межвидовых и внутривидовых основных генетических расстояний по Неи и Ли и построены соответствующие дендрограммы методом полного сцепления.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Comps B., Gomory D., Letouzey J., Thiebaut B., Petit R.J. Diverging trends between heterozygosity and allelic richness during postglacial colonization in European Beech // Genetics. — 2001. — 157. — P. 389–397.
2. Вишины Й., Швадчак И., Кампс Б., Гемери Д., Пауле Л. Генетическое разнообразие и дифференциация популяций буков на Украине. Украинские Карпаты и прилегающие территории // Генетика. — 1995. — 31, № 11. — С. 1540–1551.
3. Івченко І.С., Войтюк Ю.О. Природне зростання *Fagus sylvatica* L. на північно-східній межі ареалу // Укр. бот. журн. — 1978. — 35, № 2. — С. 193–196.
4. Молотков П.И. Буковые леса и хозяйство в них // Распространение буков европейского (*Fagus sylvatica* L.). — М.: Лесная промышленность, 1966. — С. 10.
5. Гемери Д., Швадчак И., Пауле Л., Вишины Й. Генетическое разнообразие и дифференциация популяций буков в Крыму // Генетика. — 1997. — 33, № 10. — С. 1388–1395.
6. Paule L., Vysny I., Shvadchak I., Sabar I., Gemery D. Genetic resources of European beech (*Fagus sylvatica* L.) in the Slovak, Polish and Ukrainian Carpathians // The Scientific Basis for the Evaluation of Forest Genetic Resources of Beech / Eds H.-J. Muhs, G. von Wuhlsch. — Ahrensburg, 1993. — P. 79–87.
7. Bergmann F. Isozyme gene markers // Genetic variation in European populations of forest trees. — Frankfurt am Main : J.D. Sauerlander's Verlag, 1991. — P. 66–78.
8. Gallois A., Audran J.C., Burrus M. Assessment of genetic relationships and population discrimination among *Fagus sylvatica* L. by RAPD // Theor. Appl. Genet. — 1998. — 97. — P. 211–219.
9. Rychlik W., Spencer W.Y., Rhoads R.E. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro // Nucl. Acids Res. — 1990. — 18, № 21. — P. 6400.
10. Nei M., Li W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1979. — 76. — P. 5269–5273.
11. Moreau F. Recherche de marqueurs appliquée à la différenciation moléculaire entre chêne sessile (*Quercus petraea*) et peduncule (*Quercus robur*): PhD thesis. - France : Univ. Poitiers, 1993.
12. Welsh J., McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers // Nucl. Acids Res. — 1990. — 18, № 24. — P. 7213–7218.

Надійшла 18.11.03