

ГЕНЕТИЧНІ ВЗАЄМОВІДНОСИНИ УКРАЇНСЬКИХ СОРТІВ КОНЮШИНИ ЛУЧНОЇ ЗА ДНК-МАРКЕРАМИ

Ю. М. ДУГАРЬ

*Харківський національний аграрний університет ім. В.В. Докучаєва
Харківський район, п/в «Комуніст-1», факультет агрохімії та ґрунтознавства, кафедра екології та біотехно-
логії, Україна, 62483
e-mail: jndugar@gmail.com*

У роботі порівнюються дендрограми, одержані на основі аналізу даних за SSR, ISSR та RAPD маркерами. Здійснено порівняння супердерева із використанням різних масивів молекулярних даних та узгодженого дерева, побудованого із застосуванням одного загального масива даних. Обговорюються особливості кластеризації сортів конюшини лучної на одержаних деревах у складі 2-3 кластерів, залежно від типу дендрограми. Чіткого групування сортів згідно походження не виявлено.

Ключові слова: Trifolium pratense L., SSR, ISSR, RAPD, супердерево, узгоджене дерево

Вступ. Вивчення генетичної структури ресурсів рослин проводять у декілька етапів – опис фенотипової, біохімічної або молекулярної мінливості, розрахунок показників подібності або генетичних відстаней та візуалізація даних шляхом побудови дендрограм. Дендрограми – наочний спосіб представлення даних про спорідненість біологічних об'єктів, а також їх генетичних взаємовідносин. При цьому на основі різних масивів даних, одержаних при описі одного і того ж вихідного матеріалу, дослідники часто отримують дендрограми з неоднаковою топологією. Крім цього, такі дендрограми можуть недостатньо повно класифікувати вивчаємі об'єкти. Тому при наявності різних масивів даних їх можна об'єднати в єдиний масив із наступним створенням узгодженого дерева або ж порівняти дендрограми із використанням різноманітних статистичних алгоритмів для генерування супердерева (Baker et al., 2009; Bininda-Emonds et al., 2002). Побудова узгодженого дерева є найбільш прийнятним способом для класифікації вихідного матеріалу рослин, оскільки різні типи даних об'єднуються у єдину матрицю, на основі якої розраховується загальний критерій подібності.

В наших експериментах з вивчення генетичної структури сортів конюшини лучної одержані дані з SSR, ISSR та RAPD маркерами, тобто варіабельність геному конюшини була досліджена по різних ділянках ДНК (Дугарь, Попов, 2011; Дугарь, 2012; Дугарь, Попов, 2012). Використані ДНК-маркери характеризувались високим рівнем поліморфізму, що дозволило достатньо повно описати генетичні взаємовідносини між сортами конюшини із візуальною демонстрацією у ви-

гляді дендрограм. При цьому представляє інтерес подальша класифікація сортів конюшини шляхом побудови супердерева та узгодженого дерева, що є метою даного дослідження.

Матеріали та методи. Як рослинний матеріал використали 15 сортів конюшини лучної української селекції. Умови виділення ДНК, проведення ПЛР та електрофорезу продуктів ампліфікації описані у попередніх роботах (Дугарь, Попов, 2011; Дугарь, 2012; Дугарь, Попов, 2012).

По кожному типу молекулярних маркерів створювалась матриця даних, на основі якої розраховувались генетичні дистанції. За частотними даними мікросателітної мінливості порашовані генетичні дистанції по Nei (Nei, 1972), а на основі бінарних матриць, складених із залученням полілокусних систем (ISSR, RAPD), розраховували генетичні дистанції по Nei і Li (Nei, Li, 1979). Для побудови узгодженого (консенсусного) дерева створювали об'єднану матрицю молекулярних даних і метод Majority rule extended (Mre) у програмі «Consense», яка входить у пакет філогенетичних програм «Phylip-3.69» (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>).

Для вивчення генетичних взаємовідношень між сортами конюшини лучної будували дендрограми методом найближчих сусідів (Neighbor-joining, NJ) (Saitou, Nei, 1987). У якості зовнішньої групи використовували місцевий сорт із Карпат UDS00131. Статистичну обробку даних проводили із використанням пакету філогенетичних програм «Phylip-3.69».

Супердерево генерували у програмі «CLANN 3.0.0» методом Most similar supertree (dfit)

(<http://bioinf.may.ie/software/clann/>). Бутстреп-аналіз здійснювали при 1000 повтореннях.

Результати та їх обговорення. Генетичне різноманіття українських сортів конюшини лучної охарактеризоване із застосуванням трьох типів ДНК-маркерів: SSR, ISSR та RAPD, що дозволило більш детально вивчити генетичну структуру конюшини, підтвердити гетерогенну природу цієї перехреснозапилної, ентомофільної культури.

Виявлений рівень поліморфізму різнився в залежності від типу використаних ДНК-маркерів. Всі типи молекулярних маркерів були високополіморфними, але найвищим рівнем поліморфізму характеризувалась полілокусна система ISSR. Рівень поліморфізму цієї маркерної системи склав 78,8 % (таблиця).

Дослідження варіабельності геному конюшини за трьома типами ДНК-маркерів дозволило розрахувати показники подібності та побудувати дендрограми, які відображають особливості генетичних взаємовідносин між сортами конюшини лучної.

Табл.

Результати аналізу генетичного поліморфізму сортів конюшини лучної.

Таб.

The results of genetic polymorphisms analysis of meadow clover.

ДНК-маркер	Кількість кластерів на дендрограмі, шт.	Кількість локусів, шт.		Розмір фрагментів п.н.	Поліморфізм, %
		усього	поліморфних		
SSR	2	10/87*	10	100-280	67,0
ISSR	3	75	59	105-1591	78,8
RAPD	2	134	96	141-2024	71,6

Примітка: * у чисельнику - загальна кількість локусів, а у знаменнику - загальна кількість алельних варіантів.

Note: * the numerator - the total number of lo-kusiv, and the denominator - the total number of all-allelic riantiv.

На основі мікросателітної мінливості побудована дендрограма, на якій сорти конюшини розподілились у два кластери. Так, в першому кластері сгрупувались сорти, створені у різних регіонах України: Політанка, Анітра, (Вінницька обл.), Миронівська 45 (Київська обл.), Агрос 12 (Чернігівська обл.), Тернопільська 3, Тернопільська 4, UDS00131 (західний регіон). У другому кластері знаходились сорти, одержані в Інституті землеробства (Київська обл.): Дарунок, Полянка, Маруся, Кумач, Поліс, а також сорти конюшини, одержані в різних селекційних установах (Спарта, Фалкон, Полтавська 75) (рис.1). Дендрограма, яка

отримана за даними аналізу ISSR локусів, складалась з трьох кластерів. Особливістю першого кластеру було то, що у нього увійшли 2 чернігівські сорти (Агрос 12 та Фалкон), які об'єднані у пару, а також 3 зразка (Тернопільська 4, Спарта та Поліс) різного походження. Другий кластер був представлений сортами конюшини з різних регіонів України – Тернопільська 3 (Тернопільська обл.), Полянка (Київська обл.), Анітра (Вінницька обл.) та Полтавська 75 (Полтавська обл.). У третьому кластері розташувались 6 сортів конюшини, з яких основна частина – сорти київської селекції (Дарунок, Кумач, Миронівська 45, Маруся). Виключенням були 2 зразки – UDS00131 (Карпати) та Політанка (Вінницька обл.) (рис.2).

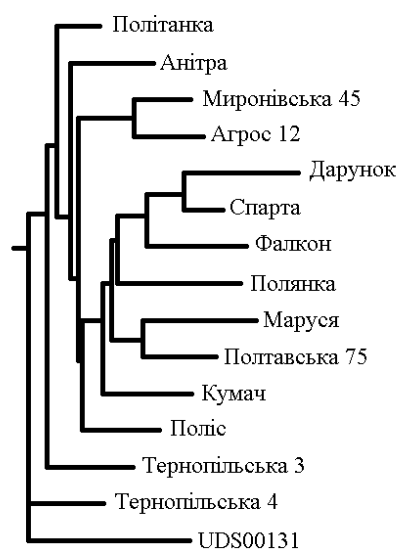


Рис.1. Дендрограма на основі даних SSR – аналізу.
Fig. 1. Dendrogram based on SSR data analysis.

При обробці матриці даних, отриманої на основі поліморфізму RAPD – локусів одержана дендрограма, яка мала у своєму складі 2 кластери. У першому кластері згрупувались усі сорти київської селекції (Миронівська 45, Поліс, Кумач, Маруся, Дарунок), тернопільської селекції (Тернопільська 4, Тернопільська 3), а також сорти з інших регіонів (Полтавська 75, Спарта).

Другий кластер сформували сорти селекції різних установ: Анітра, Політанка, Агрос 12, Полянка, UDS00131. Сорт Фалкон займав проміжне положення, але найбільше тяжів до першого кластеру (рис.3).

При генеруванні супердерева у програмі «CLANN 3.0.0» з трьох дендрограм (Creevey, McInerney, 2005) одержане дерево зі значеннями достовірності вузлів 33,3 % (рис. 4). Це свідчить про те, що кожне дерево генетичних взаємовідносин сортів конюшини є рівновірогідним.

Крім цього, одержані молекулярні дані були використані для створення узгодженої матриці з подальшим створенням узгодженого (консенсусного) дерева методом Majority rule extended (Mr). Цей метод дозволяє побудувати узгоджене дерево з дендрограм, у яких співпадає не менше, ніж 50% топології та найпоширеніших вузлів до тих пір, поки не будуть включені усі гілки (Tuimala, 2006).

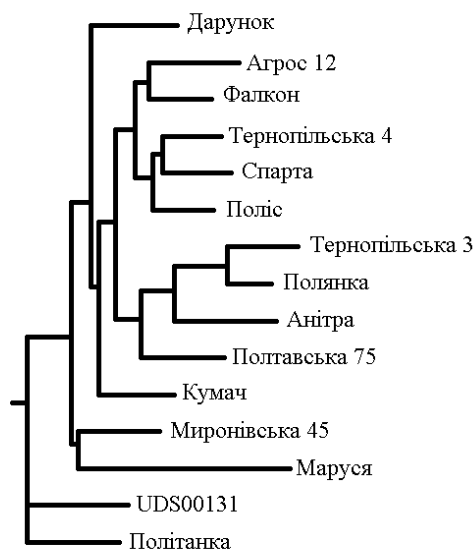


Рис.2. Дендрограма на основі даних ISSR-аналізу.
Fig. 2. Dendrogram based on ISSR data analysis.

Не дивлячись на те, що дендрограми, в основному, відрізнялись одна від одної, були виявлені деякі спільні особливості у групуванні сортів. Так, сорти Дарунок, Маруся, Кумач входили до складу одного кластеру на усіх деревах. Ці сорти створені у одному селекційному центрі – Інституті землеробства (Київська обл.), усі кормового використання, але різняться за типом розвитку (ярий, озимий, весінньо-осінній). Сорти Політанка та UDS00131 також групувались у одному кластері на всіх 6 дендрограмах.

Дендрограми на основі трьох видів ДНК-маркерів відрізнялись топологією, кількістю та складом кластерів. Тому для уточнення генетичних взаємовідносин між сортами конюшини були побудовані супердерево та узгоджене дерево.

З використанням трьох маркерних систем (SSR, ISSR, RAPD) нами одержані різні результати генетичних взаємовідносин сортів конюшини, що можна пояснити тим, що аналізувались різні ділянки ДНК (тандемні повтори, тандемні повтори з інвертованими нуклеотидами на кінці та довільні ділянки ДНК).

Узгоджене дерево складалось з двох кластерів. До першого кластеру увійшли сорти різного походження: усі сорти київської селекції – Дарунок, Кумач, Маруся, Миронівська 45, Поліс; тер-

нопільської селекції - Тернопільська 3, Тернопільська 4, а також сорти з інших регіонів: Полтавська 75, Спарта, Фалкон. В цьому кластері збереглися деякі тенденції другого кластеру дендрограми, побудованої на основі SSR-маркерів: поруч розташувались сорти Маруся та Полтавська 75 (рис. 5). У другому кластері знаходились два сорти вінницької селекції (Політанка, Анітра), а також сорти із різних областей: Агрос 12, Полянка, UDS00131. Представлений кластер за набором сортів подібний другому кластеру дендрограми із використанням RAPD-маркерів, але відрізняється топологією гілок (рис.3).

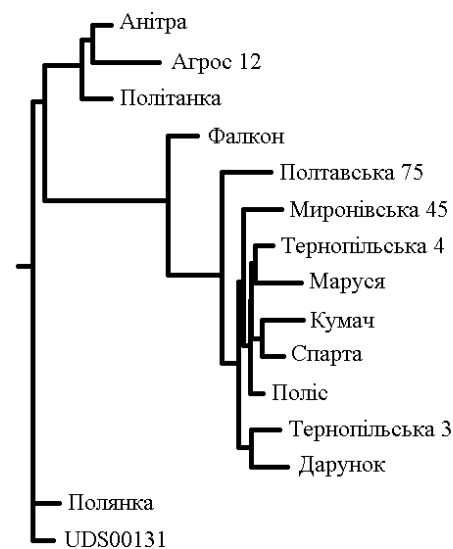


Рис.3. Дендрограма на основі даних RAPD – аналізу.
Fig. 3. Dendrogram based on RAPD data analysis



Рис.4. Супердерево.

Примітка: цифри відповідають значенням достовірності вузлів у %.

Fig. 4. Supertree.

Note: the numbers correspond to the values of significance units in %.

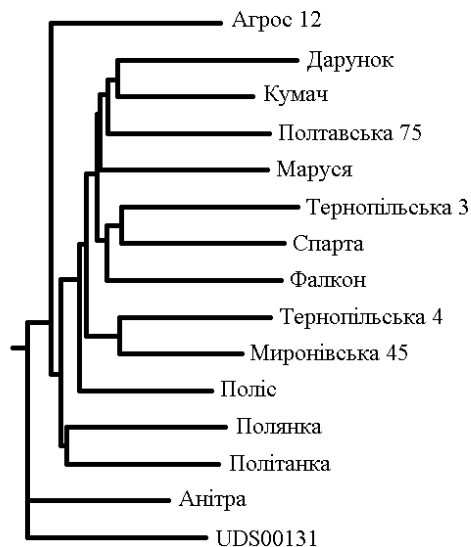


Рис. 5. Узгоджене дерево, побудоване методом NJ
Fig. 5. Coordinated tree constructed by NJ method



Рис. 6. Узгоджене дерево після бутстреп-аналізу.
Цифри відповідають значенням бутстреп-підтримок у %.

Fig. 6. Coordinated tree after bootstrap analysis.
The numbers correspond to the values of bootstrap supports in %.

Отже, побудова узгодженого дерева із залученням молекулярних даних аналізу різних ділянок ДНК конюшини дозволило нам найбільш повно оцінити взаємозв'язки між українськими сортами та встановити, що зберігаються деякі тенденції у кластеризації цих сортів.

Для перевірки достовірності кладограм часто використовують бутстреп аналіз, який ґрунтується на методі повторних виборок (resampling)

(Felsenstein, 2004). Для статистичної оцінки достовірності консенсусного дерева ми здійснили бутстреп-аналіз при 1000 повтореннях. Значення бутстреп-підтримок у різних вузлах дендрограми були менші або більші заданого порогу в 70% (Лукашов, 2009). Вузли дерева із значеннями бутстреп-підтримки <70% свідчать про те, що у топології дерева теоретично може бути інший порядок розташування гілок дерева. Узгоджене дерево після бутстреп-аналізу, загалом зберегло свою топологію, але також були деякі зміни. Так, змінив своє положення сорт Кумач. Для цієї дендрограми були характерними як низькі (13-56%), так і високі бутстреп-підтримки (71-100%) (рис.6).

Висновки. Таким чином, об'єднання дендрограм із створенням супердерева дозволило нам зробити висновок, що дендрограми, побудовані на основі SSR, ISSR та RAPD є рівновирогідними. Узгоджене дерево, побудоване на основі єдиної матриці молекулярних даних, найбільш повно відображало генетичні взаємозв'язки 15 сортів конюшини лучної української селекції. Чіткої кластеризації сортів конюшини згідно їх походження не виявлено, що, можливо, пов'язано з їхньою вузькою генетичною основою. Дослідження молекулярної мінливості сортів конюшини колекцій з інших країн доповнять одержані нами результати аналізу та дозволять виявити особливості генетичний взаємовідносин між сортами конюшини лучної.

Список літератури:

1. Baker W. J., Savolainen V., Asmussen-Lange C. B., Chase M. W., Dransfield J., Forest F., Harley M. M., Uhl N. W., Wilkinson M. Complete generic-level phylogenetic analyses of Palms (Arecaceae) with comparisons of supertree and supermatrix approaches // *Syst. Biol.* - 2009. - № 58(2). - P.240-256.
2. Bininda-Emonds O. R. P., Gittleman J. L., Steel M. A. The (Super)Tree of Life: Procedures, Problems, and Prospects Author(s) // *Annual Review of Ecology and Systematics.* - 2002. - Vol. 33. - P.265-289.
3. Creevey C. J., McInerney J. O. Clann: investigating phylogenetic information through supertree analyses // *Bioinformatics applications note.* - 2005. - Vol. 21, № 3. - P.390-392.
4. Felsenstein J. *Inferring Phylogenies.* - Sunderland MA: Sinauer Associates, 2004. - 664 p.
5. Nei M. Genetic distance between populations / *Am. Nat.* - 1972. - № 106. - P.283-292.
6. Nei M., Li W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 1979. - V.76. - P.5269-5273.
7. Saitou N., Nei M. The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // *Mol. boil. evol.* - 1987. - № 4(4). - P.406-425.
8. Tuimala J. *A primer to phylogenetic analysis using the PHYLIP package.* Fifth Edition. Espoo, Finland: Center for Scientific Computing Ltd, 2006. - 55p.

9. Дугарь Ю.Н., Попов В.Н. RAPD-анализ украинских сортов клевера лугового (*Trifolium pratense* L.) разного эколого-географического происхождения // Вестник ХНУ им. В.Н. Каразина. Серия биология. – 2011. - Вып.13, № 947. – С. 81-86.
10. Дугарь Ю. М. ISSR-анализ украинских сортов клевера лугового (*Trifolium pratense* L.) // Вестник ХНАУ. Серия биология. – 2012. – Вып. 2 (26). – С. 98-103.
11. Дугарь Ю. М., Попов В.М. Ідентифікація та паспортизація сортів конюшини лучної (*Trifolium pratense* L.) // Вісник ХНАУ. Серія біологія. – 2012. – Вып. 3 (27). – С. 82 – 90.
12. Лукашов В.В. Молекулярная эволюция и филогенетический анализ. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2009. – 256 с.

GENETIC RELATIONSHIPS OF UKRAINIAN RED CLOVER VARIETIES REVEALED BY DNA-MARKERS

Yu. M. Dugar

The paper compares dendrograms obtained by analyzing the data using SSR, ISSR and RAPD markers. Comparison of supertree using different sets of molecular data and consensus tree constructed using a common data sets is performed. The features clustering clover varieties on trees within 2-3 clusters, depending on the type of dendrogram is discussed. A clear grouping according to the origin of varieties haven't been identified.

Key words: Trifolium pratense L., SSR, ISSR, RAPD, supertree, consensus tree

Одержано редколегією 23.09.2013