

О.М. БУБЛИК¹, І.О. АНДРЕЄВ¹,
К.В. СПИРИДОНОВА¹, В.І. МУЗИКА²,
І.В. КОЛОНІНА², В.А. КУНАХ¹

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
вул. акад. Заболотного, 150, м. Київ, 03143, Україна

² ТОВ «Унгернія», пл. Сухарівська В., 16/18, будова 1, оф. 89,
м. Москва, 07045, Росія

kunakh@imbg.org.ua

ГЕНЕТИЧНА ГЕТЕРОГЕННІСТЬ РІДКІСНОГО ЕНДЕМІЧНОГО ВИДУ *UNGERNIA VICTORIS* (AMARYLLIDACEAE): RAPD-АНАЛІЗ

Ключові слова: *Ungernia victoris*, Amaryllidaceae,
RAPD-ПЛР, генетичний поліморфізм, внутрішньопопуляцій-
на варіабельність, ендемічні види

Вступ

Унгернія Віктора — *Ungernia victoris* Vved. ex Artjushenko — цибулинний багаторічник із родини *Amaryllidaceae* з класу однодольних (*Liliopsida* = *Monocotyledonae*), рідкісний ендемічний середньоазійський вид, занесений до Червоних книг Таджикистану [2] і Узбекистану [3], який трапляється лише на Гіссарському хребті та його південних відрогах. Цінність для медицини становлять ізохінолінові алкалоїди *U. victoris*. Алкалоїд галант амін — інгібітор холінестерази — застосовують у разі рухових і сенсорних порушень, пов'язаних із невритами, радикулітами, та у відновному періоді гострого дитячого поліомієліту, лікорин — для лікування гострих і хронічних бронхітів і бронхоектатичних захворювань. Крім того, *U. victoris* містить біологічно активні полісахариди, які використовують у разі таких захворювань, як порушення обміну речовин, сольового режиму, променева хвороба [5].

Незважаючи на те, що цю рідкісну рослину вже тривалий час використовують у медицині, не було проведено жодних популяційно-генетичних досліджень виду у природі. Ми вивчали генетичний поліморфізм рослин *U. victoris* з ізольованої природної популяції. Для вирішення цього завдання застосували метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням довільних праймерів, або RAPD-аналіз, який останнім часом широко практикують, досліджуючи генетичну мінливість рідкісних і ендемічних видів. Цей метод має низку переваг, зокрема, допомагає виявляти поліморфізм генетичних локусів, розсіяних по всьому геному, і забезпечує велику кількість маркерів. Вважається, що RAPD переважно відображає мінливість некодуючих ділянок ДНК і чутливий до багатьох типів мутацій. Крім того, метод не по-

© О.М. БУБЛИК, І.О. АНДРЕЄВ, К.В. СПИРИДОНОВА, В.І. МУЗИКА, І.В. КОЛОНІНА,
В.А. КУНАХ, 2008

требує інформації про послідовність ДНК досліджуваного виду, завдяки високій чутливості для аналізу достатньо малих кількостей ДНК, що має особливе значення в разі роботи з рідкісними рослинами.

Матеріали і методи досліджень

Матеріалом для дослідження були цибулини шістьох довільно обраних рослин *U. victoris* віком близько 40—50 років з географічно ізольованої природної популяції, розташованої на висоті близько 1100 м над р. м., на південному схилі Гісарського хребта (Таджикистан). Популяція обмежена гірською грядкою і двома річками і займає майже 5 га. Досліджені рослини зібрані з площі близько 400 м². У досліді їм надано номери від 1 до 6, одна особина складалася із двох цибулин, що росли на спільному денці, — їх було позначено як 5a і 5b.

Зі свіжих лусок цибулин виділяли ядра і після їх попереднього очищення екстрагували ДНК, використовуючи буфер з ДСН і протеїназою К [1]. Якість і концентрацію отриманої ДНК оцінювали за допомогою гель-електрофорезу, порівнюючи за інтенсивністю флуоресценції комплексів ДНК — бромистий етидій в УФ-променях із ДНК фага λ відомої концентрації [4].

Полімеразну ланцюгову реакцію проводили в термоциклері Терцик МС2 («Біотехнологія», Росія). Використано 24 десятичленних праймери довільної послідовності, характеристики яких наведено в табл. 1. Реакційна суміш для проведення ПЛР об'ємом 20 мкл містила: 20 нг ДНК, 0,2 мМ dNTP, 1,25 U

Таблиця 1. Характеристика RAPD-праймерів, використаних для аналізу генетичного поліморфізму рослин *U. victoris*

Праймер	Нуклеотидна послідовність (5'—3')	Враховано ампліконів, шт.	Поліморфних ампліконів, шт.	Праймер	Нуклеотидна послідовність (5'—3')	Враховано ампліконів, шт.	Поліморфних ампліконів, шт.
A01	CAGGCCCTTC	11	9	A17	GACCGCTTGT	13	9
A02	TGCCGAGCTG	6	1	A19	CAAACGTCGG	27	25
A03	AGTCAGCCAC	4	0	A20	GTTGCGATCC	21	19
A04	AATCGGGCTG	12	10	B01	GTTTCGCTCC	19	13
A05	AGGGGTCTTG	3	0	B02	TGATCCCTGG	11	7
A07	GAAACGGGTG	7	1	B03	CATCCCCCTG	6	4
A08	GTGACGTAGG	19	17	B05	TGCGCCCTTC	13	11
A09	GGGTAACGCC	10	7	B06	TGCTCTGCC	4	0
A10	GTGATCGCAG	12	9	B07	GGTGACGCAG	13	11
A11	CAATCGCCGT	19	15	B08	GTCCACACGG	15	13
A12	TCGGCGATAG	3	0	B10	CTGCTGGGAC	13	5
A14	TCTGTGCTGG	8	5			288	209
A16	AGCCAGCGAA	19	18			100	72,6

Тақ-полімерази, 0,6 мкМ праймера, 15 мМ TrisCl, рН 8,3, 75 мМ КСl, 0,06 мг/мл BSA, 2 мМ MgCl₂. На реакційну суміш нашаровували 15 мкл мінеральної олії. Як негативний контроль використовували стандартну реакційну суміш без ДНК. Ампліфікацію проводили в такому температурному режимі: 95 °С — 2 хв., 5 • (94 °С — 30 с, t_{гібр} — 30 с, 72 °С — 1 хв.), 35 • (94 °С — 20 с, t_{гібр} — 20 с, 72 °С — 40 с), 72 °С — 2 хв. 30 с. Температура гібридизації (t_{гібр}) для праймерів А14, А16 і А17 становила 38 °С, для інших — 36 °С.

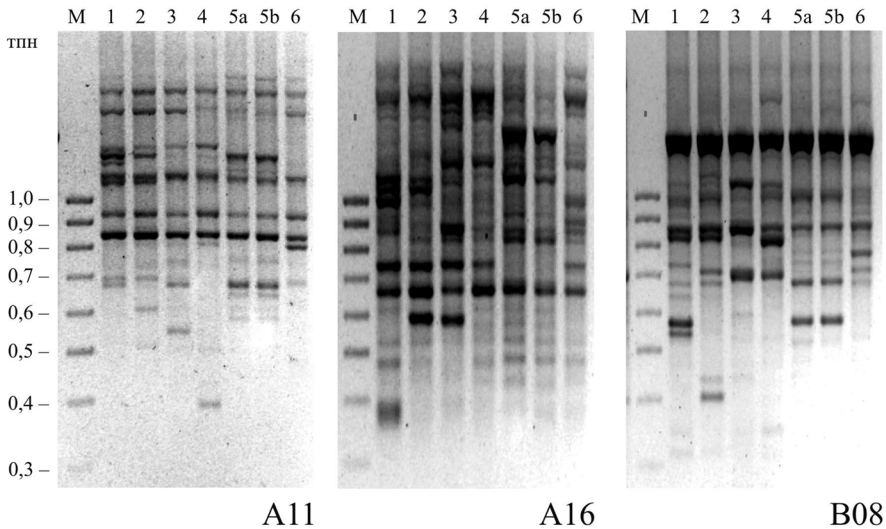
Дослід проводили щонайменше у двох повторностях. Продукти ампліфікації розділяли електрофорезом (3—4 В/см) у 1,7 %-му агарозному гелі з 0,5 мкг/мл бромистого етидію, в 1 × ТВЕ буфері, фотографували у проникаючому УФ світлі цифровим фотоапаратом з використанням фільтра «О-2,8х». Для визначення розміру фрагментів застосували ДНК-маркер «100 bp + 1,5 Kb» («СибЭнзим», Росія).

Проводячи аналіз, припускали, що кожний RAPD-амплікон відповідає індивідуальному геномному локусу, котрий існує в геномі у вигляді одного із двох алелей: домінантного (1) — амплікон присутній чи рецесивного (0) — відсутній. За результатами оцінки електрофореграм будували бінарну матрицю, враховували тільки добре помітні й відтворювані фрагменти. За допомогою програми PopGen [17] на підставі побудованої матриці визначали такі генетичні параметри за Неєм [12]: відсоток поліморфних локусів (P), середнє число алелей на локус (A), ефективне число алелей на локус (A_e), генну різноманітність Нея (очікувана гетерозиготність H_e) та індекс Шеннона (S); за методом Нея [11] побудована матриця генетичних відстаней (D_N).

Результати досліджень та їх обговорення

Рівень внутрішньопопуляційної варіабельності *U. victoris* досліджували за RAPD-аналізом геномів шести рослин з природної популяції. Для оцінки поліморфізму використано 24 декануклеотидних праймери, які за умов ПЛР забезпечували утворення чітких, відтворюваних продуктів. Типові RAPD-спектри рослин *U. victoris* наведені на рисунку. У більшості спектрів на фоні численних, менш інтенсивних поліморфних фрагментів спостерігали один—три яскраві мономорфні фрагменти, властиві всім рослинам. Кожний з досліджених об'єктів, за винятком двох цибулин зі спільним денцем, мав індивідуальний RAPD-фенотип. Їх поліморфізм виявлявся як у відмінностях, пов'язаних з наявністю окремих ампліконів, так і у варіаціях їх кількісної представленості у спектрах. Порівнюючи спектри, кількісні варіації враховували у разі не менше 3—4-кратної різниці в інтенсивності флуоресценції смуг на електрофореграмах.

Застосовані праймери ініціювали синтез 288 ампліконів розміром 230—1920 п.н., у кількості 4—27 на праймер (табл. 1) (середнє число фрагментів на праймер — 12). Залежно від праймера кількість поліморфних ампліконів варіювала від 0 (для трьох праймерів) до 17 (праймер А19), кількість мономорфних ампліконів — від 2 до 8 (табл. 1). Для всієї вибірки праймерів відсоток поліморфних локусів (P) становив 72,6 % (209). З них 81 амплікон (28,1 %



RAPD-аналіз генетичної гетерогенності рослин *U. victoris*: М — маркер молекулярної маси «100 bp Ladder», 1—6 — номери досліджених рослин, назви використаних праймерів вказано під електрофореграмами

RAPD-analysis of the *U. victoris* genetic heterogeneity: М — molecular mass marker «100 bp Ladder», 1—6 — numbers of the studied plants, names of the primers used are listed below the electrophoregrams

від загального числа) — індивідуальні (траплялися у RAPD-профілі лише однієї з рослин), 54 (18,8 %) — відзначені в RAPD-профілях двох рослин, 28 (9,7 %) — трьох рослин, 24 (8,3 %) — чотирьох, 22 (7,6 %) — п'яти рослин. 79 ампліконів (27,4 %) характерні для всієї вибірки об'єктів, тобто є мономорфними. З 209 поліморфних локусів 43 (20,6 %) були варіабельними за копійністю. Зауважимо, що лише три з поліморфних ампліконів можна було віднести до групи «мажорних» фрагментів (загальна кількість яких дорівнювала 51), а більшість поліморфних ампліконів мала нижчу інтенсивність флуоресценції на електрофореграмах.

Основні показники генетичного поліморфізму для дослідженої вибірки рослин, розраховані на підставі алейних частот, становили: середнє число алелей на локус (A) $1,726 \pm 0,447$, ефективне число алелей на локус (A_e) $1,453 \pm 0,355$, гена різноманітність Нея (очікувана гетерозиготність H_e) $0,267 \pm 0,186$, індекс Шеннона (S) $0,399 \pm 0,264$. Генетичні відстані за Неєм (D_N) між інтактними рослинами варіювали в діапазоні 26,9—47,0 %, середнє значення цього показника дорівнювало 39,8 % (табл. 2).

Результати проведених досліджень свідчать про високу внутрішньопопуляційну гетерогенність *U. victoris*. Узагальнення літературних даних з дослідження генетичної мінливості рослин методами ізоферментного аналізу [9] та RAPD-ПЛР [15] уможливило висновок щодо очікуваного рівня мінливості видів з певними особливостями біології (тривалість життєвого циклу, спосіб розмноження, географічне поширення тощо). Досліджена вибірка *U. victoris*

Таблиця 2. Генетичні відстані за Неєм [11] між рослинами *U. victoris*, розраховані за результатами RAPD-аналізу, %

Рослина	1	2	3	4	5a	5b	6
1	—						
2	26,9	—					
3	43,2	38,0	—				
4	42,7	43,7	39,0	—			
5a	40,6	44,8	44,3	47,0	—		
5b	40,6	44,8	44,3	47,0	0,00	—	
6	33,5	37,5	39,0	30,6	34,5	34,5	—

за критерієм внутрішньопопуляційної генної різноманітності, обчисленим на підставі RAPD-маркерів, мала вищий рівень мінливості, ніж інші види рослин з аналогічними характеристиками. Виникає запитання: чим може обумовлюватися такий підвищений рівень генетичної гетерогенності?

Ungernia victoris має вузький ареал, росте в аридній зоні зі спекотним, напівпустельним, різко континентальним кліматом. Трапляється на гірських схилах, вододілах і в ущелинах на висоті від 800 до 2700 м над р. м. (високогірні райони зі значним сонячним опроміненням і різкими коливаннями температур — як добових, так і річних). Це багаторічна цибулинна рослина, тривалість життя якої обчислюється десятиліттями. Один з основних способів поширення *U. victoris* — насінням, що випадає із коробочок і розноситься за допомогою вітру, опадів та інших природних факторів. Вважається, що цьому виду притаманні агамоспермія та клейстогамія і вегетативне розмноження — розділенням цибулин з денця симетрично на дві частини [5].

Генетична структура виду визначається кількома факторами, серед яких одним з вирішальних є спосіб розмноження [9]. За літературними даними, самоzapильні види мають нижчу внутрішньопопуляційну мінливість порівняно з тими, яким властивий перехресний або змішаний тип запилення. Статевий спосіб розмноження забезпечує вищу диференціацію, ніж нестатевий [9, 15]. Водночас у популяціях рослин, які вегетативно розмножуються, завдяки підтриманню декількох генотипів ефект генетичного дрейфу менш виражений, ніж у тих, що розмножуються статевим шляхом [6]. У цьому контексті отримане значення внутрішньопопуляційної генної різноманітності *U. victoris* є неочікувано високим: воно близьке до середнього значення для перехресноzapильних рослин — 0,260 (середнє для 24 видів), значно перевищує значення внутрішньопопуляційної генної різноманітності для видів-самоzapильників — 0,091 (середнє для восьми видів) та видів зі змішаним способом запилення — 0,219 (для шести видів) [15]. Завдяки безстатевому розмноженню насінням (агамоспермії) і вегетативному розмноженню, що переважають у *U. victoris*, формуються клони-нащадки з ідентичним материнському генотипом [14]. Апоміксис надає перевагу у несприятливих

умовах, оскільки є автономною репродуктивною системою та забезпечує відтворення добре пристосованих генотипів. Однак цей спосіб розмноження уможливорює накопичення рецесивних мутацій у зв'язку з тим, що при агамоспермії відсутній редукційний мейоз, який супроводжується рекомбінацією і розподілом хромосом. Як наслідок — агамоспермічні види мають неочікувано високу частку фіксованих у гетерозиготному стані локусів [16]. Можливість такого механізму формування генетичної гетерогенності підтверджують результати філогенетичного аналізу представників *Amaryllidaceae*, які демонструють значну паралогічну варіабельність ВТС ядерного гена 18S-25S рРНК *U. victoris* порівняно з іншими представниками родини [10]. Таким чином, апоміксис у поєднанні з мутаційним процесом за умови нейтрального або адаптивного характеру мутацій може сприяти формуванню генетичної різноманітності.

Високе значення генної різноманітності *U. victoris* типове для життєвої форми, властивої для цього виду, та ступеня мобільності насіння. Так, середнє значення внутрішньопопуляційної генної різноманітності, обчислене на підставі RAPD-маркерів, для триваложивучих багаторічників становило 0,242 (для 23 видів), а для видів, насіння яких поширюється за допомогою вітру та/або води і характеризується високою мобільністю, — 0,261 (для 3 видів) [15].

Ще одним фактором, з яким пов'язаний рівень генетичної варіабельності, є географічне поширення виду. Літературні дані вказують на те, що ендемічні види з просторово обмеженими ареалами, як правило, характеризуються нижчим рівнем варіабельності, ніж широко розповсюджені [8, 9]. Це може бути наслідком невеликої кількості особин у популяціях ендемічних видів [7]. Водночас окремі рідкісні види відзначаються вищими рівнями генної різноманітності, ніж споріднені з ними широко розповсюджені види [8], що може пояснюватися більшим розміром їх популяцій і/або особливостями біології виду, серед яких найважливішою є система розмноження. Отримане значення генної різноманітності для *U. victoris* ($0,267 \pm 0,186$) перевищило не лише середні значення для ендемічних — 0,191 (5 видів), вузько поширених — 0,233 (4 видів) та регіонально поширених видів — 0,222 (16 видів), але навіть для широко розповсюджених — 0,208 (15 видів) [15]. Імовірною причиною підвищеного рівня генної різноманітності *U. victoris* можуть бути суворі умови в місцях його зростання, які, за літературними даними, призводять до підвищення генетичної гетерогенності, необхідної для виживання у несприятливих ситуаціях [13].

Висновки

Таким чином, методом RAPD-ПЛР досліджено генетичну гетерогенність *U. victoris*. На підставі молекулярно-генетичного аналізу шести рослин з однієї популяції визначено основні популяційні параметри: кількість поліморфних локусів (P) становила 72,6%; число алелей на локус (A) — $1,726 \pm 0,447$; ефективне число алелей на локус (A_e) — $1,453 \pm 0,355$; генна різноманітність Нея (очікувана гетерозиготність H_e) — $0,267 \pm 0,186$; індекс Шеннона (S) —

0,399 ± 0,264. Середнє значення генетичних відстаней за Неєм (D_N) — 39,8 %. Не зафіксовано відмінностей між цибулинами, які утворилися на одному денці в результаті вегетативного розмноження. Рівень генетичного поліморфізму *U. victoris* виявився неочікувано високим для ендемічного виду, котрий розмножується насінням, що утворюється переважно шляхом агамоспермії і самозапилення, а також вегетативно.

Автори висловлюють щиру подяку д-ру біол. наук С.Л. Мосякіну за цінні поради і критичні зауваження при підготовці рукопису статті.

1. *Генная инженерия растений. Лабораторное руководство* / Под ред. Дж. Дрейпера, Р. Скотта, Ф. Армртиджа, Р. Уолдена. — М.: Мир, 1991. — С. 252—257.
2. *Красная книга Таджикской ССР*. — Душанбе: Дониш, 1988. — 336 с.
3. *Красная книга Узбекской ССР. Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды животных и растений. Т. 2. Растения*. — Ташкент: Фан, 1984. — 152 с.
4. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984. — С. 411—412.
5. *Хамидходжаев С.А.* Лекарственные растения рода унгерния в Средней Азии. — Ташкент: Фан, 1982. — 148 с.
6. *Charlesworth D., Wright S.I.* Breeding systems and genome evolution // *Current Opinion in Genetics & Development*. — 2001. — **11**. — P. 685—690.
7. *Ellstrand N.C., Elam D.R.* Population genetic consequences of small population size: Implications for plant conservation // *Annual Review of Ecology and Systematics*. — 1993. — **24**. — P. 217—242.
8. *Gitzendanner M.A., Soltis P.S.* Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners // *Amer. J. Bot.* — 2000. — **87**. — P. 783—792.
9. *Hamrick J.L., Godt M.J.W.* Allozyme diversity in plant species // *Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources* / Eds. Brown A.H.D., Clegg M.T., Kahler A.L., Weir B.S. — Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 1989. — P. 43—63.
10. *Meerow A.W., Francisco-Ortega J., Kuhn D.N., Schnell R.J.* Phylogenetic relationships and biogeography within the Eurasian clade of *Amaryllidaceae* based on plastid *ndhF* and nrDNA ITS sequences: Lineage sorting in a reticulate area? // *Syst. Bot.* — 2006. — **31**(1). — P. 42—60.
11. *Nei M.* Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // *Genetics*. — 1978. — **89**. — P. 583—590.
12. *Nei M.* *Molecular evolutionary genetics*. — New York: Columbia — University Press, 1987. — P. 176—187.
13. *Nevo E.* Evolution of genome–phenome diversity under environmental stress // *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. — 2001. — **98** (11). — P. 6233—6240.
14. *Nybohm H.* DNA fingerprinting—a useful tool in the taxonomy of apomictic plant groups // *Folia Geobot. Phytotax.* — 1996. — **31**. — P. 295—304.
15. *Nybohm H., Bartish I.* Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants // *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*. — 2000. — **3/2**. — P. 93—114.
16. *Richards A.J.* Apomixis in flowering plants: an overview // *Phil. Trans. R. Soc. London, Ser. B*. — 2003. — **358**. — P. 1085—1093.
17. *Yeh F.C., Boyle T.J.B.* Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits // *Belgian J. Bot.* — 1997. — **129**. — P. 157.

Рекомендує до друку
Є.Л.Кордюм

Надійшла 14.05.2007

Е.Н. Бублик¹, И.О. Андреев¹, Е.В. Спиридонова¹,
В.И. Музыка², И.В. Колонина², В.А. Кунах¹

¹ Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, г. Киев, Украина

² ООО «Унгерния», г. Москва, Россия

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ РЕДКОГО ЭНДЕМИЧНОГО ВИДА *UNGERNIA VICTORIS* (AMARYLLIDACEAE): RAPD-АНАЛИЗ

Исследована генетическая гетерогенность ценного лекарственного растения — эндемика Памиро-Алая *Ungernia victoris* Vved. ex Artjushenko (*Amaryllidaceae*). Методом RAPD-ПЦР проанализировано ДНК шести растений из природной популяции, расположенной на южном склоне Гиссарского хребта (Таджикистан). В целом учтено 288 фрагментов, амплифицированных с использованием 24 праймеров. Определены основные популяционно-генетические параметры: доля полиморфных локусов составила 72,6 %, эффективное число аллелей на локус (A_e) — $1,453 \pm 0,355$; генное разнообразие Нея (ожидаемая гетерозиготность H_e) — $0,267 \pm 0,186$; индекс Шеннона (S) — $0,399 \pm 0,264$. Среднее значение генетических расстояний по Нею (D_N) составляет 39,8 %. Не выявлено отличий между луковицами, которые образовались на одном доньшке в результате вегетативного размножения. Предполагается, что высокий уровень варибельности *U. victoris* может быть связан с особенностями биологии вида — многолетнего растения с преобладающим размножением путем апомиксиса, продолжительным репродуктивным периодом, значительной мобильностью семян.

Ключевые слова: *Ungernia victoris*, Amaryllidaceae, RAPD-ПЦР, генетический полиморфизм, внутривидовая варибельность, эндемичные виды.

О.М. Бублик¹, И.О. Андреев¹, Е.В. Спиридонова¹,
В.И. Музыка², И.В. Колонина², В.А. Кунах²

¹ Institute of Molecular Biology and Genetics,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

² Corp. «Ungernia», Moscow, Russia

GENETIC HETEROGENEITY OF THE RARE ENDEMIC SPECIES *UNGERNIA VICTORIS* (AMARYLLIDACEAE): RAPD ANALYSIS

Studies on genetic heterogeneity of the valuable medicinal plant endemic to the Pamiro-Alai Mountains, *Ungernia victoris* Vved. ex Artjushenko (*Amaryllidaceae*) have been carried out. Six plants derived from a natural population located at the southern slope of the Gissar Ridge (Tajikistan) were assayed though RAPD-PCR. Total of 288 amplified bands were scored from 24 RAPD primers. Major populational and genetic parameters were measured: the percentage of polymorphic loci was 72.6 %, the effective number of alleles per locus (A_e) — 1.453 ± 0.355 ; Nei's gene diversity (expected heterozygosity H_e) — 0.267 ± 0.186 ; Shannon's index (s) — 0.399 ± 0.264 . Average genetic distances according to Nei (D_N) was 39.8 %. Bulbs arising from the same stem as a result of vegetative propagation failed to display any differences. High level of variability is suggested to reflect the peculiarities of the species, which is a long-lived perennial distinguished by preferential propagation through apomixis, long reproductive period, and high seed dispersal capacity.

Key words: *Ungernia victoris*, Amaryllidaceae, RAPD-PCR, genetic polymorphism, intrapopulation variability, endemic species.