

Генетичні особливості фенологічних форм *Quercus robur* (Fagaceae) за даними аналізу поліморфізму інтронів генів β -тубуліну та мікросателітних локусів

Ярослав В. ПІРКО¹, Максим В. НЕЦВЕТОВ², Любов О. КАЛАФАТ¹, Надія М. ПІРКО¹, Анастасія М. РАБОКОНЬ¹, Сергій М. ПРИВАЛІХІН¹, Андрій Є. ДЕМКОВИЧ¹, Юлія О. БІЛОНОЖКО¹, Ярослав Б. БЛЮМ¹

¹ДУ "Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України"

вул. Осиповського, 2а, Київ 04123, Україна

yarvp1@gmail.com

newprival@yahoo.com

²ДУ "Інститут еволюційної екології НАН України"

вул. Академіка Лебедєва, 37, Київ 03143, Україна

netsvetov@nas.gov.ua

Pirko Ya.V.¹, Netsvetov M.V.², Kalafat L.O.¹, Pirko N.M.¹, Rabokon A.M.¹, Privalikhin S.M.¹, Demkovich A.Ye.¹, Bilonozhko Yu.O.¹, Blume Ya.B.¹ **Genetic features of the phenological forms of *Quercus robur* (Fagaceae) according to the analysis of the introns polymorphism of β -tubulin genes and microsatellite loci.** Ukr. Bot. J., 2018, 75(5): 489–500.

¹Institute of Food Biotechnology and Genomics, National Academy of Sciences of Ukraine

2a Osipovskogo Str., Kyiv 04123, Ukraine

²Institute for Evolutionary Ecology, National Academy of Sciences of Ukraine

37 Acad. Lebedeva Str., Kyiv 03143, Ukraine

Abstract. Early and late phenological forms of *Quercus robur* (Fagaceae) have been investigated using microsatellite markers and a DNA marker system based on the study of the intron's length polymorphism of the β -tubulin genes (TBP-markers). Relatively low indicators of genetic variability have been established ($H_o = 0.342 \pm 0.208$, $H_e = 0.566 \pm 0.199$ in the early and $H_o = 0.288 \pm 0.136$, $H_e = 0.461 \pm 0.216$ in the late phenological groups) in 40 analyzed plants of two samples with microsatellite loci. The genetic differences between the early and late forms of *Q. robur* have been determined. The 9 unique alleles for microsatellite loci and 4 fragments for TBP loci among the trees of the early form, and 5 unique alleles for the microsatellite and TBP loci for the late form have been discovered. In particular, the differences in the frequency of prevalent alleles quru-GA-0C19-222 (practically absent at the late phenological sample) and quru-GA-0C19-226 (frequency reaches more than 80% in the early phenological form and only about 50% in the late) have been detected. The evaluation of the TBP polymorphism indices conducted for the investigated forms of *Q. robur* have revealed a lower number of fragments in the early ($Ne = 1.218 \pm 0.040$) compared with the late phenological form of *Q. robur* ($Ne = 1.294 \pm 0.042$). The value of PIC (Polymorphism Information Content) for this type of markers has been greater in the late phenological form *Q. robur* ($PIC = 0.274 \pm 0.025$) than in the early form ($PIC = 0.209 \pm 0.022$). Also, according to Shannon's information index, there are differences between the early ($I = 0.253 \pm 0.029$) and the late ($I = 0.320 \pm 0.031$) phenological forms of *Q. robur*. Analysis of the molecular variation by TBP markers (AMOVA) has been revealed slight differences in the investigated phenological forms of *Q. robur*. Thus, 91% of the genetic diversity of *Q. robur* is for intra-sample polymorphism, and 9% is inter-sampling in the overall genetic heterogeneity of the species. Our results showed that variation in seasonal timing in *Q. robur* is not only attributed to the variability in the growth condition but also genetically determined. More types of DNA markers are required for further researches on genetic profiling and certification of *Q. robur* phenological forms.

Keywords: *Quercus robur*, TBP-markers, microsatellites, genetic variability, phenological forms

Вступ

Упродовж багатовікової історії Києва в озелененні використовувався *Quercus robur* L. Нині в місті поряд з молодими дубовими деревостанами штучного та природного походження досить часто

трапляються вікові дерева *Q. robur*, які можуть бути залишками колишніх природних популяцій. Одні з найстарших на території міста дерев збереглися в грабовій діброві, що є основою парку-пам'ятки садово-паркового мистецтва загальнодержавного значення "Феофанія" (Matiashuk et al., 2014; Netsvetov, Prokoruk, 2016). У цих природного походження деревостанах *Q. robur* трапляються

© Я.В. ПІРКО, М.В. НЕЦВЕТОВ, Л.О. КАЛАФАТ, Н.М. ПІРКО, А.М. РАБОКОНЬ, С.М. ПРИВАЛІХІН, А.Є. ДЕМКОВИЧ, Ю.О. БІЛОНОЖКО, Я.Б. БЛЮМ, 2018

рослини, диверсифіковані за часом настання фенологічних фаз й являють собою ранню та пізню фенологічні форми, які В.М. Черняєв (Chernyaev, 1858) описав як варіації, таксономічний статус яких наразі не підтверджено. Основні ознаки, за якими В.М. Черняєв диференціював ці форми, наступні: 1) розкриття бруньок, цвітіння, початок росту пагонів та більшість інших фенологічних фаз виникають у пізньої форми на 2–3 тижні пізніше, ніж у ранньої; 2) листя дерев пізньої форми не опадає, залишаючись на гілках до кінця зими; 3) рослини пізньої форми менше уражуються шкідниками та хворобами; 4) рослини пізньої форми мають вищу й більш регулярну форму крони, ширший стовбур і вищу якість деревини, віддають перевагу більш зволоженому місцезростанню. У подальших спостереженнях було підтверджено, що ці форми мають значні відмінності у стійкості до середовища, зростання та розвитку (Milenin, 1997; Rubtsov et al., 2007; Molchanov, 2011, 2012; Silchenko, 2012; Utkina, Rubtsov, 2017; Varna et al., 2017). Було також виявлено приуроченість фенологічних форм до різних типів ландшафту: ранньої фенологічної форми *Q. robur* до низинних форм рельєфу, пізньої – до височинних (Silchenko, 2012; Slepukh, 2016). Рослини ранньої форми *Q. robur* краще переносять нестачу вологи в ґрунті порівняно з пізньою формою, що дозволяє їм зростати в сухих місцях, однак вони пошкоджуються весняними заморозками й листогризучими комахами. Пізні форми *Q. robur* стійкіші до низьких температур весною, однак пошкоджуються літньою посухою (Molchanov, 2012; Dantec et al., 2015; Puchałka et al., 2017). На думку деяких вчених, вони є перспективними і широко використовуються для штучного формування зелених зон у європейських країнах (Coutinho et al., 2015).

У природних популяціях існують і перехідні фенологічні форми *Q. robur* (Utkina, Rubtsov, 2017), тому при ідентифікації рослин зважають на комплекс ознак фенотипу. Разом із тим варіації сезонного розвитку в популяціях *Q. robur* можуть бути наслідком звичайної мінливості, пов'язаної з особливостями умов зростання дерев (Pérez-de-Lis et al., 2017).

Фенологічна мінливість в аналогічних ґрунтових та гідрологічних умовах залежить від генетичних факторів (Batos et al., 2012; Chokheli et al., 2016). Генетична ідентифікація ранніх та пізніх фенологічних форм *Q. robur* надає змогу

охарактеризувати генетичне різноманіття цього виду. Молекулярно-генетичний аналіз може допомогти виявити найбільш цінні зразки для розповсюдження через культуру *in vitro* і масового виготовлення посадкового матеріалу. Найбільш ефективно це можна зробити за допомогою молекулярних методів з використанням ДНК-маркерів. Досить популярними з них є SSR-маркери (Simple Sequence Repeats), або мікросателіти, оскільки вони поєднують ряд таких ознак, як гіперваріабельність, висока щільність, мультиалельність, кодомінантність, відтворюваність і рівномірність розподілу по геному (Khlestkina, 2014). Саме тому ця методика добре себе зарекомендувала при ідентифікації генотипів різних сортів господарських рослин (Singh et al., 2015). Також надійним та достовірним джерелом інформації щодо міжвидової та внутрішньовидової мінливості організмів в останні роки вважається поліморфізм довжини інтронів різних генів (Xia et al., 2017). Метод оцінки поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну (Tubulin Based Polymorphism, ТВР) вважається надійною, стабільно працюючою для різних видів вищих рослин системою молекулярно-генетичних маркерів (Bardini et al., 2004).

Мета нашої роботи – визначення генетичних відмінностей між ранньою та пізньою фенологічними формами *Q. robur* за допомогою різних ДНК-маркерів.

Матеріали та методи

Для оцінки генетичного поліморфізму ранньої і пізньої фенологічних форм *Q. robur* використовували вегетативний матеріал (термінальні бруньки із фрагментами пагонів та листові пластинки), зібраний з 20 дерев кожної фенологічної форми у парку "Феофанія", розташованому на півдні правобережної частини м. Києва. Вік рослин становив 180–200 років.

Геномну ДНК екстрагували з вегетативного матеріалу ЦТАБ-методом (Green, Sambrook, 2012). Якість і кількість ДНК перевіряли за допомогою електрофорезу в 1,5%-му агарозному гелі й спектрофотометрії на біофотометрії "Eppendorf" з визначенням концентрації та ступеня забруднення ДНК. Зразки ДНК зберігали при мінус 20 °С. Для ТВР-аналізу використовували методику Breviario et al. (2007). Послідовності праймерів були такими: ТВР-F: 5'-AACTGGGCBAARGGNCAУТАУАС-3'; ТВР-R:

Таблиця 1. Послідовності праймерів та основні характеристики SSR-локусів
Table 1. Primer sequences and main characteristics of SSR-loci

Локус	Послідовність праймерів (5'-3')	Характер повторів	Температура відпалу (°C)	Джерело
quru -GA-1C08	F: TCCCAATCGATGTTTGATAAGG	(GA) ₂₉	60	(Aldrich et al., 2003)
	R: GGGCTCTTGAGAGGATGTAGG			
quru -GA-0C19	F: TTAGCTTTTACGCAGTGTCTG	(GA) ₁₈	60	(Aldrich et al., 2002)
	R: CGGCTTCGGTTTCGTC			
MSQ13	F: TGGCTGCACCTATGGCTCTTAG	(GA) _{14,11}	50	(Dow et al., 1995)
	R: ACACTCAGACCCACCATTTTCC			
QPZAG9	F: GCAATTACAGGCTAGGCTGG	(AG) ₁₂	50	(Steinkellner et al., 1997)
	R: GTCTGGACCTAGCCCTCATG			

5'-ACCATRCAYTCRTCDGCRTTYTC-3' (Breviario et al., 2007). Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили на ампліфікаторі Thermal Cycler 2720 ("Applied Biosystems", США). Реакційна суміш об'ємом 10 мкл містила 5-кратний ПЛР буфер із сульфатом амонію, 2,5 ммоль MgCl₂, 50 нг рослинної ДНК, 1 μM кожного з праймерів, 0,2 ммоль кожного-го dNTPs, 0,5 од. Taq полімерази ("Fermentas", Литва). Температурний протокол включав: початкову денатурацію при 94 °C тривалістю 3 хв, 35 циклів ампліфікації (денатурація при 94 °C, тривалість 30 с, відпал праймерів при 55 °C, 40 с, подовження до температури 72 °C, 1,5 хв), кінцеве подовження до 72 °C, 8 хв та 15 °C – утримання (Bardini et al., 2004).

Кожну ПЛР здійснювали як мінімум у 3-разовій повторності з використанням негативного контролю, щоб при подальшому електрофоретичному аналізі мати можливість виявити неспецифічні продукти ампліфікації, які розрізняються за однакових реакцій. Продукти ампліфікації (0,5 мкл) розділяли за допомогою електрофорезу в 6%-му неденатуруючому поліакриламідному гелі (ПААГ) в 1x TBE-буфері (Green, Sambrook, 2012; Pirko et al., 2016) протягом 5 год при 300 В. Фрагменти візуалізували шляхом фарбування нітратом срібла (Rahman et al., 2000; Venbouza et al., 2006). Після електрофорезу гель фотографували у видимому світлі, отримані зображення в подальшому аналізували.

Для SSR-аналізу застосовували локуси 1C08, 0C19, MSQ13, QPZAG9 (табл. 1). ПЛР-продукт SSR-локусів розділяли з використанням електрофорезу впродовж 2,5 год в неденатуруючому ПААГ, аналогічно ПЛР-продукту ТВР-маркерів. Забарвлення гелю здійснювали за допомогою нітрату срібла. При обробці електрофореграм алелі SSR-локусів записувалися як кодомінантні

маркери, при цьому назві алелю надавали оціночний розмір амплікону (п. н.).

Аналіз зображень електрофоретичних гелей як для результатів ТВР-методу, так і для SSR-локусів проводили з використанням програми GelAnalyzer (Gelanalyzer.com, <http://www.gelanalyzer.com/>).

Довжину відтворюваних і чітких фрагментів визначали за допомогою ДНК-маркера (O'Gene Ruler™ 100bp Plus DNA Ladder, ready-to-use; "Fermentas", Литва). ТВР-фрагменти записували в бінарному коді: наявність фрагменту – одиниця, відсутність – нуль.

Первинний аналіз отриманих даних методом головних координат проводили в GenAlEx (Peakall, Smouse, 2006), множинні порівняння – модифікованим χ²-методом з використанням програмного забезпечення GenRes (Demkovich, 2007).

Рівень поліморфізму ТВР-маркерів оцінювали, використовуючи показник PIC (Polymorphism Information Content), за формулою:

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

де n – загальна кількість фрагментів, що були оцінені, f_{ai} – частка випадків (рослин), в яких був відсутній i-й фрагмент, та f_{bi} – частка рослин, у яких цей фрагмент присутній (Hongtrakul et al., 1997; Breviario et al., 2007).

Результати та обговорення

Поліморфізм ядерних мікросателітних локусів у ранніх та пізніх фенологічних форм *Quercus robur*

Електрофореграми з ПЛР-продуктами мікросателітних локусів quru-GA-1C08, quru-GA-0C19, QPZAG9 наведено на рис. 1, 2 та 3, частоти

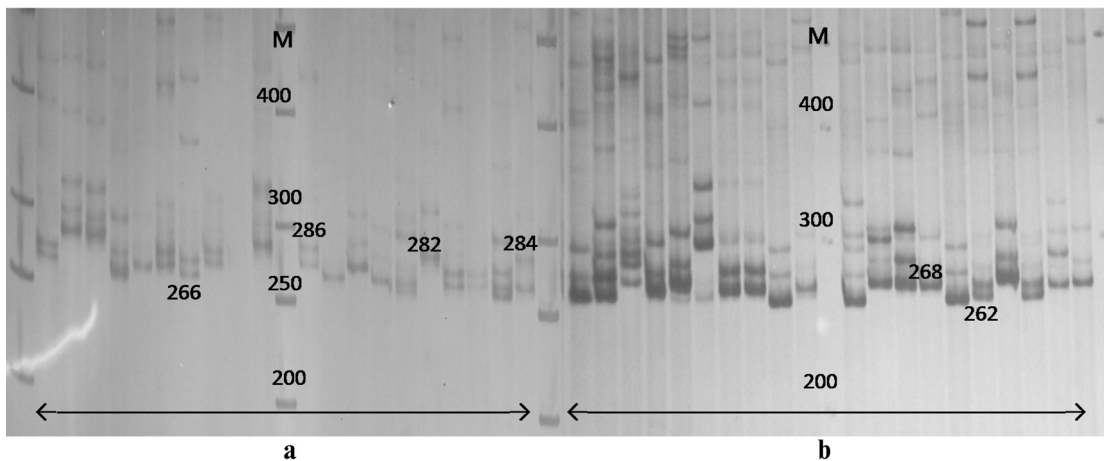


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ПЛР-локуса quru-GA-1C08 у досліджених дерев *Quercus robur*: *a* – рання форма; *b* – пізня форма; м – ДНК-маркер

Fig. 1. Electrophoregram of PCR-products of the quru-GA-1C08 locus in the investigated trees of *Quercus robur*: *a* – early form; *b* – late form; м – DNA marker

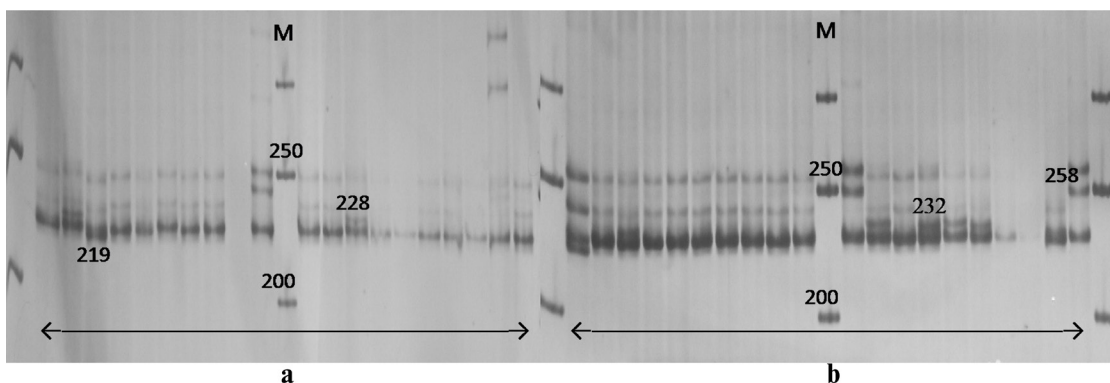


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ПЛР-локуса quru-GA-0C19 у досліджених дерев *Quercus robur*: *a* – рання форма; *b* – пізня форма; м – ДНК-маркер

Fig. 2. Electrophoregram of PCR-products of the locus quru-GA-0C19 in the investigated trees of *Quercus robur*: *a* – early form; *b* – late form; м – DNA marker

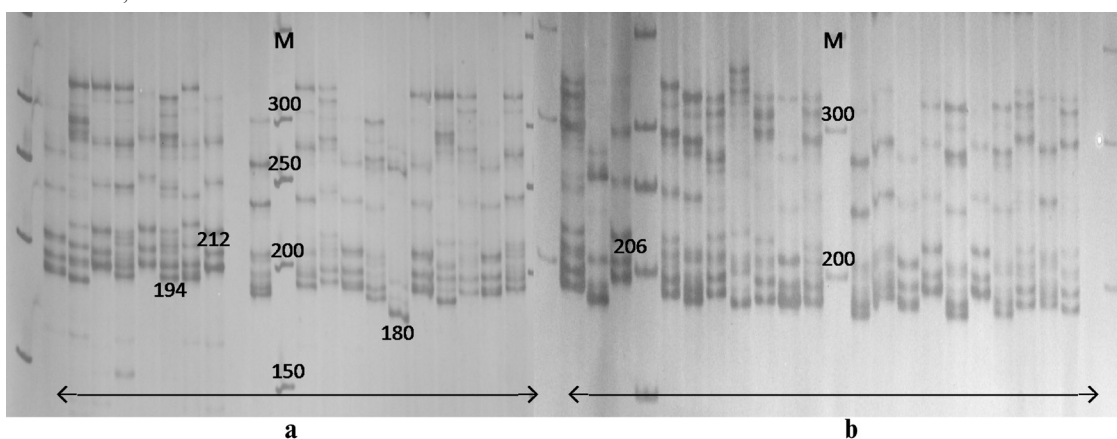


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ПЛР-локуса QPZAG9 у досліджених дерев *Quercus robur*: *a* – рання форма; *b* – пізня форма; м – ДНК-маркер

Fig. 3. Electrophoregram of PCR-product of QPZAG9 locus in investigated trees of *Quercus robur*: *a* – early form; *b* – late form; м – DNA marker

алелів – на рис. 4. Всього виявлено 30 алелів, 9 з яких були унікальними для ранньої форми (quru-GA-1C08: 266, 282, 284, 286; quru-GA-0C19: 219, 228; QPZAG9: 180, 194, 212), 5 – для пізньої форми (quru-GA-1C08: 262, 268; quru-GA-0C19: 323, 258; QPZAG9: 206).

За локусом quru-GA-1C08 виявлено 11 ампліконів із довжинами 260–286 п. н., за локусом quru-GA-0C19 – 6 алелів (розмах мінливості 219–258 п. н.). Локус QPZAG9 характеризувався наявністю 12 алелів розміром 180–211 п. н. Локус MSQ13 виявився мономорфним в обох проаналізованих групах рослин з одним алелем 211 п. н. відповідно. Раніше, при аналізі вибірок *Q. robur*, нами було виявлено невисокий алельний поліморфізм локусу MSQ13 з ідентичним предомінантним алелем 211 (неопубліковані дані). Для вибірки вікових дерев *Q. robur* зі Святогір'я (Донецька обл.) виявлено 4 алеля для локуса C19 та 9 алелів для C08 (Demkovych et al., 2014). При дослідженнях європейських деревостанів *Q. robur* кількість алелів, як правило, була вищою (Aldrich et al., 2003; Cottrell et al., 2003; Gugerli et al., 2008; Jensen et al., 2009; Ballian et al., 2010; Neophytou et al., 2010; Vranckx et al., 2014).

Відмінності між алельним складом вибірок ранніх та пізніх форм *Q. robur* значимі на рівнях $p \leq 0,01$ для локусу QPZAG9 та $p \leq 0,001$ для локусів quru-GA-1C08, quru-GA-0C19 (табл. 2, модифікований χ^2 -метод).

Оцінка значущості наявності/відсутності окремих алелів локусу QPZAG9 підтверджує таку на рівні $p < 0,05$ для окремих алелів. В одному випадку це алель 194, притаманний для ранньої форми, в інших трьох частота алелів 190, 192, 196 значно відрізняється (алелі 192, 196 більш представлені в пізньої фенологічної форми, алель 190 – у ранньої). За локусом quru-GA-1C08 диференціація між пізньою та ранньою фенологічними формами відбувається в алелів 260 та 280 на рівні $p < 0,05$ (більш представленими в пізньої форми), в алелів 266, 268, 286 (266 та 286 притаманні для ранньої форми) на рівнях $p < 0,001$ та $p < 0,01$ відповідно, проте алель 268 (для пізньої фенологічної форми) – на рівні значущості $p < 0,01$.

За локусом quru-GA-0C19 відмінності на рівні $p < 0,001$ між вибірками ранніх та пізніх дерев існують за двома предомінантними алелями (222 та 226) й обумовлені підвищеною частотою алеля 222 у вибірці ранніх дерев (біля 50%) та переважанням алеля 226 у вибірці пізньої фенологічної форми,

Таблиця 2. Відмінності між алельним складом рослин ранньої та пізньої форми *Quercus robur*

Table 2. Differences between allelic composition of samples for early and late forms of *Quercus robur*

Локус \ алель	Значення критерію χ^2 (ступені свободи)
quru-GA-1C08	43,204 (10) ***
260	4,789 (1) *
262	1,950 (1) n.s.
264	0,621 (1) n.s.
266	13,489 (1) ***
268	7,311 (1) **
270	1,347 (1) n.s.
274	2,959 (1) n.s.
280	4,680 (1) *
282	2,161 (1) n.s.
284	1,066 (1) n.s.
286	8,099 (1) **
quru-GA-0C19	22,803 (5) ***
219	2,161 (1) n.s.
222	14,803 (1) ***
226	13,438 (1) ***
228	2,161 (1) n.s.
232	0,962 (1) n.s.
258	1,950 (1) n.s.
QPZAG9	27,265 (11) **
180	2,161 (1) n.s.
184	0,621 (1) n.s.
186	0,190 (1) n.s.
188	1,617 (1) n.s.
190	4,967 (1) *
192	5,759 (1) *
194	4,438 (1) *
196	5,091 (1) *
200	0,402 (1) n.s.
206	0,962 (1) n.s.
208	2,095 (1) n.s.
212	2,161 (1) n.s.

Відмінності достовірні при: * – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; *** – $p \leq 0,001$; n.s. – відмінності недостовірні.

де його частота понад 80%. При цьому другий за частотою для ранньої форми алель 222 у вибірці пізніх дерев практично не представлений і складає менше 5%.

Основні оцінки поліморфізму вибірок ранніх та пізніх форм *Q. robur* за проаналізованими мікросателітними локусами наведені на рис. 5. Середня кількість алелів становила 6,25% та 5,25% на локус у ранньої та пізньої форм відповідно, при цьому невелику частку склали рідкісні алелі. Ефективна кількість алелів на локус була майже однаковою у співвідношенні алельного

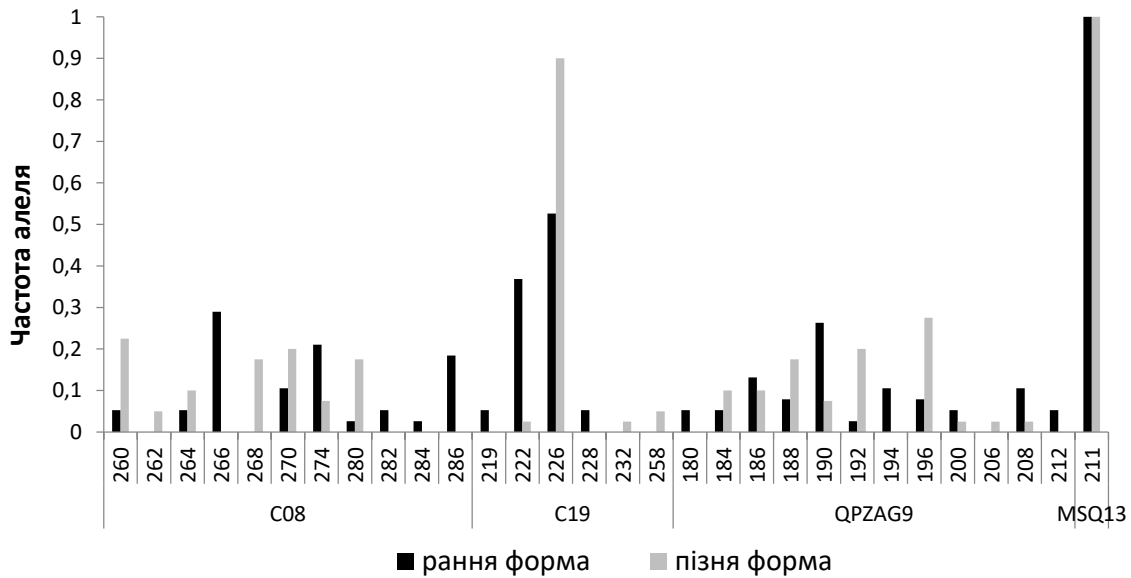


Рис. 4. Частоти алелів чотирьох мікросателітних локусів (C08, C19, QPZAG9, MSQ13) рослин ранньої та пізньої форм *Quercus robur*

Fig. 4. Allele's frequencies of four microsatellite loci (C08, C19, QPZAG9, MSQ13) of samples for early and late forms of *Quercus robur*

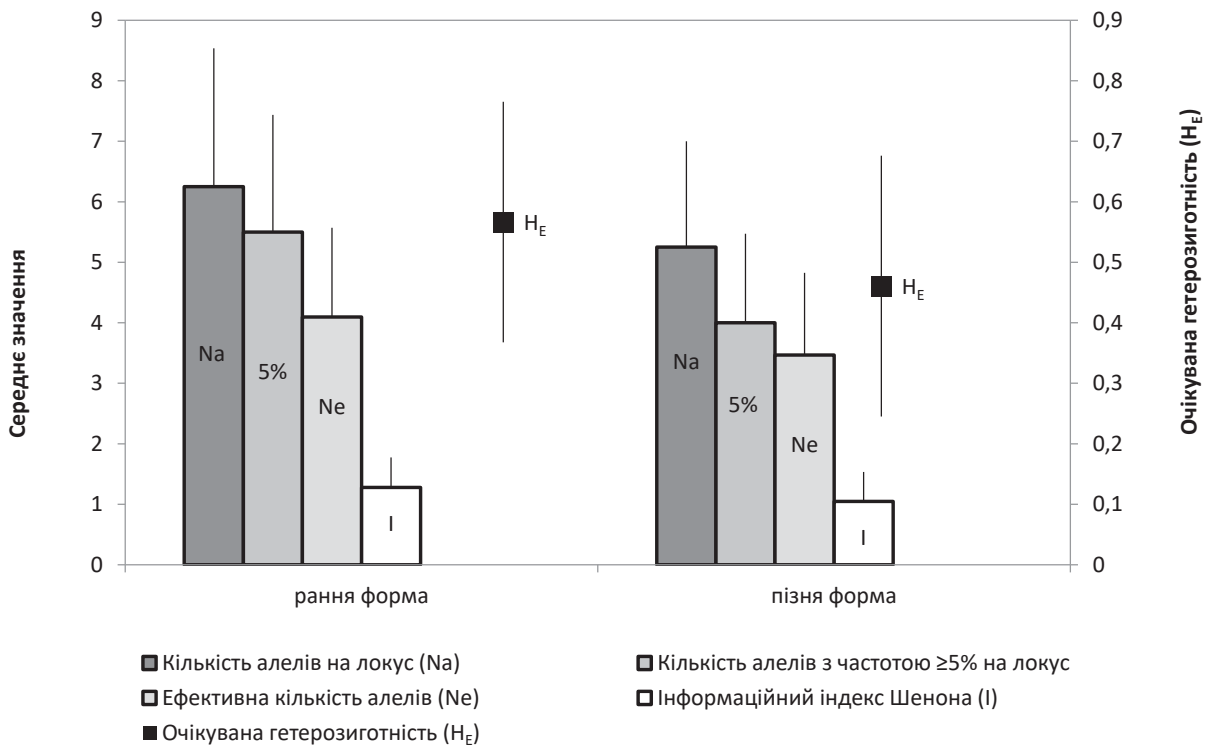


Рис. 5. Оцінка генетичного поліморфізму за мікросателітними локусами в рослин ранньої та пізньої форм *Quercus robur*

Fig. 5. Estimates of the genetic polymorphism by the microsatellite loci of the early and late forms of *Quercus robur*

різноманіття і складала близько 66% та 65% загальної кількості виявлених алелів у ранніх та пізніх фенологічних форм *Q. robur* відповідно (за абсолютними показниками ефективна кількість алелів на локус була більше на 0,6 од. у рослин ранньої фенологічної форми *Q. robur*).

У проаналізованих вибірок рослин встановлено невисокі показники генетичної мінливості ($H_E = 0,566 \pm 0,199$ у ранньої та $H_E = 0,461 \pm 0,216$ у пізньої фенологічних груп) порівняно з європейськими природними популяціями *Q. robur* ($0,821 \pm 0,002$ відповідно). Оцінки на-явної гетерозиготності вибірок ранніх та пізніх форм *Q. robur* за аналізованими локусами також сильно знижені ($H_O = 0,342 \pm 0,208$ та $0,288 \pm 0,136$) порівняно із $H_O = 0,798 \pm 0,010$ в європейських популяціях (Vranckx et al., 2014). Відповідно в досліджуваній популяції спостерігається значний дефіцит гетерозиготних генотипів (індекс фіксації Райта у ранньої фенологічної форми склав $0,462 \pm 0,247$, у пізньої – $0,259 \pm 0,179$). Хоча при аналізі 20 мікросателітних локусів у *Q. robur* в природних популяціях із Греції, Болгарії, Німеччини, Британії та Балканського п-ова також був встановлений значний рівень відхилення від рівноваги Харді-Вайнберга, проте середній коефіцієнт інбридингу склав $0,100$, варіюючи від $-0,100$ до $0,590$ (Cottrell et al., 2003; Neophytou et al., 2010; Vranckx et al., 2014). Відмітимо, що цей ефект може бути пов'язаний із властивостями використаних для аналізу мікросателітних локусів. Наприклад, для популяції *Quercus trojana* Webb аналогічного розміру при використанні шести мікросателітних локусів жоден, з яких не був мономорфним, отримано вищі оцінки різноманітності (середні H_O/H_E для популяцій складала $0,6/0,71$) (Sarabeo et al., 2017).

Виявлено пару алельних варіантів за локусом *qruG-GA-0C19*, за частотами яких існує значна різниця між ранніми та пізніми фенологічними формами *Q. robur*. Алель *qruG-GA-0C19-222* практично не представлений у пізньої форми *Q. robur*, натомість у цієї форми переважає *qruG-GA-0C19-226*. Аналогічно алель *qruG-GA-1C08-266* представлений виключно у ранньої фенологічної форми *Q. robur* і відсутній у пізньої. В подальшому наявність чи відсутність цих алелів можуть бути використані для діагностичних потреб (фінгерпринтингу).

Поліморфізм ТВР-фрагментів у ранніх та пізніх фенологічних форм *Quercus robur*

Електрофоретичний ТВР-аналіз 40 дерев *Q. robur* обох форм загалом виявив 46 фрагментів, зона розподілу яких знаходиться в діапазоні 298–1430 п. н. (рис. 6, 7).

З виявлених фрагментів унікальними для ранньої фенологічної форми *Q. robur* були чотири (з приблизними розмірами 310, 400, 405, 480 п. н.) і для пізньої форми – п'ять фрагментів (425, 440, 445, 515, 1330 п. н.). Рідкісних алелів з частотою менше 10% виявлено у ранньої форми – 13, у пізньої – 9. Найчастіше в обох форм трапляються фрагменти з приблизним розміром 850 п.н. (частота 100%) та 1170 п. н. (частота 70–75%).

При оцінці показників поліморфізму за ТВР-маркерами в досліджених форм *Q. robur* виявлено зниження кількості фрагментів у ранньої ($N_e = 1,218 \pm 0,040$) порівняно з пізньою формою ($N_e = 1,294 \pm 0,042$) (рис. 8). За індексом Шенона також спостерігаються відмінності між ранньою ($I = 0,253 \pm 0,029$) та пізньою ($I = 0,320 \pm 0,031$) фенологічними формами. Оскільки дані, отримані ТВР-методом, є бінарними, доцільним було використання показника вмісту поліморфної інформації (PIC) для оцінки генетичного різноманіття досліджених рослин. Значення PIC було більше в пізньої фенологічної форми *Q. robur* ($PIC = 0,274 \pm 0,025$), ніж у ранньої ($PIC = 0,209 \pm 0,022$). Для будь-якого біалельного маркера максимальна оцінка PIC становить 0,5 (Hongtrakul et al., 1997). В цілому, дерева досліджених фенологічних форм *Q. robur* мають відмінності за ТВР-профілями. Фрагменти, представлені тільки в одній з форм, можна використовувати для генетичного маркування.

Подальший аналіз молекулярної варіанси (AMOVA) виявив незначні відмінності досліджених фенологічних форм *Q. robur*. Так, у складі загальної генетичної гетерогенності виду за ТВР-маркерами 91% генетичного різноманіття *Q. robur* припадає на внутрішньовибірковий поліморфізм, 9% – на міжвибірковий. В аналогічному дослідженні природних популяцій *Quercus acutissima* Carruth. мінливість, пов'язана з популяційною структурою, була в 7 разів нижча за міжіндивідуальну мінливість, що, вірогідно, пов'язано із переважаючим ауткросингом у дубових деревостанах (Chung et al., 2002).

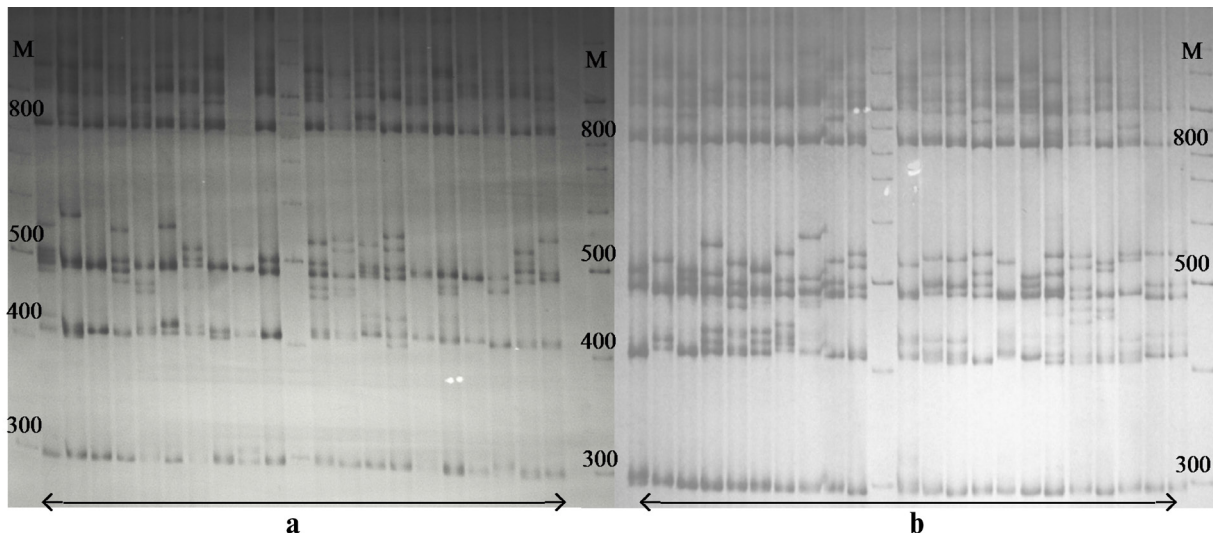


Рис. 6. Електрофореграма з ампліконами інтронів генів β -тубуліну в досліджених дерев *Quercus robur*: *a* – рання форма; *b* – пізня форма; м – ДНК-маркер

Fig. 6. Electrophoregram with amplicons of introns of β -tubulin genes in investigated trees of *Quercus robur*: *a* – early form; *b* – late form; м – DNA-marker

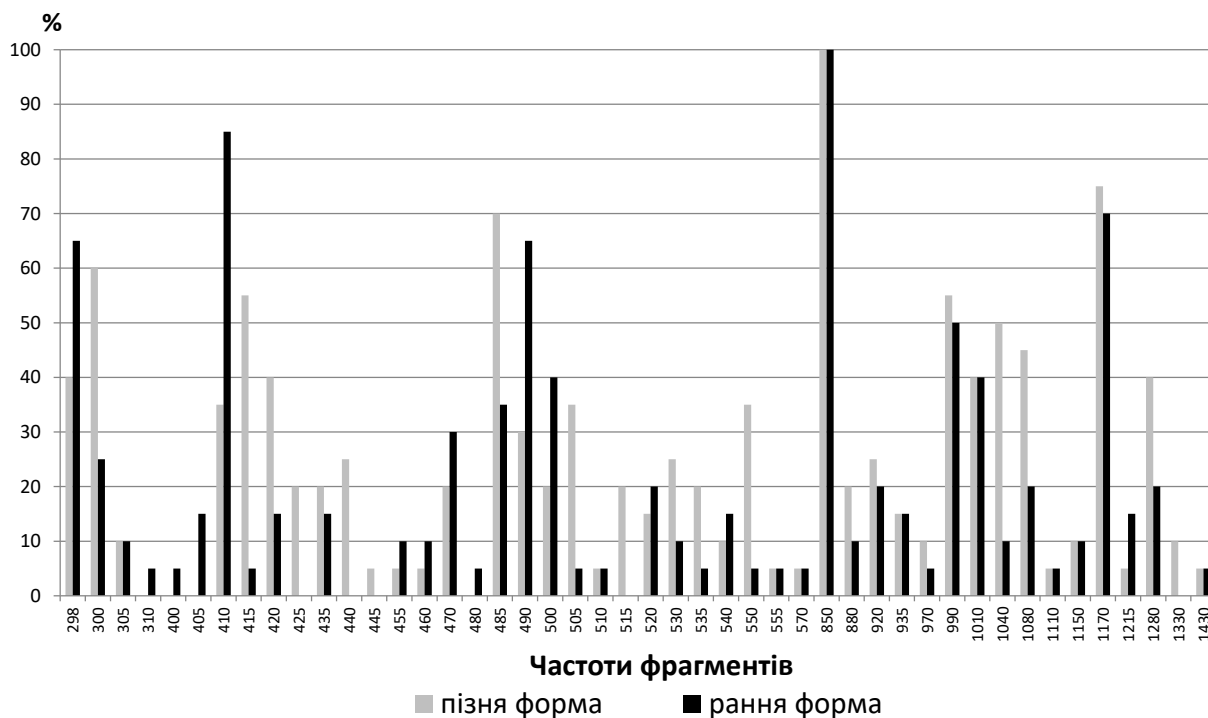


Рис. 7. Частота алелів ТВР-маркерів у рослин *Quercus robur* ранньої та пізньої форм

Fig. 7. Allele's frequencies of TBP-markers in early and late forms of *Quercus robur*

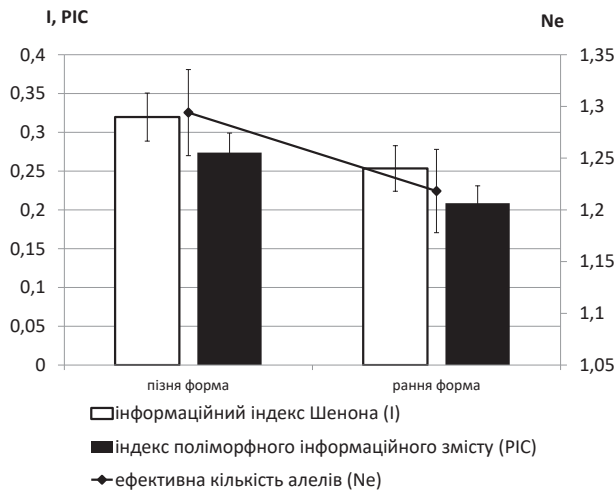


Рис. 8. Основні показники алельного різноманіття в рослин *Quercus robur* ранньої та пізньої форм за ТВР-маркерами

Fig. 8. Basic indices of allelic diversity in *Quercus robur* plants of early and late forms for the TBP markers

Розташування представників вибірок у просторі головних координат на основі генетичних дистанцій, отриманих для алелів, показує значну диференціацію досліджених форм *Q. robur*

(рис. 9), однак повного розділення на дві групи не відбувається. Зразки пізньої фенологічної форми (1, 8, 12, 16, 18, 19) більш подібні до ранніх. Можливо, це дерева "перехідної" форми.

Висновки

У результаті проведеної роботи з'ясовано генетичні відмінності між ранньою та пізньою фенологічними формами *Quercus robur*. У дерев ранньої форми виявлено 9 унікальних алелів за мікросателітними локусами та 4 фрагменти за ТВР-маркерами, а у пізньої форми – 5 унікальних алелів за мікросателітними локусами та 5 фрагментів за ТВР-маркерами. Виявлено відмінності за частотою предомінантних алелів *qugu-GA-0C19-222* (практично відсутній у вибірці пізньої фенологічної форми) та *qugu-GA-0C19-226* (частота понад 80% у ранньої фенологічної форми і лише близько 50% – у пізньої). Виявлений поліморфізм фенологічних форм *Q. robur* вказує на те, що відмінності можуть бути генетично обумовлені, а різні види ДНК-маркерів використані для генетичного профілювання та паспортизації *Q. robur*.

Principal Coordinates (PCoA)

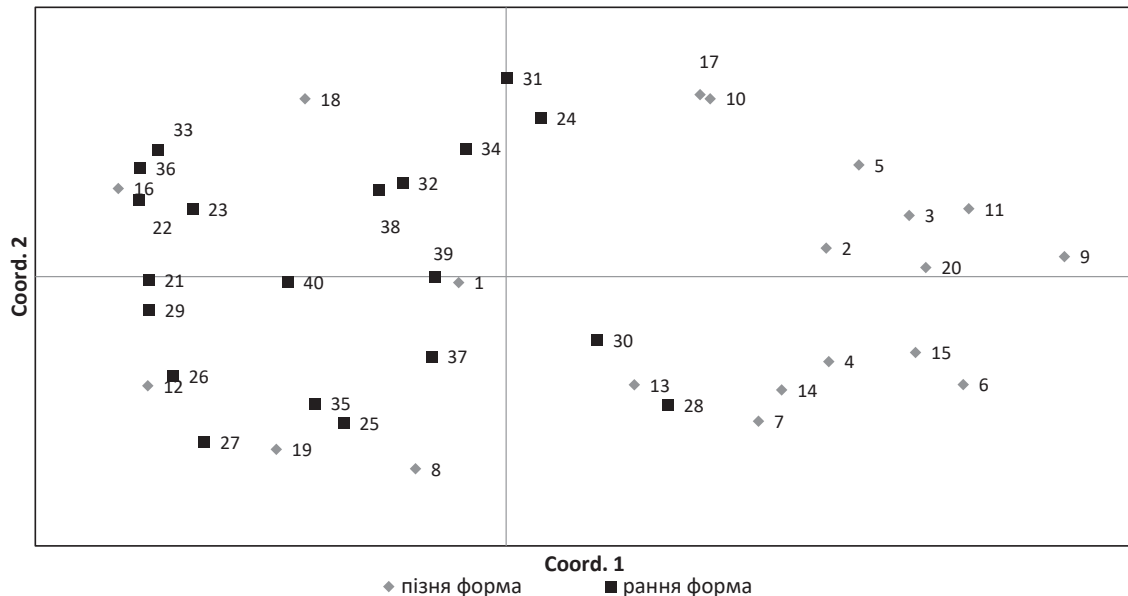


Рис. 9. Ординація рослин *Quercus robur* пізньої (1–20) та ранньої (21–40) форм у просторі перших двох головних координат

Fig. 9. Ordination of *Quercus robur* individuals samples for late (1–20) and early (21–40) forms in the space of the first two main coordinates

Подяка

Автори висловлюють щирю подяку аспіранту Ю.С. Прокопук (ДУ "Інститут еволюційної екології НАН України") за допомогу при зборі матеріалу.

СПИСОК ПОСИЛАНЬ

- Aldrich P.R., Michler C.H., Sun W., Romero-Severson J. Microsatellite markers for northern red oak (*Fagaceae: Quercus rubra*). *Mol. Ecol. Notes*, 2002, 2(4): 472–474. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8278.2002.OM82x>
- Aldrich P.R., Parker G.R., Michler C.H., Romero-Severson J. Whole-tree silvic identifications and the microsatellite genetic structure of a red oak species complex in an Indiana old-growth forest. *Can. J. Forest Res.*, 2003, 33(11): 2228–2237. <https://doi.org/10.1139/X03-160>
- Ballian D., Belletti P., Ferrazzini D., Bogunik F., Kajba D. Genetic variability of Pedunculate oak (*Quercus robur* L.) in Bosnia and Herzegovina. *Periodicum Biologorum*, 2010, 112(3): 353–362.
- Bardini M., Lee D., Donini P., Mariani A., Gianì S., Toschi M., Lowe C., Breviaro D. Tubulin-based polymorphism (ТВР): a new tool, based on functionally relevant sequences, to assess genetic diversity in plant species. *Genome*, 2004, 47(2): 281–291. <https://doi.org/10.1139/g03-132>
- Barna M.M., Barna L.S., Karpljuk N.A. *Naukovi zapysky Ternopil National Pedagog. Univ. Ser. Biology*, 2017, 4(71): 8–23. [Барна М.М., Барна Л.С., Карплюк Н.А. Біологія цвітіння ранньої (var. *praecox* Czern.) і пізньої (var. *tardiflora* Czern.) форм дуба звичайного (*Quercus robur* L.) в умовах західного Поділля. *Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біол.* 2017, 4(71): 8–23].
- Batos V., Miljkovic D., Ninic-Todorovic J. Length of vegetation period as parameter of common oak (*Quercus robur* L.) phenological variability. *Genetika*, 2012, 44(1): 139–152. <https://doi.org/10.2298/GENSR 1201139B>
- Benbouza H., Jacquemin J.-M., Baudoin J.-P., Mergeai G. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 2006, 10(2): 77–81.
- Breviaro D., Baird W.V., Sangoi S., Hilu K., Blumetti P., Gianì S. High polymorphism and resolution in targeted fingerprinting with combined β -tubulin introns. *Molecular Breeding*, 2007, 20(3): 249–259. <https://doi.org/10.1007/s11032-007-9087-9>
- Carabeo M., Cosimo M., Marcello S., Chiara Ch., F. Mattia. Estimating the genetic diversity and structure of *Quercus trojana* Webb populations in Italy by SSRs: implications for management and conservation. *Can. J. Forest Res.*, 2017, 47: 331–339. <https://doi.org/10.1139/cjfr-2016-0311>
- Chernyaev V.M. *O lesah Ukrainy*. Moscow: Univ. tip., 1858, 54 pp. [Черняев В.М. *О лесах Украины*. М.: Унив. тип., 1858, 54 с.]
- Chokheli V., Kozlovsky B., Sereda M., Lysenko V., Fesenko I., Varduny T., Kapralova O., Bondarenko E. Preliminary comparative analysis of phenological variations of *Quercus robur* by ISSR-Markers. *J. Botany*, 2016: 1–7. <https://doi.org/10.1155/2016/7910451>
- Chung M.Y., Nason J., Chung M.G., Kim K.-J., Park C.-W., Sun B.-Y., Pak J.-H. Landscape-level spatial genetic structure in *Quercus acutissima* (*Fagaceae*). *Amer. J. Bot.*, 2002, 89(8): 1229–1236. <https://doi.org/10.3732/ajb.89.8.1229>
- Cottrell J.E., Munro R.C., Tabbener H.E., Milner A.D., Forrest G.I., Lowe A.J. Comparison of fine-scale genetic structure using nuclear microsatellites within two British oak woods differing in population history. *Forest Ecol. Management*, 2003, 176(1–3): 287–303. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(02\)00289-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(02)00289-X)
- Coutinho J.P., Carvalho A., Lima-Brito J. Taxonomic and ecological discrimination of *Fagaceae* species based on internal transcribed spacer polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *AoB Plants*, 2015, 7(1): 60–79. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plu079>
- Dantec C.F., Ducasse H., Capdevielle X., Fabreguettes O., Delzon S., Desprez-Loustau M. Escape of spring frost and disease through phenological variations in oak populations along elevation gradients. *J. Ecol.*, 2015, 103(4): 1044–1056. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12403>
- Demkovich A.Ye. *Promyshlennaya botanika (Industrial botany)*, 2007, 7: 33–36 [Демкович А.Е. Программа "GenRes" для анализа данных популяционно-генетических исследований хвойных. *Промыш. ботаника*, 2007, 7: 33–36].
- Demkovych A.Ye., Korshikov I.I., Makogon I.V. *Factors in experimental evolution of organisms*, 2014, 14: 17–21. [Демкович А.Е., Коршиков И.И., Макогон И.В. Полиморфизм дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) на донецком кряже по микросателлитным локусам. *Фактори експерим. еволюції організмів*, 2014, 14: 17–21].
- Dow B.D., Ashley M.V., Howe H.F. Characterization of highly variable (GA/CT) n microsatellites in the bur oak, *Quercus macrocarpa*. *Theor. Appl. Genetics*, 1995, 91(1): 137–141. <https://doi.org/10.1007/BF00220870>
- Gelanalyzer.com [Electronic resource]. Available at: <http://www.gelanalyzer.com/>
- Green M. R., Sambrook J. *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor (New York): Cold Spring Harbor Lab. Press, 2012, 1890 pp.
- Gugerli F., Brodbeck S., Holderegger R. Utility of multilocus genotypes for taxon assignment in stands of closely related European white oaks from Switzerland. *Annals of botany*, 2008, 102(5): 855–863. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn164>
- 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, 95(3): 400–407. <https://doi.org/10.1007/s001220050576>
- Jensen J., Larsen A., Nielsen L.R., Cottrell J. Hybridization between *Quercus robur* and *Q. petraea* in a mixed oak stand in Denmark. *Ann. Forest Sci.*, 2009, 66(7): 706. <https://doi.org/10.1051/forest/2009058>

- Khlestkina E.K. Molecular markers in genetic studies and breeding. *Russ. J. Genet. Appl. Res.*, 2014, 4(3): 236–244. <https://doi.org/10.1134/S2079059714030022>
- Matiashuk R.K., Nebesnyi V.B., Konyakin S.M., Tkachenko I.V., Prokopuk Yu.S. *Naukovi dopovidi NUBIP Ukraine*, 2014, 6: 40–48. [Матяшук Р. К., Небесний В.Б., Конякін С.М., Ткаченко І.В., Прокопук Ю.С. Вікові дуби «Феофанії» – пам'ятки живої природи краю. *Наук. доп. НУБіП України*, 2014, 6: 40–48].
- Milenin A.I. *Ecological features phenological varieties of English oak (Quercus robur L.) under the CCA*: Cand. Sci. Diss. Abstract. Voronezh, 1997, 24 pp. [Миленин А.И. *Экологические особенности фенологических разновидностей дуба черешчатого (Quercus robur L.) в условиях ЦЧР*: автореф. дис. ... к. с.-х. н. Воронеж, 1997, 24 с.].
- Molchanov A.G. In: *Structural and functional deviations from normal growth and development of plants: mat. distance conf. Karelian Research Centre*. Petrozavodsk, 2011, pp. 204–208. [Молчанов А.Г. Интенсивность фотосинтеза рано- и позднораспускающихся форм дуба черешчатого в условиях недостаточного увлажнения. В кн.: *Структурные и функциональные отклонения от нормального роста и развития растений*: мат. дистанц. конф. Карел. науч. центра. Петрозаводск, 2011, pp. 204–208].
- Molchanov A.G. *Lesovedenie*, 2012, 4: 31–38. [Молчанов А.Г. Интенсивность фотосинтеза фенологических форм дуба черешчатого в условиях недостаточного увлажнения. *Лесоведение*. 2012, 4: 31–38].
- 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, 259(10): 2026–2035. <https://doi.org/10.1016/J.FORECO.2010.02.013>
- Netsvetov M.V., Prokopuk Yu.S. *Ukr. Bot. J.*, 2016, 73(2): 126–133. [Нецветов М.В., Прокопук Ю.С. Вік і радіальний приріст старовікових дерев *Quercus robur* парку "Феофанія". *Укр. бот. журн.*, 2016, 73(2): 126–133]. <https://doi.org/10.15407/ukrbotj73.02.126>
- Peakall R., Smouse P. GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes*, 2006, 6: 288–295. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
- Pérez-de-Lis G., Olano J.M., Rozas V. et al. Environmental conditions and vascular cambium regulate carbon allocation to xylem growth in deciduous oaks. *Funct. Ecol.*, 2017, 31 (3): 592–603. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12789>
- Pirko N.N., Demkovych A.Ye., Kalafat L.O., Privalikhin S.N., Rabokon A.N., Pirko Ya.V., Blume Ya.B. Intron length polymorphism of β -tubulin genes in different representatives of *Pinaceae* Lindl. family. *J. Bot.*, 2016, VIII, 2(13): 5–9.
- Puchałka R., Koprowski M., Gričar J., Przybylak R. Does tree-ring formation follow leaf phenology in Pedunculate oak (*Quercus robur* L.)? *Eur. J. Forest Res.*, 2017, 136: 259–268. <https://doi.org/10.1007/s10342-017-1026-7>
- Rahman M. H., Jaquish B., Khasa P. D. Optimization of PCR protocol in microsatellite analysis with silver and SYBR® stains. *Plant Mol. Biol. Reporter*, 2000, 18(4): 339–348. <https://doi.org/10.1007/BF02825061>
- Rubtsov V.V., Zhirenko N.G., Utkina I.A. *Lesovedenie*, 2007, 5: 44–55. [Рубцов В.В., Жиренко Н.Г. Уткина И.А. Интенсивность тока пасоки у разных фенологических форм дуба в южной лесостепи. *Лесоведение*, 2007, 5: 44–55].
- Silchenko I.I. *Vestnik Bryansk. gos. un-ta (Herald Bryansk State University)*, 2012, 4: 158–161. [Сильченко И.И. Фенологические формы дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) в различных типах ландшафтов Брянской области. *Вестн. Брянск. гос. ун-та*, 2012, 4: 158–161].
- Singh P., Mehta N., Sao A. Genetic purity assessment in linseed (*Linum usitatissimum* L.) varieties using microsatellite markers. *Bioscan*, 2015, 10(4): 2031–2036.
- Slepukh O.O. *Biologichni systemy (Biological systems)*, 2016, 8(2): 272–279. [Слепих О.О. Ритм розвитку і розповсюдження фенологічних форм дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) у Донецькій області. *Біол. системи*, 2016, 8(2): 272–279].
- Steinkellner H., Fluch S., Turetschek E., Lexer C., Streiff R., Kremer A., Burg K., Glossl J. Identification and characterization of (GA/CT) n-microsatellite loci from *Quercus petraea*. *Plant Mol. Biol.*, 1997, 33(6): 1093–1096. <https://doi.org/10.1023/A:1005736722794>
- Utkina I.A., Rubtsov V.V. Studies of phenological forms of pedunculate oak. *Contemporary Problems of Ecology*, 2017, 10(7): 804–811. <https://doi.org/10.1134/S1995425517070101>
- Vranckx G., Jacquemyn H., Mergeay J., Cox K., Kint V., Muys B., Honnay O. Transmission of genetic variation from the adult generation to naturally established seedling cohorts in small forest stands of pedunculate oak (*Quercus robur* L.). *Forest Ecol. Management*, 2014, 312: 19–27. <https://doi.org/10.1016/J.FORECO.2013.10.027>
- Xia X., Luan L.L., Qin G., Yu L.F., Wang Zh.W., Dong W.C., Song Y., Qiao Y., Zhang X.S., Sang Y.L., Yang L. Genome-wide analysis of SSR and ILP markers in trees: diversity profiling, alternate distribution, and applications in duplication. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 17902. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17203-6>

Рекомендує до друку
О.К. Золотарьова

Надійшла 04.09.2018

Пірко Я.В.¹, Нецветов М.В.², Калафат Л.О.¹,
Пірко Н.М.¹, Рабоконь А.М.¹, Привалихін С.М.¹,
Демкович А.Є.¹, Білоножко Ю.О.¹, Блюм Я.Б.¹
Генетичні особливості фенологічних форм *Quercus robur*
(*Fagaceae*) за даними аналізу поліморфізму інтронів генів
 β -тубуліну та мікросателітних локусів. Укр. бот. журн.,
2018, 75(5): 489–500.

¹ДУ "Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України"

вул. Осиповського, 2а, Київ 04123, Україна

²ДУ "Інститут еволюційної екології НАН України"

вул. Академіка Лебедева, 37, Київ 03143, Україна

Досліджено ранню та пізню фенологічні форми *Quercus robur* (*Fagaceae*) за допомогою мікросателітних маркерів та ДНК-маркерної системи, що базується на вивченні поліморфізму інтронів генів β -тубуліну (ТВР-маркери). У проаналізованих 40 рослин двох вибірок за мікросателітними локусами встановлено порівняно невисокі показники генетичної мінливості ($H_o = 0,342 \pm 0,208$, $H_e = 0,566 \pm 0,199$ у ранньої та $H_o = 0,288 \pm 0,136$, $H_e = 0,461 \pm 0,216$ у пізньої фенологічних груп). З'ясовано генетичні відмінності між ранньою та пізньою формами *Q. robur*. У дерев ранньої форми виявлено 9 унікальних алелів за мікросателітними локусами та 4 фрагменти за ТВР-локусами, у пізньої форми – по 5 унікальних алелів за мікросателітними та ТВР-локусами. Зокрема виявлено відмінності за частотою преобладаючих алелів *qru-GA-0C19-222* (практично відсутній у вибірці пізньої фенологічної форми) та *qru-GA-0C19-226* (частота понад 80% у ранньої фенологічної форми і лише близько 50% у пізньої). За оцінкою показників поліморфізму за ТВР-маркерами в досліджених форм *Q. robur* виявлено нижчу кількість фрагментів у ранньої ($N_e = 1,218 \pm 0,040$) порівняно з пізньою фенологічною формою *Q. robur* ($N_e = 1,294 \pm 0,042$). Значення PIC (вміст поліморфної інформації) за цим видом маркерів було більше у пізньої фенологічної форми *Q. robur* ($PIC = 0,274 \pm 0,025$), ніж у ранньої ($PIC = 0,209 \pm 0,022$). Також за інформаційним індексом Шеннона спостерігаються відмінності між ранньою ($I = 0,253 \pm 0,029$) та пізньою ($I = 0,320 \pm 0,031$) фенологічними формами *Q. robur*. Аналіз молекулярної варіанси за ТВР-маркерами (AMOVA) виявив незначні відмінності досліджених фенологічних форм *Q. robur*. Так, у складі загальної генетичної гетерогенності виду 91% генетичного різноманіття *Q. robur* припадає на внутрішньовибірковий поліморфізм, 9% – на міжвибірковий. Загалом, проведений аналіз засвідчив, що фенологічні особливості *Q. robur* не завжди можна вважати наслідком звичайної мінливості, пов'язаної з екологічними особливостями зростання *Q. robur*. Виявлений поліморфізм фенологічних форм вказує на те, що відмінності можуть бути генетично обумовлені, а різні види ДНК-маркерів використані для генетичного профілювання та паспортизації фенологічних форм *Q. robur*.

Ключові слова: *Quercus robur*, ТВР-маркери, мікросателіти, генетична мінливість, фенологічні форми

Пірко Я.В.¹, Нецветов М.В.², Калафат Л.А.¹,
Пірко Н.Н.¹, Рабоконь А.Н.¹, Привалихин С.Н.¹,
Демкович А.Е.¹, Белоножки Ю.А.¹, Блюм Я.Б.¹
Генетические особенности фенологических форм *Quercus robur*
(*Fagaceae*) по результатам анализа полиморфизма
интронов генов β -тубулина и микросателлитным локусам.
Укр. бот. журн., 2018, 75(5): 489–500.

¹ГУ "Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины"

ул. Осиповского, 2а, Киев 04123, Украина

²ГУ "Институт эволюционной экологии НАН Украины"

ул. Академика Лебедева, 37, Киев 03143, Украина

Исследованы ранняя и поздняя фенологические формы *Quercus robur* (*Fagaceae*) с помощью микросателлитных маркеров и ДНК-маркерной системы, основанной на изучении полиморфизма интронов генов β -тубулина (ТВР-маркеры). Среди проанализированных 40 растений двух выборок по микросателлитным локусам установлены сравнительно невысокие показатели генетической изменчивости ($H_o = 0,342 \pm 0,208$, $H_e = 0,566 \pm 0,199$ у ранней и $H_o = 0,288 \pm 0,136$, $H_e = 0,461 \pm 0,216$ у поздней фенологических групп). Обнаружены генетические различия между ранней и поздней формами *Q. robur*. У деревьев ранней формы выявлено 9 уникальных аллелей по микросателлитным локусам и 4 фрагмента по ТВР-локусам, у деревьев поздней формы – по 5 уникальных аллелей по микросателлитным и ТВР-локусам. В частности выявлены различия по частоте преобладающих аллелей *qru-GA-0C19-222* (практически отсутствуют в выборке поздней фенологической формы) и *qru-GA-0C19-226* (частота более 80% у ранней фенологической формы и только около 50% у поздней). Оценка показателей полиморфизма по ТВР-маркерам, проведенная для исследованных форм *Q. robur*, выявила снижение количества фрагментов у ранней ($N_e = 1,218 \pm 0,040$) по сравнению с поздней фенологической формой *Q. robur* ($N_e = 1,294 \pm 0,042$). Значение PIC (содержание полиморфной информации) по этому виду маркеров было больше у поздней фенологической формы *Q. robur* ($PIC = 0,274 \pm 0,025$), чем у ранней формы ($PIC = 0,209 \pm 0,022$). Также согласно значениям информационного индекса Шеннона наблюдаются различия между ранней ($I = 0,253 \pm 0,029$) и поздней ($I = 0,320 \pm 0,031$) фенологическими формами *Q. robur*. В результате анализа молекулярной варiances по ТВР-маркерам (AMOVA) обнаружены незначительные различия исследованных фенологических форм *Q. robur*. Так, в составе общей генетической гетерогенности вида 91% генетического разнообразия *Q. robur* приходится на внутривыборочный полиморфизм, 9% – на межвыборочный. В целом, согласно анализу, фенологические особенности ранней и поздней форм не всегда можно считать следствием обычной изменчивости, связанной с экологическими особенностями мест произрастания *Q. robur*. Выявленный генетический полиморфизм фенологических форм указывает на то, что различия могут быть генетически обусловленными, а различные виды ДНК-маркеров использованы для генетического профилирования и паспортизации фенологических форм *Q. robur*.

Ключевые слова: *Quercus robur*, ТВР-маркеры, микросателлиты, генетическая изменчивость, фенологические формы