
ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РАСТЕНИЙ В АНТРОПОГЕННО ТРАНСФОРМИРОВАННОЙ СРЕДЕ

УДК 575.174.015.3:582.736(477.62)

А.Е. Демкович

ПОЛИМОРФИЗМ ISSR ЛОКУСОВ ВИДОВ РОДА *ASTRAGALUS* L. ФЛОРЫ ЮГО-ВОСТОКА УКРАИНЫ

Astragalus L., ISSR, полиморфизм

Введение

К роду *Astragalus* L. относят более 2500 видов, которые распределяются между 9 подродами [6]. Его современный ареал занимает все Северное полушарие. Подавляющее большинство равнинных видов являются представителями флоры полупустынь и степей, в состав лесной флоры входит лишь несколько видов [4, 8]. В Украине произрастает 51 вид рода [2]. Для оценки популяционной структуры и разнообразия, эволютической значимости и филогенетических связей редких и исчезающих видов растений желательнее использовать современные молекулярно-генетические методы. Подобные исследования успешно проводятся для видов рода *Astragalus* флор европейских и азиатских стран [3–5, 8, 9]. Виды рода флоры Украины до настоящего времени не изучались.

С целью внедрения современных молекулярно-генетических методов в сохранение биоразнообразия была впервые проведена оценка полиморфизма ISSR локусов четырех украинских видов рода *Astragalus*.

Объекты и методы исследований

Для молекулярно-генетических исследований использовали материал, собранный в природных биотопах и собираемый в гербарии Донецкого ботанического сада НАН Украины (DNZ). Проанализирован генетический полиморфизм четырех видов рода *Astragalus* с разным уровнем региональной редкости: находящегося под угрозой исчезновения – *Astragalus novoascanicus* Klokov (Донецкая обл., Старобешевский район, район между с. Стыла и г. Докучаевск, 10.05.2012, L.; D.: Бойко А.В., Муленкова Е.Г.); редкого – *A. pubiflorus* DC. (Донецкая обл., Старобешевский район, пгт Старобешево, урочище Зор-Тау, 10.05.2012, L.; D.: Бойко А.В., Муленкова Е.Г.); типичных степных видов – *A. austriacus* Jacq. (Донецкая обл., Старобешевский район, трасса между с. Стыла и г. Докучаевск, 10.05.2012, L.; D.: Бойко А.В., Муленкова Е.Г.) и *A. ucrainicus* M. Pop. & Klokov (Донецкая обл., Старобешевский район, правый берег р. Сухая Волноваха, в окрестностях с. Стыла, 10.05.2012, L.; D.: Бойко А.В., Муленкова Е.Г.). Исследовали по 7–8 особей каждого вида.

Отбор, хранение растительного материала, выделение ДНК выполнялось по предварительно отработанным методикам [7]. Представители каждой выборки анализировались с применением праймеров (в скобках – последовательности) к ISSR локусам: UBC-808 ((AG)8C), UBC-811 ((GA)8C), UBC-817 ((GA)8A), UBC-818

((CA)₈G), UBC-823 ((TC)₈C), UBC-825 ((AC)₈T), UBC-830 ((TG)₈G), которые использовались для анализа других видов рода *Astragalus* [4, 9]. Далее локусы приведены только по номерам. Амплификация ISSR локусов проводилась при следующих условиях: первоначальная денатурация – 1 мин при 94° С, далее 35 циклов: 45 с при 94° С, 30 с при 52° С и 125 с при 72° С [3]. Электрофорез ампликонов проводили в 1,2% агарозном геле (буфер TBEх0,5) с последующей окраской бромистым этидием [7]. Обработка данных электрофоретического анализа проведена на основе «GelAnalyser 2010a» [7]. ISSR ампликоны, которые были сгенерированы по каждому праймеру, оценивались как локусы, определялось их наличие (1) или отсутствие (0), т.е. использовались бинарные данные. Соответственно, каждая уникальная полоса считалась отдельным бинарным локусом. Для анализа использовались только интенсивно окрашенные, четкие полосы (рис.).

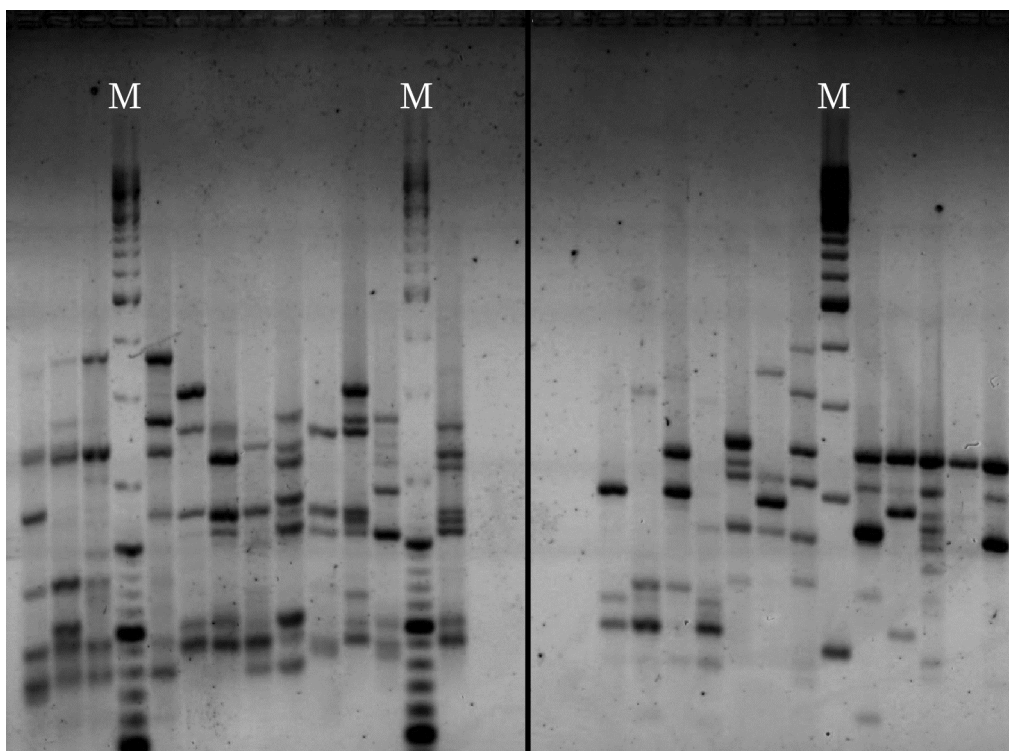


Рис. Ампликоны по локусам UBC-808 (левая сторона изображения), UBC-811 (правая сторона изображения). Агарозный гель окрашен бромистым этидием (красный канал, негатив). М – маркеры молекулярного веса.

Fig. Amplicones of loci UBC-808 (left side of image), UBC-811 (right side of image). Agarose gel electrophoresis, EtBr staining (negative of red channel). M – molecular weight markers.

Результаты исследований и их обсуждение

По семи праймерам, используемым для проведения ISSR ПЦР, для всех проанализированных образцов были получены данные о 776 полосах, среди которых был выявлен 451 уникальный локус. Размер ампликонов варьировал от 170 до 1394 пар нуклеотидов. С учетом локусов, которые встречались только 1 раз, среднее количество локусов составило 64,4 на праймер (табл.), а без учета таких уникальных локусов –

25,8 на праймер или 181 бинарный локус (на основе этих данных были проведены дальнейшие расчеты).

При анализе видового комплекса *A. rhizanthus* Benth. по ISSR локусам, количество полос, определенных К.К. Anand et al., составило 17–25 [5] (см. табл.). Для оцениваемых нами видов количество полос с встречаемостью 2 по праймерам 808, 825 было близким к таковой у *A. rhizanthus*, а по локусам 811, 817, 818, 823, 830 близкой к оценкам *A. rhizanthus* было кумулятивное количество полос с встречаемостью 2–5.

Таблица. Аллельное разнообразие семи ISSR локусов *Astragalus rhizanthus* Benth. [5] и четырех видов *Astragalus* L. флоры юго-востока Украины

Встречаемость полос	Праймер						
	808	811	817	818	823	825	830
	количество полос с определенной встречаемостью						
<i>A. rhizanthus</i>	22	23	25	18	17	19	23
1	47	43	41	51	23	42	23
2	25	12	8	11	12	20	9
3	12	5	9	10	5	9	5
4	0	2	2	1	2	2	2
5	4	2	1	3	0	1	3
7	1	0	1	0	0	0	0
9	1	0	0	0	0	0	0
10	0	0	1	0	0	0	0

Примечание: жирным выделены данные, приведенные для *A. rhizanthus*; зачеркнуты – данные, для полос с встречаемостью 1, которые в анализе не использовались.

Количество аллелей на локус варьировало от $0,63 \pm 0,07$ у *A. novoascanicus* до $0,81 \pm 0,07$ – у *A. austriacus*, составив в среднем 0,70. При этом эффективное количество аллелей было практически одинаковым у всех проанализированных видов ($1,07$ – $1,10$ с погрешностью 0,01). Близкие значения наблюдали М.Ж. Vicente et al. при ISSR анализе эндемического вида *A. nitidiflorus* Jiménez Mun. et Pau флоры Испании [10]. В целом, низкий уровень генетической вариабельности установлен для *A. novoascanicus*, а самый высокий – для *A. austriacus*.

Таким образом, впервые для видов рода *Astragalus* флоры юго-востока Украины проведен анализ ISSR полиморфизмов по семи праймерам. Подтверждена возможность использования проанализированных ISSR локусов для оценки генетического разнообразия украинских видов рода *Astragalus*.

1. **Остапко, В.М.** Сосудистые растения юго-востока Украины / В.М. Остапко, А.В. Бойко, С.Л. Мосякин. – Донецк: Ноулидж, 2010. – 247 с.
Ostapko, V.M., Boiko, G.V., and Mosyakin S.L. *Sosudistye rasteniya yugo-vostoka Ukrainy* (Vascular plants of the Southeast of Ukraine), Donetsk: Noulig, 2010.
2. **Флора УРСР.** Том 6 / ред. Д.К. Зеров. – К.: Вид-во АН УРСР, 1954. – 611 с.
Flora URSS (Flora of the Ukrainian USSR), vol. 6, Zerov, D.K., Ed., Kyiv: AN URSS, 1954.
3. **Alexander, J.A.,** Liston, A., and Popovich, S. J., Genetic diversity of the narrow endemic *Astragalus oniciformis* (Fabaceae), 2004, *American Journal of Botany*, vol. 92, no. 12, pp. 2004–2012.
4. **Anand, K.K.,** Srivastava, R.K., and Chaudhary, L.B., Analysis of genetic diversity in *Astragalus rhizanthus* Benth. ssp. *rhizanthus* var. *rhizanthus* (Fabaceae) using molecular markers from India, 2010, *Journal of Botany*, vol. 2010, no. 3, pp. 1–9.

5. **Anand, K.K.**, Srivastava, R.K., Chaudhary, L.B., and Singh, A.K., Delimitation of species of the *Astragalus rhizanthus* complex (Fabaceae) using molecular markers RAPD, ISSR and DAMD, 2010, *Taiwania*, vol. 55, no. 3, pp. 197–207.
6. **Chaudhary, L.B.**, Rana, T.S., and Anand, K.K. Current status of the systematics of *Astragalus* L. (Fabaceae) with special reference to the Himalayan species in India, 2008, *Taiwania*, vol. 53, no. 4, pp. 338–355.
7. **GelAnalyzer** 2010a. <http://www.gelalyzer.com/>. Cited March, 13, 2014.
8. **Green, M.R.**, and Sambrook, J., 2012, Molecular cloning. A laboratory manual. 4th ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
9. **Lin-kai H.**, Zhi-hong Ch., Xin-quan, Zh., Zhi-gang, W., and Chou-sheng, L., A comparative analysis of molecular diversity of Erect Milkvetch (*Astragalus adsurgens*) Germplasm from North China using RAPD and ISSR Markers, 2009, *Biochem Genet*, vol. 47, pp. 92–99.
10. **Vicente, M.J.**, Segura, F., Aguado, M., Migliaro, D., Franco, J.A., and Martinez-Sanchez, J.J., Genetic diversity of *Astragalus nitidiflorus*, a critically endangered endemic of SE Spain, and implications for its conservation, 2011, *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 39, no. 3, pp. 175–182.

Донецкий ботанический сад НАН Украины

Поступила 03.04.2014

УДК 575.174.015.3:582.736(477.62)

ПОЛІМОРФІЗМ ISSR ЛОКУСІВ ВИДІВ РОДУ *ASTRAGALUS* L. ФЛОРИ ПІВДЕННОГО СХОДУ УКРАЇНИ

Демкович А.Є.

Донецький ботанічний сад НАН України

Оцінено мінливість ISSR локусів, ампліфікованих за сімома праймерами (UBC-808, UBC-811, UBC-817, UBC-818, UBC-823, UBC-825, UBC-830) в популяціях чотирьох видів роду *Astragalus* L. на південному сході України. Розмір ампліконів варіював від 170 до 1394 пар нуклеотидів. Середня кількість локусів складала 64,4 локуси на праймер. Підтверджено можливість застосування цих ISSR локусів для оцінки генетичного різноманіття українських видів роду *Astragalus* L.

Astragalus L., ISSR, поліморфізм

UDC 575.174.015.3:582.736(477.62)

POLYMORPHISM OF ISSR LOCI IN *ASTRAGALUS* L. SPECIES OF SOUTHEASTERN UKRAINE FLORA

Demkovych A.Ye.

Donetsk Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Ukraine

Variability of ISSR loci amplified by seven primers (UBC-808, UBC-811, UBC-817, UBC-818, UBC-823, UBC-825, UBC-830) was estimated in populations of four species of the genus *Astragalus* L. in southeastern Ukraine. Amplicons ranged from 170 to 1394 bp. Mean number of loci was 64.4 per primer. The applicability of these loci to the measuring genetic diversity of *Astragalus* L. species is shown.

Astragalus L., ISSR, diversity