

УДК 581:522:582:938(477)

ИЗМЕНЧИВОСТЬ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ У ВИДОВ РОДА ЛАСТОВЕНЬ (*VINCETOXICUM WOLF*) ЮГО-ВОСТОКА УКРАИНЫ

А.Е. ДЕМКОВИЧ^{1,2}, А.З. ГЛУХОВ², С.Н. ПРИВАЛИХИН^{1,2},
В.М. ОСТАПКО², И.В. МАКОГОН², Я.В. ПИРКО¹, Я.Б. БЛЮМ¹

¹ Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины, Киев
E-mail: blume@nas.gov.ua

² Донецкий ботанический сад НАН Украины, Константиновка

*Исследовано генетическое разнообразие 13 видов рода *Vincetoxicum Wolf*, произрастающих в Украине, с использованием 4 из 8 ядерных микросателлитных маркеров, разработанных ранее для *Vincetoxicum atratum* из Японии. Количество аллелей в изученных локусах варьировало в пределах от 8 до 25. Ожидаемая гетерозиготность составила 0,690–0,938, наблюдаемая – от 0,205 до 0,806. В целом уровень генетической изменчивости изученных представителей рода *Vincetoxicum* в Украине оказался соизмеримым с уровнем изменчивости *Vincetoxicum atratum* из Японии. Микросателлитные локусы *Vinc5*, *Vinc104*, *Vinc123*, *Vinc124* могут быть успешно использованы для оценки внутри- и межвидового полиморфизма видов растений рода *Vincetoxicum Wolf* в Украине.*

Ключевые слова: *Vincetoxicum*, *Arosynaseae*, микросателлитные маркеры, генетическая изменчивость, гетерозиготность.

Введение. Род ластовень (*Vincetoxicum Wolf*) включает по разным данным от 100 [1] до 500 видов [2], из них некоторые, в частности *V. rossicum* (Клеорow) Barbag., благодаря своим морфофизиологическим характеристикам являются агрессивными инвазивными видами на американском континенте [3–5]. В значительной степени это связано с их способностью к синтезу веществ, обладающих аллелопатичес-

кой активностью [5]. Нынешний ареал видов рода *Vincetoxicum* в Европе также является результатом их экспансии из субтропиков Азии [6–8]. Потенциально на территории Украины можно наблюдать будущее экспансии инвазивных видов рода *Vincetoxicum* на американском континенте. Это делает исследования генетики популяций украинских видов рода *Vincetoxicum* актуальными и востребованными.

В Украине выделяют 16 видов растений рода *Vincetoxicum* [6]. Многие виды являются редкими в отдельных регионах и нуждаются в охране [2]. Во флоре юго-востока Украины насчитывается 12 видов рода *Vincetoxicum*, три из которых занесены в Европейский красный список [2]. Систематика видов рода *Vincetoxicum*, произрастающих в Украине, до сих пор основывалась на морфологии цветка, длине и форме роста стебля, характере опушения, величине листа, форме листовой пластинки, ее толщине и опушении, различии в окраске ее верхней и нижней сторон [7]. Эколого-ценотическая дифференциация хорошо выражена только у филогенетически различающихся групп видов этого рода. Наблюдаются параллелизмы в изменчивости неродственных видов, симпатрическое или парапатрическое существование близких видов, что усложняет систематику рода и стимулирует описание новых таксонов. В этой связи для изучения ластовневых все чаще

© А.Е. ДЕМКОВИЧ, А.З. ГЛУХОВ, С.Н. ПРИВАЛИХИН,
В.М. ОСТАПКО, И.В. МАКОГОН, Я.В. ПИРКО,
Я.Б. БЛЮМ, 2016

используются молекулярно-генетические методы [1, 9–14], часть которых могут быть имплементированы и для видов рода *Vincetoxicum* на территории Украины.

Цель настоящего исследования – изучить генетическое разнообразие 13 видов ластовня, которые произрастают на территории Украины, с использованием микросателлитных маркеров, разработанных ранее для *V. atratum* Murr. et Dence [13].

Материалы и методы. Объектами исследования являлись 13 видов рода *Vincetoxicum* флоры юго-востока Украины. Образцы для анализа отбирали в Гербарии Донецкого ботанического сада НАН Украины (DNZ). Для получения ДНК использовали листовые пластинки семи растений *V. maeoticum* (Клеоров) Barbar., шести растений *V. scandens* Sommier & Lévier и *V. hirundinaria* Medik., пяти – *V. laxum* (Bartl.) Gren. et Godr., четырех растений *V. intermedium* Taliev, двух – *V. steposum* (Pobed.) A. Löve & D. Löve, *V. jaiolica* Juz., *V. flavum* Ostapko, по одному растению *V. ucrainicum* Ostapko, *V. rossicum*, *V. donetzicum* Ostapko, *V. cretaceum* (Pobed.) Wissjul., *V. albovianum* (Kusn.) Pobed.

Геномную ДНК экстрагировали из листьев с помощью набора «NeoPrep DNA» («Neogen», Украина). Для изучения молекулярно-генети-

ческого полиморфизма микросателлитных локусов видов растений рода *Vincetoxicum* использовали восемь пар праймеров (Vinc5, Vinc101, Vinc102, Vinc104, Vinc107, Vinc118, Vinc123, Vinc124), подобранных для японского вида этого рода – ластовня черноватого (*Vincetoxicum atratum* Murr. et Dence) [13] (табл. 1).

Для каждого из анализируемых образцов ДНК проводили полимеразную цепную реакцию (ПЦР) при предварительно оптимизированной температуре [14] с каждой парой праймеров к соответствующему микросателлитному локусу. Полученные ампликоны разделяли в вертикальном неденатурирующем 7%-ном полиакриламидном геле с последующей окраской нитратом серебра [15]. В качестве стандарта молекулярной массы использовали набор O'RangeRuler 20 bp DNA Ladder («Thermo Scientific», США). Для анализа использовали только интенсивно окрашенные, четкие полосы (рисунок).

Статистическую обработку результатов микросателлитного анализа осуществляли с помощью программ свободного доступа GelAnalyser (<http://www.GelAnalyser.com>), GENALEX 6.1, PopGene v1.31 [16, 17]. В качестве показателей, характеризующих генетическое разнообразие, использовали количество аллелей на локус (N_a), ожидаемую (H_e) и наблюдаемую (H_o) гетерозиготность, а также информационный индекс Шеннона (I) [18–21].

Результаты исследований и их обсуждение.

Из восьми микросателлитных локусов, используемых для молекулярно-генетического анализа, по четырем локусам (Vinc101, Vinc102, Vinc107, Vinc118) не было получено полноценного ПЦР-продукта ни у одного из 13 исследуемых видов рода *Vincetoxicum*. Вместе с тем ампликоны по локусам Vinc5, Vinc104, Vinc123, Vinc124 обнаружены у большинства исследуемых видов. Следует отметить, что подобная картина наблюдалась во многих аналогичных исследованиях. Так, при разработке микросателлитных праймеров для представителей рода *Solidago* L. (Asteraceae) лишь 7 из 14 (50 %) локусов успешно амплифицировались для каждого из 27 исследованных видов [22]. При использовании 13 микросателлитных локусов у пяти видов растений из семейства Бромелиевых степень кросс-амплификации была выше и сос-

Таблица 1. Праймеры и температура отжига для использованных микросателлитных локусов

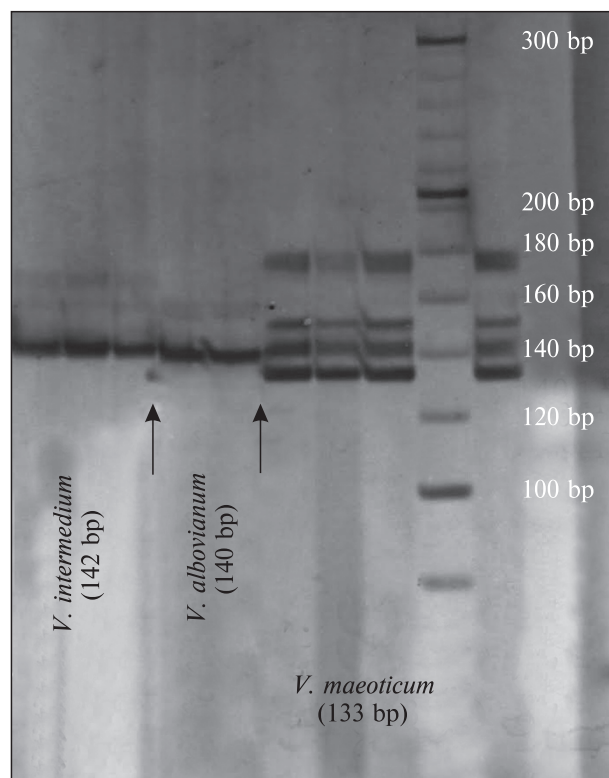
Локус	°C	Последовательность праймера (5'–3')
Vinc5	62	F: GTGGGAGTGAGAAATTGTAGC; R: CTTCTGAACTGCATCTGACC
Vinc101	65	F: GCCAGAAACTCAGTTAGCTTCA; R: GCAAATGATGCGGAAGATTCT
Vinc102	62	F: GAGCTATAGGTGACACGAGA; R: CCTTCTAGTACTTGGGAAGT
Vinc104	59	F: TGCTCCATTGATCACCTACT; R: TAACTGATCAGAAGCTCTGT
Vinc107	65	F: CCACTACGGGAAGTATTAC; R: CCTTTGGATGGCTGCCAAAT
Vinc118	68	F: GTCSTTTTGCAAGGAGGAATCA; R: GATGCCTCTATCCAAATCCCA
Vinc123	59	F: CCCGTCATATTCAACGAGAA; R: CGGGAGAGAGAGTGACTTTT
Vinc124	59	F: GACAAAAGGGTGAGAAGATA; R: GGTGATATAGTGGAGAGCAGA

тавляла 79 % [23], а для видов рода *Passiflora* — около 70 % [24]. В целом для всех 13 проанализированных видов рода Ластовень по четырем микросателлитным локусам удалось идентифицировать 64 аллеля, в среднем 16 аллелей на локус (табл. 2). Такие результаты в значительной мере соответствуют оценкам разнообразия микросателлитов для потенциально инвазивных видов растений [22, 25].

Аллели, выявленные у четырех проанализированных локусов исследованных видов, описаны нами ранее [14]. Они не в полной мере совпадали с приведенными для *V. atratum* [13]. Так, локусы Vinc5 и Vinc123 характеризовались большим размахом длины аллелей (257–339 и 121–144 п.н. по сравнению с 273–287 и 127–137 п.н. у *V. atratum* соответственно), а локус Vinc104 — меньшим (150–165 п.н. по сравнению с 172–180 п.н.). Локус Vinc124 у исследуемых видов имел аллели несколько большей длины, чем у *V. atratum* (308–461 п.н. по сравнению с 299–399 п.н.). Для локусов Vinc104, Vinc123, Vinc124 характерны два-три преобладающих аллеля, частоты которых находились в пределах 0,135–0,23 для менее частых аллелей и 0,311–0,474 — для более частых. Вместе с тем другие аллели по этим трем локусам встречались с частотой не выше 0,095, как правило — 0,016–0,064 (5 аллелей по локусу Vinc104, 8 — по Vinc123 и 18 — по Vinc124). Для локуса Vinc5 характерно отсутствие преобладающих аллелей [14].

Наименьшее количество аллелей наблюдалось у локуса Vinc104 (8 аллелей), а наибольшее — у локуса Vinc5 (25 аллелей). Для локусов Vinc123 и Vinc124 выявлено 11 и 20 аллелей соответственно (табл. 3). У *V. atratum* из Японии количество аллелей варьировало от 4 до 14 [13], а у *V. pycnostelma* из этого же региона — от 5 до 22 (в среднем 8,7) [26].

Наиболее разнообразным у всех проанализированных образцов оказался локус Vinc5 ($H_E = 0,938$, $I = 2,97$), что обусловлено отсутствием по нему преобладающих аллелей и относительно небольшим количеством гомозиготных генотипов ($F = 0,14$). Локус Vinc104 был слабополиморфным ($H_E = 0,69$, $I = 1,45$), с доминированием гомозиготных генотипов ($F = 0,703$). В целом дефицит гетерозигот характерен для всех локусов (среднее значение ин-



Аллели локуса Vinc123 у анализируемых видов: *V. intermedium*, *V. albovianum*, *V. maeoticum*

декса фиксации Райта составило 0,509). Для проанализированных ранее видов рода большая часть микросателлитных локусов находилась в состоянии равновесия [13, 26]. Вместе с тем в результате аналогичного анализа потенциально инвазивной *Falcaria vulgaris* Bernh. выявлен избыток гомозиготных генотипов по большей части микросателлитных локусов [27].

Для наиболее объемных выборок пяти видов ластовня (*V. maeoticum*, *V. scandens*, *V. hirsundinaria*, *V. laxum*, *V. intermedium*) среднее количество аллелей на локус варьировало от 3 (*V. intermedium*) до 6 (*V. maeoticum*), а ожидаемая гетерозиготность — от 0,39 до 0,77 для этих же видов (табл. 4). Информационный индекс Шеннона также варьировал от 0,67 у *V. intermedium* до 1,65 у *V. maeoticum*. При этом количество гетерозиготных генотипов у пяти упомянутых видов в среднем было выше, чем у всей совокупности изучаемых видов. В результате индекс фиксации Райта для этих видов в среднем составил 0,38, а не 0,51, как при ана-

Таблица 2. Частоты аллелей четырех микросателлитных локусов у исследуемых видов рода *Vincetoxicum* Wolf

Алель	<i>V. ucrainicum</i>	<i>V. steposum</i>	<i>V. scandens</i>	<i>V. rossicum</i>	<i>V. maeoticum</i>	<i>V. laxum</i>	<i>V. jalticola</i>	<i>V. intermedium</i>	<i>V. hirundinaria</i>	<i>V. flavum</i>	<i>V. donetzicum</i>	<i>V. cretaceum</i>	<i>V. albovianum</i>
Vinc104													
150	0	0,25	0,167	1	0,357	0	0,5	0,25	0	0,5	0	1	0
151	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
152	0	0	0,667	0	0,286	1	0,0	0,625	0,667	0	0	0	1
153	1	0,25	0,083	0	0,214	0	0,5	0	0,167	0,5	0	0	0
156	0	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
160	0	0	0,083	0	0,071	0	0	0	0	0	0	0	0
164	0	0,25	0	0	0,071	0	0	0	0	0	0	0	0
165	0	0	0	0	0	0	0	0,125	0,167	0	0	0	0
Vinc123													
121	0	0	0	0	0	0,2	0	0	0	0	0	0	0
125	0	0	0	0	0	0,2	0	0	0	0	0	0	0
130	0	0,5	0,5	0	0,25	0,4	0	0	0,167	0	0	0	0
132	0	0	0,167	0	0	0	0	0	0,25	0	0	0	0
133	0,5	0,25	0,333	1	0,333	0	1	0	0,167	0,5	1,0	1,0	0
136	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0,167	0,5	0	0	0
140	0	0	0	0	0,333	0,2	0	0	0,167	0	0	0	1,0
141	0	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
142	0	0	0	0	0,083	0	0	0,75	0	0	0	0	0
143	0	0	0	0	0	0	0	0,25	0	0	0	0	0
144	0	0	0	0	0	0	0	0	0,083	0	0	0	0
Vinc124													
308	0	0	0	0	0	0	0	0	0,25	0	0	0	0
310	1	1	0,1	0	0	0	0,5	0	0,125	1,0	0	0	0
311	0	0	0,1	0	0	0,2	0	0	0	0	0	0	0
313	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5
314	0	0	0,1	0	0,333	0,600	0,5	1	0,375	0	0	0	0
315	0	0	0	0	0	0,2	0	0	0	0	0	0	0
326	0	0	0	0	0,083	0	0	0	0,125	0	0	0	0
328	0	0	0	0	0,083	0	0	0	0	0	0	0	0
329	0	0	0,1	0	0,083	0	0	0	0	0	0	0	0
346	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5
350	0	0	0	0	0	0	0	0	0,125	0	0	0	0
365	0	0	0,2	0	0,083	0	0	0	0	0	0	0	0
366	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
372	0	0	0	0	0,083	0	0	0	0	0	0	0	0
374	0	0	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
386	0	0	0,1	0	0,167	0	0	0	0	0	0	0	0
461	0	0	0	0	0,083	0	0	0	0	0	0	0	0

Алель	<i>V. ucrainicum</i>	<i>V. sterosum</i>	<i>V. scandens</i>	<i>V. rossicum</i>	<i>V. maoticum</i>	<i>V. laxum</i>	<i>V. jalicola</i>	<i>V. intermedium</i>	<i>V. hirundinaria</i>	<i>V. flavum</i>	<i>V. donetzicum</i>	<i>V. cretaceum</i>	<i>V. albovianum</i>
Vinc5													
257	0	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
258	0	0	0	0	0,083	0	0	0	0	0	0	0	0
259	0	0	0	0	0	0	0	0	0,167	0	0	0	0
260	0	0	0	0	0	0	0	0	0,167	0	0	0	0
262	0	0	0,4	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0
263	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
264	0	0	0	0	0	0,2	0	0,5	0	0	0	0	0
266	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5
268	0	0	0	0	0,25	0,1	0	0	0	0	0	0	0
269	0	0,5	0	0	0,083	0	0,5	0	0,167	0	0	0	0
274	0	0	0,1	0	0	0,2	0	0	0,167	1	0	0	0
275	0	0	0	0	0,083	0	0	0	0	0	0	0	0
279	0	0	0	0	0	0	0	0	0,083	0	0	0	0
280	0	0	0	0	0	0	0	0	0,083	0	0	0	0
281	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0
283	0,5	0	0	0	0,167	0	0,5	0	0	0	0	0	0
284	0	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
287	0	0	0	0	0	0,2	0	0	0	0	0	0	0
288	0	0	0,1	0	0	0	0	0,167	0	0	0	0	0
289	0	0	0,1	0	0,083	0	0	0,167	0	0	0	0	0
290	0	0	0	0	0,167	0	0	0,167	0	0	0	0	0
293	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
294	0	0	0,2	0	0	0	0	0	0,167	0	0	0	0,5
296	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0
339	0	0	0	0	0,083	0	0	0	0	0	0	0	0

Таблица 3. Количество аллелей на локус, информационный индекс Шеннона, наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность, индекс фиксации Райта, рассчитанные для четырех микросателлитных локусов у *Vincetoxicum Wolf* в Украине

Локус	Количество аллелей на локус (N _a)	Информационный индекс Шеннона (I)	Гетерозиготность		Индекс фиксации Райта (F)
			наблюдаемая (H _o)	ожидаемая (H _e)	
Vinc5	25	2,97	0,806	0,938	0,14
Vinc104	8	1,45	0,205	0,69	0,703
Vinc123	11	1,94	0,297	0,813	0,634
Vinc124	20	2,35	0,367	0,827	0,557
Среднее ± ошибка	16 ± 3,9	2,18 ± 0,32	0,42 ± 0,133	0,82 ± 0,051	0,51 ± 0,126

Таблица 4. Основные показатели генетического полиморфизма исследованных видов *Vincetoxicum* Wolf в Украине

Локус	Количество аллелей на локус (Na)	Информационный индекс Шеннона (I)	Гетерозиготность		Индекс фиксации Райта (F)
			наблюдаемая (H _o)	ожидаемая (H _e)	
<i>V. scandens</i>					
Vinc5	6	1,609	1,0	0,76	-0,316
Vinc104	4	0,983	0,167	0,514	0,676
Vinc123	3	1,011	0,333	0,611	0,455
Vinc124	8	2,025	0,6	0,86	0,302
Среднее ± ошибка	5 ± 1	1,4 ± 0,252	0,52 ± 0,182	0,68 ± 0,077	0,27 ± 0,213
<i>V. maeoticum</i>					
Vinc5	8	1,979	0,833	0,847	0,016
Vinc104	5	1,433	0,286	0,735	0,611
Vinc123	4	1,286	0,167	0,708	0,765
Vinc124	8	1,907	0,5	0,819	0,39
Среднее ± ошибка	6 ± 1	1,65 ± 0,172	0,44 ± 0,146	0,77 ± 0,033	0,44 ± 0,163
<i>V. laxum</i>					
Vinc5	7	1,887	0,8	0,84	0,048
Vinc104	1	0,0	0,0	0,0	-
Vinc123	4	1,332	0,0	0,72	1,0
Vinc124	3	0,95	0,0	0,56	1,0
Среднее ± ошибка	4 ± 1,0	1,04 ± 0,397	0,2 ± 0,2	0,53 ± 0,186	0,68 ± 0,317
<i>V. intermedium</i>					
Vinc5	4	1,242	1,0	0,667	-0,5
Vinc104	3	0,9	0,25	0,531	0,529
Vinc123	2	0,562	0,0	0,375	1,0
Vinc124	1	0,0	0,0	0,0	-
Среднее ± ошибка	3 ± 1,0	0,67 ± 0,265	0,31 ± 0,237	0,39 ± 0,144	0,34 ± 0,443
<i>V. hirsutaria</i>					
Vinc5	7	1,907	0,667	0,847	0,213
Vinc104	3	0,868	0,333	0,5	0,333
Vinc123	6	1,748	0,833	0,819	-0,017
Vinc124	75	1,494	0,5	0,75	0,333
Среднее ± ошибка	5 ± 1,0	1,5 ± 0,228	0,58 ± 0,108	0,72 ± 0,079	0,21 ± 0,083
<i>Средние значения по отдельным локусам</i>					
Vinc5	6,4 ± 0,67	1,72 ± 0,136	0,86 ± 0,064	0,79 ± 0,035	-0,11 ± 0,13
Vinc104	3,2 ± 0,66	0,84 ± 0,233	0,21 ± 0,058	0,46 ± 0,122	0,54 ± 0,074
Vinc123	3,8 ± 0,66	1,19 ± 0,196	0,27 ± 0,154	0,65 ± 0,075	0,64 ± 0,192
Vinc124	5,0 ± 1,37	1,28 ± 0,37	0,32 ± 0,132	0,6 ± 0,158	0,51 ± 0,166
Среднее ± ошибка	4,6 ± 0,45	1,26 ± 0,135	0,41 ± 0,078	0,62 ± 0,057	0,38 ± 0,102

Таблица 5. Показатели подразделенности пяти видов рода *Vincetoxicum* Wolf по четырем микросателлитным локусам

Локус	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
Vinc5	-0,086	0,075	0,147
Vinc104	0,546	0,618	0,159
Vinc123	0,588	0,683	0,231
Vinc124	0,465	0,571	0,198
Среднее \pm ошибка	0,38 \pm 0,506	0,49 \pm 0,595	0,18 \pm 0,179

лизе общей совокупности локусов. Для локуса Vinc5 средний индекс фиксации вообще был отрицательным (-0,11), т.е. наблюдался избыток гетерозиготных генотипов, который при увеличении объемов выборок может быть обнаружен по этому локусу для всех видов.

Подобным образом изменялись оценки полиморфизма локусов при увеличении выборок в исследованиях, проведенных у *Falcaria vulgaris*: для меньших объемов выборок отклонения от равновесия Харди–Вайнберга (РХВ) обнаружены в 10 из 18 случаев [27], при этом в 6 из 10 случаев нарушения РХВ были связаны с дефицитом гетерозигот. При увеличении объемов выборок значимые отклонения ни по одному из исследуемых локусов от РХВ не были обнаружены [25]. Следовательно, при более масштабных объемах выборок для каждого вида показатели генотипического разнообразия по микросателлитным локусам будут ближе к ожидаемым. Еще одним источником наблюдаемого избытка гомозиготных генотипов может быть то, что определенная доля локусов при межвидовых скрещиваниях может быть представлена нуль-аллелями, что неоднократно отмечалось в работах по межвидовой амплификации SSR-локусов [23, 25, 28].

Результаты анализа подразделенности видов, выполненного с помощью F-статистик Райта, продемонстрировали неодинаковый вклад различных локусов в ее величину (табл. 5).

Следует учитывать, что F_{ST} может быть занижен за счет различий в аллельном составе у разных видов при сохранении высокого уровня наблюдаемой гетерозиготности [18, 24]. В качестве примера можно использовать локус Vinc5, у которого, несмотря на то что половина аллелей являются уникальными для отдельных видов, значение показателя межвидовой диф-

ференциации F_{ST} оказалось ниже, чем у любого другого локуса, в том числе Vinc123, у которого четверть аллелей были уникальными.

Таким образом, из восьми микросателлитных локусов (Vinc5, Vinc101, Vinc102, Vinc104, Vinc107, Vinc118, Vinc123, Vinc124) у 13 исследованных видов из украинского ареала рода *Vincetoxicum* Wolf выявлены четыре микросателлитных локуса (Vinc5, Vinc104, Vinc123, Vinc124), которые характеризуются полноценным ПЦР-продуктом. При помощи электрофореза в полиакриламидном геле установлен размер ПЦР-продуктов и количество аллелей. Определены основные показатели полиморфизма микросателлитных локусов Vinc5, Vinc104, Vinc123, Vinc124 и проведен анализ их аллельного разнообразия, в результате чего выявлены существенные его отличия по отдельным локусам от *V. atratum*. Установлена применимость микросателлитных локусов Vinc5, Vinc104, Vinc123, Vinc124 для оценки внутри- и межвидового полиморфизма видов растений рода *Vincetoxicum* Wolf в Украине.

Работа выполнена в рамках программы НАН Украины «Фундаментальные основы молекулярных и клеточных биотехнологий» 2010–2014 гг. (№ ГР 0110U006084).

VARIATION OF MICROSATELLITE LOCI IN *VINCETOXICUM* WOLF. SPECIES IN THE SOUTH-EAST OF UKRAINE

A.E. Demkovych, A.Z. Glukhov, S.N. Privalikhin, V.M. Ostapko, I.V. Makogon, Ya.V. Pirko, Ya.B. Blume

Institute of Biotechnology and Genomics of NAS of Ukraine, Kyiv

E-mail: blume@nas.gov.ua

Donetsk Botanical Garden of NAS of Ukraine

The genetic diversity of 13 *Vincetoxicum* Wolf species distributed in Ukraine was investigated using 4 of the 8

nuclear microsatellite markers, previously developed for *Vincetoxicum atratum* from Japan. The number of alleles ranged from 8 to 25. The expected heterozygosities were 0,690–0,938 and observed ones ranged from 0.205 to 0.806. In general, the level of genetic variation in studied representatives of the genus *Vincetoxicum* from Ukraine proved to be comparable with that of *Vincetoxicum atratum*. The microsatellite loci Vinc5, Vinc104, Vinc123, Vinc124 can be successfully used to assess intra- and interspecific polymorphisms of species of the genus *Vincetoxicum* Wolf in Ukraine.

МІНЛИВІСТЬ МІКРОСАТЕЛІТНИХ ЛОКУСІВ У ВИДІВ РОДУ ЛАСТОВЕНЬ (*VINCETOXICUM WOLF*) ПІВДЕННОГО СХОДУ УКРАЇНИ

А.Е. Демкович, О.З. Глухов, С.М. Приваліхін,
В.М. Остапко, І.В. Макогон, Я.В. Пірко, Я.Б. Блюм

Досліджено генетичну мінливість 13 видів роду *Vincetoxicum* Wolf, що ростуть в Україні, з використанням 4 із 8 ядерних мікросателітних маркерів, розроблених раніше для *Vincetoxicum atratum* з Японії. Кількість алелів у вивчених локусах варіювала в межах від 8 до 25. Очікувана гетерозиготність становила 0,690–0,938, а наявна – 0,205–0,806. В цілому рівень генетичної мінливості вивчених представників роду *Vincetoxicum* Wolf в Україні виявився порівнянним з рівнем мінливості *Vincetoxicum atratum* з Японії. Мікросателітні локуси Vinc5, Vinc104, Vinc123, Vinc124 можуть бути з успіхом застосовані для оцінки внутрішньо- та міжвидового поліморфізму видів рослин роду *Vincetoxicum* Wolf в Україні.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Yamashiro, T., Fukuda, T., Yokoyama, J., and Maki, M., Molecular phylogeny of *Vincetoxicum* (Apocynaceae-Asclepiadoideae) based on the nucleotide sequences of cpDNA and nrDNA, *Mol. Phylogenet. Evol.*, 2004, vol. 31, pp. 689–700.
2. *Red Book of the Donetsk Region: Plant World (Protected Plants in the Donetsk Region)*, ed. V.M. Ostapko, Donetsk, 2010.
3. Blanchard, M.L., Barney, J.N., Averill, K.M., Mohler, C.L., and DiTommaso, A., Does polyembryony confer a competitive advantage to the invasive perennial vine *Vincetoxicum rossicum* (Apocynaceae)?, *Am. J. Bot.*, 2010, vol. 97, no. 2, pp. 251–260.
4. Sanderson, L.A., and Antunes, P.M., The exotic invasive plant *Vincetoxicum rossicum* is a strong competitor even outside its current realized climatic temperature range, *NeoBiota*, 2013, vol. 16, pp. 1–15.
5. Gibson, D.M., Vaughan, R.H., and Milbrath, L.R., Invasive swallow-worts: an allelopathic role for $-(-)$ antofine remains unclear, *J. Chem. Ecol.*, 2015, vol. 41, no. 2, pp. 202–211.
6. Mosyakin, S.L., and Fedoronchuk, M.M., *Vascular plants of Ukraine: a nomenclatural checklist*, Kiev, 1999.
7. Ostapko, V.M., The genus *Vincetoxicum* N.M. Wolf. in the South-East of Ukraine, *Ukr. Bot. J.*, 1995, vol. 52, no 3, pp. 388–394.
8. Liede-Schumann, S., Khanum, R., Mumtaz, A.S., Gherghel, I., and Pahlevani, A., Going west – A subtropical lineage (*Vincetoxicum*, Apocynaceae: Asclepiadoideae) expanding into Europe, *Mol. Phylogenet. Evol.*, 2015, vol. 94, pp. 436–446.
9. Liede, S., *Cynanchum – Rhodostegiella – Vincetoxicum – Tylophora (Asclepiadaceae)*: new considerations on an old problem, *Taxon*, 1996, vol. 45, no. 2, pp. 193–211.
10. Liede, S., and Täube, A., Circumscription of the genus *Cynanchum* (Apocynaceae – Asclepiadoideae), *Syst. Bot.*, 2002, vol. 27, no. 4, pp. 789–800.
11. Liede-Schumann, S., Kong, H.-H., Meve, U., and Thiv, M., *Vincetoxicum* and *Tylophora* (Apocynaceae: Asclepiadoideae: Asclepiadeae) – two sides of the same medal: Independent shifts from tropical to temperate habitats, *Taxon*, 2012, vol. 61, pp. 803–825.
12. Endress, M.E., Liede-Schumann, S., and Meve, U., An updated classification for Apocynaceae, *Phytotaxa*, 2014, vol. 159, no. 3, pp. 175–194.
13. Tada, F., Yamashiro, T., and Maki, M., Development of microsatellite markers for the endangered grassland perennial herb *Vincetoxicum atratum* (Apocynaceae-Asclepiadoideae), *Conserv. Genet.*, 2009, vol. 10, pp. 1057–1059.
14. Demkovich, A.E., Use of microsatellite loci in molecular-genetic analysis of *Vincetoxicum* Wolf species of the Ukrainian flora, *Indust. Bot.*, 2012, no. 12, pp. 152–156.
15. Benbouza, H., Jacquemin, J.-M., Baudoin, J.-P., and Mergeai, G., Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 2006, vol. 10, no. 2, pp. 77–81.
16. Peakall, R., and Smouse, P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research, *Mol. Ecol. Notes*, 2006, vol. 6, pp. 288–295.
17. Yeh, F.C., and Boyle, T.J.B., Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits, *Belg. J. Bot.*, 1997, vol. 129, pp. 157–163.
18. Hedrick, P., *Genetics of populations*, Sudbury, Massachusetts: Jones & Bartlett Learning, 2011.
19. Eriksson, G., Ekberg, I., and Clapham, D., *An introduction to forest genetics*, Uppsala: Swedish Univ. Agric. Sci. (SLU), 2006.
20. Geburek, T., and Turok, J. (eds) *Conservation and management of forest genetic resources in Europe*, Zvolen: Arbora Publ., 2005.

21. Politov, D.V., Natural populations – woody plants. Dynamics of population gene pools under anthropogenic influences. Moscow: Nauka, 2004 [In Russian]
22. Beck, J.B., Semple, J.C., and Brull, J.M., Genus-wide microsatellite primers for the goldenrods (Solidago; Asteraceae), *Appl. Plant Sci.*, 2014, vol. 2, no. 4, p. 1300093.
23. Miranda F.D., Gontijo, A.B., Santiliano F.C., Favoreto, S.C., and Soares T.C.B., Transferability and characterization of microsatellite markers in five Bromeliaceae species belonging to the subfamilies Pitcairnioideae and Bromelioideae, *Biota Neotrop.*, 2012, vol. 12, no. 3, pp. 319–323.
24. Cerqueira-Silva, C., Santos, E., Jesus, O.N., Vieira, J.G.P., Mori, G.M., Corrêa, R.X., and Souza, A.P., Molecular genetic variability of commercial and wild accessions of passion fruit (*Passiflora* spp.) targeting *ex situ* conservation and breeding, *Int. J. Mol. Sci.*, 2014, vol. 15, no. 12, pp. 22933–22959.
25. Piya, S., Nepal, M.P., Butler, J.L., Larson, G.E., and Neupane, A., Genetic diversity and population structure of sickleweed (*Falcaria vulgaris*; Apiaceae) in the upper Midwest USA, *Biol. Invasions*, 2014, vol. 16, no. 10, pp. 2115–2125.
26. Nakahama, N., Kaneko, S., Hayano, A., Isago, Y., Inoue-Murayama, M., and Tominaga, T., Development of microsatellite markers for the endangered grassland species *Vincetoxicum pycnostelma* (Apocynaceae) by using next-generation sequencing technology, *Conserv. Genet. Res.*, 2012, vol. 4, no. 3, pp. 669–671.
27. Piya, S., and Nepal, M.P., Characterization of nuclear and chloroplast microsatellite markers for *Falcaria vulgaris* (Apiaceae), *Am. J. Plant Sci.*, 2013, vol. 4, no. 3, pp. 590–595.
28. Drašnarová, A., Krak, K., Vít, P., Doudova, J., Douda J., Hadincova, V., Zakravsky, P., and Mandak, B., Cross-amplification and multiplexing of SSR markers for *Alnus glutinosa* and *A. incana*, *Tree Genet. Genom.*, 2014, vol. 10, no. 4, pp. 865–873.

Поступила 10.12.14