

ЦЕЛКОВ А. П.^{1✉}, САХАРОВА В. Г.², РАБОКОНЬ А. М.², ПРИВАЛІХІН С. М.²,
КОРЖОВ В. Л.³, ПІРКО Я. В.²

¹ ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка,

Україна, 03022, м. Київ, просп. Академіка Глушкова, 2

² ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»,

Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а

³ Український науково-дослідний інститут гірського лісівництва ім. П. С. Пастернака,

Україна, 76018, м. Івано-Франківськ, вул. Грушевського, 31, ORCID: 0009-0006-9338-8498, 0000-0002-7335-8252, 0000-0002-6249-1824, 0009-0006-2462-2105, 0000-0002-3201-1199, 0000-0003-1887-5406

✉ a.tselikov@knu.ua, yarvp1@gmail.com

ОЦІНКА ГЕНЕТИЧНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ *PINUS* L. ОЛІГОТРОФНОГО ТОРФОВИЩА «БОЛОТО МШАНА»

Мета. Оцінити молекулярно-генетичний поліморфізм представників роду *Pinus* L. на території пам'ятки природи «Болото Мшана», а також перевірити гіпотезу про можливу їх локальну гібридизацію. **Методи.** Екстракція ДНК за використанням ЦТАБ та DNeasy Plant Pro Kit, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) з праймерами до ділянки хлоропластної ДНК і генів, які кодують β-тубулін (ТВР-маркери), електрофорез ДНК у поліакриламідному гелі з фарбуванням її нітратом срібла. **Результати.** За допомогою одного хлоропластного ДНК-маркера і двох ДНК-маркерів на основі інтронів генів β-тубуліну (ТВР, сТВР) проаналізовано ДНК-профілі *P. mugo*, *P. sylvestris* й, імовірно, *P. uliginosa* (загалом 21 зразок). Порівняли внутрішньовидовий генетичний поліморфізм видів і дослідили імовірність існування гібридних форм. **Висновки.** Найбільш ефективним й інформативним ДНК-маркером для дослідження представників роду *Pinus* L. виявився маркер на основі 2-го інтрону генів β-тубуліну. *P. sylvestris* за дослідженими генетичними маркерами продемонструвала менший генетичний поліморфізм, порівняно з *P. mugo* і *P. uliginosa*. Також було виявлено імовірні гібридні форми (*P. mugo* × *P. sylvestris*) або *P. uliginosa*.

Ключові слова: *Pinus mugo*, *Pinus sylvestris*, *Pinus uliginosa*, молекулярно-генетичні маркери, генетичний поліморфізм, гібридизація.

Гібридизація й інтрогресія є важливими еволюційними факторами, які збільшують різ-

номанітність видів і можуть призвести до видоутворення [1].

Сосна звичайна (*Pinus sylvestris* L.) і сосна гірська (*P. mugo* Turta) є таксономічно різними видами, які представляють рід *Pinus* L. (Price, 1998). Сосна звичайна – найпоширеніша сосна у світі. Її ареал включає Шотландію, Скандинавію (за винятком Данії), Північну і Центральну Європу й Північну Азію [2]. Сосна гірська поширена в горах і на болотах центральної та західної Європи, зокрема в субальпійському поясі Карпат. В Українських Карпатах угруповування розміщені на висоті від 1400 до 1900 м, із максимумом на 2010 м у Чорногорі й мінімумом – близько 700–800 м [3].

Раніше між цими видами вже морфологічно і генетично, за допомогою хлоропластних ДНК-маркерів, були підтверджені випадки природної гібридизації у змішаних популяціях [4, 5]. Частина дослідників виділяє таку проміжну форму в окремий вид – *Pinus uliginosa* [6]. Передбачається, що популяція цих проміжних форм сформувалася в Україні на оліготрофному торфовищі «Болото Мшана» поблизу села Осмолода Івано-Франківської області [6, 15]. Ця територія раніше була досліджена польським дослідником Бусинським Р. (1990), проте жодних гібридних форм ним не було виявлено [7].

Хоча у більшості сучасних систематичних і філогенетичних дослідженнях використовується аналіз і / або сиквенування мтДНК / хпДНК, однак філогенія за мтДНК / хпДНК являє собою тільки генеалогію певного фрагменту цитоплазматичного геному. Тому для більш чіткого розуміння процесу гібридизації доціль-

© ЦЕЛКОВ А. П., САХАРОВА В. Г., РАБОКОНЬ А. М., ПРИВАЛІХІН С. М., КОРЖОВ В. Л., ПІРКО Я. В.

но використовувати також генетичні маркери ядерного геному. Досить популярним підходом, який набуває все більшого практичного застосування, є оцінка поліморфізму довжини інтронів різноманітних генів (Intron Length Polymorphism, ILP). Універсальність, відтворюваність й інформативність ILP-маркерів дозволяє проводити ДНК-профілювання і генотипування широкого спектру організмів. Більше того, раніше нами вже було показано, що метод на основі оцінки поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну (tubulin base polymorphism, TBP) може вдало застосовуватися для генетичного маркування видів родини *Pinaceae*, включаючи *P. sylvestris* [8].

Враховуючи всі вище описані особливості вивчення генетичного різноманіття сосни звичайної і сосни гірської, а також спираючись на роботи словацьких [3] та польських [7] колег і на наш власний досвід застосування TBP-аналізу [8], метою цієї роботи було дослідження генетичної різноманітності представників роду *Pinus* L. (*P. sylvestris*, *P. mugo* й, імовірно, *P. uliginosa*) на території оліготрофного торфовища, пам'ятки природи «Болото Мшана».

Матеріали і методи

У 2021 році на території оліготрофного торфовища «Болото Мшана» було зібрано хвою і шишки з насінням із 12 дерев *P. sylvestris* та з 17 рослин *P. mugo* й *P. uliginosa*. Рослинний матеріал зберігали за температури -20°C . Однак для аналізу був використаний лише 21 зразок.

Геному ДНК екстрагували із зародків, хвої чи бруньки (при відсутності повного насіння) за допомогою ЦТАБ-методу [9] та DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Німеччина) за протоколом виробника. Якість і кількість ДНК визначали спектрофотометрично на NanoDrop (ThermoScientific) з визначенням концентрації та ступеня чистоти ДНК.

Полімеразну ланцюгову реакцію здійснювали в ампліфікаторі Thermal Cycler 2720 («Applied Biosystems», США). Реакційна суміш (об'ємом 10 мкл) містила п'ятикратний ПЛР-буфер з сульфатом амонію, 2,5 ммоль MgCl_2 , 50 нг рослинної ДНК, 1 мкМ кожного з праймерів, 0,2 мм кожного дНТФ, 0,5 од. DreamTaq полімерази («ThermoFisher», США). Для ампліфікації фрагментів ДНК використовували наступні праймери: TBP-F (для аналізу поліморфізму 1-го інтрона β -тубуліну): 5' – AACTGGGCBAARGGNCAУТАУАС – 3' та

TBP-R: 5' - ACCATRCAYTCRTCDGCRTTYTC – 3'; TBP-F (для аналізу поліморфізму 2-го інтрона β -тубуліна): 5' – GARAAYGCHGAYGARTGYATG – 3' і TBP-R: 5'- CRAAVCCBACCATGAARAARTG – 3' [10]; trnH (для аналізу хлоропластного локусу trnH-trnK): 5' – ACGGGAATTGAACCCGCGCA – 3' і trnK: 5' – CCGACTAGTTCGGGGTTCGA – 3' [12]. Ампліфікацію проводили за наступним протоколом: початкова денатурація (95°C) – 5 хв; 40 циклів ампліфікації (денатурація при 95°C – 1 хв, гібридизація праймерів при $55 / 55 / 62^{\circ}\text{C}$ – 1 хв, подовження при 72°C – 2 хв); кінцеве подовження при 72°C – 7 хв, утримання при 15°C [10]. Продукти ампліфікації розділяли за допомогою електрофорезу в 6 % неденатуруючому поліакриламідному гелі в 1 x TBE-буфері [13]. Візуалізацію фрагментів ДНК проводили шляхом фарбування нітратом срібла. Після електрофорезу гель фотографували у видимому світлі. Аналіз зображень електрофоретичних гелів здійснювали в програмі GelAnalyzer (<http://www.gelanalyzer.com/>). Довжину відтворюваних і чітких фрагментів визначали за допомогою маркеру довжини ДНК (O'Gene Ruler™ 100bp Plus DNA Ladder, ready-to-use; «Thermo Fisher Scientific», США).

Результати та обговорення

Спочатку було проаналізовано зразки сосни за допомогою праймерів до хлоропластної ДНК (хпДНК). На електрофореграмах детектувалося два фрагменти довжиною 1630 та 1740 п. н. Слід зазначити, що за хлоропластним локусом *trnH-trnK* зразки не диференціювалися за досліджуваними видами. У той же час у попередніх дослідженнях, за умов використання локусу хлоропластної ДНК *trnV-trnH*, авторам вдалося чітко показати потік генів між *P. sylvestris* та *P. mugo* [14].

У подальшому зразки були проаналізовані за допомогою оцінки поліморфізму довжини першого інтрону генів β -тубуліну (TBP-аналіз), оскільки попередній метод не продемонстрував чітких закономірностей. За отриманими результатами (рис. 1) досліджувані зразки сосни показали Фнізьке генетичне різноманіття. Було отримано лише шість поліморфних смуг. Зразки досліджуваних видів сосен мали багато спільних ампліконів.

Деякі зразки *P. sylvestris* мали унікальні амплікони, які були відсутні в зразках *P. mugo* й імовірної *P. uliginosa*. Серед зразків сосни гір-

ської також було виявлено унікальні фрагменти. Незважаючи на деякі відмінності між зразками, не можна стверджувати, що вони диференціюються чітко за видами. Варто зазначити, що зразки 5 і 12, які належать до різних видів, мають спільні фрагменти довжиною 550 п. н., 560 п. н., яких немає в інших зразках. Тому, поперше, для сосни звичайної характерна наявність внутрішньовидового поліморфізму, а подруге, можна припустити, що частина зразків, імовірно, має гібридне походження, оскільки у своєму профілі містила фрагменти, характерні для усіх досліджуваних видів.

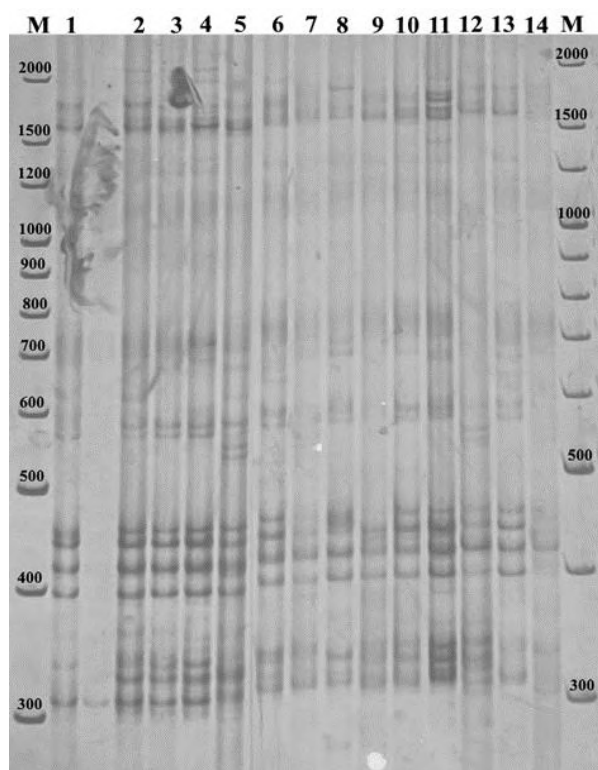


Рис. 1. Електрофореграма ампліфікованих фрагментів першого інтрону β -тубуліну у зразків *P. sylvestris* (1–6), *P. mugo* і *P. uliginosa* (7–14), М – молекулярний маркер «100bp Plus Ladder».

Оскільки за першим інтроном у цілому спостерігався низький рівень поліморфізму, то в подальшому зразки також проаналізували за використання праймерів до другого інтрону генів β -тубуліну (сТВР). Розмір ампліконів варіював у широких межах, однак фрагменти довжиною 226 п. н., 237 п. н. і 340 п. н. зустріча-

лися в усіх досліджених зразках, незалежно від видової приналежності (рис. 2). Для сосни звичайної характерна наявність приблизно 7 фрагментів на генотип, а у сосни гірської ті/ або *P. uliginosa* кількість фрагментів варіювала від 14 до 24. При цьому у досліджених видів, як у випадку з 1-м інтроном, також була виявлена внутрішньовидова гетерогенність.

Найразючіше з досліджених зразків вирізнялися зразки сосни № 11, № 14 і № 18, для яких, на відміну від решти, була встановлена більша кількість ампліконів, які поєднували фрагменти з обох видів, що дозволяє віднести їх, імовірно, до гібридних форм (*P. mugo* \times *P. sylvestris*) або *P. uliginosa*.

Таким чином, на основі отриманих даних можна зробити висновок, що за проаналізованими генетичними маркерами сосна гірська, а також імовірні гібридні форми мають більше генетичне різноманіття, порівняно з сосною звичайною, а використання методу оцінки поліморфізму 2-го інтрону β -тубуліну дозволяє провести внутрішньовидову диференціацію значно ефективніше, ніж за допомогою оцінки 1-го інтрону.

Висновки

Отже, у результаті дослідження *P. sylvestris*, *P. mugo* й, імовірно, *P. uliginosa* за допомогою хлоропластного ДНК-маркера, ТВР-і сТВР-аналізу, найкращу ефективність продемонстрував метод оцінки довжини другого інтрону β -тубуліну (сТВР). Також за цим підходом вдалося виокремити зразки, які поєднували амплікони, виявлені в обох видів, які, імовірно, можна віднести до гібридних форм (*P. mugo* \times *P. sylvestris*) або, так званого, *P. uliginosa*. У цілому у сосни звичайної за використання зазначених генетичних маркерів виявлено менший рівень генетичного поліморфізму, порівняно із сосною гірською й імовірних гібридних форм.

Робота виконана в рамках спільного українсько-словацького проєкту (2020–2022 рр.) Національної академії наук України і Національної академії наук Словаччини «Genetic structure of the putative hybrid swarms between *Pinus sylvestris* and *P. mugo* in northern Slovakia and western part of Ukraine».

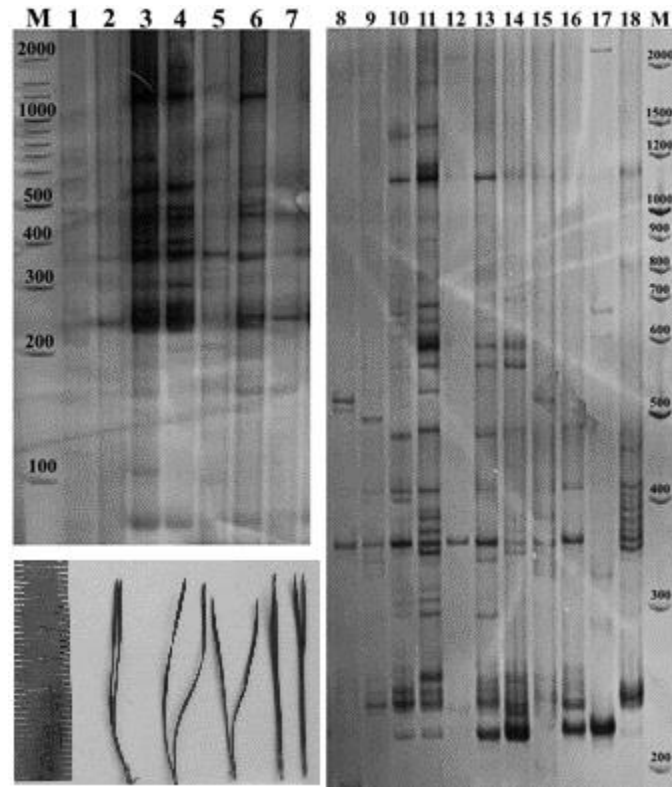


Рис. 2. Електрофореграма ампліфікованих фрагментів за другим інтроном β -тубуліну у зразків *P. sylvestris* (1–7), *P. mugo* і *P. uliginosa* (8–18), М – молекулярний маркер «100bp Plus Ladder». Внизу зліва наведено зображення хвої досліджених зразків сосни.

References

1. Abbott R., Albach D., Ansell S., Arntzen J. W., Baird S. J. E., Bierne N., Boughman J., Brelsford A., Buerkle C. A., Buggs R., R. Butlin K., Dieckmann U., Eroukhmanoff F. et al. Hybridization And Speciation. *Journal of Evolutionary Biology*. 2013. Vol. 26. P. 246. doi: 10.1111/J.1420-9101.2012.02599.X.
2. Sullivan Janet. 1993. *Pinus sylvestris*. Fire Effects Information System, [Online]. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station, Fire Sciences Laboratory (Producer). 2024. Retrieved from: <https://www.fs.usda.gov/database/feis/plants/tree/pinsyl/all.html>.
3. Tsaryk I., Didukh Y.P., Tassenkevich L., Waldon B., Boratynski A. *Pinus mugo* Turra (Pinaceae) in the Ukrainian Carpathians. *Dendrobiology*. 2006. Vol. 55. P. 1641–1307. Retrieved from: <https://eurekamag.com/research/012/879/012879220.php>.
4. Kormutak A., Brana M., Manka P., Galgoci M., Libantova J., Camek V., Bolecek P., Gomory D. Hybridization Processes in Putative Hybrid Swarms of Scots Pine and Mountain Dwarf Pine as Revealed by Chloroplast DNA. *Acta Biologica Cracoviensia s. Botanica*. 2015. Vol. 56. P. 61–66. doi: 10.2478/abcsb-2014-0025.
5. Sobierajska K., Wachowiak W., Zaborowska J, Labiszak B., Wojkiewicz B., Sękwicz M., Jasinska A. K., Sękwicz K., Boratynska K., Marcysiak K. et al. Genetic Consequences of Hybridization in Relict Isolated Trees *Pinus sylvestris* and the *Pinus mugo* Complex. *Forests*. 2020. Vol. 11. P. 1086. doi: 10.3390/f11101086.
6. Jasinska A. K., Iakushenko D. M., Sobierajska K., Tretiak P. R., Iszkulo G. *Pinus uliginosa* G. E. Neumann ex Wimm. – a new taxon for the Ukrainian flora. *Ukr. Bot.* 2009. Vol. 66, № 5. P. 640–646.
7. Businsky R., Businska L. The genus *Pinus* L., Pines: contribution to knowledge. *Acta Pruhoonica*. 2008. Vol. 88. P. 1–126.
8. 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. *Journal of botany*. 2016. Vol. VIII, NR. 2 (13). P. 5–9.
9. Green M. R., Sambrook J. *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012. 1890 p.
10. Bardini M., Lee D., Donini P., Mariani A., Gianii S., Toschi M., Lowe Ch., Breviario D. Tubulin-based polymorphism (TBP): a new tool, based on functionally relevant sequences, to assess genetic diversity in plant species. *Genome*. Vol. 47. P. 281–291. doi: 10.1139/g03-132.
11. Braglia L., Manca A., Mastromauro F., Breviario D. cTBP: A successful intron length polymorphism (ILP)-based genotyping method targeted to well defined experimental needs. *Diversity*. 2010. Vol. 2 (4). P. 572–585. doi: 10.3390/d2040572.
12. Demesure B., Sodji N., Petit R. J. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular ecology*. 1995. Vol. 4. P. 129–131. doi: 10.1111/j.1365-294X.1995.tb00201.x.

13. 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 gel. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2006. Vol. 10 (2). P. 77–81.
14. Kormutak A., Brana M., Manka P., Galgoci M., Libantova J., Camek V., Bolecek P., Gomory D. Hybridization processes in putative hybrid swarms of scots pine and mountain dwarf pine. *Acta biologica cracoviensia (Series Botanica)*. 2014. Vol. 56 (2). P. 61–66. doi: 10.2478/abcsb-2014-0025.
15. Jasinska A. K., Iakushenko D. M., Sobierajska K., Tretiak P. R., Iszkulo G. *Pinus uliginosa* G. E. Neumann ex Wimm. – a new taxon for the Ukrainian flora. *Ukr. bot. zhurn.* 2009. Vol. 66 (5). P. 640–646.

TSELIKOV A. P.¹, SAKHAROVA V. H.², RABOKON A. M.², PRIVALIKHIN S. M.², KORZHOV V. L.³, PIRKO Ya. V.²

¹ Educational and Scientific Center "Institute of Biology and Medicine", Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine, 03022, Kyiv, Akademika Glushkova ave., 2

² Institute of Food Biotechnology and Genomics, Nat. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Osyovskogo str., 2a

³ Ukrainian Research Institute of Mountain Forestry named after P. S. Pasternak, Ukraine, 76018, Ivano-Frankivsk, Hrushevskoho str., 31

ASSESSMENT OF THE GENETIC POLYMORPHISM OF GENUS *PINUS* L. THE OLIGOTROPHIC PEAT BOG "BOLOTO MSHANA"

Aim. To evaluate the molecular genetic polymorphism of representatives of the genus *Pinus* L. on the territory of the "Boloto Mshana" nature reserve, as well as to test the hypothesis about their possible local hybridization **Methods.** DNA extraction using CTAB and DNeasy Plant Pro Kit, polymerase chain reaction (PCR) with primers for the chloroplast DNA and genes encoding β -tubulin (TBP markers), electrophoresis of DNA in a polyacrylamide gel with silver nitrate staining. **Results.** DNA profiles of *P. mugo*, *P. sylvestris* and probably *P. uliginosa* (21 samples in total) were analyzed using one chloroplast DNA marker and two DNA markers based on introns of β -tubulin genes (TBP, cTBP). The intraspecific genetic polymorphism of the species was compared and the probability of the existence of hybrid forms was investigated. **Conclusions.** The marker based on the 2nd intron of the β -tubulin genes turned out to be the most effective and informative DNA marker for studying representatives of the *Pinus* L. genus. *P. sylvestris* showed less genetic polymorphism by the investigated genetic markers, compared to *P. mugo* and *P. uliginosa*. Possible hybrid forms (*P. mugo* \times *P. sylvestris*) or *P. uliginosa* were also discovered.

Keywords: *Pinus mugo*, *Pinus sylvestris*, *Pinus uliginosa*, molecular genetic markers, genetic polymorphism, hybridization.