

БІЛОНОЖКО Ю. О.^{1✉}, РАБОКОНЬ А. М.¹, ПОСТОВОЙТОВА А. С.¹, КАЛАФАТ Л. О.¹, БОЙКО Н. С.², ПРИВАЛІХІН С. М.¹, ТОПЧІЙ Т. В.¹, ДЕМКОВИЧ А. Є.¹, БЛЮМ Я. Б.¹, ПІРКО Я. В.¹

¹ ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»,

Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а, e-mail: tkacheva_ua@ukr.net

² Державний дендрологічний парк «Олександрія» НАН України,

Україна, 09113, м. Біла Церква, 13, e-mail: index_bc@ukr.net

✉ tkacheva_ua@ukr.net, (067) 951-18-45

ГЕНЕТИЧНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ ОМЕЛИ БІЛОЇ (*VISCUM ALBUM* L.) В УКРАЇНІ

Мета. Метою роботи було встановлення генетичних відмінностей між рослинами *V. album*, що зростають на території України.

Методи. В дослідженні використано вибірки омели білої, зібраної в різних областях України. Використовували метод оцінки поліморфізму довжини інтронів генів β-тубуліну. Ампліфіковані фрагменти ДНК фракціонували за допомогою електрофорезу у неденатуруючому поліакриламідному гелі та візуалізували шляхом фарбування нітратом срібла. **Результати.** Проаналізовано генотипи 91 рослини. Отримано ДНК профілі омели білої зі специфічним набором ампліконів інтронів генів β-тубуліну, які дозволили диференціювати зразки між собою. Дані фінгерпринтингу було використано для кластерного аналізу та побудови дендрограми. **Висновки.** Встановлено, що проаналізовані зразки омели не відрізняються за географічним фактором та характеризуються низьким рівнем генетичного різноманіття у досліджених вибірках.

Ключові слова: *Viscum album* L., поліморфізм довжини інтронів, β-тубулін, генетична мінливість, Україна.

Viscum album L. (омела біла, або омела європейська) – широко розповсюджений вид напівпаразитичної рослини на території більшості країн Європи, в тому числі й в Україні [1]. Належить до роду *Viscum*, який об'єднує близько 60 видів, що паразитують на різноманітних видах деревних рослин. Серед останніх нараховують до 500 видів дерев (омела оселяється як на голонасінних, так і на покритонасінних рослинах) [2]. До цього переліку належить значна кількість як декоративних, так і економічно важливих порід. Встановлено тісний взає-

мозв'язок між зараженням та смертністю дерев, а отже, *V. album* є важливим біотичним фактором, що знижує життєздатність рослин, на яких вона паразитує [3]. Водночас різні види омели є невід'ємними складовими багатьох рослинних та тваринних угруповань [4]. Значне місце *V. album* займає і у дослідженнях медичного напрямку, оскільки завдяки вмісту великої кількості хімічних речовин вважається дієвим засобом при лікуванні ряду захворювань [5].

Незважаючи на великий науковий та економічний інтерес до омели білої, дослідженню популяційно-генетичних особливостей цього виду приділяється недостатньо уваги. Переважна більшість генетичних досліджень *V. album* присвячена уточненню систематичних питань. Для генетичного аналізу омели білої з метою вирішення питань філогенії було використано ряд ДНК-маркерів, зокрема хлоропластні та ядерні рибосомальні, а також мікросателітні маркери для таких видів, як *Psittacanthus schiedeianus* (*Loranthaceae*) та *Viscum coloratum* (*Santalaceae*) [6–10]. На сьогодні різні вчені визнають існування трьох підвидів (або рас) омели білої, які відрізняються за спеціалізацією до рослини-господаря: *V. album* ssp. *abietis* (Wiesb.) Abromeit трапляється на ялиці (*Abies* sp.), *V. album* ssp. *austriacum* (Wiesb.) Vollmann трапляється переважно на сосні (*Pinus* sp.), а *V. album* ssp. *album* L. росте на найрізноманітніших листяних породах дерев та кущах [10, 11]. Нещодавно за допомогою методів оцінки поліморфізму довжини першого та другого інтронів генів β-тубуліну (ТВР, Tubulin Based Polymorphism, та сТВР) було встановлено значні молекулярно-генетичні відмінності омели білої, що зростає на клені та сосні, та продемонстро-

© БІЛОНОЖКО Ю. О., РАБОКОНЬ А. М., ПОСТОВОЙТОВА А. С., КАЛАФАТ Л. О., БОЙКО Н. С., ПРИВАЛІХІН С. М., ТОПЧІЙ Т. В., ДЕМКОВИЧ А. Є., БЛЮМ Я. Б., ПІРКО Я. В.

вано можливість використання ТВР-аналізу для визначення статі рослин омели [12].

У 2009 р. було опубліковано роботу Zuber та Widmer, в якій наведено аналіз генетичної різноманітності *V. album* із використанням хлоропластних ДНК маркерів [10]. У дослідженні проаналізовано значну вибірку зразків омели різних підвидів, зібраних у 20 країнах світу (більше 80 популяцій). Україна в цьому дослідженні представлена лише двома вибірками, обмеженими Львівською областю. На сьогодні відмічається розповсюдження омели білої майже по всій території нашої країни. Генетичні особливості омели білої, що зростає на цих територіях, раніше не досліджувалися.

Отже, метою роботи було встановлення генетичних відмінностей між рослинами *V. album*, що зростають на території різних областей України.

Матеріали і методи

На рис. 1 показано схематичне розташування вибірок омели білої, що зростає на різних видах листяних порід у межах Київської області та інших областей України.

Для аналізу відбирали листові пластини, які одразу запаковували в окремі ботанічні пакети. Для подальшого використання рослинний матеріал заморожували та зберігали за -20°C . Геномну ДНК екстрагували з листків за допомогою ЦТАБ-методу [13]. Якість і кількість

ДНК перевіряли за допомогою електрофорезу в 1,5 %-ному агарозному гелі і спектрофотометрично на біофотометрі («Eppendorf», США) з визначенням концентрації та якості ДНК. Зразки ДНК зберігали за -20°C . Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили в мікропробірках на 200 мкл 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. Тақ полімерази («ThermoFisher», США). Для ТВР аналізу були взяті послідовності праймерів (ТВР-F: 5'-AACTGGGCBAARGGNCAYTA-YAC-3', ТВР-R: 5'-ACCATRCAYTCTCDGCR-TTUTC3') з наукових літературних джерел [14]. Ампліфікацію проводили за таким протоколом: початкова денатурація (94°C) – 3 хв, 40 циклів ампліфікації (денатурація за 94°C – 30 с, відпад праймерів за 55°C – 40 с, елонгація за 72°C – 1,5 хв), кінцева елонгація за 72°C – 8 хв, утримання за 15°C [14]. Продукти ампліфікації розділяли за допомогою методу вертикального неденатуруючого електрофорезу в 6%-ному поліакриламідному гелі. Візуалізацію фрагментів ДНК проводили шляхом фарбування нітратом срібла [15]. Аналіз зображень здійснювали з використанням програми GelAnalyzer (<http://www.gelanalyzer.com/>).

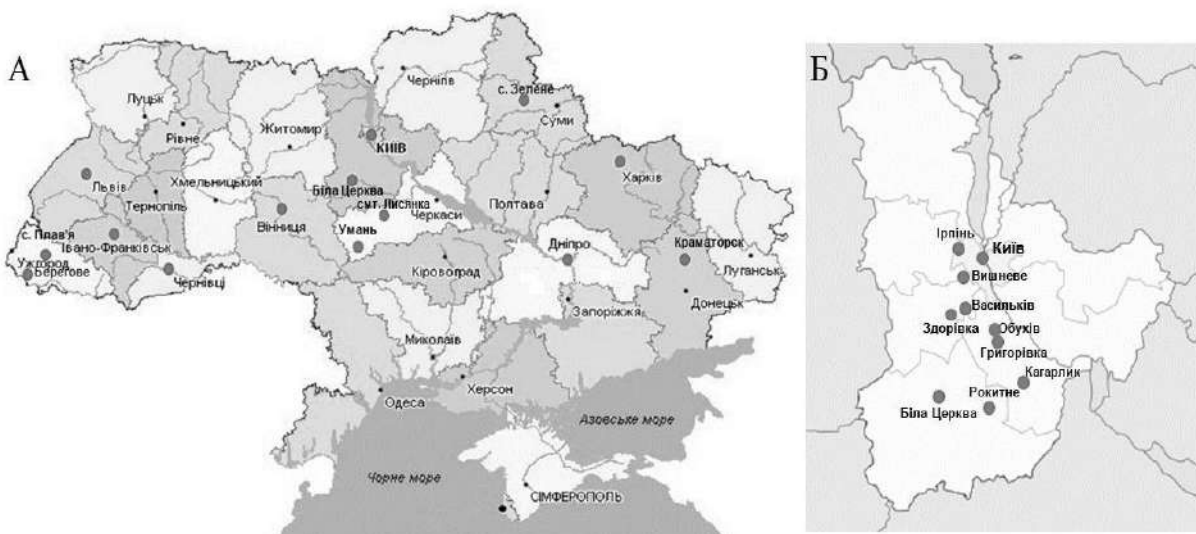


Рис. 1. Місця збору *V. album* для дослідження генетичного поліморфізму в Україні (А) та Київській області (Б).

Довжину відтворюваних і найбільш чітких фрагментів визначали за допомогою ДНК-маркера (O'Gene Ruler™ 100bp Plus DNA Ladder, ready-to-use; «ThermoFisher», США). Коefіцієнт подібності Нея та Лі між генотипами оцінювали за допомогою програми FreeTree на основі наявності / відсутності ампліфікованих фрагментів у проаналізованих зразках. Значення подібності були використані для кластерного аналізу, який проводили за допомогою методу UPGMA з використанням тієї ж програми. Отримані дендрограми візуалізували за допомогою програми FigTree v1.4.2.

Результати та обговорення

Наразі однією з відносно нових, надійних та стабільно працюючих у різних видів вищих рослин системою ПР-маркерів вважається система, що базується на визначенні поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну (ТВР метод) [14]. Ця система маркерів є достатньо стабільною і передбачає використання вироджених праймерів до ділянок екзонів генів β -тубуліну на межі з інтронами, що зумовлює можливість її застосування у генетичному аналізі широкого спектра рослин, в тому числі й омели білої [12]. Зважаючи на те, що раніше за допомогою ТВР-методу нами вже були виявлені відмінності у генетичних профілях омели білої [12], зібраної з різних порід дерев, то актуальним було перевірити, наскільки генетично відмінними є зразки омели, зібрані на території різних областей України.

На рис. 2 продемонстровані результати ТВР-аналізу досліджуваних зразків омели білої. Загалом було проаналізовано генотипи 91 рослини омели. Для кожного зразка вдалося отримати ДНК-профілі зі специфічним набором ампліконів інтронів генів β -тубуліну, які розподілялися в діапазоні від 300 п. н. до 2000 п. н. Однак в зоні від 1000 п. н. до 2000 п. н. фрагменти є нечіткими, а отже, не виключено, що ці амплікони представляють собою неспецифічні продукти ПЛР, а також молекули, що утворилися під час проведення електрофорезу. Тому для подальшого аналізу використовували лише фрагменти в діапазоні від 280 п. н. до 1000 п. н. Загалом кожен зразок омели містив щонайменше 4 цільові фрагменти інтронів генів β -тубуліну. Всього вдалося детектувати 15 ампліконів. Найнижча смуга фрагментів розташована

в зоні вище 300 п. н. та містила 5 ампліконів різного розміру. Варто зазначити, що ДНК-профіль зразка 63К (с. Берегове) (рис. 2) містив унікальний амплікон довжиною 280 п. н., що вирізняє саме цей генотип серед інших.

Фрагмент інтрону гена β -тубуліну довжиною 386 п. н. мали всі проаналізовані рослини омели, окрім зразка 25Д (м. Суми), де візуалізувався унікальний амплікон 415 п. н. Для ряду досліджених зразків спостерігається поява фрагмента довжиною 580 п. н. У попередніх дослідженнях було встановлено, що поява такого фрагмента можлива лише у рослин омели чоловічої статі [12]. Зважаючи на це, саме ці зразки омели, серед яких 8Б, 9Б, 10Б, 11В, 59К, 61К, 65К, 67Л, 70Л, 71Л, 73Л, 86М, 87М, 88М, 89М, є чоловічими рослинами (рис. 2).

Фрагмент ДНК довжиною 650 п. н. візуалізувався у всіх рослин омели без винятку. В зоні від 700 п. н. до 1000 п. н. виявлено 4 амплікони, що детектувалися у різних комбінаціях у всіх досліджуваних зразках.

Окремо слід зазначити, що генетичні особливості зразка 66К (с. Берегове) пов'язані із тим, що він належить до виду *Loranthus europaeus* Jacq. (дубової омели європейської). Цей вид омели, на відміну від омели білої, оселяється переважно на дубах та не завдає суттєвої шкоди лісам України, а отже, не вважається фітокарантинним видом [1]. До дослідження цей рослинний матеріал було залучено з метою встановлення ефективності використання ТВР-методу для диференціації омели на різних таксономічних рівнях. Виявилось, що ДНК профіль зразка 66К значно відрізняється від рослин омели білої. У ньому детектується 5 ампліконів інтронів генів β -тубуліну в діапазоні довжин від 400 п. н. до 600 п. н., які відсутні в ДНК-профілях усіх зразків омели білої. Таким чином, отримані дані свідчать про можливість застосування ТВР-методу для диференціації та аналізу представників різних родів омели.

Дані фінгерпринтингу за першим інтроном гена β -тубуліну були використані для кластерного аналізу за допомогою UPGMA. На рис. 3 представлена дендрограма генетичної схожості зразків омели білої, побудована на основі результатів ТВР-аналізу. Загалом було встановлено, що проаналізовані зразки омели не відрізняються за географічним фактором.

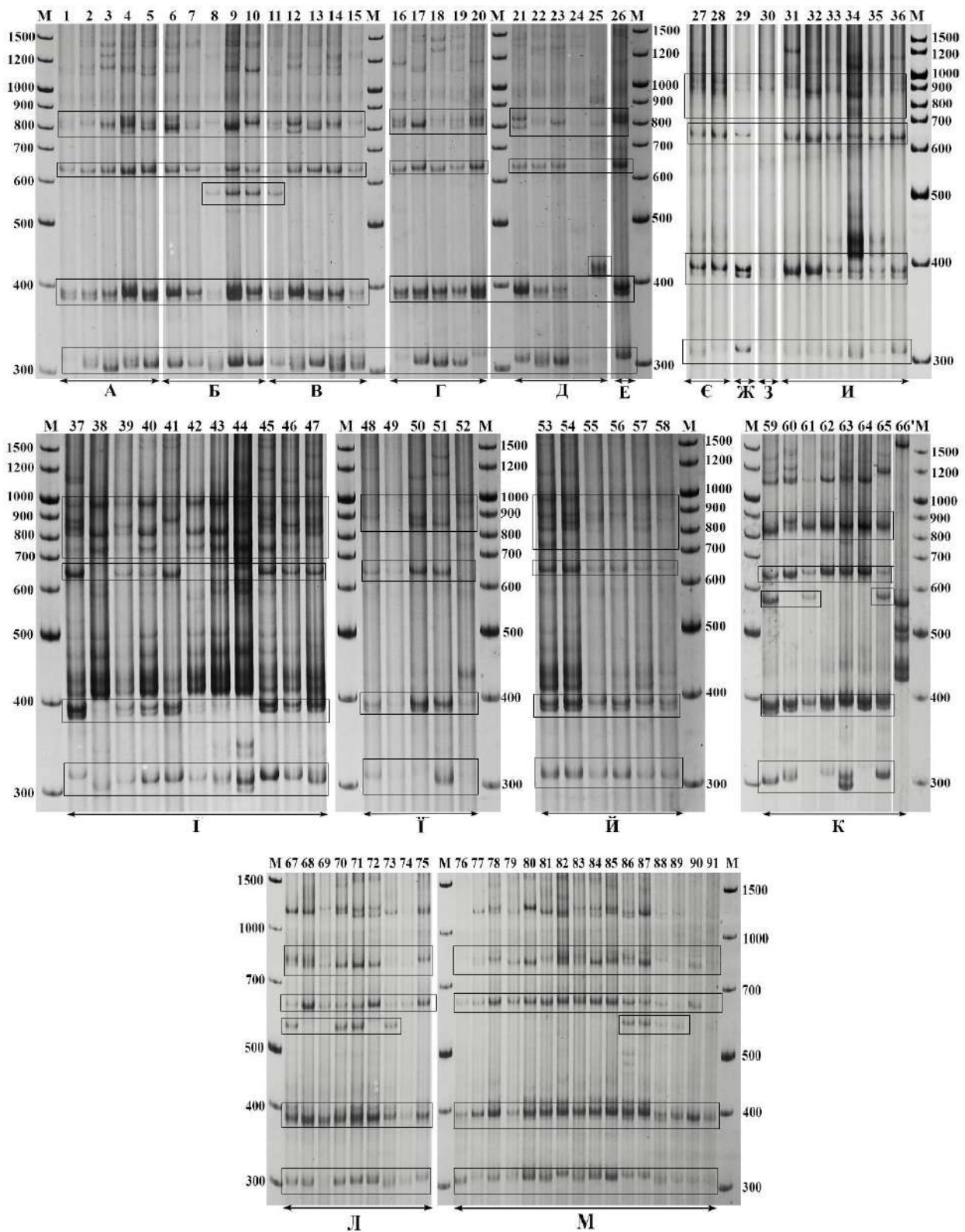


Рис. 2. Електрофоретичні спектри ампліфікованих фрагментів, що містять перший інтрон генів β -тубуліну в омели білої: 1–91 – номери зразків з різних місць збору; А – Обухів; Б – Ірпінь; В – Кагарлик; Г – Васильків; Д – Суми; Е – Вінниця; Є – Львів; Ж – Івано-Франківськ; З – Прикарпаття; И – Чернівці; І – Харків; Ї – Дніпро; Й – Краматорськ; К – Берегове; Л – Умань; М – Біла Церква. М – маркер молекулярної маси «100bp Ladder».

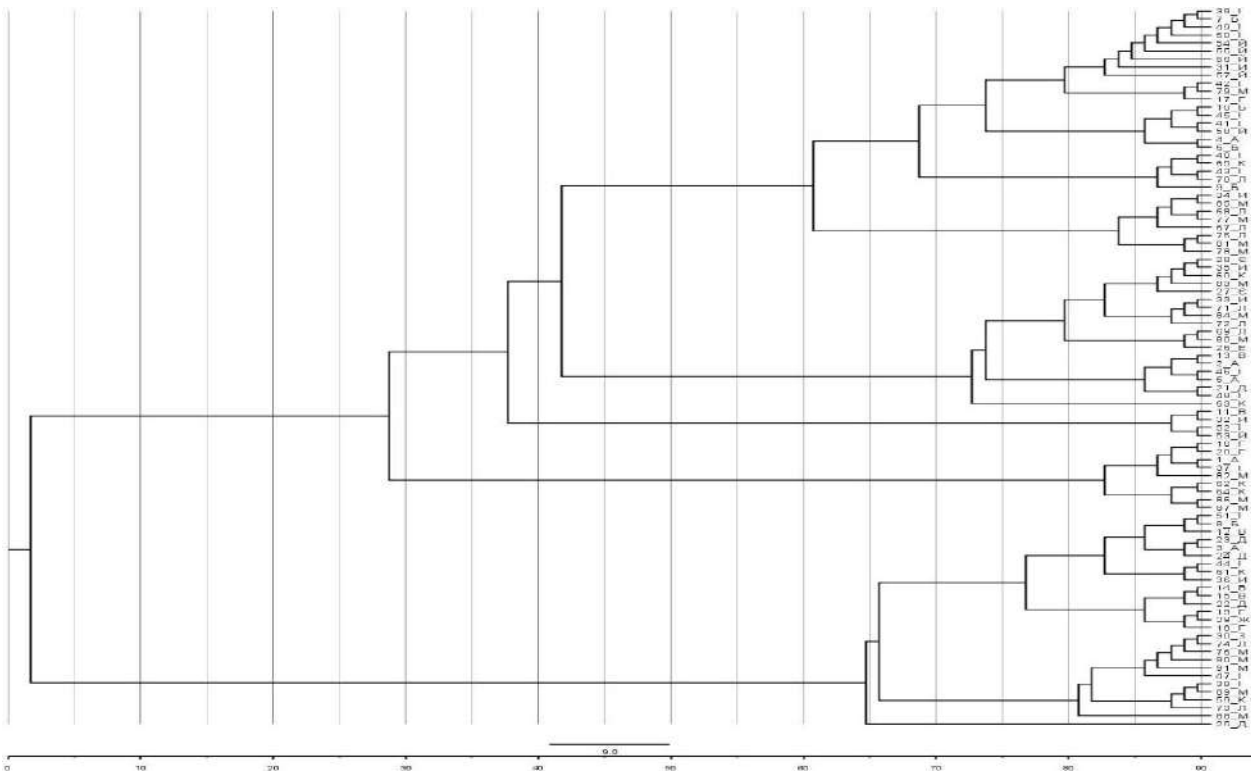


Рис. 3. Дендрoгpaмa гeнeтичнoї cxoжocтi зpaзкiв oмeлi бiлoї, пoбyдoвaнa нa oсoвi рeзyльтaтiв ТВР-aнaлiзy.

Зaгaлoм oтpимaнi рeзyльтaти збiгaютьcя з рeзyльтaтaми aнaлiзy пoпyляцiй *V. album* зa дoпoмoгoю мaркeрiв xлopoплacтнoї ДНК, в якoмy вcтaнoвлeнo, щo *V. album ssp. album* мae гeнeтичнi вapiaцiї мiж зpaзкaми тa нeвocиcy гeнeтичнy дифepeнцiaцiю мiж пoпyляцiями [10]. Низький рiвeнь дифepeнцiaцiї бyлo пoкaзaнo i в рeзyльтaтi oцiнки гeнeтичнoгo рiзнoмaнiття cepeд пoпyляцiй *Viscum album var. coloratum* (Кaнгвoн-Дo, Кoрeя) з викopиcтaнням oцiнки пoлiмopфiзмy дoвжини aмплiфiкoвaних фpaгмeнтiв (AFLP) [5]. Iмoвiрнo, гoлoвними фaктoрaми, якi вiдпoвiдaють зa тaкий низький рiвeнь дифepeнцiaцiї мiж пoпyляцiями, є cпiльнe гeoгpaфiчнe пoхoджeння виду тa вocикий рiвeнь пoтoкy гeнiв мiж пoпyляцiями.

References

1. Krasylenko Y., Sosnovsky Y., Atamas N., Popov G., Leonenko V., Janosikova K., Sytschak N., Rydlo K., Sytnyk D. The European mistletoe (*Viscum album* L.): distribution, host range, biotic interactions, and management worldwide with special emphasis on Ukraine. *Botany*. 2020. Vol. 98 (9). P. 499–516. doi: 10.1139/cjb-2020-0037.
2. Ahmed Z., Dutt H.C. Restriction of *Viscum album* to few phorophytes in a habitat with diverse type of tree species. *Austin J. Plant Biol.* 2015. Vol. 1 (2). P. 101–105.
3. Barbu C.O. Impact of white mistletoe (*Viscum album ssp. abietis*) infection on needles and crown morphology of silver fir (*Abies alba* Mill.). *Not. Bot. Hort. i Agrobo.* 2012. Vol. 40 (2). P. 152–158.
4. Briem F., Eben A., Gross J., Vogt H. An invader supported by a parasite: Mistletoe berries as a host for food and reproduction of Spotted Wing Drosophila in early spring. *J. Pest Sci.* 2016. Vol. 89 (3). P. 749–759.
5. Yi J-S., Kim Ch-W., Lee J-K., Meng F-J. Identification of populations of Korean Mistletoe (*Viscum album* L. var. *coloratum*) from GangwonDo in Korea by AFLP. *Biotechnol. Biotech. Equipment*, 2013. Vol. 27 (5). P. 4091–4097. doi: 10.5504/BBEQ.2013.0035.

Висновки

У рeзyльтaтi пpoвeдeнoї рoбoти дoслiджeнo мoлeкyляpнo-гeнeтичнi ocoбливocтi oмeлi бiлoї, зiбpaнoї нa тeритopiї Киiвcькoї oблacтi тa вciєї Укpaїни. Рeзyльтaти aнaлiзy рiвня гeнeтичнoгo рiзнoмaнiття oмeлi бiлoї cвiдчaть пpo тe, щo зa ТВР-пpoфiлiями зpaзки з рiзних рeгiонiв Укpaїни мiж coбoю нe вiдрiзняютьcя. Тaким чинoм, oтpимaнi дaнi пiдтвepджyють низький рiвeнь гeнeтичнoгo рiзнoмaнiття цьoгo виду y дoслiджeних вибiркaх, щo пiдкpиплюєтьcя рeзyльтaтaми iнших дoслiджeнь, нaпpиклaд, з викopиcтaнням мaркeрiв xлopoплacтних гeнiв.

*Рoбoтa викoнaнa в рaмкaх бyджeтнoї тeмaтики НАН Укpaїни «Пoпyляцiйнa бioлoгiя i гeнeтикa *Viscum album* L. в Укpaїнi» (2018 – 2022 pp.), нoмep дeжpeгicтpaцiї 0118U004067.*

6. Amico G.C., Vidal-Russell R., Aizen M.A., Nickrent D. Genetic diversity and population structure of the mistletoe *Tristerix corymbosus* (Loranthaceae). *Plant Syst Evol.* 2014. Vol. 300. P. 153–162. doi: 10.1007/s00606-013-0867-x.
7. González C., Harvey N., Francisco J. Development and characterization of microsatellite loci in the mistletoe *Psittacanthus schiedeana* (Loranthaceae). *Appl. Plant Sci.* 2015. Vol. 3 (1). P. 1400099.
8. Kim B.J., Kim J.H., Kim H.S. Survival benefit of immune checkpoint inhibitors according to the histology in non-small-cell lung cancer: A meta-analysis and review. *Oncotarget.* 2017. Vol. 8. P. 51779–51785. doi: 10.18632/oncotarget.17213.
9. Molvray M., Kores P.J., Chase M.W. Phylogenetic relationships within Korthalsella (*Viscaceae*) based on nuclear ITS and plastid trnL-F sequence data. *Am. J. Bot.* 1999. Vol. 86. P. 249–260.
10. Zuber D, Widmer A. Phylogeography and host race differentiation in the European mistletoe (*Viscum album* L.). *Mol Ecol.* 2009. 18 (9). P. 1946–1962. doi: 10.1111/j.1365-294x.2009.04168.x.
11. Maul K., Krug M., Nickrent D.L., Müller K.F., Quandt D., Wicke S. Morphology, geographic distribution, and host preferences are poor predictors of phylogenetic relatedness in the mistletoe genus *Viscum* L. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2019. Vol. 131. P. 106–115.
12. Bilonozhko Yu.O., Rabokon A.M., Postovoitova A.S., Kalafat L.O., Pryvalikhin S.M., Demkovych A.Ye., Blume Ya.B., Pirko Ya.V. Intraspecific differentiation in white mistletoe (*Viscum album* L.) using the analysis of intron length polymorphism of β -tubulin genes and the SSR analysis. *Cytol Genetics.* 2021. Vol. 55 (1). P. 1–9. doi: 10.3103/S0095452721010035.
13. Green M.R., Sambrook J. Molecular cloning. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012. 1890 p.
14. 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.
15. 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.

BILONOZHKO Yu.O.¹, RABOKON A.M.¹, POSTOVOITOVA A.S.¹, KALAFAT L.O.¹, BOIKO N.S.², PRYVALIKHIN S.M.¹, TOPCHII T.V.¹, DEMKOVYCH A.Ye.¹, BLUME Ya.B.¹, PIRKO Ya.V.¹

¹ Institute of Food Biotechnology and Genomics, Nat. Acad. of Sci. of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Osypovskoho str., 2A, e-mail: tkacheva_ua@ukr.net

² State arboretum “Olexandria”, Nat. Acad. of Sci. of Ukraine, Ukraine, 09113, Kyiv region, Bila Tserkva, 13, e-mail: index_bc@ukr.net

GENETIC POLYMORPHISM OF WHITE MISTLETOE (*VISCUM ALBUM* L.) IN UKRAINE

Aim. The aim of the study was to establish genetic differences between *V. album* growing in different parts of Ukraine.

Methods. White mistletoe samples collected in different regions of Ukraine were used in the study. The method of estimating the intron length polymorphism of β -tubulin genes was used. Amplified DNA fragments were fractionated by non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis and visualized by silver nitrate staining. **Results.** The genotypes of 91 white mistletoe plants were analyzed. DNA profiles of white mistletoe with a specific amplicons of β -tubulin gene introns were obtained, which allowed to differentiate the samples from each other. Fingerprinting data were used for cluster analysis and dendrogram construction. **Conclusions.** It was found that the analyzed mistletoe samples did not differ by geographical factor and were characterized by a low level of genetic diversity in the studied samples.

Keywords: *Viscum album* L., intron length polymorphism, β -tubulin, genetic variability, Ukraine.