

16. Koczak S.D., Haas N.A., Hussey P.J., Silflow C.D., Snustad D.P. The small genome of *Arabidopsis* contains at least six expressed  $\alpha$ -tubulin genes // Plant Cell. – 1992. – 4. – P. 539–547.
17. Blume Ya.B., Baird W.V., Yemets A.I., Breviario D. The Plant Cytoskeleton: Key Tool for Agro-Biotechnology. – Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, NY, 2008. – 457 p.

**BAYER G.YA., PYDIURA N.A., YEMETS A.I., PIRKO YA.V., BLUME YA.B.**

*Institute of Food Biotechnology and Genomics NAS of Ukraine,  
Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2A, e-mail: galinabayer@mail.ru*

#### **BIOINFORMATICS SEARCH OF THE TUBULINE GENES IN LINUM GENOME**

**Aims.** Flax (*Linum usitatissimum*) is the most important industrial crop that covers human needs in the cellulose-rich fibers of high quality. Molecular mechanisms of cellulose biosynthesis are still poorly understood, but a basic component consisting of 36-polypeptides is already known. It is cellulose synthase complex associated with cytoskeleton elements. Obviously, both physical and chemical properties of cellulose biopolymer as well as the characteristics of newly-formed fiber depend on the genes expression during the cell wall biogenesis. **Methods.** Using *Arabidopsis* tubulin genes we have performed the similarity search of genes via TBLASTN predicted proteins of the *Linum* genome available at Phytozome v9.1. **Results.** A total of 17 tubulin gene candidates were found in *Linum* genome. Using ClustalW software we have made a multiple amino acid sequence alignment of the tubulin type specific regions of these genes with the sequences of *Arabidopsis* tubulin genes and obtained a phylogenetic tree for these sequences. **Conclusions.** We provide 17 genes of  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin in flax genome. Homology of amino acid sequences to sequences annotated *A. thaliana* genes flax able to carry up to 7 types of isoforms of  $\alpha$ -tubulin and 10 isoforms of  $\beta$ -tubulin.

*Key words:* *Linum usitatissimum*,  $\alpha$ -tubulin,  $\beta$ -tubulin, gene.

**УДК 575.2:634.942 (477.62)**

**ДЕМКОВИЧ А.Е., КОРШИКОВ И.И., МАКОГОН И.В.**

*Донецкий ботанический сад НАН Украины,  
Украина, 83059, г. Донецк, пр. Ильича, 110, e-mail: dbsgenetics@gmail.com*

#### **ПОЛИМОРФИЗМ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО (*QUERCUS ROBUR* L.) НА ДОНЕЦКОМ КРЯЖЕ ПО МИКРОСАТЕЛЛИТНЫМ ЛОКУСАМ**

Аборигенный вид украинской флоры и одна из главных лесообразующих пород Украины – дуб черешчатый (*Quercus robur* L.) – отличается высоким адаптационным потенциалом. Об этом свидетельствует его природная распространенность: от севера Скандинавии до юга Европы, от Пиренейского полуострова до Уральских гор. *Q. robur* – анемофильный вид с высоким уровнем ауткроссинга, доля самоопыления у растений в популяциях составляет 2–5% [1]. При этом жизнеспособная пыльца может распространяться до 80 км, обеспечивая опосредованный поток генов [2]. Изменчивость *Q. robur* давно является предметом исследований [3], а генетическое разнообразие с использованием молекулярных маркеров изучается в пределах ареала вида в Европе уже более 20 лет [4, 5]. В этом плане *Q. robur* на территории Украины изучен фрагментарно и то

зарубежными учеными, которые исследовали его популяционно-генетическую изменчивость в пределах определенной части ареала. Краевые популяции, находящиеся вне зоны экологического оптимума, где возможен дрейф генов, в поле зрения пока не попадали. На территории Украины природные дубравы встречаются в степной зоне, где их разнообразие лимитировано действием неблагоприятных факторов среды и влиянием человека.

В изучении популяционно-генетического разнообразия древесных растений активно применяются микросателлитные локусы. Их рассматривают в качестве эффективных маркеров, позволяющих проводить разносторонние исследования генетической изменчивости видов рода *Quercus* L. [2, 6, 7]. Многолокусный анализ микросателлитов, которые наследуются кодоминантно, позволяет идентифицировать каждый из двух аллелей

локуса, т.е. определить является ли исследуемая особь гомо- или гетерозиготной по этому локусу. В этом микросателлитный анализ имеет явное преимущество перед другими методами, например, RAPD и AFLP. Однако применение микросателлитов в анализе генетической изменчивости *Q. robur* в ряде случаев затруднено из-за присутствия в популяциях по многим локусам null-аллелей, которые не амплифицируются [7]. В анализе молекулярно-генетической изменчивости видов рода *Quercus* на основе ДНК чаще используют ядерные микросателлитные маркеры *ssrQrZAG* [2, 7], *ssrQpZAG* [8], *guru-GA* [9].

Цель работы – анализ генетического полиморфизма *Q. robur* в популяциях Донецкого края по четырем ядерным микросателлитным локусам.

#### Материалы и методы

Объектом исследований послужили растения *Q. robur* из двух популяций. В первой (НПП «Святые горы», пойменный лес на левом берегу р. Северский Донец, N 49°1'42", E 37°33'44" – N 49°1'43", E 37°32'19", Демкович А.Е.) исследовали 14 деревьев, во второй (Певчая балка на юго-восток от г. Зугреса, напротив с. Певчее, на склонах, N 47°59,663', E 38°18,428'; байрачный лес, на каменистых склонах, N 47°59,834', E 38°18,663'; 03.07.2013, Остапко В.М.) – 5 деревьев. ДНК получали из высушенных листьев гербарных образцов с использованием коммерческих наборов для выделения ДНК из животных тканей «Diatom DNA prep» (Изоген, Россия). Предварительно листья очищали от загрязнений, при необходимости проводили отмывку 96%-ным этанолом. Для сорбции фенольных соединений из растительных тканей применялся высокомолекулярный поливинилпирролидон (ПВП, K90), 7%-ный раствор которого добавлялся до начала гомогенизации на первом шаге протокола. Использовали четыре пары праймеров: GA-1C08, GA-1F02, GA-1I15, GA-0C19 [9] (табл.). Для каждого из анализируемых образцов ДНК была проведена полимеразная цепная реакция (ПЦР) при предварительно оптимизированной температуре с каждой парой праймеров к соответствующему микросателлитному локусу. Полученные ампликоны разделяли в вертикальном неденатурирующем 7%-ом полиакриламидном геле с последующей окраской бромистым этидием. В качестве

стандарта молекулярного веса использовали O'Range ruler 200 bp ДНКмаркер (Fermentas). Изображения гелей, полученные с помощью цифрового фотоаппарата или сканера, обрабатывали в свободно доступном программном обеспечении «GelAnalyser 2010a» [10], статистическую обработку данных проводили с помощью «GenAlEx» [11], «PopGen» [12].

#### Результаты и обсуждение

Для четырех ядерных микросателлитных локусов растений *Q. robur* были получены интерпретируемые спектры продуктов амплификации (рис.). Размеры ампликонов четырех локусов у *Q. robur* Донецкого края были близкими к ранее обнаруженным у этого вида в европейской части ареала [13]. Общее количество выявленных аллелей – 24, что на шесть аллелей больше чем, например, в популяциях этого вида во Франции по данным локусам (табл.). Одинаковое количество аллелей (2) у растений обеих частей ареала выявлено только по наименее изменчивому локусу – GA-1I15. Уровень наблюдаемой гетерозиготности по четырем микросателлитным локусам у *Q. robur* Донецкого края был ниже, чем в популяциях Франции. Если это снижение гетерозиготности для локуса GA-1C08 составило 21,2%, то по другим локусам оно было заметно больше: GA-1F02 = 53,0%, GA-1I15 = 70,6% и GA-0C19 = 83,6%. Одной из причин низкой изменчивости *Q. robur* украинской части ареала может быть проявление эффекта основателя в анализируемых выборках.

Другой возможной причиной обнаруженного по микросателлитным локусам избытка гомозигот является невозможность точного учета в ограниченной выборке всех гетерозигот по null-аллелям. Для их выявления необходимо заметно увеличить объем выборки, что позволит математически оценить их частоту. Так, в исследованиях изменчивости *Q. robur* по 6 из 32 микросателлитных локусов выявлены null-аллели. Однако обнаружены они были в результате аналитического скрещивания [7]. Генная множественность *Q. robur* в 12 популяциях Боснии и Герцеговины, исследуемых по другим микросателлитным локусам (QpZAG), была значительно выше, чем на основе анализируемых нами локусов в популяциях Донецкого края.

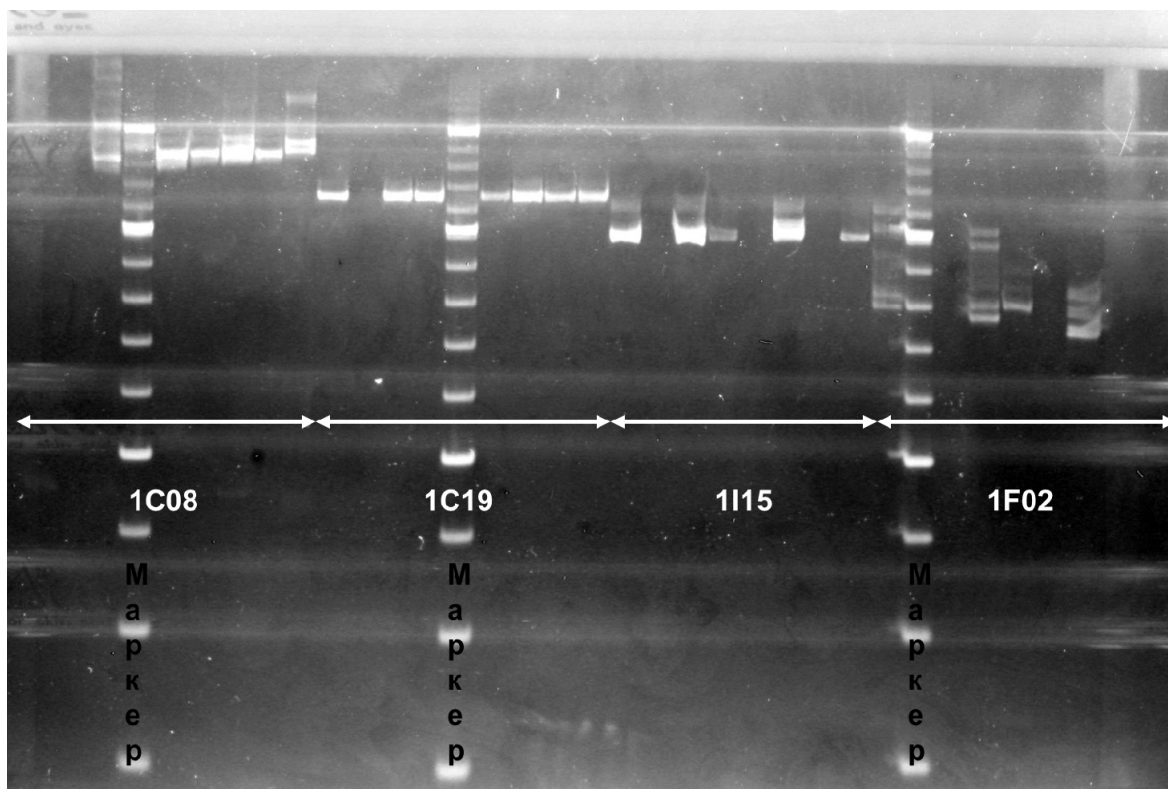


Рис. Электрофоретические варианты ампликонов по четырем ядерным микросателлитным локусам *Quercus robur* L.

Таблица. Показатели генетической изменчивости по четырем микросателлитным локусам *Quercus robur* L. на Донецком кряже

Локус	Последовательность праймеров (5'-3')	Температура отжига (°C)	Количество аллелей Na	Гетерозиготность		Размеры аллелей (пар нуклеотидов)
				ожидаемая H <sub>E</sub>	наблюдаемая H <sub>O</sub>	
quru-GA-1C08	F: TCCCAATCGATGTTTGATAA GG	60	<u>9</u>	<u>0,78</u>	<u>0,26</u>	<u>259–284</u>
	R: GGGCTCTTGAGAGGATGTA GG		7	-	0,33	224–276
quru-GA-0C19	F: TTAGCTTTTACGCAGTGTCG	60	<u>4</u>	<u>0,28</u>	<u>0,11</u>	<u>216–241</u>
	R: CGGCTTCGGTTTCGTC		2	-	0,67	216–226
quru-GA-1115	F: CAGCCTCATCGATTACCCCA AAC	50	<u>2</u>	<u>0,05</u>	<u>0,05</u>	<u>203–210</u>
	R: GGTCGCTGAGGGGAAAG		2	-	0,17	196–198
quru-GA-1F02	F: CCAATCCACCCTTCCAAGTT CC	50	<u>9</u>	<u>0,759</u>	<u>0,47</u>	<u>148–182</u>
	R: TGGTTGTTTTGCTTTATTCA GCC		7	-	1,00	154–168

Примечания: курсивом – литературные данные [13]; подчеркнуты оценки для *Q. robur* украинской части ареала.

В выборке 215 деревьев из 12 популяций *Q. robur* на Балканском полуострове выявлено 108 аллелей. При этом средняя наблюдаемая гетерозиготность ( $H_O$ ) варьировала между популяциями от 0,563 до 0,833, хотя всегда была ниже ожидаемой гетерозиготности ( $H_E$ ) [8]. Значения коэффициента инбридинга  $F_{IS}$  изменялись в пределах 0,074–0,362, составив в среднем 0,234. В популяциях *Q. robur* Донецкого края гетерозиготность деревьев по микросателлитным локусам составила в среднем 22,0%, во французских популяциях по этим локусам – 54,0% [13], что меньше, чем у *Q. robur* на Балканском полуострове – 67,4% [8]. Значение  $F_{IS}$  для исследуемой нами выборки *Q. robur* равнялось 0,43. Для трех микросателлитных локусов этой выборки установлено достоверное отклонение фактического распределения генотипов от теоретически ожидаемого согласно закону Харди-Вайнберга из-за избытка гомозигот. Средний коэффициент инбридинга в популяциях *Q. robur* из Греции, Болгарии, Германии, северной Британии варьировал от 0,100 до 0,590 [14–16]. Установленный нами с помощью четырех микросателлитных локусов уровень гетерозиготности *Q. robur* соответствовал фактически тому, что выявляется с помощью аллозимных маркеров. Так, например, в насаждениях *Q. robur* в Белорусском Полесье среднее значение  $H_O$ , определенное по 13 аллозимным локусам,

равнялось 0,227 [17]. В результате анализа ядерной ДНК методом PCR–RFLP девяти генетических резерватов и насаждений *Q. robur* в Беларуси установлено, что средние значения  $H_O$  и  $H_E$  варьировали соответственно 0,243–0,250 и 0,254–0,265 [18]. На Южном Урале средние значения  $H_O$  и  $H_E$ , определенные с помощью аллозимных локусов, были 0,248 и 0,323, а в случае использования девяти микросателлитных локусов QpZAG эти значения существенно возрастали: 0,746–0,847 и 0,685–0,805 соответственно [19]. Для двух популяций *Q. robur* на восточной границе природного распространения (Башкирское Зауралье и макросклоны Южно-Уральских гор) средние значения  $H_O$  и  $H_E$ , установленные в анализе изменчивости 17 аллозимных локусов, составили соответственно 0,138–0,145 и 0,118–0,124. Для этих популяций был свойствен некоторый избыток гетерозигот [20].

#### Выводы

На Донецком крае *Q. robur* отличается высоким уровнем генной множественности и средним уровнем генного разнообразия. Необходимы более детальные исследования популяционно-генетического разнообразия *Q. robur* как в степной зоне юго-востока Украины, так и в пределах всей украинской части ареала для создания генетических резерватов. Для таких исследований эффективными могут быть ядерные микросателлитные локусы.

#### Литература

1. Petit R.J., Csaikl U.M., Bordács S., Burg K., Coart E., Cottrell J., Van Dam B., Deans J.D., Dumolin-Lapigüe S., Fineschi S., Finkeldey R., Gillies A., Glaz I., Goicoechea P.G., Jensen J.S., Кцниг A.O., Lowe A.J., Madsen S.F., Мбтыбс G., Munro R.C., Olalde M., Pemonge M.-H., Popescu F., Slade D., Tabbener H., Turchini D., Sven de Vries G.M., Ziegenhagen B., Kremer A. Chloroplast DNA variation in European white oaks // For. Ecol. Manag. – 2002. – 156, № 1–3. – P. 5–26.
2. Buschbom J., Yanbaev Y., Degen B. Efficient Long-Distance Gene Flow into an Isolated Relict Oak Stand // J. of Heredity. – 2011. – 102, № 4. – P. 464–472.
3. Семериков Л.Ф. Изменчивость дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) на восточной границе ареала // Экология. – 1976. – № 5. – С. 13–21.
4. Kremer A., Petit R.J. Gene diversity in natural populations of oak species // Ann. Sci. For. – 1993. – 50 (Suppl. 1 “Genetics of Oaks”). – P. 186–202.
5. Hampe A., Pemonge M.-H., Petit R.J. Efficient mitigation of founder effects during the establishment of a leading-edge oak population // Proc. Biol. Sci. – 2013. – 280, № 1764. – P. 20131070.
6. Muir G., Schlütterer C. Evidence for shared ancestral polymorphism rather than recurrent gene flow at microsatellite loci differentiating two hybridizing oaks (*Quercus* spp.) // Mol. Ecol. – 2005. – 14, № 2. – P. 549–561.
7. Kampfner S., Lexer C., Glüssl J., Steinkellner H. Characterization of (GA)<sub>n</sub> microsatellite loci from *Quercus robur* // Hereditas. – 1998. – 129, № 2. – P. 183–186.
8. Ballian D., Belletti P., Ferrazzini D., Boguni F., Kajba D. Genetic variability of Pedunculate Oak (*Quercus robur* L.) in Bosnia and Herzegovina // Periodicum Biologorum. – 2010. – 112, № 3. – P. 353–362.
9. Aldrich P.R., Michler C.H., Sun W., Romero-Severson J. Microsatellite markers for northern red oak (Fagaceae: *Quercus rubra*) // Mol. Ecol. – 2002. – 2, № 4. – P. 472–474.

10. GelAnalyser [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [http://www.GelAnalyser.com /downloads/ users\\_ manual\\_2010.pdf](http://www.GelAnalyser.com/downloads/users_manual_2010.pdf)
11. Peakall R., Smouse P. GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // *Mol. Ecol.* – 2006. – 6. – P. 288–295.
12. POPGENE [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene\\_download.html](http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene_download.html)
13. Aldrich P.R., Jagtap M., Michler C.H., Romero-Severson J. Amplification of North American red oak microsatellite markers in European white oaks and Chinese chestnut // *Silvae Genet.* – 2003. – 52, № 3–4. – P. 176–179.
14. 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 // *For. Ecol. Manag.* – 2010. – 259, № 10. – P. 2026–2035.
15. 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 oakwoods differing in population history // *For. Ecol. Manag.* – 2003. – 176, № 1–3. – P. 287–303.
16. 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.) [Электронный ресурс] // *For. Ecol. Manag.* – 2013. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foreco.2013.10.027>
17. Каган Д.И. Популяционно-генетическая структура дуба черешчатого в лесосеменных плантациях и насаждениях Белорусского Полесья: автореф. дис. на соискание уч. степени кандидата биол. наук: спец. 06.03.01 «Лесные культуры, селекция, семеноводство». – Гомель, 2012. – 23 с.
18. Ковалевич О.А. Геногеография дуба черешчатого на территории Беларуси по данным анализа хлоропластной ДНК: автореф. дис. на соискание уч. степени кандидата биол. наук: спец. 06.03.01 «Лесные культуры, селекция, семеноводство». – Гомель, 2013. – 24 с.
19. Габитова А.А. Дуб черешчатый (*Quercus robur* L.) на Южном Урале: эколого-генетический анализ популяционной структуры: автореф. дис. на соискание уч. степени кандидата биол. наук: спец. 03.02.08 «Экология» (биологические науки) и 03.02.07 «Генетика». – Уфа, 2012. – 18 с.
20. Муллагулов Р.Ю., Редькина Н.Н., Янбаев Ю.А. Аллозимная изменчивость дуба черешчатого *Quercus robur* L. (Fagaceae) в изолированных популяциях на восточной границе ареала // *Вестник ОГУ.* – 2008. – № 81. – С. 107–110.

**ДЕМКОВИЧ А.Е., KORSHIKOV I.I., MAKOGON I.V.**

*Donetsk Botanical Garden, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 83059, Donetsk, Pr. Illicha, 110, e-mail: dbsgenetics@gmail.com*

**POLYMORPHISM OF *QUERCUS ROBUR* L. INVESTIGATED BY MICROSATELLITE LOCI IN DONETSKIY KRYAZH**

**Aims.** Analysis of tree genetic polymorphism at four nSSR loci in two highland populations of *Quercus robur* L. in Donetskii Kryazh. **Methods.** To determine plant genotype, we used electrophoretic analysis in polyacrylamide gel of PCR-products of four nSSR loci. **Results.** There were detected 2 to 9 (total 24) alleles at the investigated loci. Observed heterosigosity ( $H_O$ ) = 0.22, expected ( $H_E$ ) = 0.47. A significant excess of homozygous genotypes was detected. **Conclusions.** Microsatellite loci provide more exact determination of the allele diversity and heterozygosity of *Q. robur*.

*Key words:* *Quercus robur* L., population, polymorphism, microsatellite loci, Donetskii Kryazh.

**УДК 581.1**

**ЖУК О.И.**

*Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, Украина, 03022, г. Киев, ул. Васильковская, 31/17, e-mail: zhuk\_bas@voliacable.com*

**ЭВОЛЮЦИЯ СИГНАЛЬНЫХ СИСТЕМ ФИТОГОРМОНОВ РАСТЕНИЙ**

В процессе эволюции растительных организмов сформировались сложные сигнальные системы, координирующие экспрессию генов, клеточную активность в

процессе роста и развития, формирование ответа на стресс [1]. Критической детерминантой эволюции наземных растений является необходимость формирования органов для