

УДК 575.174.015.3

DOI: 10.31651/2076-5835-2018-1-2022-1-74-84

Прокоп'як Мар'яна Зіновіївна

кандидат біологічних наук, доцент
Тернопільський національний педагогічний
університет імені В. Гнатюка
mosula@chem-bio.com.ua

ORCID <https://orcid.org/0000-0002-2846-4208>

Флячок Адріана Ігорівна

магістрантка хіміко-біологічного факультету
Тернопільський національний педагогічний
університет імені В. Гнатюка
adrianaflyiachock@chem-bio.com.ua

ORCID <https://orcid.org/0000-0002-7279-8643>

Майорова Оксана Юріївна

кандидат біологічних наук, викладач
Тернопільський національний педагогічний
університет імені В. Гнатюка
majorova@chem-bio.com.ua

ORCID <https://orcid.org/0000-0002-1927-4621>

Грицак Людмила Русланівна

доктор біологічних наук, професор
Тернопільський національний педагогічний
університет імені В. Гнатюка
hrytsak1972@gmail.com

ORCID <https://orcid.org/0000-0002-2872-5201>

Дробик Надія Михайлівна

доктор біологічних наук, професор
Тернопільський національний педагогічний
університет імені В. Гнатюка
drobyk.n@gmail.com

ORCID <https://orcid.org/0000-0002-8927-8687>

ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ ПОКАЗНИКІВ ІНФОРМАТИВНОСТІ ISSR-МАРКЕРІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ ГЕНЕТИЧНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ РОСЛИН

Оцінено інформативність ISSR-маркерів і продемонстровано їх ефективність для оцінки генетичного різноманіття рослин з семи популяцій *Gentiana lutea* L. з Українських Карпат. За усіма показниками (ЗКА, КПА, PIC, MI, R_p, D) найбільш інформативними були UBC#811, UBC#807, а найменш – UBC#827 і UBC#889. Відношення між усіма параметрами оцінки ефективності праймерів характеризувалося високим рівнем достовірності ($p < 0,001$, $p = 0,05$), лише у деяких випадках воно було вищим, ніж 5 %. Оцінено рівень генетичного поліморфізму *G. lutea* за UBC#807, UBC#811 і UBC#840.

Ключові слова: *Gentiana lutea* L.; генетична різноманітність; роздільна здатність; розпізнавальна здатність; кількість поліморфних ампліконів.

Постановка проблеми. Аналіз останніх публікацій

До сьогоднішнього дня змінився ряд поколінь різних типів молекулярно-генетичних маркерів. Кожний із них має свої позитивні й негативні характеристики, але у цілому вони доповнюють один одного [1–3]. У молекулярній генетиці однією із центральних проблем є вивчення поліморфізму геномів рослин, оскільки її вирішення

має як фундаментальне, так і практичне значення [1]. На сьогодні методи молекулярно-генетичного аналізу на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) є одними з найефективніших для вивчення генетичного поліморфізму тварин і рослин. Маркерна система нуклеотидної послідовності ДНК дозволяє тестувати генетичну різноманітність на рівні генів.

Створення молекулярних маркерів і їх використання у біологічних дослідженнях дозволило детальніше вивчити генетичний поліморфізм, а також дослідити рівень спорідненості на між- і внутрішньовидовому рівнях. ДНК-маркери використовуються з різними цілями (для генетичного фінгерпринтування, ідентифікації сортів, картування хромосом, ідентифікації генів та їх клонування, проведення філогенетичного аналізу, паспортизації організмів й ін.) [1].

Вивчаючи генетичну структуру популяцій, можна отримати інформацію про унікальність їх генофонду, а також дослідити рівень внутрішньопопуляційного і внутрішньовидового поліморфізму, встановити напрямок розвитку генетичних процесів у них. Детальне вивчення популяційно-генетичної структури з використанням ДНК-маркерів дозволить прогнозувати можливі порушення її стабільного відтворення. Для проведення цих досліджень насамперед необхідно підібрати оптимальні високоінформативні молекулярно-генетичні маркери і оцінити рівень їхньої інформативності і ефективності [1, 2]. Під час вивчення генетичного поліморфізму ефективним є використання різноманітних ДНК-маркерів, які пов'язані з різними послідовностями геному. Водночас, важливим також є зниження вартості проведення ПЛР-аналізів, що пов'язане із залученням невеликої кількості праймерів, однак вони повинні бути інформативними.

Кількісно ступінь поліморфізму зазвичай вимірюється двома різними показниками: гетерозиготність (heterozygosity, H) і величиною інформаційного поліморфізму (polymorphism information content, PIC). Маркерні системи розрізняють за величиною їх інформативності, що, у свою чергу, залежить від ступеня їхнього поліморфізму [4]. Гетерозиготність локуса (H) визначається як ймовірність того, що в популяції особина гетерозиготна за цим локусом. PIC визначається здатністю маркера визначати поліморфізм у популяції залежно від кількості виявлених алелей і розподілу їх частот. Максимальними значеннями для H і PIC є 0,5 для домінантних маркерів, 1 – для кодомінантних [5].

Вченими запропоновано індекс інформативності маркерів (marker index, MI), який дорівнює добутку PIC на кількість поліморфних локусів [6]. Як показник здатності праймерів чи систем ПЛР-маркерів диференціювати зразки між собою створили показник роздільної здатності (resolving power, R_p) [7]. Розпізнавальна здатність (discrimination power, D) відображає ймовірність того, що два довільно обрані зразки мають різні набори ПЛР-продуктів і відрізняються один від одного [8].

Мета. Підібрати найінформативніші ISSR-праймери для оцінки генетичного поліморфізму популяцій рослин, на прикладі представників роду *Gentiana* L., а також визначити найефективніші показники інформативності ДНК-маркерів.

Матеріали та методи дослідження

Матеріалом для дослідження обрано дикорослі рослини із шести природних (гг. Шешул-Павлик (Sh), пол. Лемська (Lem), г. Гутин Томнатик (HT), гг. Трояска-Татарука (Tr), пол. Крачунеска (Kr)), пол. Красна (хр. Красна) (Krs) і однієї штучно створеної (г. Пожижевська (Pozh)) популяцій *G. lutea* з Українських Карпат. Із різних частин кожної популяції було відібрано по 15 зразків листкової пластинки, окрім двох популяцій: на г. Гутин Томнатик, з якої, у зв'язку з малою чисельністю, відібрано 11, та з популяції на пол. Красна – 6. У роботі за основу було взято метод виділення ДНК

Rogers S.O. і Bendich A.J. (1985), модифікований Спірідонову К.В. (2000). Протестовано 13 ISSR-праймерів, а для роботи із зразками ДНК *G. lutea* було відібрано 9 ISSR-праймерів (UBC#807, UBC#809, UBC#810, UBC#811, UBC#827, UBC#835, UBC#840, UBC#857, UBC#889) [11]. Ампліфікацію проводили у термоциклері Терцик МС2. Для проведення ISSR-ПЛР використовували температурний режим: 95°C – 2 хв, 35 циклів (94°C – 30 с, 53°C – 30 с, 72°C – 1,5 хв), 72°C – 2,5 хв. Продукти ПЛР фракціонували електрофорезом у 1,3 % агарозному гелі в 1 × SB-буфері (5 мМ Na₂B₄O₇, рН 8,5). Для статистичної оцінки даних ПЛР-аналізу застосовували програми TotalLab TL120 (Nonlinear Dynamics), FAMD 1.25, Mega 6, GenAlEx 6.5. Розподіл загальної генетичної мінливості між популяціями та в їхніх межах вивчали методом аналізу молекулярної варіанси (AMOVA).

Для оцінки інформативності праймерів розраховували наступні показники: загальну кількість ампліконів (ЗКА), кількість поліморфних ампліконів (КПА), показник інформативності (PIC), індекс інформативності маркерів (MI), роздільну здатність (Rp), розпізнавальну здатність (D).

Зв'язок між показниками інформативності праймерів розраховували за допомогою коефіцієнта кореляції Спірмена. Для обрахунку показників інформативності праймерів також було використано програму iMEC.

Результати та їх обговорення

Відбір праймерів для дослідження генетичного різноманіття *G. lutea* було розпочато з попереднього скринінгу, за допомогою якого оцінювали якість і кількість продуктів ампліфікації. У результаті попереднього скринінгу 9 з 13 ISSR-праймерів (69 %) виявилися найбільш інформативними і були обрані для подальшої оцінки генетичного поліморфізму *G. lutea*. Характеристики праймерів за продуктами, які вони синтезують представлені у таблиці 1, 2.

Використані праймери забезпечували ампліфікацію фрагментів у межах: 400–3200 п.н. Загальна кількість ампліконів і кількість поліморфних ампліконів на праймер є важливими показниками придатності праймерів і маркерних систем загалом для оцінки генетичної різноманітності. Мономорфні праймери вважаються не інформативними.

У результаті полімеразної ланцюгової реакції з використанням 9 ISSR-праймерів для 92 зразків *G. lutea* із семи популяцій (г. Гутин Томнатик, пол. Лемська, пол. Красна, пол. Крачунеска, г. Трояска-Татарука, г. Шешул-Павлик, г. Пожижевська) отримано 786 продуктів ампліфікації.

Кількість продуктів на праймер (ЗКА) становила для праймера UBC#807 від 13 до 21, у середньому – 15,4; для праймера UBC#809 від 8 до 16, у середньому – 11,4; для праймера UBC#810 від 7 до 15, у середньому – 9,9; для праймера UBC#811 від 12 до 23, у середньому – 16,6; для праймера UBC#827 від 6 до 11, у середньому – 8,6; для праймера UBC#835 від 7 до 16, у середньому – 12,4; для праймера UBC#840 від 7 до 17, у середньому – 12,4; для праймера UBC#857 від 8 до 14, у середньому – 11; для праймера UBC#889 від 12 до 17, у середньому – 14,9.

Найбільшу кількість ампліконів, синтезовано з використанням праймера UBC#811 (згідно даних дослідження семи популяцій *G. lutea* у середньому 16,6), а найменшу – з використанням UBC#827 (табл. 1).

Найбільшу кількість поліморфних фрагментів (КПА) отримано з допомогою UBC#811 – 14,7 на праймер (усереднене значення для семи популяцій), а найменшу з використанням UBC#827 – 5,6 на праймер. Загалом із 786 продуктів ампліфікації, отриманих після проведення ISSR-ПЛР, 81 % були поліморфними (табл. 2).

Таблиця 1

Загальна кількість ампліконів, розрахована для зразків із популяцій *G. Lutea*

№	Праймер	п.н.	Tr	Kr	Sh	Posh	Lem	HT	Krs	Ave
1	UBC#807	293–3184	13	15	21	16	19	11	13	15,4
2	UBC#809	189–2263	8	13	16	12	11	9	11	11,4
3	UBC#810	259–2079	7	8	11	7	15	11	10	9,9
4	UBC#811	317–3384	16	19	23	21	16	9	12	16,6
5	UBC#827	383–1296	6	8	10	8	10	7	11	8,6
6	UBC#835	221–3145	16	14	12	15	13	7	10	12,4
7	UBC#840	232–3159	13	11	17	13	12	7	14	12,4
8	UBC#857	379–2857	12	13	14	8	10	7	11	10,7
9	UBC#889	402–1697	12	17	17	16	17	12	13	14,9
	Ave	400–3200	11	13	16	13	14	9	12	12,6

Таблиця 2

Кількість поліморфних ампліконів, розрахована для зразків із популяцій *G. Lutea*

№	Праймер	Tr	Kr	Sh	Posh	Lem	HT	Krs	Ave
1	UBC#807	13	11	17	12	18	11	13	13,6
2	UBC#809	7	10	12	9	7	8	8	8,7
3	UBC#810	3	5	7	7	14	10	9	7,9
4	UBC#811	15	18	17	18	14	9	12	14,7
5	UBC#827	3	5	4	6	7	5	9	5,6
6	UBC#835	13	12	5	6	9	6	9	8,6
7	UBC#840	12	7	13	8	5	4	13	8,9
8	UBC#857	7	9	5	3	5	5	10	6,3
9	UBC#889	9	5	7	8	8	9	7	7,6
	Ave	9	9	10	9	10	8	10	9,3

Кількість ампліконів, які утворює праймер, визначає теоретично можливу кількість унікальних наборів фрагментів, які ним можуть бути утворені, а кількість поліморфних фрагментів характеризує реальну наявність у особин дослідженої вибірки відмінностей між послідовностями геному, які визначають утворення ПЛР-продуктів [12]. Поліморфний амплікон є найбільш інформативним для генетичного аналізу за умови рівномірного представлення алелей поліморфного локуса. Проте ЗКА і КПА не враховують особливостей розподілу поліморфних фрагментів між дослідженими генотипами, зокрема їхні частоти у вибірці зразків. Спробу врахування частот поліморфних локусів було зроблено в показниках PIS, похідному від нього MI, Rp і D.

На основі частот ампліконів і наборів фрагментів, продукованих окремими праймерами, для кожного з них було розраховано показники інформативності. Отримані значення наведено в таблицях 3–6. Для оцінки ефективності ISSR-праймерів визначено показник роздільної здатності (Rp) для кожного використаного праймера. Згідно усереднених даних для зразків із семи популяцій найвищі показники Rp серед усіх досліджених праймерів були у UBC#807 і UBC#811. Найменш інформативним за цим показником був UBC#827. Найвищі показники роздільної здатності мав UBC#807 для зразків із популяцій Sh, Posh, Lem, Krs, HT, у Posh, Kr – UBC#811, а у Tr –

UBC#840. $R_p < 1$ був лише у зразків із популяції Tr за використання праймера UBC#810 (0,667). Загалом значення R_p коливалося у межах 2,9–8,1.

Таблиця 3

Показник інформативності праймерів – роздільна здатність (R_p), використаний для оцінки інформативності ISSR-праймерів при оцінці генетичного поліморфізму зразків із популяцій *G. Lutea*

№	Праймер	Tr	Kr	Sh	Posh	Lem	HT	Krs	Ave
1	UBC#807	6,800	7,200	10,667	7,333	9,600	7,091	8,333	8,146
2	UBC#809	2,267	5,867	6,936	5,467	4,400	4,727	4,000	4,809
3	UBC#810	0,667	2,000	4,667	3,467	7,200	5,636	4,667	4,043
4	UBC#811	6,000	11,067	8,533	8,400	6,533	5,455	7,000	7,570
5	UBC#827	2,667	3,200	1,733	1,733	2,933	2,727	5,000	2,856
6	UBC#835	2,800	6,133	3,333	3,733	5,600	4,182	5,333	4,445
7	UBC#840	7,200	3,200	9,333	4,800	2,800	1,818	7,667	5,260
8	UBC#857	1,467	5,200	2,400	1,467	2,133	2,909	5,667	3,035
9	UBC#889	4,267	3,333	3,200	4,667	3,200	3,455	5,667	3,970
	Ave	3,793	5,244	5,644	4,563	4,933	4,222	5,926	4,904

Для оцінки ефективності ISSR-праймерів розраховано показник інформативності (PIC) для кожного використаного праймера (табл. 4). Згідно усереднених даних для зразків із семи популяцій найвищі показники PIC серед усіх досліджених праймерів були у UBC#807. За значеннями PIC ISSR-праймери були подібними між собою, коливалися у межах від 0,189 до 0,500 і в середньому становив 0,433.

Таблиця 4

Показник інформативності (PIC), використаний для оцінки інформативності ISSR-праймерів при оцінці генетичного поліморфізму зразків із популяцій *G. Lutea*

№	Праймер	Tr	Kr	Sh	Posh	Lem	HT	Krs	Ave
1	UBC#807	0,484	0,463	0,495	0,494	0,471	0,495	0,479	0,483
2	UBC#809	0,439	0,489	0,478	0,498	0,460	0,473	0,500	0,477
3	UBC#810	0,416	0,500	0,448	0,495	0,499	0,494	0,498	0,479
4	UBC#811	0,423	0,493	0,481	0,476	0,491	0,489	0,490	0,478
5	UBC#827	0,358	0,349	0,358	0,497	0,403	0,455	0,493	0,416
6	UBC#835	0,491	0,484	0,358	0,331	0,451	0,455	0,491	0,437
7	UBC#840	0,482	0,422	0,471	0,414	0,270	0,439	0,500	0,428
8	UBC#857	0,327	0,418	0,224	0,330	0,385	0,447	0,498	0,376
9	UBC#889	0,467	0,189	0,214	0,375	0,189	0,390	0,416	0,320
	Ave	0,394	0,374	0,392	0,434	0,402	0,460	0,485	0,420

Значення показника індексу інформативності маркерів (MI) становив від 0,66 до 8,568, в середньому – 4,082 (табл. 5). Згідно усереднених даних для зразків із семи популяцій найвищі показники MI серед усіх досліджених праймерів були у UBC#811. Найменш інформативними за цим показником був UBC#827. Найвищі показники індексу інформативності маркерів мав UBC#811 і UBC#807 для зразків із популяцій Kr, Sh, Posh, Lem, HT, Sh, Posh, Lem.

Таблиця 5

Індекс інформативності маркерів (MI), використаний для оцінки інформативності ISSR-праймерів при оцінці генетичного поліморфізму зразків із популяцій *G. Lutea*

№	Праймер	Tr	Kr	Sh	Posh	Lem	HT	Krs	Ave
1	UBC#807	6,292	5,093	8,415	5,930	8,472	5,437	6,226	6,552
2	UBC#809	3,073	4,89	5,736	4,485	3,216	3,784	3,996	4,169
3	UBC#810	1,248	2,500	3,136	3,462	6,983	4,942	4,480	3,822
4	UBC#811	6,345	8,874	8,177	8,568	6,876	4,397	5,884	7,017
5	UBC#827	1,074	1,745	1,428	2,980	2,822	2,277	4,439	2,395
6	UBC#835	6,383	5,808	1,785	1,983	4,060	2,732	4,420	3,882
7	UBC#840	5,784	2,954	6,123	3,310	1,352	1,754	6,496	3,968
8	UBC#857	2,289	3,762	1,12	0,660	1,924	2,236	4,982	2,425
9	UBC#889	4,203	0,945	1,498	3,000	1,515	3,507	2,911	2,511
	Ave	2,612	2,409	4,158	3,820	4,136	3,452	4,870	3,637

Розпізнавальна здатність, яка розраховується з частот не окремих ампліконів, а їх наборів, враховує незалежність розподілу поліморфних ампліконів у наборах фрагментів різних генотипів. Розпізнавальну здатність можна успішно застосовувати як показник інформативності при відборі праймерів для оцінки генетичного різноманіття виду. Для оцінки ефективності ISSR-праймерів визначено показник розпізнавальної здатності для кожного використаного праймера. Результати представлено в таблиці 6. Згідно усереднених даних для зразків із семи популяцій найвищі показники розпізнавальної здатності серед усіх досліджених праймерів були у UBC#807 і UBC#811 (0,751 і 0,746 відповідно). Найменш інформативними за цим показником був UBC#889 (0,368).

Таблиця 6

Показник розпізнавальна здатність (D), використаний для оцінки інформативності ISSR-праймерів при оцінці генетичного поліморфізму зразків із популяцій *G. Lutea*

№	Праймер	Tr	Kr	Sh	Posh	Lem	HT	Krs	Ave
1	UBC#807	0,833	0,597	0,696	0,629	0,857	0,803	0,845	0,751
2	UBC#809	0,896	0,671	0,636	0,694	0,589	0,623	0,769	0,697
3	UBC#810	0,505	0,752	0,565	0,751	0,726	0,803	0,786	0,698
4	UBC#811	0,908	0,805	0,644	0,697	0,680	0,671	0,818	0,746
5	UBC#827	0,414	0,401	0,413	0,848	0,483	0,581	0,811	0,564
6	UBC#835	0,813	0,652	0,413	0,709	0,570	0,581	0,816	0,651
7	UBC#840	0,837	0,516	0,617	0,375	0,297	0,547	0,741	0,561
8	UBC#857	0,370	0,507	0,241	0,500	0,454	0,564	0,783	0,488
9	UBC#889	0,607	0,201	0,229	0,375	0,201	0,461	0,505	0,368
	Ave	0,687	0,567	0,495	0,599	0,540	0,626	0,764	0,611


Отже, за використаними показниками ефективності використані ISSR-праймери можна рангувати як у таблиці 7. Загалом, за усіма показниками як найбільш інформативні визначено UBC#811, UBC#807, а найменш ефективними в оцінці генетичного поліморфізму *G. lutea* – UBC#827 і UBC#889.

Значення розпізнавальної здатності, розраховане для праймера UBC#889, який забезпечує синтез у середньому 14,9 амплікона, дорівнює 0,368, а у праймера з меншою кількістю ампліконів UBC#827 (8,9) значення показника у 1,5 рази більше і становить $D = 0,564$. Очевидно, це пов'язано із різною частотою утворення паттернів (наборів фрагментів) праймерами, оскільки праймер буде мати високий показник розпізнавальної здатності, коли він забезпечуватиме утворення паттернів з однією частотою [8].

Ефективність праймерів не можна оцінювати лише за кількістю ампліконів, які вони синтезують. Наприклад, два праймери, які утворюють однакову кількість ампліконів (UBC#835 і UBC#840 по 12,4), мають різні значення показника розпізнавальної здатності 0,651 і 0,561 відповідно.

Таблиця 7

Рангування ISSR-праймерів у відповідності до значень використаних показників інформативності (R_p , PIC, MI, D, ЗКА, КПА)

R_p	PIC	MI	D	ЗКА	КПА	
UBC#827	UBC#889	UBC#827	UBC#889	UBC#827	UBC#827	Min  Max
UBC#857	UBC#857	UBC#857	UBC#857	UBC#810	UBC#857	
UBC#889	UBC#827	UBC#889	UBC#840	UBC#857	UBC#889	
UBC#810	UBC#840	UBC#810	UBC#827	UBC#809	UBC#810	
UBC#835	UBC#835	UBC#835	UBC#835	UBC#835	UBC#835	
UBC#809	UBC#809	UBC#840	UBC#809	UBC#840	UBC#809	
UBC#840	UBC#811	UBC#809	UBC#810	UBC#889	UBC#840	
UBC#811	UBC#810	UBC#807	UBC#811	UBC#807	UBC#807	
UBC#807	UBC#807	UBC#811	UBC#807	UBC#811	UBC#811	

Взаємозв'язки між використаними параметрами оцінки ефективності праймерів (R_p , PIC, MI, D, ЗКА, КПА) розраховували із використанням коефіцієнта кореляції Спірмена. Відношення між усіма параметрами характеризувалося високим рівнем достовірності ($p < 0,001$, $p = 0,05$), лише у деяких випадках воно було вищим, ніж 5 % (табл. 8).

Таблиця 8

Коефіцієнт кореляції Спірмена (r_s) між параметрами інформативності праймерів (R_p , PIC, MI, D, ЗКА, КПА), використаних для оцінки генетичного поліморфізму *G. Lutea*

Показники інформативності праймерів	R_p	PIC	MI	D	ЗКА	КПА
R_p						
PIC	0,717**					
MI	0,967*	0,717**				
D	0,683 ^{NS}	0,967*	0,717**			
ЗКА	0,742**	0,275 ^{NS}	0,742**	0,325 ^{NS}		
КПА	0,983*	0,683 ^{NS}	0,983*	0,667 ^{NS}	0,758**	

Примітки: * – $p < 0,001$; ** – $p = 0,05$; ^{NS} – $p > 0,05$.

Виявлено дуже високу силу зв'язку між Rp і MI, Rp і КПА, а також між PIC і D, MI і КПА. Сильний зв'язок між MI і КПА, очевидно, зумовлений тим, що MI розраховується як добуток показника PIC і кількості поліморфних локусів. Між іншими показниками, за виключенням PIC – ЗКА, PIC – КПА, D – ЗКА, D – КПА, Rp – D, сила зв'язку була достовірною низькою.

Очевидно, отримані результати означають, що всі використані показники інформативності праймерів характеризують ефективність ПЛР-маркерів. Значення PIC коливалося у вузьких межах з-поміж усіх досліджуваних зразків, а також не виявлено кореляцій між ним і ЗКА й КПА. Saini M. із співавторами встановлено, що PIC виявився менш придатним для оцінки ефективності RAPD-маркерів, призначених для вивчення генетичного поліморфізму *Vigna radiate* (L.) Wilczek., оскільки не було кореляції між ним та іншими дослідженими показниками інформативності [13].

Показники Rp, PIC, MI, D, імовірно, відображають різну інформативність праймерів. На їх основі можна розробити алгоритм вибору оптимальної кількості праймерів, необхідних для визначення генетичної різноманітності. Ретельний первинний скринінг праймерів обраного ПЛР-методу є важливою умовою вибору найефективнішого методу дослідження.

Вибір найоптимальніших найефективніших ISSR-праймерів здійснено за показниками Rp і D. Rp розраховують, виходячи з частот алелей окремих локусів, а це позбавляє можливості врахувати явище залежності розподілу деяких з ампліконів у спектрах один від одного, коли наявність одного із фрагментів у спектрі з великою вірогідністю пов'язана з наявністю іншого.

Водночас цього недоліку позбавлений показник розпізнавальної здатності, який розраховується на основі частот наборів фрагментів і безпосередньо пов'язаний із кількістю пар, які не розпізнає праймер.

Для визначення оптимальної кількості маркерів, яку необхідно використати у молекулярно-генетичному аналізі, необхідно враховувати мету дослідження. Наприклад, для оцінки генетичного різноманіття, визначення структури популяцій, генетичної спорідненості або приналежності особин достатньо мінімальної кількості маркерів.

Ця комбінація забезпечує належну статистичну значимість отриманих даних, а подальше збільшення числа маркерів практично не покращує результати аналізу. Тому для оцінки генетичного різноманіття популяцій достатнім є набір із 3–6 праймерів (залежно від розміру вибірки і ступеня диференціації популяцій). Згідно отриманих нами результатів праймери UBC#807, UBC#811 і UBC#810 мали найвищі значення D ($D > 0,800$) для зразків із шести природних і однієї штучно створеної популяцій *G. lutea*. Згідно даних показника Rp найінформативнішими були UBC#807, UBC#811 і UBC#840. Враховуючи те, що праймер UBC#840 забезпечував синтез більшої кількості ампліконів (у 1,3 рази), у тому числі поліморфних, порівняно із UBC#810, тому використаємо його.

Для комбінацій праймерів (UBC#807, UBC#811 і UBC#840) були розраховані основні індекси генетичної різноманітності (P, He, S) і проведений аналіз молекулярної дисперсії (AMOVA). Порівнявши показники генетичного поліморфізму популяцій тирличу жовтого, отримані з використанням трьох ISSR-праймерів (UBC#807, UBC#811 і UBC#840), з показниками генетичного поліморфізму, оціненими за дев'ятьма ISSR-праймерами (UBC#807, UBC#809, UBC#810, UBC#811, UBC#827, UBC#835, UBC#840, UBC#857, UBC#889), встановлено, що загалом значення частки поліморфних ампліконів були схожими і становили 42 % і 40 % відповідно. (табл. 9).

Таблиця 9

Показники генетичного поліморфізму *G. lutea*, розраховані за даними ПЛР-аналізу з використанням UBC#807, UBC#811 і UBC#840 праймерів

Популяція	P, %	He	S
Sh	53,41	0,187±0,021	0,282±0,030
Lem	42,05	0,132±0,019	0,203±0,028
Pozh	43,18	0,125±0,018	0,195±0,027
Kr	39,77	0,137±0,020	0,206±0,029
T	45,45	0,119±0,017	0,189±0,026
HT	27,27	0,097±0,018	0,147±0,026
Krs	43,18	0,145±0,020	0,220±0,029
Середнє	42,05	0,135±0,007	0,206±0,011

Примітки: P – частка поліморфних ампліконів, He – очікувана гетерозиготність, S – індекс Шенона.

Щодо показників очікуваної гетерозиготності та індексу Шенона, то вони були вищими у випадку використання трьох праймерів. Зростання показників генетичної різноманітності, очевидно, зумовлено збільшенням частки поліморфних праймерів внаслідок видалення із вибірки тих, які утворюють мономорфні амплікони.

Аналіз молекулярної варіанси AMOVA показав, що майже 49 % генетичної різноманітності *G. lutea* припадає на міжпопуляційні відмінності, а частка внутрішньопопуляційного поліморфізму становить 51 % за результатами, отриманими з використанням UBC#807, UBC#811 і UBC#840. Під час використання 3 праймерів спостерігається зміщення розподілу загальної генетичної різноманітності за AMOVA у бік переважання внутрішньопопуляційного поліморфізму. Імовірно, це пов'язано із специфікою розподілу поліморфних фрагментів, які виявляють здебільшого міжпопуляційні відмінності. Загальна підрозділеність популяцій (F_{ST}) становить 0,489 (табл. 10).

Таблиця 10

Аналіз молекулярної дисперсії AMOVA популяцій *G. lutea* за результатами ISSR-ПЛР

Поліморфізм (source)	Ступінь свободи (d.f.)	Сума квадратів (sum of squares)	Відсоток дисперсії, % (percentages of variation)	Індекс фіксації (fixation index)	P
Міжпопуляційний	6	603,017	49	$F_{ST} = 0,489$	0,010
Внутрішньопопуляційний	85	634,603	51	-	-

Примітка: кількість пермутацій матриці = 1000.

Висновки

Встановлено, що всі використані показники інформативності праймерів певною мірою характеризують інформативність ISSR-маркерів, які використовують для вивчення генетичного поліморфізму і генетичної структури *G. lutea*. Нами відібрано три ISSR-праймери (UBC#807, UBC#811 і UBC#840) з найвищими показниками роздільної і розпізнавальної здатності. Порівнявши отримані показники генетичного поліморфізму популяцій тирличу жовтого, отриманими з використанням трьох ISSR-праймерів (UBC#807, UBC#811 і UBC#840), з показниками генетичного поліморфізму,

оціненими за дев'ятьма ISSR-праймерами (UBC#807, UBC#809, UBC#810, UBC#811, UBC#827, UBC#835, UBC#840, UBC#857, UBC#889), встановлено, що загалом значення частки поліморфних ампліконів були схожими, а значення показників очікуваної гетерозиготності та індексу Шенона були вищими. Зростання показників генетичної різноманітності, імовірно, обумовлено збільшенням частки поліморфних праймерів внаслідок видалення із вибірки тих, які утворюють мономорфні амплікони.

Список використаної літератури

1. Сиволап Ю.М. Геном рослин і «молекулярна селекція». *Селекція і насінництво*. 2008. Т. 96. С. 34–42.
2. Misra A., Shasany A.K., Shukla A.K. et al. AFLP markers for identification Swertia species (Gentianaceae). *Genetics and Molecular Research*. 2010. Vol. 9 (3). P. 1535–1544.
3. Mondini L., Noorani A., Pagnotta M.A. Assessing plant genetic diversity by molecular tools. *Diversity*. 2009. Vol. 1. P. 19–35.
4. Чесноков Ю.В., Артемьева А.М. Оценка меры информационного полиморфизма генетического разнообразия. *Сельскохозяйственная биология*. 2015. Т. 50, № 5. С. 571–578.
5. Amiryousefi A., Huvönen J., Poczai P. iMEC: Online Marker Efficiency Calculator. *Applications in Plant Sciences*. 2018. Vol. 6 (6). e1159.
6. Powell W., Morgante M., Andre C., Hanfey M., Vogel J., Tingey S., Rafalski A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Breeding*. 1996. 2. P. 225–228.
7. Prevost A., Wilkinson M.J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 1999. 98. P. 107–112.
8. Tessier C., David J., This P., Boursiquot J.M., Charrier A. Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. *Theor. Appl. Genet.* 1999. 98. P. 171–177.
9. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol. Biol.* 1985. Vol. 5. P. 69–76.
10. Спірідонова К.В. Вивчення особливостей геномної мінливості культивованих клітин раувольфії зміїної *Rauwolfia serpentina* Benth : дис...канд. біол. наук: 03.00.15. Київ, 2000. 149 с.
11. Mosula M.Z., Konvalyuk I.I., Mel'nyk V.M., Drobyk N.M., Tsaryk Y.V., Nesteruk Yu.Y., Kunakh V.A. Genetic polymorphism of *Gentiana lutea* L. (Gentianaceae) populations from the Chornohora ridge of the Ukrainian Carpathians. *Cytology and Genetics*. 2014. Vol. 48, № 6. P. 371–377. Doi: 10.3103/S0095452714060073.
12. Андреев І.О., Мосула М.З., Мельник В.М., Бублик О.М., Конвалюк І.І., Дробик Н.М. Порівняння показників інформативності ПЛР-маркерів для аналізу генетичного різноманіття на прикладі *Gentiana lutea* L. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2014. Т. 14. С. 141–146.
13. Saini M., Singh S., Hussain Z. et al. RAPD analysis in mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek.] II: A comparison of efficiency parameters of RAPD primers. *Indian J. Biotechnol.* 2010. Vol. 9. P. 276–282.

References

1. Syvolap, Yu.M. (2008). Plant genome and "molecular selection". *Seleksiia i nasinnystvo* [Breeding and seed production]. 96. 34–42. (in Ukr.)
2. Misra, A., Shasany, A.K., Shukla, A.K. et al. (2010). AFLP markers for identification Swertia species (Gentianaceae). *Genetics and Molecular Research*. 9 (3). 1535–1544.
3. Mondini, L., Noorani, A., Pagnotta, M.A. (2009). Assessing plant genetic diversity by molecular tools. *Diversity*. 1. 19–35.
4. Chesnokov, Yu.V., Artemyeva, A.M. (2015). Evaluation of the measure of polymorphism information of genetic diversity. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya* [Agricultural Biology]. 50, 5. 571–578. (in Rus.)
5. Amiryousefi, A., Huvönen, J., Poczai, P. (2018). iMEC: Online Marker Efficiency Calculator. *Applications in Plant Sciences*. 6 (6). e1159.
6. Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanfey, M., Vogel, J., Tingey, S., Rafalski, A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Breeding*. 1996. 2. 225–228.
7. Prevost, A., Wilkinson, M.J. (1999). A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 98. 107–112.
8. Tessier, C., David, J., This, P., Boursiquot, J.M., Charrier, A. (1999). Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. *Theor. Appl. Genet.* 98. P. 171–177.
9. Rogers, S.O., Bendich, A.J. (1985). Extraction of DNA from milligram amounts of fresh herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol. Biol.* 5. 69–76.
10. Spiridonova, K.V. (2000). Study of the genomic variability of cultured *Rauwolfia serpentina* Benth cells : dissertation. Cand. s.-g. sciences: 16.00.10 "Genetic". Kiev. 149. (in Ukr.)

11. Mosula, M.Z., Konvalyuk, I.I., Mel'nyk, V.M., Drobyk, N.M., Tsaryk, Y.V., Nesteruk, Yu.Y., Kunakh, V.A. (2014). Genetic polymorphism of *Gentiana lutea* L. (Gentianaceae) populations from the Chornohora ridge of the Ukrainian Carpathians. *Cytology and Genetics*. 48, 6. 371–377. Doi: 10.3103/S0095452714060073.
12. Andreev, I.O., Mosula, M.Z., Mel'nyk, V.M., Bublyk, O.M., Konvalyuk, I.I., Drobyk, N.M. (2014). Comparison of informativeness indices of pcr-based markers for genetic diversity analysis as exemplified by *Gentiana lutea* L. *Factors in Experimental Evolution of Organism*. 14. 141–146. (in Ukr.)
13. Saini, M., Singh, S., Hussain, Z. et al. (2010). RAPD analysis in mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek.] II: A comparison of efficiency parameters of RAPD primers. *Indian J. Biotechnol.* 9. 276–282.

M. Z. Prokopiak, A. I. Fliachok, O. Yu. Maiorova, L. R. Hrytsak, N. M. Drobyk Evaluation of the Effectiveness of ISSR-Marker Informativeness Indicators for the Analysis of Plant Genetic Polymorphism

Introduction. A number of generations of different types of molecular genetic markers have changed to the present day.

The DNA nucleotide sequence marker system allows testing genetic diversity at the gene level. The creation of molecular markers and their use in biological researches made it possible to study genetic polymorphism in more detail, as well as to investigate the level of kinship at the inter- and intra-species levels. The use of various DNA markers that are associated with different sequences of the genome is effective at the time of studying genetic polymorphism. At the same time, it is also important to reduce the cost of polymerase chain reaction analysis, which is associated with the use of a small number of primers, and to choose the most informative primers.

Purpose. The purpose of the research is to select the most informative ISSR primers for assessing the genetic polymorphism of plant populations using the example of representatives of the *Gentiana* L. genus, as well as to determine the most effective indicators of the informativeness of DNA markers.

Methods. Molecular genetic markers, statistical methods, calculation of indicators of informativeness of primers.

Results. It was established that all the used indicators of the informativeness of the primers to a certain extent characterize the informativeness of the ISSR-markers, which are used for learning of the genetic polymorphism and genetic structure of *G. lutea*.

Three ISSR primers (UBC#807, UBC#811 and UBC#840) with the highest indicators of discriminating (*D*) and resolving power (*R_p*) were selected by us. It was established that in general the value of the percentage of polymorphic amplicons was similar, and the values of the indicators of expected heterozygosity and the Shannon index were higher.

This was established as a result of comparing the genetic polymorphism indices of the *G. lutea* populations obtained using three ISSR primers (UBC#807, UBC#811 and UBC#840) with the genetic polymorphism indices estimated by nine ISSR primers (UBC #807, UBC#809, UBC#810, UBC#811, UBC#827, UBC#835, UBC#840, UBC#857, UBC#889). The increase in genetic diversity is probably caused by an increase in the polymorphic primers due to the removal from the sample of those that form monomorphic amplicons.

Originality. For the first time, an effective indicator of the informativeness of primers was selected and the most effective ISSR markers were selected for the assessment of the genetic diversity of plants of the genus *Gentiana* L. on the example of seven populations of *G. lutea* from the Ukrainian Carpathians.

Conclusions. The most informative primers were selected and their effectiveness was demonstrated for assessing the genetic diversity of a sample of plants from seven populations located in the mountain ranges of the Ukrainian Carpathians. In general, UBC#811 and UBC#807 were identified as the most informative, and UBC#827 and UBC#889 were the least effective in evaluating the genetic polymorphism of *G. lutea*. This conclusion was made by evaluating indicators (total number of amplicons, number of polymorphic amplicons, PIC (polymorphism information content), MI (marker index), *R_p*, *D*). The relationship between all the parameters of the evaluation of the effectiveness of the primers was characterized by a high level of reliability ($p < 0.001$, $p = 0.05$), only in some cases it was higher than 5%. The level of genetic polymorphism of *G. lutea* for UBC#807, UBC#811 and UBC#840 was evaluated.

Key words: *Gentiana lutea* L.; genetic diversity; resolving power; discriminating power, number of polymorphic amplicons.

Одержано редакцією 12.11.2021
Прийнято до публікації 18.04.2022