

А.С. Бахтаулова<sup>1</sup>, Б. Бекманов<sup>2</sup>, Ж.Ж. Канагатов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Жетысуский государственный университет им. И. Жансугурова, Талдыкорган, Казахстан;

<sup>2</sup>Институт общей генетики и цитологии КН МОН РК, Алматы, Казахстан  
(E-mail: bahtaulova@mail.ru)

## Молекулярно-генетический анализ разнообразия дикой яблони (*Malus sieversii* Ledeb. M. Roem.) с помощью ДНК-маркеров

*Malus sieversii* занимает особое место в числе ценных растительных видов Жонгар-Алатауского государственного национального природного парка. Она формирует значительные (1,05 % от площади парка) массивы дикоплодовых насаждений. Для сохранения яблоневых лесов проведены исследования современного состояния насаждений генетических резерватов яблони Сиверса на территории парка, созданы дизайн и синтез праймеров для молекулярно-генетического анализа, дана генетическая характеристика образцов ДНК с помощью ISSR-маркеров, выполнен анализ и интерпретация результатов молекулярно-генетического исследования. Молекулярно-генетический анализ разнообразия дикой яблони обеспечит основу для устойчивого развития естественных популяций яблони Сиверса путем выращивания генетически однородного посадочного материала. Исследования направлены на сохранение уникального генофонда яблоневых лесов для селекции и восстановления культурных сортов.

**Ключевые слова:** яблоня Сиверса, популяция, сохранение, генетический резерват, ISSR-маркер, молекулярно-генетический анализ.

### Актуальность

Известно, что оригинальные дикие предки современных яблонь (*Malus sieversii* Ledeb. M. Roem.) произрастают в условиях Заилийского Алатау, Джунгарского Алатау, Тарбагатай, Сайрам-Угама и Каратау. Также дикорастущие формы яблони Сиверса произрастают в Синьцзянской провинции Китая. Современный интерес к яблоне Сиверса вызван тем, что почти все сорта современных яблонь имеют гетероклональное происхождение и являются восприимчивыми к болезням, характеризуются низкой устойчивостью к вредителям.

Уровень генетического полиморфизма как природных популяций, так и культурных растений наиболее эффективно определяется с помощью ДНК-маркеров. Кроме этого, молекулярные маркеры применяются для исследования происхождения, доместикации видов и их последующей миграции, получения информации по филогенетическим взаимоотношениям между видами, а также для географической локализации популяций, имеющих разное генетическое происхождение. Для изучения связей между таксонами растений часто используется анализ полиморфизма нуклеотидных последовательностей уникальных генов, таких как рибосомальные транскрибируемые спейсеры ITS-1 и ITS-2, спейсеры хлоропластного генома и т.д. Однако эти данные не всегда можно экстраполировать на эволюцию генома в целом, поскольку различные локусы генома эволюционируют с разной скоростью. Применение нейтральных молекулярных маркеров, таких как ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeat*), сравнительно равномерно распределенных по растительному геному, позволяет одновременно определить изменчивость по группе не связанных между собой локусов, что особенно ценно для сохранения и использования генетических ресурсов [1–3]. Такая информация дает возможность оценить генетический дрейф, происходящий в экосистемах, а также эффективно проводить мониторинг популяций редких и исчезающих видов растений, находящихся на охраняемых территориях.

Известно, что в Казахстане за последние полвека площадь дикоплодовых лесов сократилась примерно на 60–70 %. Культурные сады в странах Европы, США, Азии многократно обрабатываются от вредителей и болезней в течение года. Последнее связано с тем, что у культурных сортов яблонь отсутствует или ослаблена устойчивость к вредителям, повреждающим листья и плоды, а также возбудителям, вызывающим грибные, бактериальные и вирусные болезни. В связи с этим необходимо провести широкомасштабные исследования по оценке морфологических признаков и помологических характеристик с параллельным проведением молекулярно-генетической паспортизации, осуществляемой посредством исследования полиморфизма ДНК селективируемых и выделенных форм из ди-

коплодовых лесов *Malus sieversii*. При этом важно проведение оценки исходных форм вводимых в культуру *in vitro* и их регенерированных клонов [4–6].

Дикие виды яблони, несущие гены устойчивости к стрессам абиотического и биотического характера, широко используются при создании исходного материала для новых сортов. По мнению ученых [7], геном растений, вегетативно размножаемых человеком в течение длительного времени и вновь скрещиваемых между собой, представляет сложную гетерозиготную структуру.

Молекулярное маркирование находит широкое применение в различных областях, позволяющих оценить состояние генетических ресурсов популяции различных видов, осуществить обеспечение в ходе проведения селекционных программ, провести анализ объектов семенного фонда.

Применение ПЦР анализа (*PCR — polymerase chain reaction*) подразумевает использование термостабильной ДНК полимеразы для амплификации *in vitro* отдельных специфических последовательностей или локусов ДНК с применением случайных или специфических праймеров (олигонуклеотидных последовательностей). Амплифицированные фрагменты разделяются электрофоретически, и полосы (пики) выявляются окрашиванием. Предпочтение методов генотипирования с использованием ПЦР обусловлено, прежде всего, потребностью в реакции небольших количеств ДНК (5–100 нг образца на реакцию).

Исследованиями [8, 9] установлено, что на молекулярном уровне вид *M. sieversii* имеет близкое родство с культурными яблонями. В работе, выполненной исследователями из КНР Chunyu Zhang и Xuesen Chen с соавторами [10], получены данные по изучению внутривидового полиморфизма четырех географически изолированных популяций *M. sieversii*, произрастающих на северо-западе Китая, с использованием SSR маркеров. Chunyu Zhang и Xuesen Chen с соавторами установили наличие у четырех изолированных популяций *M. Sieversii* 16 идентификационных электрофоретических бэндов (полос). Причем они отмечают, что процент полиморфных бэндов у популяции *GL* был наиболее высоким (89,06 %), наиболее низкий (78,12 %) — у популяции *YM*.

Результаты молекулярной оценки ДНК показали генетическую связь многочисленных культурных сортов, созданных селекционерами США, Канады, Англии, России, Казахстана и других стран. Казахстанскими учеными установлена генетическая связь яблони Сиверса с местными сортами Восход, Алатау, Заман, Апорт и американским сортом Голден делишес [11, 12].

Для мониторинга состояния природных популяций *M. Sieversii* и разработки рекомендаций по охране и размножению важна обобщенная генетическая характеристика по типичным для данного вида популяций ДНК-маркерам.

#### Методика

В ходе работы проведен первичный отбор растительных образцов со старовозрастных маточных растений из генетических резерватов для оценки внутривидового разнообразия яблони Сиверса молекулярно-генетическими методами ISSR-маркирования.

Для анализа генетического полиморфизма ДНК нами были взяты образцы листьев, полученные путем проращивания семян (четыре образца), и листья взрослых деревьев (пять образцов). Контролем служили образцы: № 5 — листья, взятые с наиболее старого маточного растения яблони Сиверса (около 300 лет), и № 13 — листья, взятые с яблони Сиверса, посаженной в Ботаническом саду А. Джангалиевым (табл. 1).

Т а б л и ц а 1

#### Образцы для исследования

Номер образца	Место отбора	Часть растения	Описание
1	2	3	4
1	И.У. Черновский, Лепсинский ф-л, Чернова речка	Плоды	Мелкие, в диаметре 2 см, цвет желто-розовый
2	И.У. Черновский, Лепсинский ф-л, Чернова речка	Плоды	Средние, в диаметре 3,5 см, цвет неопределенный
3	И.У. Черновский, урочище Крутое	Плоды	Средние, в диаметре 3,5 см, цвет желтый
4	И.У. Черновский, урочище Крутое	Плоды	Средние, в диаметре 4,5 см, цвет желтый
5	Лепсинский ф-л, И.У. Черновской, Чернова речка	Листья	Старовозрастное дерево (300 лет)

## Продолжение таблицы 1

1	2	3	4
6	И.У. Тополевский, Обход № 2, Осиновая, кв. № 19	Листья	Старовозрастное дерево
7	И.У. Тополевский, Кокжота, Обход № 2, кв. № 10	Листья	Старовозрастное дерево
8	Сарканский питомник	Листья	Сеянец из семян (3 года)
9	Сарканский питомник	Листья	Сеянец из семян (1 год)
10		Эндосперм из семени	(Отрицательный результат)
11		Эндосперм из семени	(Отрицательный результат)
12	Плодовый питомник популяция Каратау	Листья	
13	Ботанический сад	Листья	Возраст 50 лет

Метод ускоренного проращивания семян в первую очередь позволяет подтвердить жизнеспособность семян. Этот метод использован для получения первичных листьев для выделения геномной ДНК. Семена, лишённые покровов, помещали в чашки Петри на увлажнённую основу (кусочки фильтровальной бумаги). Семена проращивали в закрытых чашках на свету при температуре 23 °С, примерно 8–10 дней (рис. 1, 2).

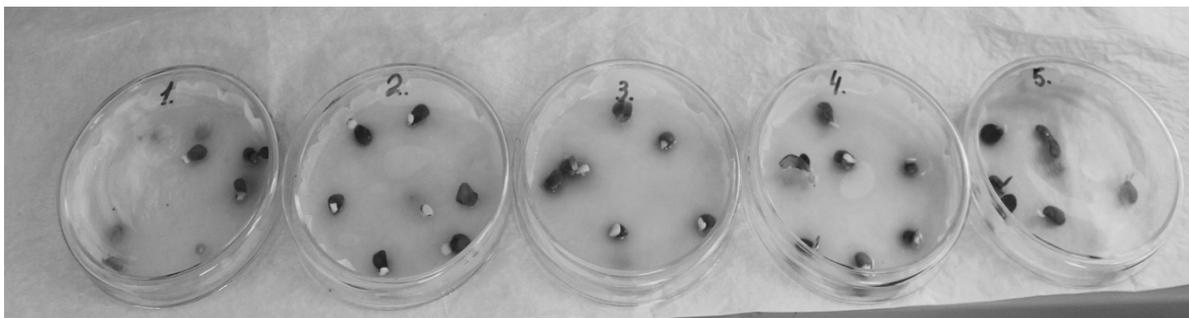


Рисунок 1. Проращивание семян яблони в чашках Петри

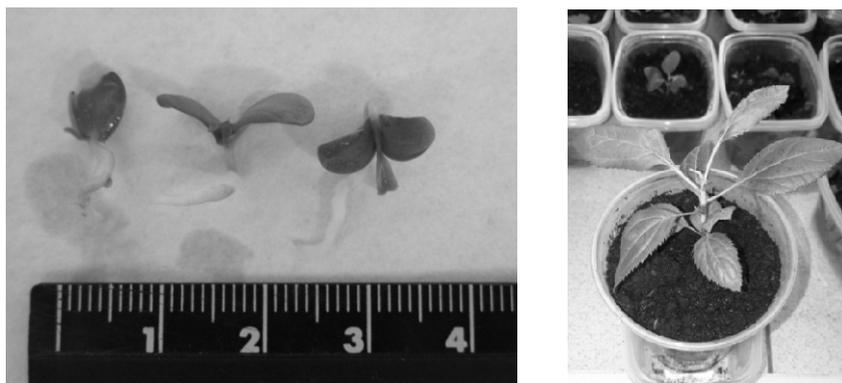


Рисунок 2. Проросшие семена яблони

Также в работе были использованы зрелые листья, собранные осенью этого года. Перед выделением ДНК все листья тщательно промыты дистиллированной водой и просушены. Выделение геномной ДНК проводили согласно стандартной методике (СТАВ-метод). В основе метода лежит лизис клеток буфером на основе СТАВ (цетилтриметиламмонийбромид, входит в состав многих бытовых моющих средств), депротеинизация хлороформом и осаждение ДНК изопропанолом. Для выделения использовали 30–80 мг листьев. Количественную и качественную оценку выделенных ДНК проводили с помощью ДНК-фотометра *Biofotometer Plus* (Eppendorf, Германия) и электрофоретического ана-

лиза. Для фотометрического анализа проводили измерение адсорбции водных растворов ДНК при трех длинах волн: 260, 280 и 320 нм. Размер молекул ДНК, так же как наличие примесей РНК, определяли методом электрофореза в 0,7 %-ном агарозном геле после окрашивания бромистым этидием. Визуализация ДНК, РНК проводилась с использованием гельдокументирующей системой *Quantum-ST5-1100 (Vilber Lourmat, Франция)*.

Для подбора молекулярных маркеров (ММ) был проведен предварительный анализ результатов исследований предыдущих исследователей яблони [3, 6, 8, 12]. При подборе праймерных пар были использованы ранее созданные праймеры, имеющиеся в NCBI и подходящие для анализа яблони.

Синтез олигонуклеотидов осуществлялся на синтезаторе ASM-800 («Биоссет», Новосибирск, Россия) в лаборатории молекулярной генетики Института общей генетики и цитологии КН МОН РК согласно методике, предложенной производителем. Благодаря высокому качеству синтеза полученные олигонуклеотиды не нуждаются в дополнительной очистке на ПААГ для большинства приложений. Высокая эффективность синтезатора ASM-800 позволила выполнить синтез праймеров в кратчайшие сроки (табл. 2).

Т а б л и ц а 2

#### Праймеры для скрининга образцов

№	Праймеры	Нуклеотидная последовательность
1	(ТА)8G	TATATATATATATATAG
2	(ТС)8C	TCTCTCTCTCTCTCC
3	(ТG)8A	TGTGTGTGTGTGTGGA
4	(ТG)8AA	TGTGTGTGTGTGTGAA
5	(AG)9C	AGAGAGAGAGAGAGAGC
6	(GA)9C	GAGAGAGAGAGAGAGAC

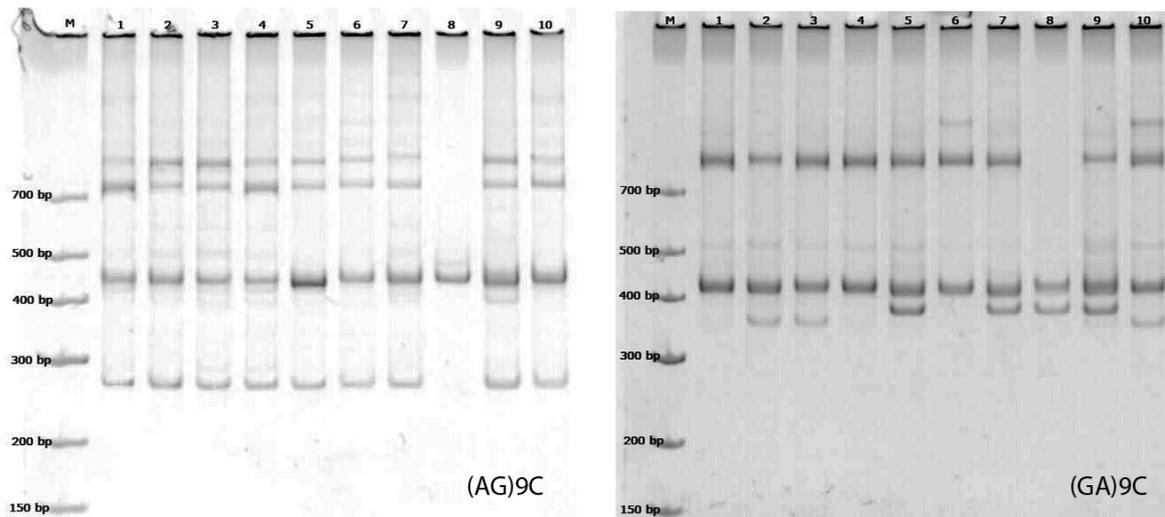
Аmplификацию проводили на приборе *Mastercycler nexus gradient (Eppendorf, Германия)*. Реакционная смесь для ПЦР, со всеми используемыми праймерами (табл. 2), объемом 10 мкл содержала 15–20 нг исходной ДНК, 1,5 мМ dNTP, 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5–10 пМ каждого праймера, 1 ед. *Taq*-полимеразы и 10x стандартного ПЦР-буфера (*ThermoScientific, США*). Постановку ПЦР проводили по следующей программе: предварительная денатурация 94 °С 2 мин; 35 циклов (94 °С 1 мин; 35 °С 2 мин; 72 °С 2 мин); конечная элонгация 6 мин 72 °С.

Продукты амплификации разделяли в 5 %-ном полиакриламидном геле при 60 В в течение 2 часов в 1ХТВЕ буфере, и полосы выявляли окрашиванием бромистым этидием. Спектры документировали с помощью гельдокументирующей системы *Quantum-ST5-1100 (Vilber Lourmat, Франция)*. Для определения длин фрагментов ДНК использовали маркер молекулярной массы 25–700 bp DNA Ladder (*ThermoScientific, США*). Для интерпретации полученных результатов учитывали только наиболее яркие и четкие полосы.

В ряде случаев, особенно при гибридизации близкородственных форм, морфологические различия вегетативных органов могут быть недостаточны для идентификации гибридных сеянцев. В этих случаях для ранней диагностики и селекции гибридных генотипов могут быть использованы молекулярно-генетические методы. Одним из самых распространенных и информативных методов является анализ электрофоретических спектров межмикросателлитных последовательностей ДНК (ISSR). Для оценки variability генома яблони Сиверса был использован именно этот ISSR-анализ с использованием 6 межмикросателлитных маркеров у 10 растений яблони Сиверса. Выбранные ISSR-маркеры характеризовались высоким уровнем информативности. Число ДНК-паттернов на определенный локус варьировало от 1 до 7, что дает возможность сравнить внутри одного вида полиморфизм.

#### Результаты

В результате были получены электрофореграммы продуктов амплификации. Число фрагментов, амплифицируемых праймерами (AG)9C и (GA)9C, выявили полиморфные, а также мономорфные ДНК-фрагменты. В случае (AG)9C с молекулярной массой 450 bp и в случае (GA)9C с молекулярной массой 420 bp фрагменты характеризуются мономорфными, так как эти фрагменты встречаются во всех исследуемых образцах (рис. 3).

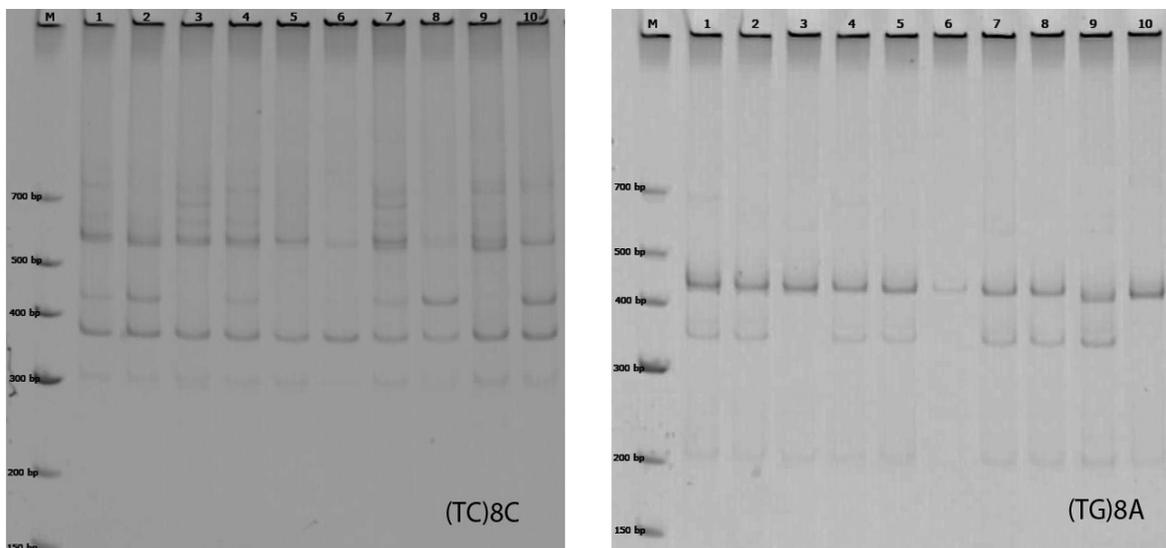


*M* — молекулярный маркер (*GeneRuler 25–700 kb DNA Ladder (ThermoScientific, США)*);  
 1–10 — образцы ДНК

Рисунок 3. Электрофореграммы продуктов амплификации ДНК с праймерами (AG)9C и (GA)9C яблони Северса

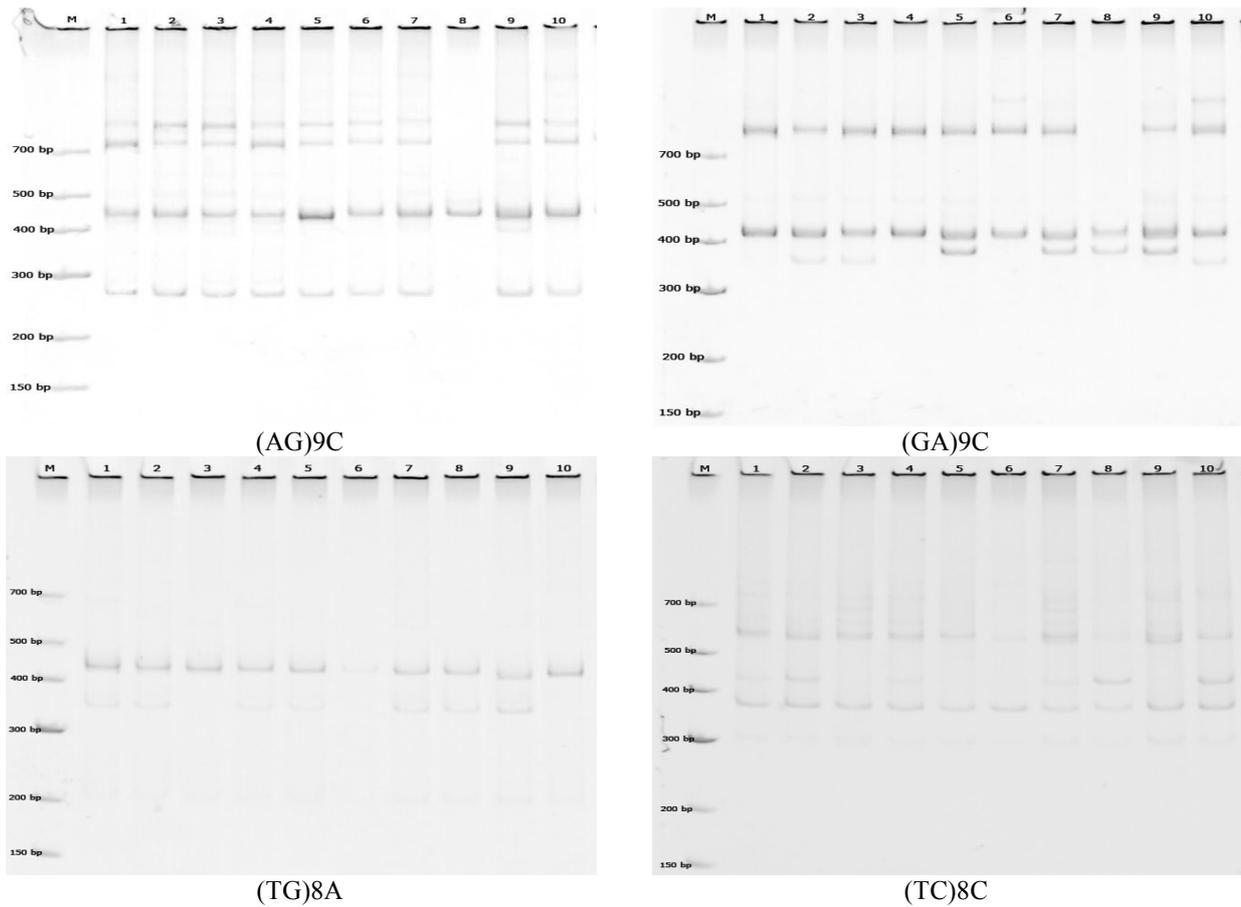
Также можно отметить интересный факт, что образцы № 8 и № 9 с праймерами (AG)9C и (GA)9C показали ДНК-паттерн, отличающийся от остальных образцов.

Другие праймеры ((TC)8C и (TG)8A), использованные в работе, также показали различные ДНК-фрагменты (рис. 4). Как видно из рисунка 4, изученные маркеры (TC)8C и (TG)8A проявили различный уровень полиморфизма. Максимальное количество ДНК-фрагментов было идентифицировано для праймера (TC)8C при анализе образцов яблони Северса.

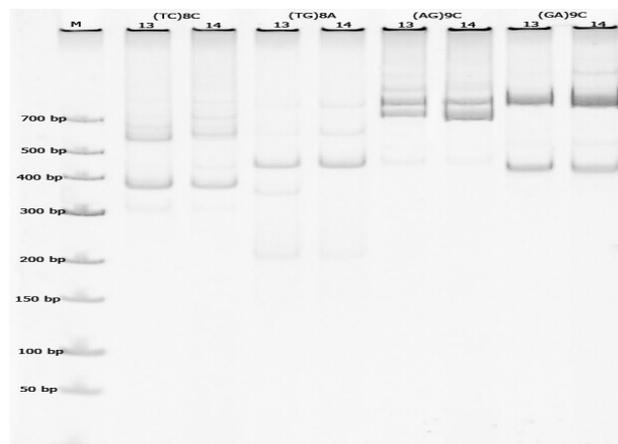


*M* — молекулярный маркер (*GeneRuler 25–700 kb DNA Ladder (ThermoScientific, США)*);  
 1–10 — образцы ДНК

Рисунок 4. Электрофореграммы продуктов амплификации ДНК с праймерами (TC)8C и (TG)8A яблони Северса



*M* — молекулярный маркер (*GeneRuller 25–700 kb DNA Ladder (ThermoScientific, США)*);  
*1–10* — образцы ДНК



*M* — молекулярный маркер (*GeneRuller 25–700 kb DNA Ladder (ThermoScientific, США)*);  
*13, 14* — образцы дополнительной ДНК

Рисунок 5. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК с праймерами

В целом, с учетом полученных результатов все изученные ISSR-маркеры, кроме (TA)8G и (TG)8AA, могут быть рекомендованы при изучении генетического разнообразия яблони Сиверса с использованием ПЦР.

#### Обсуждение

Первичный анализ растительных образцов с маточных деревьев генетических резерватов для проведения оценки внутривидового разнообразия яблони Сиверса по данным молекулярно-генети-

ческого обследования был получен авторами проекта ГЭФ/ПРООН «Сохранение *in-situ* горного агроборазнообразия в Казахстане».

Анализ полученных данных показал, что на территории Жонгар-Алатауского ГНПП только труднодоступные и наиболее удаленные резерваты (Кокжота 1, 2) общей площадью 88 га, или 17 %, считаются лучшими насаждениями, не затронутыми процессами генетической эрозии и не содержащими ДНК *Malus domestica*. В резерватах «Пихтовое и Солдатское ущелья» и «Урочище Крутое» до 30 % семян оказались гибридными с *Malus domestica*. На генетических резерватах «Чернова речка» и № 1, 2, 3 АЛСЦ генетическая оценка деревьев не проводилась.

Результаты проведенного нами анализа генетического полиморфизма ДНК, выполненного с использованием 6 межмикросателлитных маркеров, позволили идентифицировать отобранные образцы *Malus sieversii* и объективно охарактеризовать степень их генетического разнообразия. В дальнейшем имеется возможность использовать эти же ISSR-маркеры для характеристики и идентификации яблони Сиверса при сравнении с другими сортами яблони [9].

По результатам анализа генетического полиморфизма ДНК наиболее идентичным *Malus sieversii* являются образцы под номерами 1, 3, 6 и 9 (табл. 1). Образцы листьев 1 и 3, полученные из пророщенных семян, были отобраны на территории генетических резерватов Черновского инспекционного участка Чернова речка и урочища Крутое. В структуре плодовых лесов данных резерватов находятся самые старые экземпляры *Malus sieversii*, имеющие средние или мелкие плоды желтого, желто-розового цвета.

Образец листьев 6 отобран со старовозрастного экземпляра *Malus sieversii* генетического резервата Тополевского инспекционного участка, расположенного в 19 квадрате Осиновая.

Образец листьев 9 был отобран с семян Сарканского плодового питомника, полученного из семян *Malus sieversii*. Плоды для получения сеянцев ежегодно собираются со старовозрастных экземпляров генетических резерватов, однако в результате перекрестного опыления возможны генетические изменения или эрозия сеянцев.

Таким образом, результаты проведенного исследования позволили идентифицировать образцы яблони Сиверса и объективно характеризовать степень их генетического разнообразия.

#### Выводы

Принцип маркерного подхода к селекции очень удобен при анализе больших генетических коллекций, так как дает возможность оценки разнообразия по селективируемым генам и выявления доноров с комплексом важных признаков. Так, проведенный анализ яблони позволил установить, что исследуемые генотипы содержат большое количество уникальных микросателлитных локусов генома, что и представляет интерес для селекционной работы. Результаты такого анализа могут быть основой при выборе родительских форм для скрещиваний. По результатам анализа генетического полиморфизма ДНК наиболее идентичным *Malus sieversii* являются образцы, взятые со старовозрастных особей генетических резерватов Чернова речка и урочища Крутое и сеянца, выращенного из плодов этих растений.

В целом результаты работы говорят о высокой перспективности дальнейшего использования ISSR-маркеров, (AG)<sub>9</sub>C, (GA)<sub>9</sub>C, (TC)<sub>8</sub>C и (TG)<sub>8</sub>A в исследованиях по оценке генетического разнообразия отечественной яблони и подтверждают эффективность применения ДНК-маркерных систем, основанных на анализе полиморфизма межмикросателлитных последовательностей генома.

*Исследования выполнены в рамках научного проекта № 0649/ГФ4 ГФ МОН РК.*

#### Список литературы

- 1 Williams, J.G.K., Kubelik, A.P., & Livak, K.J. et al. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18(22), 6531–6535.
- 2 Deguilloux, M.F. (2004). DNA-based control of oak wood geographic origin in the context of the cooperage industry. *Ann. For. Sci.*, 61, 97–104.
- 3 Kenis, K., & Keulemans, J. (2005). Genetic linkage maps of two apple cultivars based AFLP and microsatellite markers. *Molecular Breeding*, 15(2), 205–219.
- 4 Tatum, T.C., Stepanovic, S., & Biradar, D.P. et al. (2005). Variation in nuclear DNA content in *Malus* species and cultivated apples. *Genome*, 48(5), 924–930.

- 5 Yamamoto, T., Kimura, T., & Sawamura, Y. et al. (2001). SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear. *Theoretical and Applied Genetics*, 102(6), 865–870.
- 6 Bendokas, V., Gelvonauskienė, D., & Gelvonauskis, B. et al. (2007). Identification of apple columnar hybrids in juvenile phase using molecular markers. *Scientific Works of Lithuanian Institute of Horticulture and Lithuanian University of Agriculture*, 26(3), 289–295.
- 7 Brisset, M.N., Cesbron, S., Thomson, S.V., & Paulin, J.P. (2000). Acibenzolar-Smethyl induces the accumulation of defense-related enzymes in apple and protects from fire blight. *European Journal of Plant Pathology*, 106, 529–536.
- 8 Chen, D.M., Zlang, S.L., & Jin, Y.F. (1997). A method for genomic DNA preparation of woody fruit crops. *Acta Agriculturae Universitatis Chekianensis*, 23(6), 621–624.
- 9 Oraquzie, N.C., Gardiner, S.E., & Basset, H.C.M. et al. (2001). Genetic diversity and relationship in *Malus* sp. germplasm collections as determined by Random Amplified Polymorphic DNA. *American Society for Horticultural Science*. 126(3), 318–328.
- 10 Chunyu, Zh., & Chen, X. (2000). The RAPD evidence for the phylogenetic relationship of the closely related species of cultivated apple. *Genet. Res. Crop Evolut.*, 47(4), 353–357.
- 11 Saveleva, E.N., & Kudriavtsev, A.M. (2015). AFLP-analiz geneticheskogo raznoobraziia v rode *Malus* Mill. (Yablonia) [AFLP-analysis of genetic diversity in the genus *Malus* Mill (Apple tree)]. *Genetika. — Genetics*, 10, 1126–1133 [in Russian].
- 12 Aitkhozhina, N.A. et al. (2008). *Molekuliarno-biologicheskaya otsenka vnurividovogo raznoobraziia yablon s ispolzovaniem PTsR-analiza* [Molecular biological assessment of intraspecific diversity of Apple trees using PCR]. Almaty: Otchet NTI [in Russian].

А.С. Бахтаулова, Б. Бекманов, Ж.Ж. Канагатов

### **ДНК-маркерлер арқылы жабайы алманың (*Malus sieversii* Ledeb. M. Roem.) алуантүрлілігін молекулярлық-генетикалық талдау**

*Malus sieversii* Жоңғар-Алатау мемлекеттік ұлттық табиғи саябақтың құнды бай түрлер ішінде ерекше орын алады. Бұл жабайы жемісті екпелердің маңызды (бақ көлемінен 1,05 %) негізін құрайды. Алма ормандарын сақтау үшін бақтың аумағында Сиверс алма ағашының генетикалық резерваттарының қазіргі жағдайы зерттелді, молекулярлық-генетикалық талдау үшін праймерлерді жобалау және синтездеу жасалды, ДНК үлгілерінің генетикалық сипаттамалары ISSR-маркерлерімен анықталды және молекулярлық-генетикалық зерттеулердің нәтижелеріне талдау мен интерпретация жасалды. Жабайы алма ағаштарының алуан түрлілігінің молекулярлық-генетикалық талдауы генетикалық біртекті отырғызу материалдарын өсіру үшін Сиверс алма ағашының табиғи популяциясын тұрақты дамытуды қамтамасыз етеді. Мәдени сұрыптарды іріктеу және қалпына келтіру үшін алма ормандарының бірегей гендік қорын сақтауға бағытталған. Зерттеу ҚР БҒМ ГҚ № 0649/ГФ4 ғылыми жобасының аясында орындалды.

*Кілт сөздер:* Сиверс алма ағашы, популяция, сақтау, генетикалық резерват, ISSR-маркер, молекулярлық-генетикалық талдау.

A.S. Bakhtaulova, B. Bekmanov, Zh.Zh. Kanagatov

### **Molecular and genetic analysis of diversity of Wild Apple (*Malus sieversii* Ledeb. M. Roem.) using DNA markers**

*Malus Sieversii* takes a special place among valuable plant species of Zhongar-Alatau State National Natural Park. It forms a significant array of wild fruit trees (1.05 % of park area). The current state of genetic reserves of Sievers apple forests was studied in the park in order to preserve apple forests. We created design and synthesis of primers for molecular genetic analysis, determined genetic characteristics of DNA samples using ISSR-markers, analyzed and interpreted results of molecular genetic studies. Molecular genetic analysis of diversity of wild apple trees will provide the basis for sustainable development of Sievers apple natural populations by growing genetically uniform planting material. Researches focus on preserving unique gene pool of apple forests for selection and restoration of cultivars. The studies were carried out within research project No.0649/GF4 of grant funding by MES RK.

*Keywords:* Sievers Apple, population, preservation, genetic reserve, ISSR-marker, molecular and genetic analysis.