Применение ISSR-маркеров для выявления и оценки генетической дифференциации популяций липы мелколистной на территории Республики Башкортостан

© Р.Р. Хисамова¹, Х.Г. Мусин², Р.Г. Фархутдинов¹

¹Башкирский государственный университет
Россия, Республика Башкортостан, 450076 г. Уфа, улица Заки Валиди, 32.

²Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН
Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, проспект Октября, 71.

Email: r.hisamova@mail.ru, frg2@mail.ru

Для выявления генетического полиморфизма были использованы маркеры ISSR16 и ISSR17, которые помогли в определенной степени установить генетическое родство липовых насаждений из разных природных зон, а также генетические различия.

Ключевые слова: популяции, липа, полиморфизм, СТАБ-метод выделения ДНК, дендрограмма.

На территории Республики Башкортостан произрастает большое количество многообразных растений. Это связано напрямую с разнообразием климатических зон за счет высотной поясности и широтной зональности [7, 11, 12]. В настоящее время систематика дикорастущих растений в Российской Федерации в большей степени основывается на классических методах ботаники. В то же время генетические методы исследования в нашей республике используются нечасто. Следовательно, исследования с использованием молекулярно-генетических маркеров, в частности, генетического полиморфизма видов, и также популяций, в нашей республике считается актуальным [10].

Так как для липы мелколистной (*Tilia cordata* Mill.) исследования только на начальном пути своего развития, на сегодняшний день большой интерес представляет генетический анализ популяций липы для того, чтобы в дальнейшем оценить гетерогенность генетического характера и разграничения возможных отдельных популяций. В настоящее время для выявления полиморфизма липы мелколистной ДНК прежде всего могут применяться методы, которые основаны на ПЦР для одновременного выявления мультислокусного полиморфизма ДНК. В этом случае знания нуклеотидных последовательностей всего генома или его частей не считаются необходимыми.

Целью данной работы было проведение молекулярно-генетических исследований для выявления особенностей генетического полиморфизма популяций липы мелколистной произрастающих в разных природных зонах Республики Башкортостан с использованием ISSR-маркеров.

Материалы и методы. Исследования и сбор материала проводились в период лета (июль-август) 2019 и 2020 годов на территории Республики Башкортостан. Для выделения ДНК использовали СТАВ – метод [1], в модификации д.б.н. Кулуева Б.Р. [10].

Исследования генетической дифференциации *T. cordata* было проведено на основе анализа полиморфизма ДНК с помощью микросателлитного маркера с полилокусным

доминантным типом наследования – Inter Simple Sequence Repeats (ISSR). Для ISSR анализа нами были выбраны два праймера ISSR 16 и ISSR 17. Выбор праймеров был обусловлен тем, что именно они по данным ряда авторов показали высокую полиморфность локусов по отношению к другим исследованным объектам [2, 3]. Нуклеотидная последовательность данных праймеров следующая:

ISSR16 GAGAGAGAGAGAGAGAC
ISSR17 GAGAGAGAGAGAGAGAYC

Для ISSR-PCR анализа применяли стандартную методику [6]. Для фракционирования выделенного тотального ДНК и анализа размера ампликонов после ПЦР использовали 1% агарозный гель. Для его приготовления с расчетом на 100 мл взвесили 1 % агарозы (Le 2 agarose, Russia), прилили 2000 мкл TAE 50x буфера и довели до 100 мл дистиллированной водой. ПЦР–продукт наносили в гель в количестве 7,5 мкл, вместе с 2,5 мкл загрузочного красителя состава бромфеноловый синий+ксиленцианол.

Анализы проводили в однократном трис-ацетатном (TAE) буфере. Реактивы для одного литра однократного TAE буфера следующие: TAE 50x – 20 мл, дистиллированная вода – 980 мл. После окончания электрофореза гель выдерживали в растворе бромистого этидия в течение 8 минут. Приблизительную оценку качества выделенного продукта проводили по интенсивности флуоресценции в УФ-свете [9].

При построении дендрограмм применили метод UPGMA с использованием программы TREECON [5].

Результаты. В наших исследованиях использовались гербарные образцы листьев липы. Сбор растительного материала был произведен с 26 липовых насаждений на территории Республики Башкортостан (табл. 1).

Таблица 1. Места сбора образцов *Tilia cordata* Mill. для анализа.

№ образца	Место сбора
1.	Альшеевский район. Село санатория им. Чехова.
2.	Давлекановский район. Озеро Аслыкуль.
3.	Гафурийский район. Заказник «Зилим».
4.	Государственный природный зоологический заказник республиканского значения «Наказбашевский». Куюргазинский район.
5.	Кугарчинский район. Заказник «Икский» д. Щербаки.
6.	Кугарчинский район. Заказник «Икский». Хутор Сюрень
7.	Хайбуллинский район. Заповедник «Шайтантау».
8.	Бурзянский район. Заказник «Алтын-Солок». д. Киленбай.
9.	Бурзянский район. д. Галиакберово.
10.	Бирский район. Заказник «Бирский».
11.	Аскинский район. д. Усть-Табаска.
12.	Белокатайский район. д. Карлыханово.
13.	Ишимбайский район. с. Макарово.
14.	Туймазинский район. п. Кандры.
15.	Буздякский район. с. Кузеево. Предуральская лесостепная зона.
16.	Мелеузовский район. Нац. парк Башкирия. Р-н Кашалы.
17.	Башкирский заповедник. Белорецкий район. с. Реветь
18.	Мишкинский район. д. Новоакбулатово. Заказник Алтын-Солок
19.	Бишбулякский район. д. Елбулактамак
20.	Аургазинский район. д. Куезбашево

21.	Мелеузовский район. п. Нугуш
22.	Белебеевский район. г. Белебей.
23.	Мелеузовский район. Национальный парк Башкирия. п. Нугуш
24.	Гафурьевский район. с. Табынское.
25.	Бижбулякский район. д. Бижбуляк.
26.	Иглинский район. д. Иглино.

В результате проведения ПЦР с использованием в качестве матрицы ДНК, выделенной по протоколу, в большинстве случаев наблюдалось достаточное количество продукта и хорошая воспроизводимость ISSR-маркеров, что свидетельствует об удалении ингибиторов ПЦР.

Результаты ISSR-анализа оценивали с использованием бинарной матрицы, в которой значения 1 и 0 указывают на наличие или отсутствие продукта, соответственно. Генетические отношения оценивались с использованием анализа кластеров UPGMA (невзвешенный парный метод с арифметическим средним), основанный на индексах генетического подобия.

На основании данных, полученных в ходе ISSR-анализа, с помощью программы TREECON, была построена дендрограмма по двум маркерам, отражающая генетическое сходство изученных образцов (рис.1).

Рис. 1. Общая схема дендрограммы сходства образцов *T. cordata* на территории Республики Башкортостан с использованием генетического маркеров ISSR16 и ISSR17

Анализ филогенетического дерева показал, что образцы под номерами 23 и 1 являются опорными объектами. Липовые образцы №16 и №9 филогенетически отдалены от других образцов. Проведение ISSR анализа образцов липы мелколистной из различ-

ных природных зон для выявления генетического полиморфизма с использованием маркеров ISSR16 и ISSR17 показало, что генетически близкими оказались образцы липы из Альшеевского района и Национального парка Башкирия. Наибольшее генетическое различие в исследуемой группе по выявлению генетического полиморфизма с использованием маркеров ISSR16 и ISSR17 установлено в липовых насаждениях из Давлекановского, Гафурийского, Кюргазинского и Бижбулякского районов, что может свидетельствовать о существовании в этих районах отдельных популяций липы мелколистной.

Необходимо отметить, что применение только двух маркеров не дало возможности выявить четких ареалов произрастания генетически различных популяций лип. Следовательно, задачей для дальнейших исследований будет поиск, и расширение спектра индивидуальных маркеров для лип. Это в последующем поможет показать специфичность популяций липы и использовать их при оценке нектаропродуктивных популяций.

Литература

1. Doyle J. J. and Doyle J. L. Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue // Focus. - Vol. 12. - No. 1. - 1990. - P. 13-15.
2. Hossein Jafari S. Genetic differentiation between bitter and sweet asafetida plants using ISSR markers / Hossein Jafari, S., Sepehry, A., Soltanloo, H. et al. // Mol. Biol. Rep. – 2019. – V. 46. – 1069-1078.
3. Rafalski JA. Generating and using DNA markers in plants. / Rafalski JA, Vogel JM, Morgante M, Powell W, Andre C, Tingey SV. // Nonmammalian Genomic Analysis: A Practical Guide. Academic Press. - 1996. – P. 75–134.
4. Singh Akanksha. Efficiency of SSR, ISSR and RAPD markers in molecular characterization of mungbean and other Vigna species / Singh Akanksha, Dikshit HK, Jain Neelu, Singh D, Yadav RN. // Indian journal of Biotechnology. – 2014. – V. 13. – P. 81-88.
5. Van de Peer Y. Treecon for Windows: a software package for the construction and drawing evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. Computer Application in the Biosciences. 1994. V.10. No. 5. P. 569–570.
6. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics. 1994. Vol. 20. P. 176–183.
7. Байрамгулова З.Х. Особенности генофонда солодки Коржинского на юго-востоке Башкортостана / З.Х. Байрамгулова, Н.Н. Редькина, Н.Р. Байрамгулов // Актуальные проблемы генетики и молекулярной биологии. Материалы всероссийской молодежной конференции в рамках федеральной целевой программы «Научные и научнопедагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы. ФГБОУ ВПО "Башкирский государственный аграрный университет". – 2010 – С. 32–37.
8. Водчиц Н. В. Сравнительный анализ методов экстракции общей геномной ДНК голубики высокорослой / Н. В. Водчиц, И. О. Зайцева [и др.] // Веснік Палескага дзяржаўнага ўніверсітэта. Серыя прыродазнаўчых навук : навучна-практычны журнал. – 2014. – №2. – С. 25-30.

9. Звягин А.С. Адаптация методики микросателлитного анализа для изучения генетического разнообразия сортов винограда пино белый, рислинг и их клонов / А.С. Звягин, Л.П. Трошин, Ж.М. Мухина [и др.] // «Новации и эффективность производственных процессов в виноградарстве и виноделии». – Т.2 - Виноградарство. – Краснодар, 2005. – С.113-117.
10. Кулуев Б.Р. Молекулярно-генетическое исследование Одуванчика осеннего (*Taraxacum hybernum steven*) с использованием SSR-, RAPD- и ISSR-маркеров / Б.Р. Кулуев, А.В. Фатерыга, А.Р. Кулуев, Е.В. Михайлова, А.В. Чемерис // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2018. - 22 (1). – С. 102–107.
11. Тухватуллина Л.А. Редкие ресурсные дикорастущие луки флоры Башкортостана в условиях интродукции / Л.А. Тухватуллина, Л.М. Абрамова // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2012. – №1. – С. 33–35.
12. Федоров Н.И. Сравнительный анализ изменчивости изоферментных локусов видов *Thalictrum* L. на Южном Урале / Н.И. Федоров, Н.Н. Редькина, Ю.А. Янбаев, О.И. Михайленко // Актуальные проблемы генетики и молекулярной биологии. Материалы всероссийской молодежной конференции в рамках федеральной целевой программы «научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы. Министерство сельского хозяйства Российской Федерации. ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный аграрный университет». – 2012. – С. 90–92.

Application of ISSR markers to identify and assess genetic differentiation *Tilia cordata* Mill. of populations on the territory of the Republic of Bashkortostan

R. R. Khisamova¹, Kh. G. Musin², R. G. Farkhutdinov¹

¹*Bashkir State University*

32 Zaki Validi Street, 450076 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.

²*Institute of Biochemistry and Genetics, Russian Academy of Sciences*

71 Prospekt Oktyabrya, 450054 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.

Email: r.hisamova@mail.ru, frg2@mail.ru

To identify genetic polymorphism, markers ISSR16 and ISSR17 were used, which helped to a certain extent to establish the genetic relationship of linden plantations from different natural zones, as well as genetic differences.

Keywords: populations, linden, polymorphism, CTAB-method of DNA isolation, dendrogram.