

УДК [575.2+582.572.2]:58.088

Т.А. Крицкая
А.А. Крицкий
А.С. Кашин

T.A. Kritckaia
A.A. Kritckii
A.S. Kashin

ОЦЕНКА УРОВНЯ ВНУТРИВИДОВОГО ПОЛИМОРФИЗМА ТЮЛЬПАНА ШРЕНКА НА ОСНОВЕ ISSR-МАРКЁРОВ

VALUE OF INTRASPECIFIC POLYMORPHISM LEVEL OF THE *TULIPA SCHRENKII* REGEL USING ISSR-MARKERS

Проведён ISSR анализ ДНК растений из популяций *Tulipa schrenkii* Regel – вида, занесённого в «Красную книгу Российской Федерации». Отобрано десять информативных праймеров для молекулярно-генетического анализа вида. Уровень полиморфизма внутри вида составил в среднем 50,9 %. Выявлено 52 полиморфных локуса, по которым были генотипированы 76 образцов *T. schrenkii* из 6-ти популяций Саратовской области. Показатели внутривидовой изменчивости варьировали в пределах от 18,3 % до 68,3 % (в среднем 46,6 %). По результатам определения расстояний Неи и анализа в TFGA выявлено две генетические группы, соответствующие, вероятно, времени заселения видом указанных территорий после последних трансгрессий Каспийского моря.

Тюльпан Шренка (*Tulipa schrenkii* Regel, Liliaceae) является высоко декоративным охраняемым видом. На территории Саратовской области и Российской Федерации *T. schrenkii* имеет тенденцию к сокращению численности (Литвинская, 2008; Худякова, Давиденко, 2006).

Одним из наиболее актуальных и перспективных путей сохранения редких и исчезающих видов растений является создание генетического банка *in vitro*. Известно, что отбор образцов охраняемых видов растений *ex situ* целесообразно проводить с учетом данных об уровне и характере генетического разнообразия вида в целом, полученных с использованием молекулярно-генетических методов (Хадеева и др., 2012).

В настоящее время для генетического мониторинга используются различные типы молекулярных маркеров (RELF, RAPD, AFLP, ISSR, микросателлиты и т. п.), каждая из которых имеет свои достоинства и недостатки (Гостимский и др., 2005; Куцев, 2009). Микросателлитные последовательности окружают многие гены и могут быть использованы как «якорные» последовательности к этим генам. На этой особенности основан ISSR-метод (Inter-Simple Sequence Repeat), в котором используется только один праймер, который работает на обеих цепях ДНК, и амплифицируется фрагмент межмикросателлитной ДНК длиной от 50 до 3000 п.н. ISSR не требует предварительного клонирования и секвенирования фрагментов для подбора праймеров и хорошо воспроизводим в строгих условиях реакции (Боронникова, 2009).

Цель нашего исследования состояла в подборе наиболее информативных ISSR-праймеров для оценки внутривидового полиморфизма *T. schrenkii*.

Сбор материала проводился на территории Балаковского (BLK), Красноармейского (KRM), Озинского (OZN), Пугачёвского (PGV), Саратовского (SRT) и Фёдоровского (FDR) районов Саратовской области. Для проведения молекулярно-генетического (ISSR) анализа было собрано 76 образцов *T. schrenkii*, представляющих 6 популяций.

Суммарную ДНК исходных образцов выделяли с использованием набора NucleoSpin® Plant II (MACHEREY-NAGEL, Germany) согласно протоколу производителя из 20 мг растительного материала в воздушно-сухом состоянии, полученного из молодых вегетирующих листьев дикорастущих тюльпанов. Концентрацию экстрагированной ДНК определяли с помощью флуориметра Qubit (Invitrogen, США).

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в амплификаторе Mastercycler gradient (Eppendorf, Germany) с ISSR-праймерами, синтезированными ЗАО «Синтол» («Биоком», Москва). Для ПЦР были использованы наборы реактивов производства «Евроген» (Москва). ISSR-анализ ПЦР проводили в объёме реакционной смеси 25 мкл, содержащей: NH_4 -буфер – 1х, смесь dNTPs – 0,8 мкМ, праймер – 0,4 мкМ, Hot Start Taq-полимеразу – 1 ед., ДНК (5,0, 12,5, 25,0, 37,5 и 50,0 нг) и деионизованную воду (Фризен, 2007).

Программа амплификации включала следующие этапы: 1 цикл – 95 °С – 2 мин.; 35 циклов – 95 °С – 30 с., 44 °С – 45 с., 72 °С – 1 мин. 30 с; 1 цикл – 72 °С – 10 мин., 4 °С – длительное охлаждение (Куцев, 2009).

Разделение продуктов амплификации проводили в 2 %-ном агарозном геле с использованием горизонтальной камеры для электрофореза с 0,5xTBE-буфером. Готовый гель окрашивали бромистым этидием, фрагменты ДНК анализировали в трансиллюминаторе (Vilber Lourmat, Франция) и фотографировали с помощью гель-документирующей системы (Doc-print VX2, Германия). Учитывали только локусы, имеющие однозначную интерпретацию, мономорфные фрагменты в анализ не включались. Статистическую обработку результатов выполняли с помощью программы TFGA version 1,3 (Miller, 1997).

Таблица 1

ISSR-праймеры, дающие удобную амплификацию ДНК *T. schrenkii*

Название праймера	Последовательность (5'-3')	Количество полиморфных локусов
UBC810	(GA)8T	5
UBC811	(GA)8C	7
UBC816	(CA)8T	3
UBC824	(TC)8G	1
UBC827	(AC)8G	6
UBC836	(AG)8YA	6
UBC841	(GA)8YC	3
UBC843	(CT)8RA	10
UBC845	(CT)8RG	6
UBC851	(GT)8YG	5

При проведении ISSR-анализа протестировали 26 праймеров, из которых для дальнейшего анализа было отобрано 10, обеспечивающих получение достаточного количества чётких полиморфных ампликонов (UBC810, UBC811, UBC816, UBC824, UBC827, UBC836, UBC841, UBC843, UBC845, UBC851). Размер амплифицированных фрагментов варьировал в диапазоне от 50 до 300 п.н. Экспериментально было установлено оптимальное количество ДНК в реакционной смеси, которое составило 25 нг. Увеличение количества ДНК в пробе приводило к образованию «шмеров», маскирующих продукты амплификации, тогда как при низком содержании ДНК фрагменты получались бледными и нечёткими.

Таблица 2

Уровень генетического полиморфизма *T. schrenkii* по 52 ISSR-локусам

№	Популяция	Размер выборки	Процент полиморфных локусов, %
1	BLK	12	18,3
2	KRM	10	59,3
3	OZN	10	68,3
4	PGV	10	35,0
5	SRT	10	55,3
6	FDR	24	43,4
	Всего:	76	

Всего в результате ISSR-анализа выявлено 102 локуса, из них 52 (50,9 %) были полиморфными и амплифицировались десятью вышеперечисленными праймерами (табл. 1). Выявлено 4 уникальных фрагмента – по 2 для популяций KRM и SRT. Показатели внутривнутрипопуляционной изменчивости варьировали в пределах от 18,3 % (BLK) до 68,3 % (OZN), среднее количество полиморфных локусов внутри популяций составило 46,6 % (табл. 2). По полученным на основе ISSR-маркеров данным были составлены бинарные матрицы и проведён кластерный анализ методом UPGMA с использованием генетических дистанций Неи (Nei, 1972).

Установлено, что по степени генетической близости исследуемые популяции объединяются в два основных кластера: 1 – образцы KRM, OZN и SRT; 2 – BLK, PGV и FDR (рис. 1). Образцы кластеризуются в соответствии с приуроченностью районов произрастания исследованных популяций к определённым элементам макрорельефа. Предполагается, что степень генетического сходства и различия обусловлены временем заселения растениями вида указанных территорий после последних трансгрессий Каспийского моря.

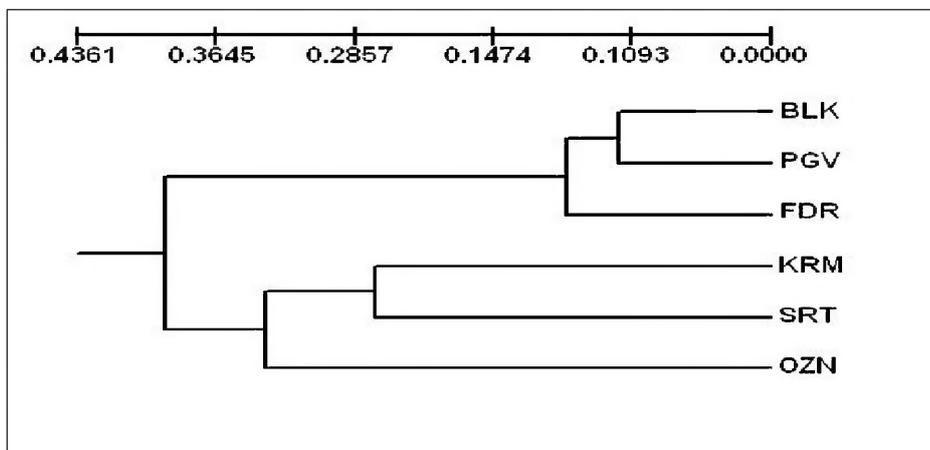


Рис. 1. UPGMA-дендрограмма, построенная на основе ISSR-данных для шести популяций *T. schrenkii* Саратовской области

Таким образом, установлено оптимальное количество ДНК, необходимое и достаточное для ПЦР анализа *T. schrenkii*, которое составило 25 нг на реакцию. Отобрано десять информативных праймеров для ISSR-анализа вида. Получены предварительные данные об уровне и характере полиморфизма *T. schrenkii*. Для получения более полной картины необходимо увеличить количество исследуемых выборок, а также включить в анализ дополнительный математический инструментарий.

ЛИТЕРАТУРА

- Боронникова С.В.** Молекулярное маркирование и генетическая паспортизация ресурсных и редких видов растений с целью оптимизации сохранения их генофондов // *Аграрный вестник Урала. Биология*, 2009. – № 2 (56). – С. 57–59.
- Гостимский С.А., Кокаева З.Г., Коновалов Ф.А.** Изучение организации и изменчивости генома растений с помощью молекулярных маркеров // *Генетика*, 2005. – Т. 41, № 4. – С. 480–490.
- Куцев М.Г.** Фрагментарный анализ ДНК растений: RAPD, DAF, ISSR. – Барнаул: АРТКА, 2009. – 164 с.
- Литвинская С.А.** Тюльпан Шренка – *Tulipa schrenkii* Regel / Красная книга Российской Федерации (растения и грибы). – М.: «Товарищество научных изданий КМК», 2008. – С. 333–334.
- Фризен Н.** Молекулярные методы, используемые в систематике растений. – Барнаул: АзБука, 2007. – 64 с.
- Хадеева Н.В., Яковлева Е.Ю., Горюнова С.В., Шишкина А.А., Кочумова А.А., Жолобова О.О., Коротков О.И., Кудрявцев А.М.** Оценка состояния популяций гиацинта сарматского *Billevalia sarmatica* (Georgi) Woronow Волгоградской области с помощью молекулярно-генетического маркирования // *Генетика*, 2012. – Т. 48, № 6. – С. 706–712.
- Худякова Л.П., Давиденко О.Н.** Тюльпан Геснера – *Tulipa gesneriana* L. / Красная книга Саратовской области: Грибы. Лишайники. Растения. Животные. – Саратов: Изд-во торгово-промышленной палаты Саратов. обл., 2006. – С. 81.
- Miller M.P.** Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data / Computer software distributed by author, 1997.
- Nei M.** Genetic distance between populations // *American Naturalist*, 1972. – V. 106, No 949. – P. 283–292.

SUMMARY

DNA samples obtained from the populations of the Red Data Book species *Tulipa schrenkii* Regel from Saratov region were examined using ISSR analyses. Ten informative primers were selected for molecular-genetic analyses of the species. Polymorphism level within the *T. schrenkii* species was 50,9 % on the average. 76 individuals from 6 tulip populations with 52 polymorphic loci were allowed. The level of variability within populations was 18,3 % to 68,3 % (46,6 % on the average). An analysis in the TFPGA by means of Nei's distances was revealed two genetic groups of tulips, which are determined, apparently, by the time the plants of the species populated the mentioned territories after the last Caspian Sea overlaps.