

ИНФОРМАТИВНОСТЬ ISSR-МАРКЕРОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ КЛЕНА ОСТРОЛИСТНОГО НА ЮЖНОМ УРАЛЕ

С применением ISSR-анализа исследован полиморфизм 9 популяций клена остролистного (*Acer platanoides* L.) Южного Урала. Доля полиморфных фрагментов ДНК, в зависимости от праймера, изменялась от 0,800 до 0,926 и в среднем составила 0,861. Проведенный анализ не выявил каких-либо географических закономерностей в генетическом разнообразии популяций. Сделаны рекомендации по охране и рациональному использованию генетических ресурсов вида в регионе.

Ключевые слова: клен остролистный, популяция, Южный Урал, ISSR-маркеры, полиморфизм популяций.

На восточной части ареала на Южном Урале, где имелось около 90 % эксплуатационного запаса кленов бывшего СССР, в последние четыре десятилетия наблюдалось почти двукратное уменьшение (с 271 до 161 тысячи гектаров) лесопокрываемых площадей клена остролистного. Такое сокращение вызвано главным образом не антропогенной деятельностью, а комплексом неблагоприятных климатических факторов. Оно создает угрозу для устойчивости широколиственных лесов Южного Урала, где *Acer platanoides* L. является, наряду с липой *Tilia cordata* Mill., дубом черешчатым *Quercus robur* L. и видами ильмовых *Ulmus* L., ключевым видом. Это обстоятельство требует знаний о состоянии генофонда клена остролистного в регионе, а их отсутствие препятствует разработке научно обоснованных мер по охране и рациональному использованию генетических ресурсов вида на Южном Урале. К сожалению, до сегодняшнего времени не имеются исследования генетики популяций *Acer platanoides* L., выполненных с применением современных молекулярно-генетических методов. Исходя из вышеизложенного, в настоящей работе поставлена цель – провести оценку информативности молекулярно-генетических маркеров для последующего их использования для популяционно-генетического и экологического изучения клена остролистного. В качестве метода был избран ISSR-анализ (Inter Simple Sequence

Repeats). Он основан на использовании полимеразной цепной реакции (ПЦР) с одним или несколькими праймерами (длиной 15–24 нуклеотида), состоящими из tandemных коротких 2–4 нуклеотидных повторов и одного селективного нуклеотида на 3'-конце. В геномах растений и животных количество микросателлитных повторов очень велико, что делает этот метод удобным для генетического анализа. Микросателлитные последовательности окружают многие гены и могут быть использованы как якорные последовательности к ним. Метод не требует предварительного клонирования и секвенирования фрагментов ДНК для подбора праймеров и хорошо воспроизводим [1].

Материал и методы исследований

На территории Республики Башкортостан образцы для анализа были собраны с растений на пробных площадях в насаждениях клена остролистного, условно обозначенных Ap1 (Мишкинский район, 55.590846 с.ш., 55.600944 в.д.), Ap2 (Калтасинский район, 55.990671 с.ш., 55.174831 в.д.), Ap3 (Аскинский район, 55.939444 с.ш., 56.611059 в.д.), Ap4 (Куюргазинский район, 52.781621 с.ш., 55.836891 в.д.), Ap5 (Ишимбайский район, 53.245329 с.ш., 55.979297 в.д.), Ap6 (Альшеевский район, 53.983732 с.ш., 54.796708 в.д.), Ap7 (Туймазинский район, 54.529813 с.ш., 53.590570 в.д.), Ap8 (Уфимский район, 54.771547 с.ш., 55.731663 в.д.), в Пермс-

ком крае взята выборка Ар9 (Куединский район, 56.554042 с.ш., 55.709419 в.д.).

Выделение ДНК проводили по методике С. Роджерса [1] с отличием того, что в качестве сорбента вторичных метаболитов использован поливинилполипирролидон. Для проведения молекулярно-генетического анализа [1] была выделена ДНК из свежих листьев с 31-32 деревьев с каждой пробной площади. Навеска одного образца составляла 100 мг. Анализ полиморфизма ДНК проведен у 286 проб ДНК с пятью праймерами посредством полимеразной цепной реакции. Концентрацию и качество ДНК определяли на спектрофотометре «NanoDrop 2000» (ThermoFisherScientific, США) и выравнивали до 10 нг/мкл.

Для полимеразной цепной реакции (ПЦР) использована реакционная смесь, включающая 2 единицы *Tag*-полимеразы, 2,5 мкл стандартного 10x буфера для ПЦР, 25 пМ праймера, 2,5 мМ Mg²⁺, 0,25 мМ dNTP, 5 мкл геномной ДНК. Амплификация проведена в Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems, США) по программе: предварительная денатурация 94 °С, 2 мин.; первые пять циклов 94 °С, 20 сек.; t° отжига, 10 сек.; 72 °С, 10 сек.; в последующих тридцати пяти циклах 94 °С, 5 сек.; t° отж., 5 сек.; 72 °С, 5 сек. Последний цикл элонгации длился 2 мин при 72 °С. Температура отжига в зависимости от G/C-состава праймеров варьировала от 52 до 64 °С. В качестве отрицательного контроля в реакционную смесь добавляли вместо ДНК 5 мкл деионизированной воды. ПЦР повторяли не менее трех раз. Продукты амплификации разделяли путем электрофореза в 1,7% агарозном геле в 1x TBE буфере. Гели окрашивали бромистым этидием и фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете в системе Gel-Doc XR («Bio-Rad», США). Для определения длины фрагментов ДНК использовали маркер молекулярной массы (100 bp+1.5+3 KbDNA Ladder, «ООО-СибЭнзим-М»). Определение длин фрагментов проводилось с использованием программы QuantityOne в системе гель-документации Gel-Doc XR («Bio-Rad», США). Для компьютерной обработки полученные данные представлены в виде матрицы бинарных данных. В ней наличие или отсутствие в спектре одинаковых по размеру фрагментов ДНК рассматривается как состояние 1 или 0, соответственно. При этом учитывали только воспроизводимые в повторных

экспериментах фрагменты, изменчивость по интенсивности не учитывалась. Компьютерный анализ полученных данных проведен с помощью программы POPGENE1.31 [2] и с помощью специализированного макроса GenAlEx6 [3] для MS-Excel.

Для выявления уровня полиморфизма ДНК были протестированы 22 ISSR-праймера: (AC)₈CG, (AC)₈CC, (AC)₈CT, (GA)₈C, (CA)₆G, (ACC)₆G, (AGC)₆C, (AGC)₆G, (AC)₈T, (TG)₈AA, (TG)₈GC, (AG)₈CA, (AG)₈CG, (CTC)₆C, (GAG)₆C, (ACG)₇G, (ATG)₇C, (CT)₈TG, (CA)₆GT, (GA)₆GG, (GT)₆GG, (GA)₆CC.

Результаты исследований

При сравнительном изучении установлено, что праймеры X10 (нуклеотидная последовательность 5' > 3' (AGC)₆C, длина фрагментов 180-1750 пн), M27 ((AG)₈C, 190-1020 пн), M3 ((AC)₈CT, 150-2150 пн), ISSR-10 ((ATG)₇C, 210-1040 пн) и CR-215 ((CA)₆GT, 140-900 пн) являются наиболее информативными для достижения цели работы.

При использовании отдельных праймеров суммарной выборке растений установлены следующие характеристики: X10 (число фрагментов 20, в т.ч. полиморфных – 16, частота последних 0,800), M27 (22, 19, 0,864), M3 (27, 25, 0,926), ISSR-10 (16, 13, 0,813) и CR-215 (16, 14, 0,861). Число фрагментов варьировало в целом, таким образом, составило 101, полиморфных – 87 (частота 0,861) от 13 до 25. Доля полиморфных локусов в выборке в зависимости от ISSR-праймера колебалась от 0,800 до 0,926 и в среднем составила 0,861.

Нам не известны другие популяционно-генетические исследования клена остролистного с применением молекулярно-генетических методов, основанных на ПЦР. Ранее нами приведено [4] описание изменчивости аллозимов ферментов (аспартатаминотрансферазы, диафоразы, шикиматдегидрогеназы, лейцинаминопептидазы, аминокептидазы, малатдегидрогеназы, кислой фосфатазы, пероксидазы, неспецифических эстераз, NADHдегидрогеназы, алкогольдегидрогеназы, изоцитратдегидрогеназы, 6-фосфоглюконатдегидрогеназы, формиатдегидрогеназы и глутаматдегидрогеназы), которые контролируются не менее чем 25 локусами. Изменчивость выявлена в 13 локусах – в них поли-

Таблица. Число и частота ISSR-маркеров ДНК в выборках клена остролистного

Праймеры	Выборки								
	Ap1	Ap2	Ap3	Ap4	Ap5	Ap6	Ap7	Ap8	Ap9
X10	4 (0.400)	6 (0.462)	6 (0.500)	5 (0.417)	4 (0.333)	3 (0.250)	8 (0.533)	4 (0.333)	8 (0.533)
27	6 (0.500)	9 (0.600)	10 (0.667)	10 (0.714)	8 (0.500)	12 (0.632)	4 (0.364)	5 (0.294)	10 (0.526)
M3	12 (0.632)	10 (0.500)	6 (0.500)	15 (0.833)	17 (0.773)	16 (0.727)	1 (0.100)	4 (0.364)	5 (0.625)
ISSR-10	7 (0.583)	4 (0.400)	10 (0.769)	7 (0.700)	8 (0.571)	10 (0.769)	5 (0.385)	3 (0.250)	5 (0.417)
CR-215	7 (0.583)	3 (0.273)	5 (0.556)	8 (0.615)	6 (0.545)	6 (0.600)	4 (0.364)	5 (0.385)	9 (0.818)
Всего	36 (0.554)	32 (0.464)	37 (0.607)	45 (0.672)	42 (0.560)	47 (0.618)	22 (0.367)	21 (0.323)	37 (0.569)

Примечание: В скобках указана доля полиморфных локусов.

морфизм выявлен не менее чем у одного образца. Доля полиморфных локусов может составлять составляет 52 %. Эта величина снижается, если использовать 95 %-ный критерий полиморфности. Обнаруженные различия результатов изоферментного и ISSR-анализов могут быть связаны с тем, что они характеризуют функционально отличающиеся части генома.

Число полиморфных фрагментов изменяется (таблица) в зависимости от выборок от 21 до 40, их частота – от 0,323 до 0,672. Анализ не выявили какой-либо закономерности клинальной изменчивости в направлении север-юг, ее зависимости от приуроченности групп кленов к разным растительным или экологическим условиям. Таким образом, причины повышенного или пониженного генетического разнообразия тех или иных популяций требуют дополнительного исследования. Следует отметить, что изоферментные маркеры также не позволили выявить [4] пространственные закономерности в уровне полиморфизма локусов клена остролистного в различных популяциях Южного Урала. Возможно, между кленовниками территории существует достаточно сильный поток генов, нивелирующий генетические различия популяций. В пользу этого предположения служит почти повсеместная встречаемость *A. platanoides* раной долей участия в составе широколиственных лесов западного макросклона южно-уральских гор и Предуралья. В этом случае вид, если рассматривать его как объект охраны и использования генетических ресурсов, не требует дифференцированного подхода при

проведении природоохранных и лесохозяйственных мероприятий в регионе.

Выводы

Представляется, что нами обнаружено генетическое разнообразие ISSR-маркеров клена остролистного, близкое к максимально имеющемуся в регионе. В качестве аргументов можно сравнительно большую исследованную территорию (расстояния между крайними местообитаниями более 500 и 200 км в направлениях север-юг и запад-восток), особенности расположения изученных кленовников в части ареала вида (пробные площади заложены в том числе на крайних северной, восточной и южной его границах), экологическое разнообразие региона (изученные насаждения расположены в растительных зонах: бореальнолесная с подзоной сосновых и березовых лесов, широколиственнолесная с подзоной широколиственно-хвойных лесов, широколиственнолесная с подзоной широколиственных лесов, лесостепная), а также сравнительно большой размер суммарной выборки (генотипированы 286 деревьев). Обнаруженный высокий полиморфизм ISSR-маркеров, а также выровненность вычисленной доли полиморфных локусов (параметр изменяется в достаточно узком диапазоне от 0.800 до 0,926) делает их удобным и информативным инструментом для широкого спектра генетических, ботанических и экологических исследований, на основе которых можно разработать меры по охране и рациональному использованию генетических ресурсов клена остролистного.

29.04.2014

Работа выполнена при финансировании задания 2014/153 государственных работ в сфере научной деятельности в рамках базовой части государственного задания Минобрнауки России ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»

Список литературы:

1. Боронникова С.В. Исследование генетической изменчивости популяций редкого вида Урала *Adenophora lilifolia*(L.) A.DC. на основании анализа полиморфизма ISSR-маркеров // Генетика. – 2009. – Т. 45. – №5. – С.652–655.
2. POPGENE, the Microsoft Windows-based user-friendly software for population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits / F.C. Yeh, R.C. Young, J. Mao et al. // Department of Renewable Resources, Univ. of Alberta, Edmonton. - Alta, 1999. – 238pp.
3. Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. // Mol. Ecol. Not. – 2006. – V. 6. – P.288–295.
4. Янбаев Ю.А., Косарев М.Н., Бахтиярова Р.М. и др. Генетические аспекты сохранения биологического разнообразия. – Уфа БГУ, 2000. – 108 с.

Сведения об авторах

Янбаев Юлай Аглямич, проректор по учебной работе Башкирского государственного университета, доктор биологических наук, профессор
450076, г. Уфа, ул. З. Валиди, д. 32, тел. (347)2736774, e-mail: Yanbaev_ua@mail.ru

Боронникова Светлана Витальевна, заведующий кафедрой ботаники и генетики растений Пермского государственного национального исследовательского университета, доктор биологических наук, профессор
614990, г. Пермь, ул. Букирева 15, e-mail: svboronnikova@yandex.ru

Ахметов Артур Рамирович, аспирант кафедры лесоводства и ландшафтного дизайна Башкирского государственного аграрного университета
450001, г. Уфа, ул. 50 лет Октября, д. 34, e-mail: bearah@mail.ru

Нечаева Юлия Сергеевна, младший научный сотрудник Естественно-научного института Пермского государственного национального исследовательского университета
6140990, г. Пермь, ул. Генкеля 4, e-mail: yulianechaeva@mail.ru

Пришневская Яна Викторовна, инженер-исследователь Естественно-научного института Пермского государственного национального исследовательского университета
614000, г. Пермь, ул. Куйбышева 68, e-mail: yana_prishnivskaya@mail.ru