

БОТАНИКА

УДК 575.113.1:577.21
DOI: 10.26456/vtbio314

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОБРАЗЦОВ РАСТЕНИЙ РЕДКОГО В РОССИИ ВИДА *ISOPYRUM THALICTROIDES* L. (RANUNCULACEAE) ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ЕГО ПОПУЛЯЦИЙ*

**Е.В. Немцова¹, В.В. Телеганова², Ю.А. Семенищенков¹,
Е.А. Михайлюкова¹, В.А. Курило¹**

¹Брянский государственный университет им. акад. И.Г. Петровского», Брянск
²ГБУ Калужской области «Дирекция парков», Калуга

В статье обсуждаются результаты сравнительного молекулярно-генетического анализа образцов редкого в России центральноевропейского вида равноплодника василистникового (*Isopyrum thalictroides* L., *Ranunculaceae*). В России этот вид обнаружен в природных условиях только в национальном парке «Угра» (Калужская область). Результаты изучения полиморфизма ДНК, выделенной из 7 образцов с территории России, Беларуси и Украины, позволили определить степень генетического сходства изучаемых образцов и их филогенетические связи, косвенно указывающие на тренды распространения в природе. Генетические паспорта растений *I. thalictroides*, распространенных в Восточной Европе, смогут быть использованы в расширенных исследованиях генетического полиморфизма популяций вида и созданию представлений о его географическом распространении в прошлом и в настоящее время.

Ключевые слова: *Isopyrum thalictroides*, генетический полиморфизм, ISSR-PCR, национальный парк «Угра».

Введение. Молекулярно-генетические методы в настоящее время все чаще используются в экологическом мониторинге популяций растений, в том числе редких, расширяя представления о возможностях их формирования, а также о тенденциях распространения таксонов в будущем (Avisé et al., 1987; Hewitt, 2001; Avisé, 1998, 2009; Потокина и др., 2012; Боронникова, 2009; 2013;

* Исследование выполнено при финансовой поддержке ФГБУ «Национальный парк «Угра» (г. Калуга) в рамках госзадания по теме «Молекулярно-генетическое исследование образцов растений редкого в России вида равноплодника василистникового для изучения его полиморфизма и выяснения возможных путей расселения в Восточной Европе».

Волкова, 2015; Пинаева и др., 2020; и др.). В данном аспекте особую, интересную для изучения группу растений составляют центрально- и западноевропейские виды растений, представленные в средней России у восточных границ своих ареалов. Происхождение изолированных восточных локалитетов многих из таких видов неизвестно или слабо изучено, поэтому служит предметом для обсуждения. В частности, для некоторых западных видов обоснована концепция заноса из регионов Европы в разное историческое время, в том числе спонтанного распространения в военное время (виды-полемохоры); изучению распространения на Западе России таких таксонов посвящен обширный перечень научных работ (см.: Решетникова и др., 2021). Некоторые «западные» виды культивируются в Центральной России (например, *Armeria maritima*, виды *Primula* и т. д.), что делает возможным их расселение из культуры. Однако, несмотря на большой интерес к флористическим инвазиям с Запада, сравнительные молекулярно-генетические исследования в популяциях потенциально заносных видов в России единичны, а их результаты не дают четкого ответа о естественности происхождения «восточных» популяций (Волкова, 2015).

В 2019 г. в Калужской области впервые в России был обнаружен редкий центральноевропейский вид – равноплодник василисниковый (*Isopyrum thalictroides* L., *Ranunculaceae*) – реликт атлантического периода голоцена, синэкологически связанный с буково-дубовыми лесами и распространявшийся к востоку вместе с широколиственными лесами. Он как аборигенный вид занесен в Красную книгу Беларуси (2015), а в России обнаружен в природных условиях только в национальном парке «Угра» (Телеганова, 2019; Телеганова, Майоров, 2019). Изучение возможных путей расселения равноплодника представляет большой интерес.

Как известно, молекулярно-генетическое исследование методом ISSR-PCR является быстрым и удобным методом изучения полиморфизма ДНК. Результаты такого анализа позволяют определить степень генетического сходства изучаемых образцов и их филогенетические связи, косвенно указывающие на тренды распространения в природе (Павлинов, 2005; Лукашов, 2009; и др.). Генетические паспорта растений *I. thalictroides*, распространенных в Восточной Европе, смогут быть использованы в расширенных исследованиях генетического полиморфизма популяций вида и создании представлений о его географическом распространении в прошлом и в настоящее время.

Материал исследования. Работа выполнена в ИННО-центре биотехнологии и экологии Брянского государственного университета имени академика И.Г. Петровского. Объектами молекулярно-

генетического анализа служили образцы ДНК, выделенные из растений *Isopyrum thalictroides*, распространённых на территории России, Республики Беларусь и Украины (табл. 1). Все используемые в процессе исследования образцы являлись гербарными вариантами. ДНК высушенных растений может подвергаться значительной деградации, что может влиять на качество полученных при проведении анализа ампликонов. Поэтому выделение ДНК из образцов проводилось в 2–3-х кратной повторности. Для исследования применяли ткани листовой пластинки.

В основе молекулярно-генетического исследования методом ISSR-PCR лежит клонирование геномной ДНК с использованием праймеров, содержащих динуклеотидные повторы и несколько случайных нуклеотидных пар. В результате накапливаются фрагменты ДНК, расположенные между SSR-локусами. Межмикросателлитные участки в геномах разных индивидуумов характеризуются разной длиной. В результате анализа образуется спектр ампликонов разной длины, исследуя который можно судить о полиморфизме исследуемого генотипа (Zietkiewicz et al., 1994).

Молекулярно-генетический анализ методом ISSR-PCR включал следующие этапы: 1) выделение ДНК растений *I. thalictroides*; 2) подбор праймеров, проведение ISSR-PCR; 3) обработка полученных результатов, определение коэффициента Сьеренсена-Чекановского, построение дендрограмм генетического родства.

Таблица 1

Характеристика образцов *Isopyrum thalictroides*, используемых для изучения генетического полиморфизма

№ образца	Место сбора	Тип растительного сообщества	Дата сбора
1.	Россия, г. Москва, ГБС им. В.Н. Цицина РАН; культивируется посадочный материал из Закарпатской области Украины, полученный из Киевского БС АН УССР 10.05.1958	Нет данных	23.04.2021
2.	Россия, Калужская область, Козельский район, Национальный парк «Угра», Березичское лесничество	Широколиственный лес	25.04.2021
3.	Беларусь, Брестская область, Каменецкий район, окрестности деревни Каменюки	Ясенник	3.05.2017
4.	Беларусь, Брестская область,	Грабово-дубовый	17.04.2019

	Ляховичский район, окрестности деревни Старые Буды	лес	
5.	Беларусь, Минская область, Несвижский район, окрестности Поселка Биозавода	Дубрава кислотно-снытевая	17.04.2019
6.	Беларусь, Брестская область, Каменецкий район, окрестности деревни Кустичи	Грабово-дубовый лес	20.04.2019
7.	Украина, Винница	Нет данных	196(?) г.

В процессе исследования использовались модифицированные общепринятые протоколы молекулярно-генетических исследований (Генная..., 1991, Маниатис, 1984). Амплификацию проводили в многоканальном программируемом термостате «Терцик» компании «ДНК-Технология». Для анализа использовали Таq ДНК-полимеразу и нуклеозидтрифосфаты компании «SibEnzyme», ISSR-праймеры производства «Синтол». Состав ПЦР-смеси на одну реакцию указан в табл. 2, температурный режим в табл. 3.

При проведении исследования использованы 6 пар ISSR-праймеров, последовательности и температура отжига которых указаны в табл. 4. Повторность проведения ISSR-PCR – двукратная.

Электрофоретическое разделение продуктов ISSR-PCR проводили в ходе горизонтального электрофореза в 2% агарозном геле следующего состава: 1) 2 г агарозы; 2) 100 мл однократного TBE-буфера; 3) 5 мкг/мл интеркалирующего флуоресцентного красителя бромистого этидия.

Таблица 2
Состав смеси для проведения анализа методом ISSR-PCR

№ п. п.	Компонент	Объем, мкл
1.	Вода деионизированная	13,8 мкл
2.	10X буфер DreamTaq™ Green	2,0 мкл
3.	dNTP Mix (2 mM/ml)	2,0 мкл
4.	ISSR-праймер (50 пмоль/мкл)	1,0 мкл
5.	Таq ДНК-полимераза (5000 u/ml)	0,2 мкл
6.	Геномная ДНК	1,0 мкл
	Всего	20,0 мкл

Таблица 3

Температурный режим ПЦР

№ п. п.	Этап	Температура, °С	Время, сек	Количество циклов
1.	Первичная денатурация	94	240	
2.	Денатурация	94	35	37
3.	Отжиг	Согласно таблице 4	30	37
4.	Элонгация	72	120	37
5.	Финальный синтез	72	240	

Условия проведения электрофореза: напряжение – 120 В; время – 2 часа. Для проведения электрофореза применяли маркер молекулярных масс M27, содержащий 12 фрагментов от 100 до 3000 bp (100 bp+1.5 Kb+3 Kb, производство «Сибэнзим»).

Степень сходства анализируемых образцов *Isopyrum thalictroides* была определена с применением коэффициента Сьеренсена-Чекановского:

$$K = 2c / (a + b),$$

где а – количество полиморфных ампликонов выбранного образца; b – количество полиморфных ампликонов другого образца; с – число совпадающих ампликонов для двух образцов. Коэффициент может иметь значения в диапазоне от 0 до 1 (Лукашов, 2009; Павлинов, 2005). Вычисление генетической дистанции производится по формуле: $1 - K$.

Таблица 4

Характеристика праймеров, используемых для проведения ISSR-PCR

Наименование	5'-3' последовательность	Температура отжига
IS3	(GA) ₈ C	53 °С
IS5	(CA) ₇ (R)C	53 °С
IS6	(AG) ₇ (Y)T	52 °С
UBC810	(GA) ₈ T	50 °С
UBC840	(GA) ₈ YT	52 °С
B4	(CA) ₆ GG	50 °С

По таблицам генетического сходства составлены дендрограммы, на основе анализа которых были выделены отдельные кластеры. Дендриты построены при помощи программы STATISTICA 10.0 (StatSoft).

В настоящем исследовании были проанализированы 7 образцов ДНК *I. thalictroides* (табл. 1) с использованием 6 наборов праймеров в 2-кратной повторности с целью анализа воспроизводимости сомнительных фрагментов при проведении ISSR-PCR. В процессе исследования проанализированы 89 препаратов ДНК.

Используемые в работе ISSR – праймеры позволили получить достаточное для анализа количество воспроизводимых полиморфных ампликонов. Разработаны генетические паспорта растений *I. thalictroides* разных популяций.

Результаты исследования. Результаты проведения гелелектрофореза продуктов ISSR-PCR с применением праймера IS-3, приведены на рис. 1. При использовании праймера IS-3 было получено 22 ампликона длиной от 1550 до 210 п.н.; праймера IS-5 – 24 ампликона длиной от 185 до 995 п.н.; праймера IS-6 – 21 ампликон длиной от 130 до 942 п.н.. При использовании праймера UBC-810 было синтезировано 29 фрагментов длиной от 203 до 1123 п.н.; праймера UBC-840 – 29 ампликонов с длиной 126-1306 п.н.; праймера В-4 – 20 фрагментов от 103 до 967 п.н.

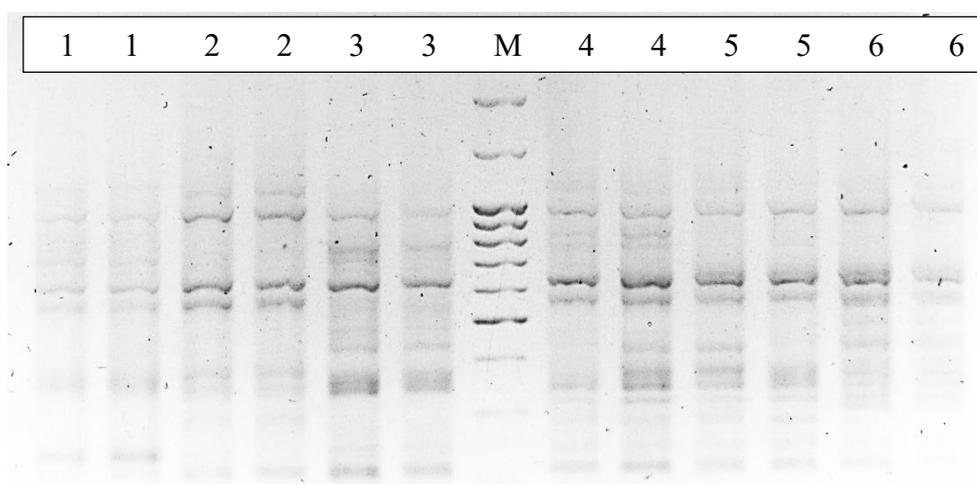


Рис. 1. Гель-электрофорез продуктов ISSR-PCR на ДНК растений *Isopyrum thalictroides* с праймером IS-3. Схема нанесения: 1-6 – номера образцов, М – маркер.

Анализ построенных дендритов по отдельным праймерам выявил некоторые общие закономерности родства изученных образцов. Однако полученные данные имеют ограничения в использовании, связанные с недостаточным количеством полиморфных фрагментов, при использовании матриц генетического сходства только по одному праймеру.

Поэтому, в ходе дальнейшего исследования, был построен дендрит родства (Ward-метод, индекс Сьеренсена-Чекановского) на основе матрицы генетического сходства по общим генетическим формулам с использованием 6 наборов праймеров (рис. 2). Данный дендрит наиболее полно отражает родство анализируемых образцов.

Анализ дендрограммы сходства позволяет сделать выводы о

том, что изучаемые образцы сгруппированы в три кластера. Первый (образцы 1 и 2) объединил образцы из украинского Закарпатья (культивируемые в ГБС РАН) и из национального парка «Угра» (Калужская область, Россия). Объединение образцов в единый кластер можно интерпретировать следующим образом: во-первых, можно допустить возможность заноса растений из культуры ГБС РАН в лесные сообщества Березичского лесничества с последующим формированием генетически близкой популяции в Калужской области; во-вторых, генетическая близость образцов Закарпатья и Калужской области может быть обусловлена историческим расселением вида, при котором калужские локалитеты являются крайними восточными в пределах ареала вида. Против данной гипотезы свидетельствует значительная географическая удаленность локалитетов.

Второй кластер формируют образцы из Республики Беларусь, что вполне может быть оправдано географической близостью мест их сбора. Анализ позволил выявить образец-«аутсайдер», имеющий наименьшее генетическое сходство с остальными – из Винницкой области Украины.

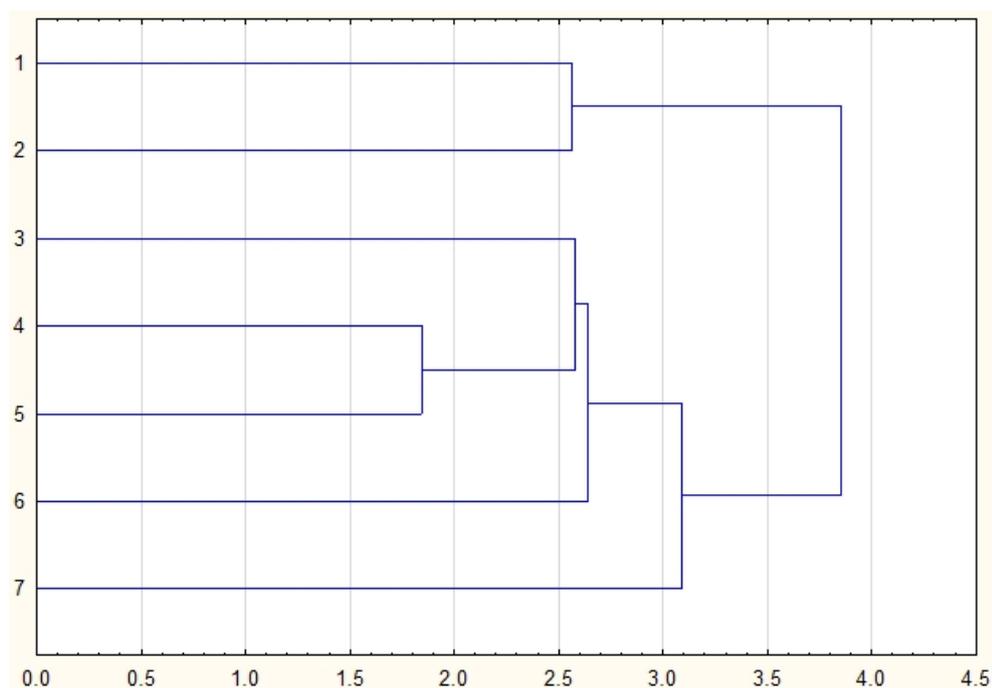


Рис. 2. Дендрограмма генетического сходства образцов *Isopyrum thalictroides* по всем используемым праймерам

Интерпретацию результатов анализа осложняют значительный географический разброс локалитетов сбора образцов, а также их небольшая выборка.

Важным фактором является предотвращение ДНК-контаминации анализируемых образцов. Для этого необходимо использовать для проведения анализа препараты ДНК отдельных индивидуумов, чтобы исключить появление нежелательных ампликонов, затрудняющих проведение статистической обработки.

Заключение. В результате проведения молекулярно-генетического исследования растений *I. thalictroides* построена дендрограмма генетического родства. Изучаемые образцы сформировали три кластера. Первый кластер включал образцы из украинского Закарпатья (культивируемые в ГБС РАН) и из национального парка «Угра» (Калужская область, Россия). Второй кластер сформирован образцами из Республики Беларусь. Выявлен образец-«аутсайдер», имеющий наименьшее генетическое сходство с остальными – из Винницкой области Украины.

*Авторы выражают благодарность к. б. н., с. н. с. отдела флоры ФГБУН ГБС им. Н. В. Цицина РАН Р. З. Саодатовой; д. б. н., профессор кафедры ботаники и физиологии растений ГГУ им. Ф. Скорины (Республика Беларусь, г. Гомель) А. Г. Цурикову; к. б. н., заместителю заведующего Гербарием ИЭБ им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси (Республика Беларусь, г. Минск), Д. В. Дубовику за предоставленные образцы *I. thalictroides* для анализа.*

Список литературы

- Боронникова С.В.* 2009. Молекулярно-генетическая паспортизация редких реликтовых видов растений // Вестник НГУ. Сер.: Биология, клиническая медицина. Т. 7. Вып. 3. С. 3-11.
- Боронникова С.В.* 2013. Молекулярно-генетический анализ и оценка состояния генофондов ресурсных видов растений Пермского края. Пермь. 239 с.
- Волкова П.А.* 2015. Использование молекулярно-генетических данных для анализа миграционных путей сосудистых растений в Восточной Европе в позднеледниковье: дис... д-ра биол. наук. М. 226 с.
- Генная инженерия растений: Лабораторное руководство.* 1991. Пер. с англ. / Дж. Дрейпер, Р. Скотт, Ф. Армитидж, Р. Уолден / Под ред. Дж. Дрейпера. М.: Мир. 408 с.
- Красная книга Республики Беларусь: редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды дикорастущих растений растения.* 2015. Минск: «Беларуская Энцыклапедыя» імя Петруся Броўкі. 448 с.
- Лукашов В.В.* 2009. Молекулярная эволюция и филогенетический анализ: учебное пособие. М.: Изд-во БИНОМ. 256 с.

- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* 1984. Методы генетической инженерии: Молекулярное клонирование. М.: Мир. 479 с.
- Павлинов И.Я.* 2005. Введение в современную филогенетику (кладогенетический аспект). М.: Тов. науч. изд. КМК. 51 с.
- Пинаева Ю.Ю., Бельтюкова Н. Н., Пришневская Я. В., Султангазина Г.Ж., Бейшова И.С., Ульянов В.А., Бейшов Р.С.* 2020 Молекулярно-генетический анализ редкого вида растения *Pulsatilla patens* (L.) Mill. Северного Казахстана // Бюл. науки и практики. Т. 6. № 5. <https://doi.org/10.33619/2414-2948/54>
- Потокина Е.К., Орлова Л.В., Вишневецкая М.С., Алексеева Е.А., Потокин А.Ф., Егоров А.А.* 2012. Генетическая дифференциация ели на северо-западе России по результатам маркирования микросателлитных локусов // Экологическая генетика. Т. 10. № 2. С. 40-49.
- Решетникова Н.М., Нотов А.А., Майоров С.Р., Щербаков А.В.* 2021. Великая Отечественная война как фактор флорогенеза: результаты поиска полемохоров в Центральной России // Журн. общ. биол. Т. 82. № 4. С. 297-317.
- Телеганова В.В.* 2020. *Isopyrum thalictroides* L. (*Ranunculaceae*) – новый вид для флоры России // Растительность Восточной Европы и Северной Азии. Мат. II Междунар. науч. конф. (Брянск, 12-14 октября 2020 г.). 2020. Брянск: РИСО БГУ. 72 с.
- Телеганова В.В., Майоров С.Р.* 2019. Находка *Isopyrum thalictroides* L. (*Ranunculaceae*) в Калужской области // Бюл. Московского общества испытателей природы. Отдел биол. Т. 124. № 6. С. 76.
- Avise J.C, Arnold J., Ball R.M., Bermingham E., Lamb T., Neigel J.E., Reeb C.A., Saunders N.C.* 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics // Annu. Rev. Ecol. Syst. V. 18. P. 489-522.
- Avise J.C.* 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection // Mol. Ecol. V. 7. P. 371-379.
- Avise J.C.* 2009. Phylogeography: retrospect and prospect // Journ. Biogeogr. V. 36. P. 3-15.
- Hewitt G.M.* 2001. Speciation, hybrid zones and phylogeography - or seeing genes in space and time // Mol. Ecol. V. 10. P. 537-549.
- Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D.* 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics. V. 20. P. 176-183.

**MOLECULAR GENETIC STUDY OF PLANT SAMPLES OF RARE
IN RUSSIA SPECIES *ISOPYRUM THALICTROIDES* L.
(*RANUNCULACEAE*) TO ASSESS POLYMORPHISM
OF ITS POPULATIONS**

**E.V. Nemtsova¹, V.V. Teleganova², Yu.A. Semenishchenkov¹,
E.A. Mihajlyukova¹, V.A. Kurilo¹**

¹Bryansk I.G. Petrovsky State University, Bryansk

²Parks Directorate of the Kaluga Region, Kaluga

Here we discuss the results of a comparative molecular genetic analysis of samples of a rare in Russia Central European species *Isopyrum thalictroides* L. (*Ranunculaceae*). In Russia, this species was found in natural conditions only in the Ugra National Park (Kaluga Region). The results of studying DNA polymorphism isolated from 7 samples from the territory of Russia, Belarus and Ukraine made it possible to determine the degree of genetic similarity of the studied samples and their phylogenetic connections, indirectly indicating distribution trends in nature. Genetic passports of *I. thalictroides* plants, distributed in Eastern Europe, can be used in extensive studies of genetic polymorphism of populations of the species and the creation of ideas about its geographical distribution in the past and at present.

Keywords: *Isopyrum thalictroides*, genetic polymorphism, ISSR-PCR, Ugra National Park.

Об авторах:

НЕМЦОВА Елена Валентиновна – кандидат биологических наук, директор ИННО-центра биотехнологии и экологии, доцент кафедры биологии ФГБОУ ВО «Брянский государственный университет имени академика И.Г. Петровского», 241036, Брянск, ул. Бежицкая, д. 14, e-mail: elenanemz@mail.ru.

ТЕЛЕГАНОВА Виктория Владимировна – кандидат биологических наук, ГБУ Калужской области «Дирекция парков», 248009, Калуга, Грабцевский проезд, 14, e-mail: teleganovavika05@rambler.ru.

СЕМЕНИЩЕНКОВ Юрий Алексеевич – доктор биологических наук, профессор кафедры биологии ФГБОУ ВО «Брянский государственный университет имени академика И.Г. Петровского», 241036, Брянск, ул. Бежицкая, д. 14, e-mail: yuricek@yandex.ru.

МИХАЙЛЮКОВА Елена Александровна – студентка естественно-географического факультета ФГБОУ ВО «Брянский

государственный университет имени академика И.Г. Петровского», 241036, г. Брянск, ул. Бежицкая, д. 14, e-mail: kendibitter@gmail.com.

КУРИЛО Владимир Александрович – студент естественно-географического факультета ФГБОУ ВО «Брянский государственный университет имени академика И.Г. Петровского», 241036, Брянск, ул. Бежицкая, д. 14, e-mail: vladimirkurilo2001@yandex.ru.

Немцова Е.В. Молекулярно-генетическое исследование образцов растений редкого в России вида *Isopyrum thalictroides* L. (*Ranunculaceae*) для изучения полиморфизма его популяций / Е.В. Немцова, В.В. Телеганова, Ю.А. Семенищенок, Е.А. Михайлюкова, В.А. Курило // Вестн. ТвГУ. Сер. Биология и экология. 2023. № 3(71). С. 49-59.

Дата поступления рукописи в редакцию: 14.12.22

Дата подписания рукописи в печать: 04.09.23