

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНОМНЫХ SSR-МАРКЕРОВ, RAPD И ISSR-АНАЛИЗА ДЛЯ ОЦЕНКИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ОДУВАНЧИКА ЛЕКАРСТВЕННОГО

USE OF GENOMIC SSR MARKERS, RAPD AND ISSR — ANALYSIS TO ASSESS THE GENETIC DIVERSITY OF DANDELION OFFICINALIS

**Z. Bisultanova
M. Atsaeva
P. Dzhambetova**

Summary. The article describes the mechanism of using genomic SSR markers, RAPD and ISSR in order to assess the genetic diversity of dandelion officinalis. A brief description of this plant is given and the regions of its distribution are described. It is noted that the plant was previously actively used in folk medicine, which is largely due to its therapeutic and other benefits. When studying genomic markers, the significance of these studies is noted on the example of studying the patterns of genetic variation in plants, which make it possible to draw conclusions about the adaptation of plants and the identification of their genes. Describes the genomic study of dandelion officinalis using DNA extraction and RAPD analysis in laboratory conditions. When studying three plant specimens, it was found that there were no significant differences in the amplified fragments in three plant species (collected from different heights). A conclusion was also formulated that there is no relationship between the height at which a dandelion grows and its genetic variability. However, there were differences in the pattern of polymorphic loci, a difference in the size of the amplified bands. This made it possible to draw a conclusion about the effectiveness of the methods used to study interspecies differences.

Keywords: dandelion officinalis, research, differences, genetic variability, RAPD, ISSR, marker, DNA.

Бисултанова Зура Исановна

Старший преподаватель, ФГБОУ ВО «Чеченский государственный университет им. А.А. Кадырова»
zura_sun@mail.ru

Ацаева Марет Махмудовна

К.б.н., доцент, ФГБОУ ВО «Чеченский государственный университет им. А.А. Кадырова»
acaeva-mm@mail.ru

Джамбетова Петимат Махмудовна

Д.б.н., профессор, ФГБОУ ВО «Чеченский государственный университет им. А.А. Кадырова»
petimat-lg@rambler.ru

Аннотация. В статье описывается механизм использования геномных SSR-маркеров, RAPD и ISSR в целях оценки генетического разнообразия одуванчика лекарственного. Дается краткая характеристика данного растения и описываются районы его распространения. Отмечено, что растение ранее активно применялось в народной медицине, что во многом обусловлено его терапевтическими и иными преимуществами. При изучении геномных маркеров отмечается значимость данных исследований на примере исследования паттернов генетической изменчивости растений, которые позволяют сделать выводы об адаптации растений и идентификации их генов. Описывается геномное исследование одуванчика лекарственного с помощью выделения ДНК и анализа RAPD в лабораторных условиях. При изучении трех экземпляров растения было выявлено, что существенных отличий у трех видов растений (собранных с разных высот) в амплифицированных фрагментах нет. Также сформулирован вывод об отсутствии зависимости между тем, на какой высоте растет одуванчик и его генетической вариабельностью. Однако были выявлены различия в рисунке полиморфных локусов, разница в размерах амплифицированных полос. Это позволило сделать вывод об эффективности применяемых методов для изучения межвидовых различий.

Ключевые слова: одуванчик лекарственный, исследование, различия, генетическая вариабельность, RAPD, ISSR, маркер, ДНК.

Одуванчик лекарственный (*Taraxacum officinale* s.l.) — растение рода *Taraxacum* и член семейства сложноцветных (Asteraceae Dumort. (Compositae Giseke), род *Taraxacum officinale* Wigg. [2]. Это известное лекарственное растение с широким ареалом естественного обитания. Популяции одуванчика лекарственного распространены в Европе, Северной и Южной Америке и Азии. На территории России встречается повсеместно, исключая тундровые, гольцовые и пустынные районы [1]. Растения

Taraxacum очень инвазивны и в изобилии можно найти на обочинах дорог, в садах и в сельской местности [9]. В России, Индии и Китае одуванчик использовался в этнофармакологии как традиционная народная медицина из-за его печеночного и гипергликемического воздействия. Одуванчик обладает многочисленными терапевтическими преимуществами [14], так как является источником различных питательных и биологически активных веществ, а его корень и листья содержат витамины (А, К, С и В-комплекс), минералы (кальций,

Таблица 1. Последовательность праймеров для SSR -, RAPD -, ISSR — анализа

Название локусов/праймеров	Последовательность праймеров
SSR-праймеры	
TKS_003	F-5'-TCACCGAGTTGTAGAGAGAGA-3'
	R-3'-CAGCAATTAAGGCTCTGTAAA-5'
TKS_0111	F-5'-ATCTACAACAAGTTCGTGAGG-3'
	R-3'-AATCAACTGGATTCTTAGGG-5'
TKS_0112	F-5'-ACAGGAGTTGATGTCTTGATG-3'
	R-3'-ATTGAATCATTAACCGTCAGA-5'
TKS_0113	F-5'-CCAAGACCTCTACAATCGTTA-3'
	R-3'-ATCTTCGGAGTAGTGGATTGA-5'
RAPD — праймеры	
AFK1	5'-ACGGTGGACG-3'
AFK3	5'-GCGTCCATTC-3'
ISSR-праймеры	
IS1	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGYG-3'
IS3	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAC-3'

магний, калий, цинк и железо), микроэлементы, клетчатку, лецитин и холин [11]. Доказано, что корни одуванчика лекарственного являются перспективным источником инулина. [4]. Одуванчик лекарственный широко используется в растительных тест-системах [3]. Ареал вида представляет собой обширные территории или акватории с разнообразными условиями окружающей среды [10].

Исследования показывают, что существуют специфические аллели, сопряженные с адаптивными показателями среды обитания живых организмов. Такие аллели впервые были выявлены у модельного объекта *Arabidopsis thaliana*, функциональные аллели FRI, которого коррелировали с значительным широтным наклоном времени цветения растения у 70 североевропейских и средиземноморских экотипов при выращивании в экологически реалистичных условиях в садах [11]. Реципрокная трансплантация с последующим ассоциативным анализом множества образцов между 213K однонуклеотидными полиморфизмами, плодовитостью и выживаемостью в каждом экспериментальном участке показали эффекты приспособленности, специфичные для окружающей среды [13]. Тесты на ассоциации однонуклеотидный полиморфизм-фактор среды выполненные на немодельных видах растений демонстрируют аналогичные эффекты. Так у осины европейской (*Populus tremula*, L.) D. Hall et al (2007) были найдены убедительные доказательства адаптивной дивергенции фенологических признаков через широтный градиент [8]. McAssey E.V. с коллегами идентифицировали генетические маркеры четко указывающие на генетическое разделение между северными и южными популяциями дикого подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) [10].

Исследование паттернов генетической изменчивости растений могут дать представление о механизмах, ответственных за адаптацию различных видов растений в определенной среде, выявление которых представляет большой интерес в области эволюционной биологии, и идентифицировать гены, лежащие в основе экологически значимых черт [10].

Микросателлитные маркеры являются эффективными маркерами генетической гетерогенности как отдельных организмов, так и разных видов и родов, благодаря сохранению их последовательностей во фланкирующих регионах [7]. Хотя одуванчик лекарственный широко используется при проведении большого количества популяционно-генетических исследований, нами не было найдено публикаций по популяциям в Чеченской Республике, основанных на использовании молекулярных маркеров. В настоящей работе сделана попытка выявить генетические различия у растений одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* s.l.), собранных из различных мест обитания Чеченской Республики на разных высотах от 350 м до 2750 м над уровнем моря при использовании SSR-, RAPD-маркеров.

Методы исследования

Выделение ДНК

Нами были собраны листья, стебли, корни *Taraxacum officinale* из нескольких географических точек ЧР. Геномную ДНК экстрагировали из листьев одуванчика лекарственного (с каждого участка выборка растений составила не менее 3 экземпляров) с использованием

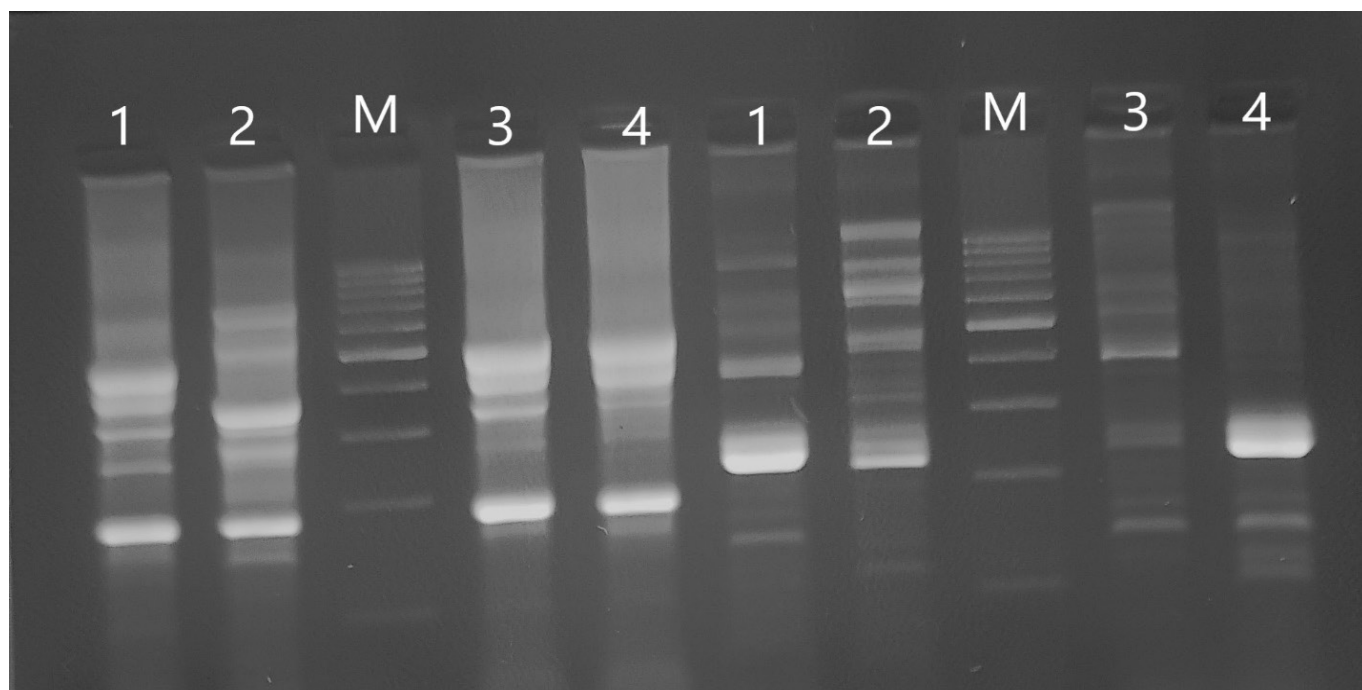


Рис. 1. Электрофореграмма амплифицированных фрагментов ДНК с SSR-праймерами TKS_0111 (1–4) и TKS_0112 (1–4). В 1-й и 6-й дорожках (1) фрагменты ДНК одуванчика лекарственного, собранного на высоте 350 м. Во 2-й и 7-й дорожках (2) – собранного на высоте 920–950 м над уровнем моря. В 3-й и 8-й дорожках (3) — собранного на высоте 1750–1900 м. под номером 4 ДНК-ампликоны растения, обитающего в горах ЧР на высоте 2500 и выше.

ем набора для экстракции ДНК DNEasy Plant Mini Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с инструкциями производителя. Количество экстрагированной ДНК определяли с помощью флуориметра Qubit 4.0, Thermo Scientific).

ПЦР-амплификация

ДНК каждого образца *Taraxacum officinale* подвергли скринингу с использованием 4 пар праймеров SSR, универсальных праймеров AFK1, AFK3 для RAPD-анализа и двух ISSR-праймеров [5]. Все праймеры были синтезированы в ООО «Евроген» (Россия). (таблица 1).

Реакционная смесь для ПЦР готовилась на основе готовых мастер-миксов (ООО «Лаборатория Изоген», г. Москва) путем добавления в пробирки по 10 мкл ПЦР-растворителя, 10 пМ праймеров, и 25 мкМ. — 50 нг геномной ДНК. Общий объем реакционной смеси составлял 25 мкл. Отжиг праймеров SSR проводили в термоциклере Applied Biosystems™ 2720. Первоначальная денатурация при 94 °C в течение 3 минут, затем 35 циклов при 94 °C в течение 40 сек., отжиг при 50 °C и 55 °C в течение 40 секунд и синтез 72 °C в течение 40 секунд. Окончательное удлинение проводили при 72 °C в течение 5 мин [5].

Для ПЦР с универсальными праймерами (RAPD-анализ) использовали набор лиофилизованных готовых реакционных смесей GenPak™ PCR Core (12x8) (ООО «Лаборатория Изоген», г. Москва), в который добавляли 90 пМ праймера, 0.2–0.5 мкг тотальной ДНК. ДНК амплифицировали в термоциклере Applied Biosystems™ 2720, который был запрограммирован следующим образом: начальная денатурация в течение 3 минут при 94 °C; 35 циклов по 50 с при 94 °C (денатурация), 50 с при 30 °C (отжиг) и элонгация 1 мин 40 с при 72 °C и окончательное удлинение при 72 °C в течение 7 мин.

Анализ RAPD продуктов проводили электрофорезом в 2% агарозном геле в 0,5-кратном буфере TBE. Амплифицированные SSR-фрагменты разделяли в 3% — ном агарозном геле в 0,5-кратном буфере TBE. Гели окрашивали бромидом этидия (0,5 мкг/мл) и визуализировали в УФ-свете. Полосы ДНК, которые были амплифицированы данным праймером, оценивались как присутствующие (1) или отсутствующие (0) для всех исследованных образцов.

Результаты и обсуждение

Все выбранные праймеры амплифицировали фрагменты, размер которых варьировался от 150 до 1500

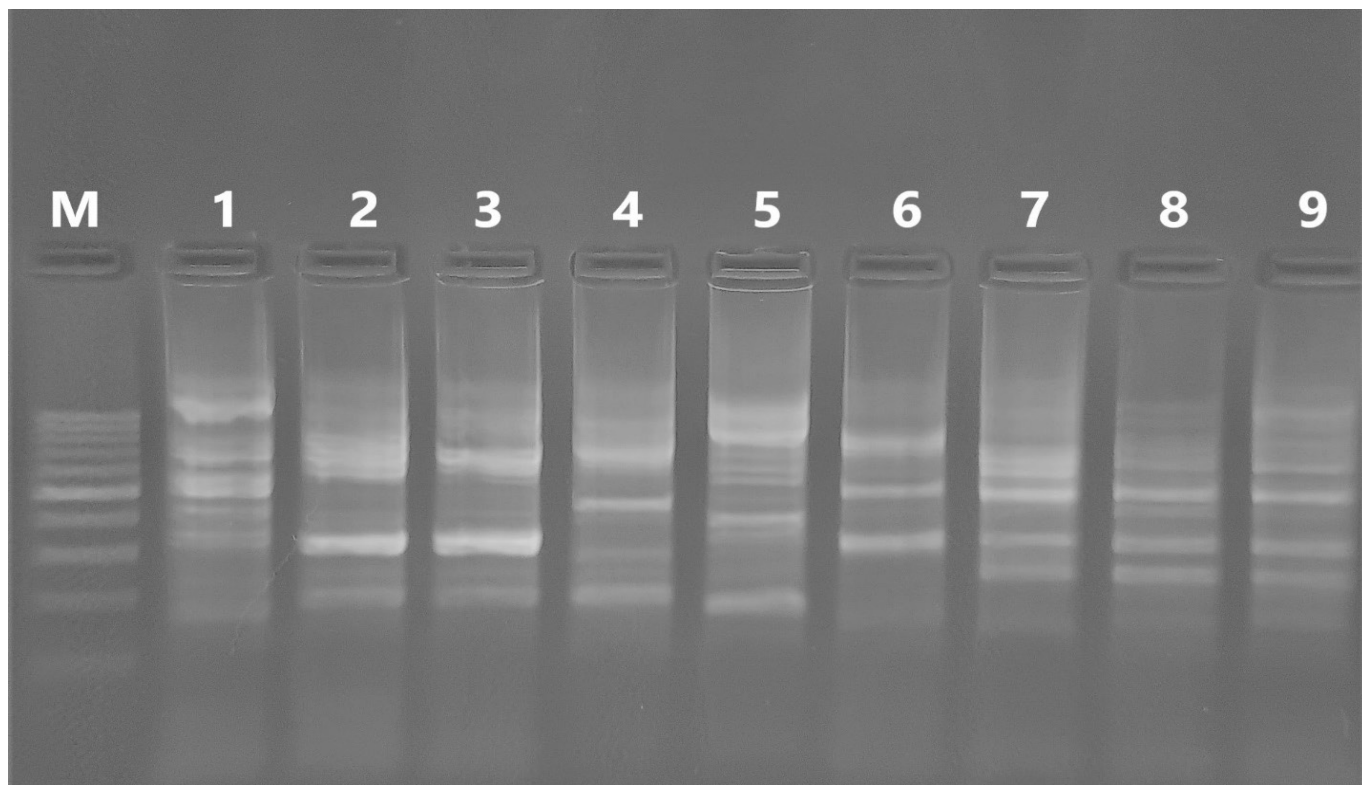


Рис. 2. Электрофореграмма ISSR анализа одуванчика лекарственного, собранного в горах с разной высоты над уровнем моря.

пн. Все амплифицированные полосы оказались полиморфными, в среднем 3,1 полосы на праймер.

Все выбранные праймеры амплифицировали фрагменты, размер которых варьировался от 150 до 1500 пн. Все 24 амплифицированных образца оказались полиморфными, не менее 3-х полос на праймер. Среднее количество аллелей на локус составляло 2. Количество полос, образовавшихся на один праймер после RAPD, составило не менее трех на образец. Точно так же все использованные в данном исследовании праймеры SSR приводили к количеству амплифицированных фрагментов, размер которых варьировался от 150–1500 п.н. Все амплифицированные полосы оказались полиморфными, в среднем по 2 полосы на праймер.

Сравнительный анализ результатов электрофореза показывает незначительные различия в размерах амплифицированных фрагментов с помощью SSR-маркеров между одуванчиком лекарственным, собранным с разных высот над уровнем моря (рис. 1). Однако четкой зависимости между определенной высотой и генетической вариабельностью обнаружить не удалось.

SSR-маркеры 0111 и 0112 не выявили различия между растениями, собранными из разных мест обитания

В тоже время у образца № 2 наблюдаются существенные различия от остальных образцов.

Анализ амплифицированных фрагментов ДНК одуванчика лекарственного RAPD- и ISSR-анализом, выявил значительные различия в рисунке полиморфных локусов на агарозном геле после электрофореза (рис. 2). Наблюдаемые различия позволяют говорить о генетической гетерогенности популяции одуванчика лекарственного в зависимости от высоты на уровне тенденции.

В то же время в выборке растений одуванчика с одного места обитания в некоторых случаях наблюдалась значительная разница в размерах амплифицированных полос. Предположительно, эти экземпляры, по которым наблюдались существенные отклонения, не относились к одуванчику лекарственному и требуются дополнительные исследования для определения видовой принадлежности данных образцов

Микросателлитные маркеры являются эффективными маркерами генетической гетерогенности как отдельных организмов, так и разных видов и родов, благодаря сохранению их последовательностей во фланкирующих регионах [7]. Хотя большое количество популяционно-генетических исследований было

проведено на видах одуванчика, никаких генетических исследований, основанных на использовании молекулярных маркеров, ранее не публиковалось по популяциям в Чеченской Республике.

В нашей работе микросателлитный анализ была проверен на одуванчике лекарственном. Одуванчик лекарственный (*T. officinale*) является видом дикой флоры, который был предметом научных и медицинских исследований на протяжении более века. Факторы окружающей среды и эволюционные изменения могут быть благоприятны для широкого распространения ареала Одуванчика лекарственного [9].

Генетические параметры, оцененные на основе данных SSR-, RAPD- ISSR-анализов, показали, что в отобранных популяциях значительный уровень генетического разнообразия. Высокий уровень варибельности, наблюдаемый в SSR-локусах, которые мы использовали, согласуется с результатами исследований, проведенных на разных видах [6]. Результаты этого исследования показывают эффективность методов SSR, RAPD и ISSR в межвидовом различии.

Перспектива дальнейших исследований предусматривает изучение одуванчика лекарственного в разных регионах Северного Кавказа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Азнагулова А.В. Фармакогностическое исследование одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg.) Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук. Самара, 2016.
2. Воробьев Г.В. Адаптивные возможности одуванчика лекарственного в условиях загрязнения атмосферы автомобильным транспортом Г.В. Воробьев, А.Ю. Алябьев, Т.И. Огородникова, А.Ф. Хамидуллин, В.Н. Воробьев/ ЭКОЛОГИЯ, 2014, № 2, с. 91–96.
3. Джембетова П.М. Одуванчик лекарственный (*Taraxacum officinale* WIGG. S.L.) как удобный объект для генетического мониторинга загрязнения окружающей среды. /Реутова Н.В., Джембетова П.М. //Экологическая генетика. 2006. Т. 4. № 3. С. 3
4. Дьякова Н.А. Одуванчик лекарственный — перспективный источник инулина/ Н.А. Дьякова, А.А. Мындра, Т.Г. Шушунова, Л.А. Великанова // Сельскохозяйственный журнал. 2016. № 9. с. 387–391
5. Кулуев Б.Р., Фатерыга А.В., Кулуев А.Р., Михайлова Е.В., Чемерис А.В. Молекулярно-генетическое исследование одуванчика осеннего (*Taraxacum hybernum* Steven) с использованием SSR-, RAPD- и ISSR-маркеров. // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(1):102–107. DOI 10.18699/VJ18.337
6. Ahmed N, Mir JI, Mir RR, et al. SSR and RAPD analysis of genetic diversity in walnut (*Juglans regia* L.) genotypes from Jammu and Kashmir, India. *Physiol Mol Biol Plants*. 2012;18(2):149–160. doi:10.1007/s12298-012-0104-z
7. Al-Faifia Sulieman A. Development, characterization and use of genomic SSR markers for assessment of genetic diversity in some Saudi date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars/Sulieman A. Al-Faifia, Hussein M. Migdadia*, Salem S. Algamdia, Mohammad Altaf Khana, Megahed H. Ammara, Rashid S. Al-Obeeda, Mohammad I. Al-Thamraa, Ehab H. EL-Hartya, Jerenj Jakseb *Electron. J. Biotechnol.* vol.19 № 3 2016 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.01.006>
8. Hall, David, et al. "Adaptive Population Differentiation in Phenology across a Latitudinal Gradient in European Aspen (*Populus Tremula*, L.): A Comparison of Neutral Markers, Candidate Genes and Phenotypic Traits." *Evolution*, vol. 61, no. 12, Society for the Study of Evolution, Wiley, 2007, pp. 2849–60.
9. Jafari M, Akram W, Pang Y, et al. Genetic diversity and biogeography of *T. officinale* inferred from multi locus sequence typing approach. *PLoS One*. 2018;13(9): e0203275. Published 2018 Sep 18. doi:10.1371/journal.pone.0203275.
10. McAssey EV, Corbi J, Burke JM. Range-wide phenotypic and genetic differentiation in wild sunflower. *BMC Plant Biol*. 2016;16(1):249. Published 2016 Nov 10. doi:10.1186/s12870-016-0937-7
11. Qureshi S., Adil S., Abd El-Hack M., Alagawany M., farag M. (2017). Beneficial uses of dandelion herb (*Taraxacum officinale*) in poultry nutrition. *World's Poultry Science Journal*, 73(3), 591–602. doi:10.1017/S0043933917000459.
12. Stinchcombe JR, Weinig C, Ungerer M, Olsen KM, Mays C, Halldorsdottir SS, Purugganan MD, Schmitt J. A latitudinal cline in flowering time in *Arabidopsis thaliana* modulated by the flowering time gene *FRIGIDA*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 30;101(13):4712–7.
13. Weinig, C. Ecological genomics and process modeling of local adaptation to climate Cynthia Weinig, Brent E Ewers^{1,2} and Stephen M Welch⁴ *Current Opinion in Plant Biology* 2014, 18:66–72.
14. Wirngo FE, Lambert MN, Jeppesen PB. The Physiological Effects of Dandelion (*Taraxacum Officinale*) in Type 2 Diabetes. *Rev Diabet Stud*. 2016;13(2–3):113–131. doi:10.1900/RDS.2016.13.113

© Бисултанова Зура Исановна (zura_sun@mail.ru),

Ацаева Марет Махмудовна (acaeva-mm@mail.ru), Джембетова Петимат Махмудовна (petimat-ig@rambler.ru).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»