

УДК 57.088.2

DOI: 10.31040/2222-8349-2024-0-2-62-76

**МОДИФИЦИРОВАННЫЙ ЦТАБ-МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ
ВЫСОКОКАЧЕСТВЕННОЙ ДНК ИЗ ЛИПЫ МЕЛКОЛИСТНОЙ (*TILIA CORDATA* MILL.)
ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МУЛЬТИЛОКУСНОГО ПОЛИМОРФИЗМА**

© Х.Г. Мусин, Р.Р. Хисамова, Р.Г. Фархутдинов, А.А. Ямалеева, Б.Р. Кулуев

Липа мелколистная (*Tilia cordata* Mill.) является главным медоносным древесным растением в Республике Башкортостан. Липовые леса, составляя основу всего лесного фонда Республики Башкортостан, произрастают в широком диапазоне климатогеографических условий. Это предполагает наличие большого числа популяций липы в Республике Башкортостан, которые к тому же могут различаться по продуктивности и качеству нектара. Поэтому исследования по выявлению генетического полиморфизма и популяционной структуры *T. cordata* в Республике Башкортостан с использованием различных методов молекулярной генетики представляются актуальными. Для выделения ДНК различных растений наиболее подходящим является использование высушенных листьев, однако у липы они содержат большое количество ингибиторов ПЦР. Исходя из этого, целью нашего исследования был подбор и испытание оптимального метода выделения высококачественной тотальной ДНК из сухих листьев липы мелколистной, пригодной для мультиплексных ПЦР. Качество выделенной ДНК оценивали спектрофотометрически, агарозным гель-электрофорезом и путем постановки реакций ISSR-ПЦР. Из шести испытанных методов выделения ДНК наиболее подходящим для *T. cordata* оказался модифицированный нами метод с использованием ЦТАБ, который отличается от стандартных подходов использованием в экстрагирующем буфере меркаптоэтанола, поливинилпирролидона и аскорбиновой кислоты, а также растиранием листьев на льду и неполным отбором водной фазы при обработке хлороформом. С использованием данного метода была выделена ДНК из 24 образцов *T. cordata* из разных районов РБ, проведен ISSR-анализ с использованием восьми праймеров. По результатам анализа были выделены две большие группы популяций липы мелколистной, северная группа была связана с бассейном реки Уфа, а южная – с бассейном реки Белая.

Ключевые слова: ISSR-анализ, *Tilia cordata*, метод выделения ДНК, мультилокусная ПЦР, цетилтри-метиламмония бромид, контаминация ДНК, полиморфизм.

Введение. Липа мелколистная (*Tilia cordata* Mill.) – вид многолетних древесных растений рода *Tilia* L., семейства *Malvaceae* Juss., широко распространен по всей Европе и Западной Азии, листопадное, высотой до 38 м с шатровидной кроной [1]. Одно из главных достоинств липы – ее нектароносность. Липовый мед очень ценится из-за душистости, богатого химического состава и вкусовых качеств [2]. Нектаропродуктивность насаждений липы достигает 800–1000 кг/га. Во время цветения в местах ее массового произрастания пчелиные семьи собирают за день до 10–14 кг меда.

При однократном отборе один цветок дает до 7 мг нектара. При отсутствии болезней цветет ежегодно, но средневозрастные деревья выделяют нектар нестабильно, максимальное выделение наблюдается у дерева в возрасте 70–90 лет, а столетние липы секретируют нектар почти ежегодно. Кроме того, популяции липы достаточно сильно варьируют по продуктивности нектара не только в зависимости от возраста, но и в зависимости от места произрастания [3]. В связи с чем возникает проблема разноразнокачественности липовых популяций. Не каждое насаждение липы отвечает требованиям

МУСИН Халит Галеевич – к.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,
e-mail: mg@khalit.ru

ХИСАМОВА Рамиля Раилевна, Уфимский университет науки и технологий, e-mail: r.hisamova@mail.ru
ФАРХУТДИНОВ Рашит Габдулхаевич – д.б.н., Уфимский университет науки и технологий,
e-mail: frg2@mail.ru

ЯМАЛЕЕВА Анна Александровна – д.б.н., Уфимский университет науки и технологий,
e-mail: lili-ha@yandex.ru

КУЛУЕВ Булат Разяпович – д.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, e-mail: kuluev@bk.ru

нектароносности и могут быть отнесены к «липам нектароносным». Для создания качественных нектароносных плантаций необходимо выявлять наиболее нектароносные популяции липы и использовать их в качестве исходного материала для дальнейшей селекции, вегетативного размножения, создания искусственных плантаций или нектароносных дендрариев [4].

Одним из путей решения данной проблемы является генетическая паспортизация лип, которая в будущем позволит быстро выявлять нектароносные популяции липы в любое время года, не прибегая к прямому анализу нектаропродуктивности дерева, который возможен лишь в период цветения. Для этого в каждом регионе может быть предварительно проведен генетический анализ полиморфизма лип в сочетании с анализом нектаропродуктивности. Это позволит составить картину распределения всех основных популяций в регионе, различающихся по нектаропродуктивности. Если для обычного однолокусного ПЦР-анализа может подойти ДНК не очень хорошего качества, то для использования методов мультилокусных (мультиплексных) ПЦР необходим исключительно высококачественный ДНК-материал [5]. Однако выделение генетического материала из различных видов деревьев затруднено из-за большого количества фенольных соединений, полисахаридов и других высокомолекулярных вторичных метаболитов в их тканях [1], которые являются известными ингибиторами молекулярно-биологических реакций. К тому же адаптированная для одного вида дерева методика выделения нуклеиновых кислот иногда оказывается неэффективной при использовании на других видах [6]. Потому усовершенствование и адаптация универсальных методов выделения ДНК для каждого вида древесных растений остается актуальной задачей.

Для первичного анализа генетического полиморфизма растений довольно часто используют метод ISSR-анализа (Inter Simple Sequence Repeats), который основан на реакции с использованием праймера с микросателлитной последовательностью [7]. ISSR-праймеры имеют длину 24–30 н.п. и включают 2–4 нуклеотидных повтора и 1–3 селективных нуклеотида на 3'-конце. Эти праймеры позволяют амплифицировать межмикросателлитные последовательности, по размерам которых различаются между собой виды, подвиды и др. Из-за большой специфичности праймерных последовательностей и высокой температуре отжига (55–65°C) воспроизводимость ISSR-реакции достаточно высокая, что позволяет дифференцировать даже изолированные популяции одного вида растений. В представленной работе метод ISSR был выбран как критерий для анализа качества ДНК, так как для методов мультилокусной ПЦР требуется более качественная ДНК, чем при обычной ПЦР. Предварительное исследование показало, что при использовании стандартного метода выделения с использованием ЦТАБ [8] из высушенных листьев *T. cordata* ДНК выделялся в незначительном количестве и часто оказывался контаминированным, что не позволяло получить достаточное для анализа количество ISSR-спектров.

Таким образом, целью настоящего исследования стало усовершенствование метода выделения ДНК из образцов высушенных листьев различных популяций липы мелколистной и проверка данного метода с использованием ISSR-анализа.

Материалы и методы.

1. Отбор генетического материала.

Листья *T. cordata* собирали в летний период (май – сентябрь) 2020–2021 гг. на территории Республики Башкортостан (РБ). Точки сбора указаны в табл. 1, а карта исследования приведена на рис. 1. Ареал исследования включал 8 административных районов РБ и 24 точки сбора генетического материала.

2. Выделение ДНК.

Для выделения ДНК использовали высушенные листья липы. Образец массой 50.0 мг (точная навеска) растирали до гомогенного состояния в ступке в присутствии 600 мкл буфера для экстракции ДНК (соответствующий для каждого метода 1–6). Смесь инкубировали на твердотельном термостате «Термит ТТ-2» («ДНК-Технология», Россия) при 65°C 60–80 мин с периодическим перемешиванием и осаждали клеточный дебрис центрифугированием при 10000g 10 минут на микроцентрифуге Minispin («Eppendorf», Германия). После чего производили очистку ДНК-смеси согласно представленным ниже методам 1–6.

*Точки сбора растительного материала для сравнительного ISSR-ПЦР анализа разнообразия генетического материала *T. Cordata**

№	Географическое расположение	Координаты
1	Давлекановский р-н, окрестности дер. Новояпарово	54°18'49" с.ш., 55°11'5,8" в.д.
2	Давлекановский р-н, город Давлеканово, побережье р. Дема	54°12'32,2" с.ш., 55°2'13,2" в.д.
3	Уфа, сад имени Н.К. Крупской	54°42'44,1" с.ш., 55°57'4,6" в.д.
4	Уфа, парк по улице Зорге	54°52'39,2" с.ш., 56°0'19,7" в.д.
5	Уфимский р-н, окрестности дер. Новые Карашиды, пойма р. Уфа	54°52'55,7" с.ш., 56°17'18,9" в.д.
6	Нуримановский р-н, окрестности дер. Укарлино, пойма р. Уфа	55°2'4,6" с.ш., 56°28'46" в.д.
7	Нуримановский р-н, окрестности дер. Новобирючево	55°14'38,3" с.ш., 56°36'17,5" в.д.
8	Нуримановский р-н, окрестности дер. Чандар	55°17'49,1" с.ш., 56°43'11" в.д.
9	Нуримановский р-н, окрестности дер. Красный ключ	55°22'38,7" с.ш., 56°40'50" в.д.
10	Иглинский р-н, окрестности с. Минзитарово	54°54'47,4" с.ш., 56°28'37,3" в.д.
11	Иглинский р-н, окрестности дер. Улу-Теляк	54°53'31,7" с.ш., 56°58'45,5" в.д.
12	Гафуринский р-н, окрестности дер. Курорта	53°55'37,1" с.ш., 56°32'22,9" в.д.
13	Гафуринский р-н, дер. Утяково	53°55'37,1" с.ш., 56°32'22,9" в.д.
14	Гафуринский р-н, дер. Табынское	53°59'6,2" с.ш., 56°22'32,2" в.д.
15	г. Стерлитамак, ул. Кочетова	53°37'51,7" с.ш., 55°58'14" в.д.
16	Стерлитамакский р-н, дер. Покровка, пойма р. Ашкадар	53°32'34,9" с.ш., 55°55'46,3" в.д.
17	Бижбулякский р-н, окрестности с. Бижбуляк	53°42'3,6" с.ш., 54°16'12,3" в.д.
18	Бижбулякский р-н, окрестности дер. Елбулак-Матвеевка	53°37'47,2" с.ш., 54°11'18,4" в.д.
19	Бижбулякский р-н, окрестности дер. Тукай	53°33'54,1" с.ш., 54°11'46,1" в.д.
20	Бижбулякский р-н, окрестности дер. Елбулакмак	53°32'23,6" с.ш., 54°15'7,1" в.д.
21	Бижбулякский р-н, окрестности дер. Аитово, пойма р. Дема	53°29'57,9" с.ш., 54°12'11,3" в.д.
22	Белебеевский р-н, окрестности дер. Усен-Ивановское	54°11'47,2" с.ш., 54°21'7,6" в.д.
23	Белебеевский р-н, окрестности дер. Покровка	54°8'21,1" с.ш., 54°13'46,4" в.д.
24	Белебей, парк «Поющие родники»	54°6'46,9" с.ш., 54°5'58,5" в.д.

Оригинальный метод выделения ДНК с помощью ЦТАБ (метод 1) [8]

Экстрагирующий буфер: 2% ЦТАБ, 8.175% NaCl, 100 мМ Трис-НСI (рН 8.0), 20 мМ ЭДТА.

После того как удаляли клеточный дебрис, охлаждали смесь до комнатной температуры и добавляли равный объем смеси «хлороформ : изоамиловый спирт» (по объему 24 : 1) (сокращенно Х:И). Встряхивали пробирки на роторном шейкере RM-1L («ELMI», Латвия) 20 мин, разделяли фазы центрифугированием при 10000 g, 8 мин. Снимали верхнюю фазу и добавляли в нее равный объем холодного (-20°C) изопропанола. Инкубировали при -70°C 30 мин и осаждали ДНК центрифугированием при 14000 g 30 мин 4°C в микроцентрифуге Eppendorf Centrifuge 5430R («Eppendorf», Германия).

Метод выделения с помощью ЦТАБ, основанный на разности концентраций (Метод 2) [9]

Экстрагирующий буфер: 2% ЦТАБ, 8.175% NaCl, 100 мМ Трис-НСI (рН 8.0), 20 мМ ЭДТА.

5хЦТАБ буфер: 5% ЦТАБ, 140 мМ ЭДТА.

Буфер для преципитации: 1% ЦТАБ, 50 мМ Трис-НСI (рН 8.0), 20 мМ ЭДТА.

НС-ТЕ буфер: 5.85% NaCl, 10мМ Трис-НСI (рН 8.0), 2мМ ЭДТА.

После удаления дебриса к супернатанту приливали равный объем смеси Х:И. Встряхивали на роторном шейкере 30 мин и разделяли смесь также, как и в методе 1. К верхней фазе приливали 1/5 от объема фазы 5хЦТАБ, осторожно перемешивали и инкубировали при 65°C 10 мин. Охлаждали образцы до комнатной температуры и добавляли равный объем смеси Х:И. Повторяли манипуляции предыдущего этапа. После разделения фаз, к водной фазе приливали двойной объем буфера для преципитации, перемешивали переворачиванием пробирки и оставляли на ночь при комнатной температуре. Осаждали нуклеиновые кислоты центрифугированием при 8000 g 30 мин, растворяли в 100 мкл буфера NS-TE, добавляли двойной объем этанола, инкубировали 30 минут при -70°C и центрифугировали при 10000 g 30 мин 4°C.

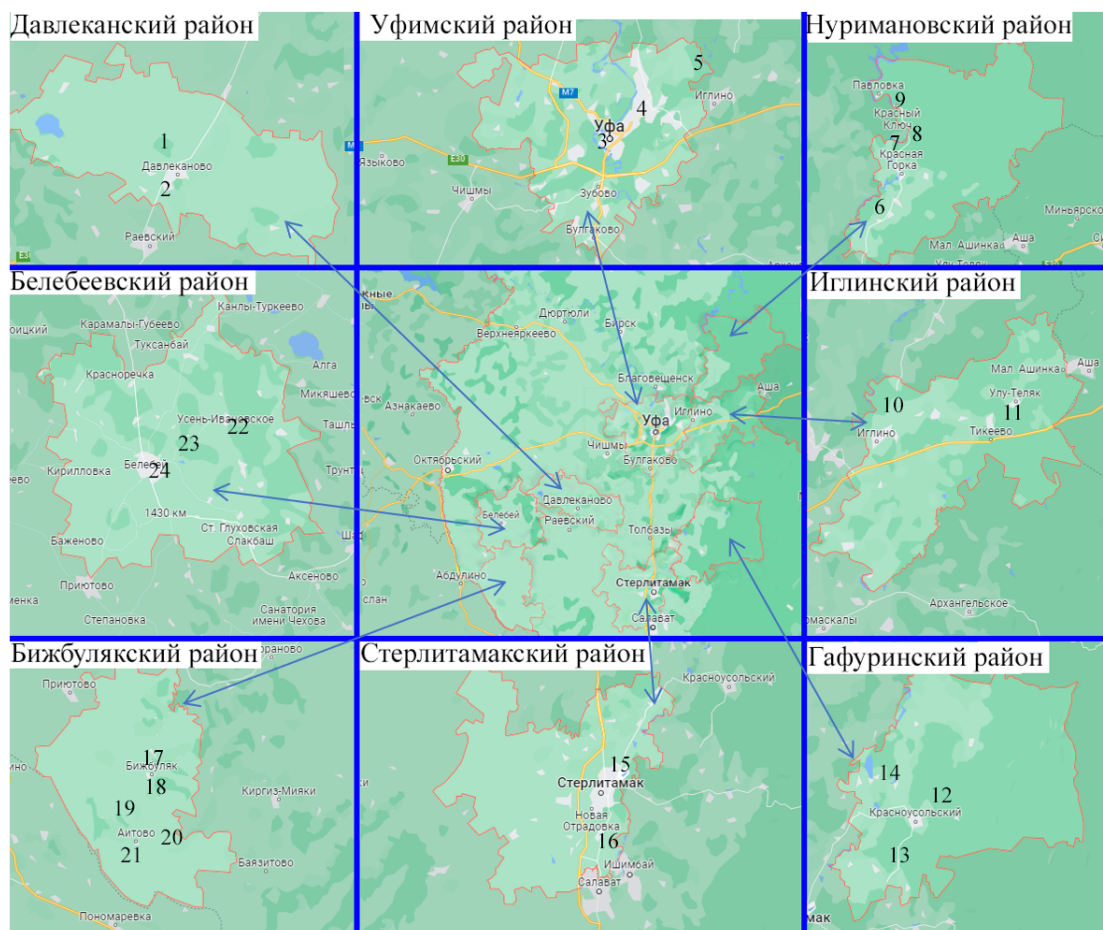


Рис. 1. Точки отбора растительного материала на карте Республики Башкортостан. Карты предоставлены бесплатным интернет-сервисом Google Maps. Дата обращения: 21.02.2022 г.

Метод солевой экстракции (Метод 3) [10]

Экстрагирующий буфер: 200 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 250 мМ NaCl, 25 мМ ЭДТА, 0.5% додецилсульфат натрия (SDS).

В оригинальном методе солевой экстракции используют протеиназу К, однако в данной работе депротенинизацию проводили с помощью фенола и хлороформа. Супернатант после удаления дебриса охлаждали до комнатной температуры и добавляли 1/2 объема фенола (рН=7.0). Встряхивали в шейкере 10 мин, центрифугировали при 10000 g 5 мин, отбирали верхнюю фазу и повторяли процедуру депротенинизации фенолом до полного удаления интерфазы (в среднем 3 раза). Отбирали супернатант и добавляли равный объем хлороформа для удаления остатков фенола. Встряхивали и центрифугировали при тех же параметрах. Отбирали супернатант и добавляли равный объем изопропанола, инкубировали при -20°C 2-3 часа, центрифугировали при 15000 g 15 мин при 4°C.

Метод выделения ДНК по [11] с модификациями от [12] (Метод 4)

Экстрагирующий буфер: 100 мМ Трис-НСl (рН 8.0), 0.05 мМ ЭДТА, 10% полиэтиленгликоль 6000, 6.8% сорбитол, 1% лаурилсаркозин, 0.1% альбумин бычий сывороточный, 0.1% аскорбиновая кислота, 1% Tween-80, 0.1% (по объему) 2-меркаптоэтанол (добавляли непосредственно перед использованием).

Образцы листьев липы растирали также, как было указано выше. Однако гомогенат переливали в 2.5 мл микропробирки и добавляли 480 мкл 5 М NaCl и 360 мкл горячего (55-60°C) 10% ЦТАБ, тщательно встряхивали и инкубировали на твердотельном термостате 65°C 50-60 мин. Пробирку охлаждали до комнатной температуры. Добавляли 400 мкл Х:И, встряхивали на шейкере 30 мин и центрифугировали при 12000 g 3 мин. Процедуру очистки хлороформом повторяли 3 раза. Далее к верхней фазе приливали равный объем холодного изопропанола, перемешивали смесь переворачиванием,

инкубировали при -20°C около часа и центрифугировали при 14000 g 15 мин 4°C .

Выделение ДНК с использованием мочевины (Метод 5).

Экстрагирующий буфер: 2% SDS, 10 мМ ЭДТА, 0.35 М NaCl, 100 мМ Трис-HCl (pH 8.0), 7 М мочевины.

В данной методике отсутствует описанная выше процедура инкубирования в экстрагирующем буфере при 65°C . После гомогенизации в экстрагирующем буфере сразу добавляли равный объем смеси «фенол : хлороформ : изоамиловый спирт» (25:24:1) (Ф:Х:И), встряхивали на шейкере 10 мин, центрифугировали при 8000 g 5 мин. Отбирали верхнюю фазу и повторяли данную процедуру еще 2 раза. После чего к водной фазе добавляли равный объем Х:И, встряхивали и центрифугировали так же. К водной фазе добавляли равный объем изопропанола (-20°C), держали в морозильнике при -20°C более 30 мин, центрифугировали при 12000 g 30 мин.

Метод выделения при помощи ЦТАБ, модифицированный в рамках данной работы для липы мелколистной (метод 6) (Приложение 2)

Экстрагирующий буфер: 100 мМ Трис-HCl (pH 8.0), 4 мМ ЭДТА, 2% ЦТАБ, 50 мМ аскорбиновая кислота, 1.375% поливинилпирролидон (ПВП) 40000, 8.175% NaCl, 0.5% (по объему) меркаптоэтанол (добавляли непосредственно перед использованием). Экстрагирующий буфер и ступки с пестиками перед процедурой выделения охлаждали.

После удаления дебриса к супернатанту приливали равный объем смеси Х:И, встряхивали на шейкере 10 мин и центрифугировали при 8000 g 3 мин. Отбирали водную фазу и повторяли данную процедуру до полного исчезновения интерфазы (в среднем еще 2 раза). Верхнюю фазу отбирали не полностью, чтобы не контаминировать его компонентами интерфазы. Далее к водной фазе приливали равный объем холодного (-20°C) изопропанола и оставляли при -20°C на 2 часа. Осаждали ДНК при 15000 g 15 мин и продолжали процедуры, описанные ниже.

Дополнительная очистка ДНК

После финального осаждения ДНК методами 1–6 осадок растворяли в 100 мкл буфера TE и добавляли 50 мкл 7.5 М ацетата аммония

и инкубировали на льду (0°C) 1.5–2 часа. Смесь центрифугировали при 14000 g, к супернатанту добавляли равный объем изопропилового спирта. Осаждали нуклеиновые кислоты центрифугированием при 14000 g 30 мин. Промывали осадок 75% этиловым спиртом, сушили при 60°C 10 мин и растворяли в 30 мкл воды.

3. Анализ качества выделенной ДНК.

Концентрацию ДНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop-One-W («ThermoFisher scientific», США), и для установления чистоты выделенной ДНК анализировали отношение $A_{260}/280$ и $A_{260}/230$. Идеально чистая ДНК обладает отношением $A_{260}/280 = 1.8$ и $A_{260}/230 = 2.0$.

Для дополнительной оценки качества ДНК анализируемые образцы наносили на 0.8% агарозный гель и проводили электрофорез в 1xTAE-буфере. Гель окрашивали бромистым этидием (5 мг/л) и документировали в гелъдокументирующей системе Gel Doc EZ System («Bio-Rad Laboratories», США). Выделенные образцы ДНК использовали для ISSR-анализа (табл. 2). Реакционная смесь для ISSR-анализа объемом 30 мкл содержала следующие компоненты: 1 ед. Taq-полимеразы («Евроген», Россия), 3 мкл 10-кратного буфера Taq-полимеразы, MgCl_2 (5 мМ), 0.25 мМ каждого dNTP, 90 пМ праймера, 0.2–0.5 мкг тотальной ДНК. Условия реакции: 1 – начальная денатурация – 5 мин при 94°C ; 2 – 35 циклов: денатурация при 94°C – 50 с, температура отжига 52°C – 50 с и элонгация при 72°C 1 мин 40 с; 3 – заключительная элонгация 7 мин при 72°C .

4. Анализ результатов ISSR.

Изображения агарозного электрофореза получали в системе Image Lab («Bio-Rad Laboratories», США). Выравнивание геля и определение длины ампликонов проводили в программе Image Lab. Только отчетливые и воспроизводимые фрагменты ДНК (табл. 2), оценивались как «присутствующие» (1) или «отсутствующие» (0) для всех изученных образцов. Последовательности праймеров, приведены в табл. 2. Литературные источники, из которых были взяты данные ISSR-праймеры приведены в обзорной статье [7].

Различающую способность маркера оценивали путем расчета процента полиморфизма (P, %), полиморфной информативности (PIC)

и маркерного индекса (MI). Оценивали PIC-содержание маркера [13]:

$$PIC_j = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2,$$

где i – i -й паттерн j -го маркера, n – количество паттернов j -го маркера, P – частота паттерна.

Маркерный индекс рассчитывали по формуле:

$$MI = PIC \times \text{количество уникальных паттернов.}$$

Т а б л и ц а 2

Последовательности праймеров для ISSR-анализа

Название	Последовательность 5'–3'
HB10	(GA) ₆ CC
HB14	(GA) ₆ YG
IS16	(GA) ₈ C
IS17	(GA) ₈ YC
IS24	(AC) ₈ TC
IS34	(TC) ₈ CC
IS38	(CT) ₈ G
LK7	(CT) ₈ CCA

Дендрограммы сходства образцов строили в TreeCon 3.1. в операционной системе Windows XP SP3. При постройке древа использовали метод [14] и бутстрап-анализ с 1000 повторениями для оценки достоверности результатов различий на филогенетическом древе. Дендрограммы строили невзвешенным парно-групповым методом (UPGMA). Статистическую обработку результатов проводили в StatSoft® Statistica 10.0.

Результаты и обсуждение. После выделения ДНК вышеназванными методами для оценки чистоты и качества выделения проводили агарозный гель электрофорез, результаты которых для образца № 10 можно увидеть на рис. 2, а также определяли присутствие примесей методом спектрофотометрии (табл. 2.) Из других образцов осадок нуклеиновых кислот на последних этапах очистки периодически не осаждался на дно пробирки, также оказывался связан вязкой субстанцией (предположительно полисахаридными или полифенольными веществами). Дополнительная очистка ацетатом аммония и/или смесью Ф:Х:И, переосаждение спиртами не улучшала результат. Вероятно, содержание полисахаридов и/или полифенольных веществ (возможно, их качественный состав) в образце № 10 несколько отличался от других

образцов, в результате чего нам удалось выделить ДНК материал из него всеми перечисленными методами (1–6) (табл. 3).

По результатам гель-электрофореза наилучшие результаты были получены при выделении ДНК методами 4 и 6 (рис. 2). В остальных вариантах обнаруживалась связанная ДНК (рис. 2, методы 1, 2, 3), застрявшая в лунке геля, или количество выделенной ДНК было настолько мало, что не обнаруживалось визуально.

После спектрофотометрического анализа выяснили, что наибольшее количество ДНК материала выделилось методами 3 и 6. Однако наиболее чистыми оказались образцы ДНК, выделенные методами 5 и 6 (табл. 3). В методах 1 и 3 отношение A260/230 было больше 2.0, что может говорить о том, что данные образцы содержат в себе примеси фенольных соединений. В образцах, выделенных методами 1 и 2, отношение A260/280 было выше эталонной, что может говорить о загрязнении ДНК низкомолекулярными соединениями. В образцах 3 и 4 A260/280 было намного ниже 1.8, что говорит о присутствии низкомолекулярных органических примесей.

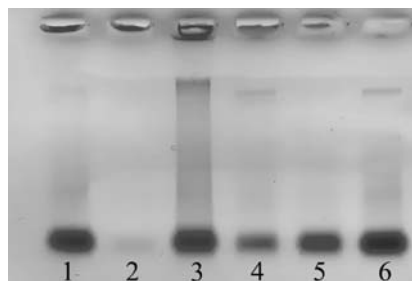


Рис. 2. Электрофореграмма на агарозном геле ДНК материалов после выделения различными методами: 1–6 – методы выделения ДНК

Т а б л и ц а 3

Концентрация и чистота выделенной ДНК, определенная методом спектрофотометрии

Метод выделения	A260/280	A260/230	Концентрация, нг/мкл
1	1.92±0.09	2.29±0.12	28.4±2.1
2	2.01±0.09	1.83±0.09	11.1±4.3
3	1.34±0.09	2.14±0.09	98.9±3.8
4	1.48±0.09	1.77±0.09	72.0±2.1
5	1.75±0.09	1.67±0.09	1.2±1.0
6	1.83±0.09	1.89±0.09	104.3±6.4

Примечание: пределы погрешности представлены стандартным отклонением внутри выборки.

Таким образом, наиболее качественный ДНК-материал был получен с помощью модифицированного нами метода 6. Вероятнее всего, критичными при выделении ДНК из высушенных листьев липы оказались следующие моменты: 1 – использование меркаптоэтанола, аскорбиновой кислоты и ПВП; 2 – растирание образца листьев в холодных ступках (-20°C) с использованием охлажденного (4°C) экстрагирующего буфера; 3 – после разделения фаз (с использова-

нием Х:И) отбор не более 80% водной фазы (поскольку на нижней части водной фазы, ближе к интерфазе накапливается вязкая субстанция); 4 – во время очистки ацетатом аммония центрифугирование в центрифуге при температуре 4°C , 5 – использование большего объема буфера (к примеру 1000 мкл вместо 600 мкл для предложенного количества растительного материала). Все эти модификации метода увеличивали конечный выход и качество ДНК.

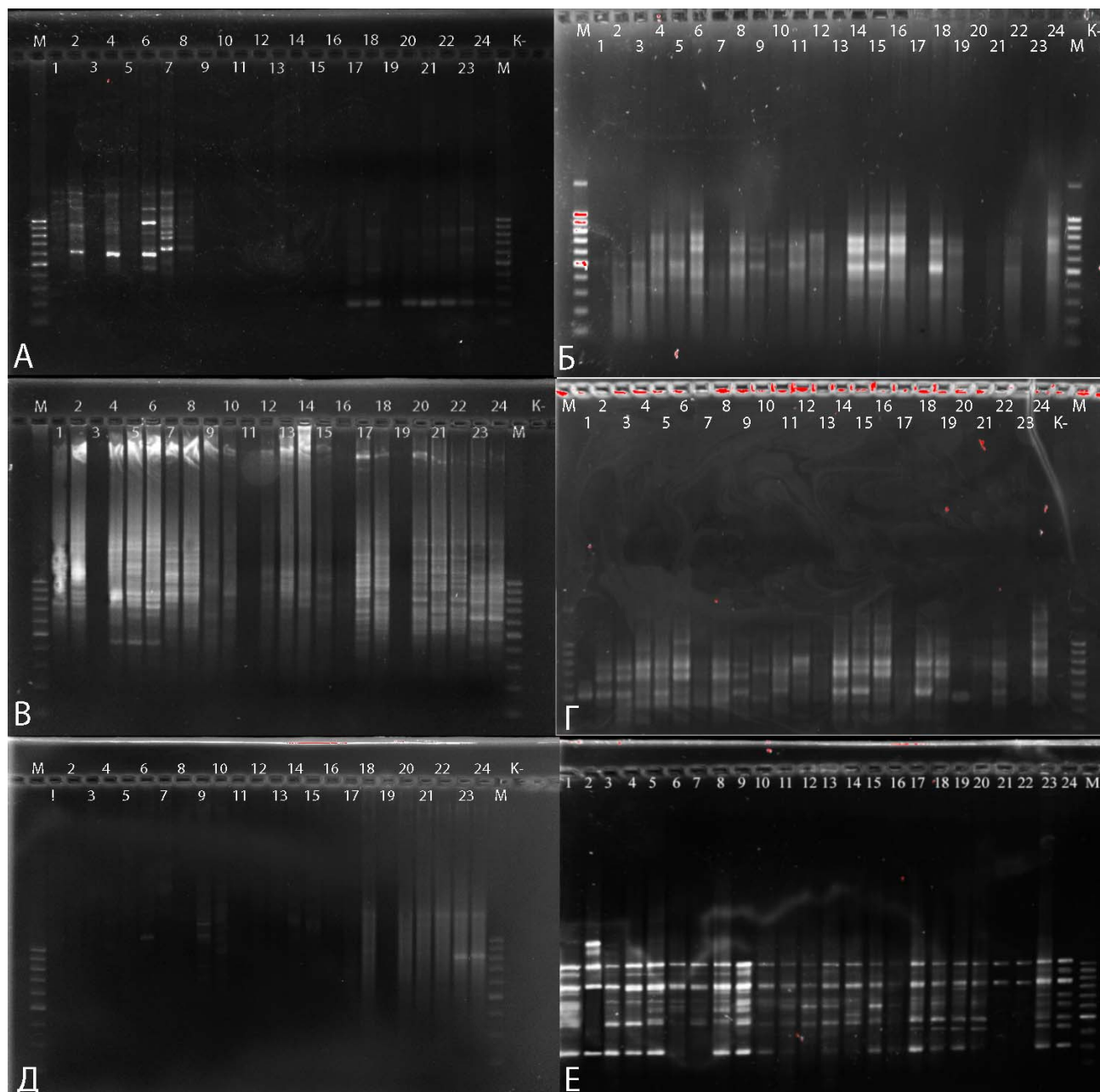


Рис. 3. Электрофореграммы результатов ISSR-анализа с праймером IS34 с использованием ДНК, выделенных различными методами: А – Е – методы выделения ДНК 1–6 соответственно. М – маркер молекулярной массы 100 бр («Евроген», Россия). К- – минус контроль ПЦР. 1–24 – образцы ДНК лип

Для последующего ISSR-анализа и анализа воспроизводимости мы выделяли ДНК каждым методом в трех повторностях. После каждого выделения ставили ISSR-ПЦП и электрофоретически анализировали количество и качество полученных ампликонов. При выделении методами 1 и 5 (рис. 3А и Д) мы получили крайне мало спектров ISSR. При проведении ISSR с образцами метода 3 (рис. 3В) мы получили сплошные полосы разрушенных и неправильно синтезированных ДНК. Анализировать такие ISSR-спектры очень сложно. Анализ ДНК выделенных методами 2 и 4 (рис. 3Б и Г) показал довольно много хорошо различимых ISSR-спектров, однако сравнив их количество и качество со спектрами, полученными модифицированным нами методом 6 (рис. 3Е), мы пришли к выводу, что последние явно превосходят все остальные варианты. Далее образцы ДНК, выделенные методом 6, было решено использовать для более тщательного ISSR-анализа с использованием других праймеров (см. табл. 2). Это связано с тем, что для точного анализа спектров ISSR необходимо получить четкие полосы на гель-электрофорезе, чего при использовании других методов выделения ДНК липы мы не смогли достичь (рис. 3).

Т а б л и ц а 4

Характеристики полиморфизма полученных ISSR-спектров

Маркер	Число ампликонов	Число уникальных ампликонов	P, %	PIC	MI
HB10	5	3	60	0.539	1.61
HB14	6	6	100	0.727	4.36
IS16	7	4	57	0.693	2.77
IS17	8	2	25	0.692	1.38
IS24	8	4	50	0.720	2.88
IS34	9	3	33	0.486	1.46
IS38	8	8	100	0.767	6.14
LK7	6	6	100	0.784	4.70

Не все изученные ISSR-маркеры одинаково удачно подходят для выявления ДНК-полиморфизма липы мелколистной (табл. 4). По проценту полиморфности (P) наиболее удачными для этого дерева оказались ISSR-праймеры HB14, IS38 и LK7. Полученные дендрограммы сходства образцов липы мел-

колиственной по каждому из ISSR-маркеров представлены на рис. S1 и S2 (Приложение 1). Они давали максимальное количество уникальных паттернов, и обладали наиболее высокими значениями полиморфной информативности (PIC) и маркерного индекса (MI). Наименьшее число уникальных ампликонов удалось выявить с помощью маркерной последовательности IS17, процент полиморфизма которого равнялся 25%, а маркерный индекс 1.38. Далее путем объединения результатов ISSR-анализа всеми использованными праймерами была построена комплексная дендрограмма сходства всех анализируемых 24 образцов липы мелколистной из РБ (рис. 4).

По результатам ISSR анализа оказалось, что наибольшей полиморфностью обладает популяция лип, растущих в побережье реки Дема в городе Давлеканово (см. рис. 4). Дендрограмма сходства в целом разделяется на две крупные группы: на северные популяции, которые растут преимущественно в пойме реки Уфа, и южные популяции, которые растут в основном в пойме реки Белая. Необходимо отметить, что в отечественной литературе встречаются схожие данные, согласно которым при изучении хлоропластной ДНК на территории РБ выявлены северные и южные популяции лип [15].

Ожидаемо выявилась закономерность в распределении популяций липы на дендрограмме и местом произрастания: чем дальше друг от друга находятся популяции на карте, тем больше генетических различий между ними. Достаточно хорошо выделились популяции липовых насаждений, образцы которых собраны на территории Бугульминско-Белебеевской возвышенности (образцы № 22, 17, 23, 24, 19, 18, 20, 21). Потенциальная нектарпродуктивность липовых насаждений данной местности уступает горнолесной зоне (Гафурийский район), это связано с более «молодым» возрастом липняков [16]. Согласно географическому строению, рельефу и природно-климатическим условиям, Бугульминско-Белебеевская возвышенность выделена в самостоятельную лесостепную зону в Предуральской степи и разделена северной лесостепью от горно-лесной зоны (образцы № 12, 13 и 14) и Уфимского плато (образцы № 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11).

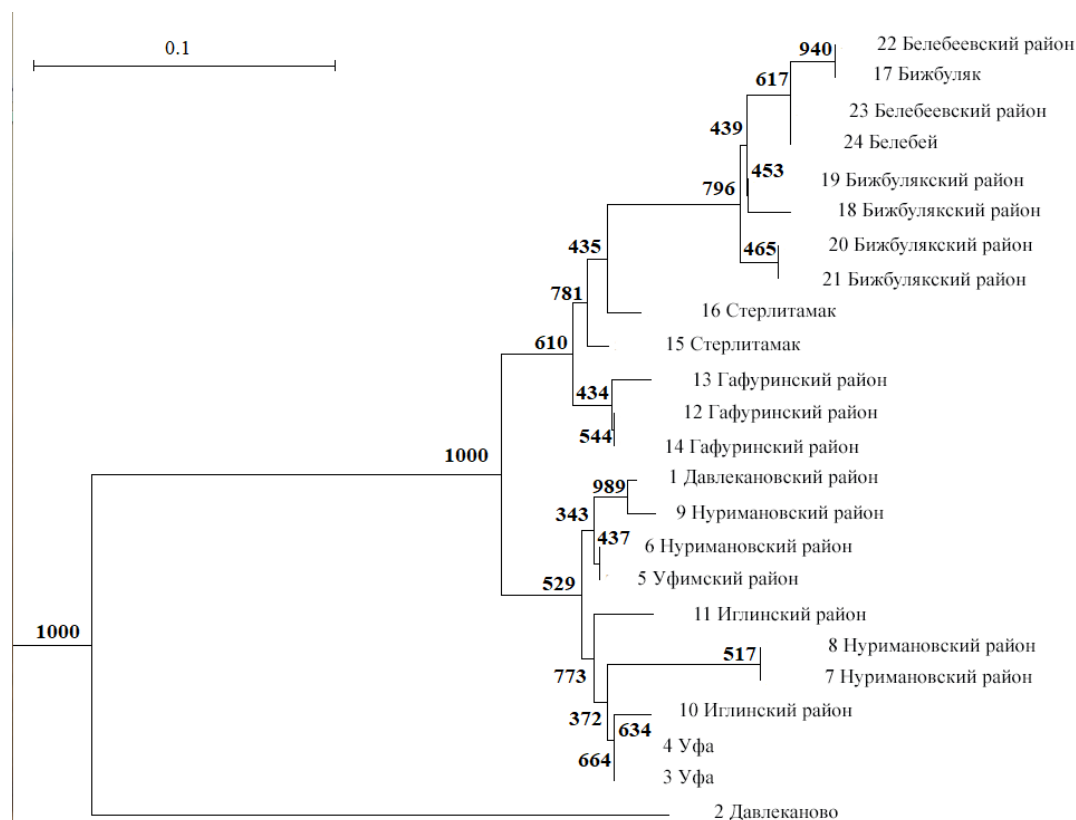


Рис. 4. Комплексная дендрограмма сходства образцов *T. cordata* на территории Республики Башкортостан, полученная с использованием метода ISSR-анализа

Одним из наиболее нектаропродуктивных районов Башкирии считается Гафурийский [16], который также достаточно четко удалось выделить с помощью маркеров IS16 и IS38 (приложение 1, рис. S1B и S2B). Если в комплексной дендрограмме липняки горнолесной зоны и Бугульминско-Белебеевской возвышенности были объединены в свои группы, то образцы с территории Уфимского плато и прилегающих равнин в Нуримановском (№ 7, 8, 9) и Иглинском (10 и 11) районах были достаточно полиморфны, даже при расположении на относительно небольшом расстоянии друг от друга (см. рис. 4). Данные факты требуют более тщательного анализа с расширением мест сбора материала и с привлечением других ДНК-маркеров и выяснения причин полиморфизма липовых насаждений, которая может быть связана с особенностями процесса распространения популяций липы мелколистной в Республике Башкортостан.

Заключение. На основе классического ЦТАБ-метода разработан модифицированный метод выделения ДНК, который оказался более

эффективным для получения качественной ДНК из сухих листьев липы мелколистной. Основные изменения в методике заключались в следующем: 1 – использование меркаптоэтанола, аскорбиновой кислоты и ПВП в экстрагирующем буфере; 2 – растирание сухих листьев в холодных ступках (-20°C) с использованием охлажденного (4°C) экстрагирующего буфера; 3 – отбор около 80% водной фазы после разделения фаз; 4 – проведение центрифугирования при температуре 4°C во время очистки ацетатом аммония. Также для выделения ДНК из сухих листьев липы мелколистной подходят стандартные методы: метод солевой экстракции и метод, предложенный [11]. Однако полученные этими методами образцы ДНК давали меньшее количество ISSR-спектров, чем предложенный в работе метод. Подробный протокол модифицированного нами метода приведен в дополнительных материалах (Приложение 2). В результате проведенных исследований были получены предварительные данные о генетическом разнообразии популяций липы в Республике Башкортостан. Были обнаружены две большие группы популяций липы мелколистной, связан-

ных с бассейнами двух крупнейших рек исследуемого региона: Уфы и Белой. Исследования по генотипированию популяций липы мелколистной в Республике Башкортостан будут продолжены с использованием различных ДНК-маркеров.

Работа выполнена в рамках Государственного задания №122030200143-8.

Литература

1. Cittan M., Altuntaş E., Çelik A. Evaluation of antioxidant capacities and phenolic profiles in *Tilia cordata* fruit extracts: A comparative study to determine the efficiency of traditional hot water infusion method // *Industrial Crops and Products*. 2018. № 122. P. 553–558.

2. Исяньюлова Р.Р., Талипов Э.Н. Липа мелколистная как одна из преобладающих пород в составе насаждений Республики Башкортостан // *Использование и охрана природных ресурсов в России*. 2019. Т. 157. № 1. С. 50–54.

3. Khisamov R.R., Farkhutdinov R.G., Yumaguzhin F.G., Ishbulatov M.G., Mustafin R.F., Galeev E.I., Kutliyarov A.N., Rakhmatullin Z.Z. Honey Production Potential and Cadastral Valuation of Melliferous Resources for the Southern Urals // *Journal of Engineering and Applied Sciences*. 2018. № 5. P. 4622–4629. DOI: 10.3923/jeasci.2018.4622.4629

4. Кулуев Б.Р., Членов И.В., Полякова Н.В., Мурзабулатова Ф.К., Рязанова Н.А., Абдуллина Р.Г., Билалова Р.А., Мусин Х.Г., Заикина Е.А., Бережнева З.А., Кулуев А.Р., Галимова А.А., Шигапов З.Х. Создание первого нектароносного ландшафтного участка непрерывного цветения (нектарного леса) в Республике Башкортостан // *Biomics*. 2022. Т. 14. № 1. С. 1–31. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2022-1

5. Кулуев А.Р., Матниязов Ю.М., Никонов Ю.М., Чемерис А.В. Выделение геномной ДНК *Nicotiana tabacum* L., обогащенной хлоропластной ДНК с использованием сахарозного градиента // *Известия Уфимского научного центра РАН*. 2018. № 2. С. 71–75.

6. Рябушкина Н.А., Омашева М.Е., Галиапаров Н.Н. Специфика выделения ДНК из растительных объектов // *Биотехнология. Теория и практика*. 2012. № 2. С. 9–26.

7. Нигматуллина Н.В., Кулуев А.Р., Кулуев Б.Р. Молекулярные маркеры, применяемые для определения генетического разнообразия и видоидентификации дикорастущих растений // *Biomics*. 2018. Т. 10. № 3. С. 290–318. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-39.

8. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // *Phytochemistry bulletin*. 1987. 19(1):11-15.

9. Звягин А.С. Выделение ДНК из гербарных листьев *Vitis vinifera* L. // *Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета*. 2010. № 58. С. 436–447.

10. Aljanabi S.M. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques / S.M. Aljanabi, I. Martinez // *Nucleic Acids Resource*. 1997. 25:4692–4693.

11. Devey M.E., Bell J.S., Smith D.N. A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD and microsatellite markers // *Theoretical and Applied Genetics*. 1996. 92:673–679.

12. Semerikov V.L., Lascoux M. Nuclear and cytoplasmic variation within and between Eurasian *Larix* species // *American Journal of Botany*. 2003. № 90. P. 1113–1123.

13. Smith J.S.C., Chin E.C., Shu H., Smith O.S., Wall S.J., Senior M.L., Mitchell S.E., Kresovich S., Ziegler J. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.) comparisons with data from RFLPs and pedigree // *Theoretical and Applied Genetics*. 1997. 95:163–173.

14. Nei M., Li W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1979. 76(10):5269–5273.

15. Семерикова С.А., Исаков И.Ю., Семериков В.Л. Изменчивость хлоропластной ДНК отражает историю *Tilia cordata* s. l. в восточной части ареала // *Генетика*. 2020. Т. 56. № 2. С. 188–200.

16. Хисамов Р.Р., Фархутдинов Р.Г., Хасанов Ф.Р. Мониторинг естественных медоносных ресурсов Бугульминско-Белебеевской возвышенности в пределах Республики Башкортостан // *Фундаментальные исследования*. 2014. № 5 (часть 1). С. 84–88.

References

1. Cittan M., Altuntaş E., Çelik A. Evaluation of antioxidant capacities and phenolic profiles in *Tilia cordata* fruit extracts: A comparative study to determine the efficiency of traditional hot water infusion method // *Industrial Crops and Products*, 2018, no. 122, pp. 553–558.

2. Isjan'julova R.R., Talipov Je.N. Lипа melkolistnaja kak odna iz preobladajušhiih porod v sostave nasazhdenij Respubliki Bashkortostan // *Ispol'zovanie i ohrana prirodnyh resursov v Rossii*, 2019, vol. 157, no. 1, pp. 50–54. (In Russian)

3. Khisamov R.R., Farkhutdinov R.G., Yumaguzhin F.G., Ishbulatov M.G., Mustafin R.F., Galeev E.I., Kutliyarov A.N., Rakhmatullin Z.Z. Honey Production Potential and Cadastral Valuation of Melliferous Resources for the Southern Urals // *Journal of Engineering and Applied Sciences*, 2018, no. 5, pp. 4622–4629. DOI: 10.3923/jeasci.2018.4622.4629

4. Kuluev B.R., Chlenov I.V., Poljakova N.V., Murzabulatova F.K., Rjazanova N.A., Abdullina R.G., Bilalova R.A., Musin H.G., Zaikina E.A., Berezhneva Z.A., Kuluev A.R., Galimova A.A., Shigapov Z.H. Sozdanie pervogo nektaronosnogo landshaftnogo uchastka nepreryvnogo cvetenija (nektarnogo lesa) v Respublike Bashkortostan // *Biomics*, 2022, vol. 14, no. 1, pp. 1–31. (In Russian)
5. Kuluev A.R., Matnijazov Ju.M., Nikonorov Ju.M., Chemeris A.V. Vydelenie genomnoj DNK *Nicotiana tabacum* L., obogashhennoj hloroplastnoj DNK s ispol'zovaniem saharoznogo gradienta *Izvestiya Ufim-skogo nauchnogo tsentra RAN*, 2018, no. 2, pp. 71–75. (In Russian)
6. Rjabushkina N.A., Omasheva M.E., Galiakparov N.N. Specifika vydelenija DNK iz rastitel'nyh ob#ektov // *Biotehnologija. Teorija i praktika*, 2012, no. 2, pp. 9–26. (In Russian)
7. Nigmatullina N.V., Kuluev A.R., Kuluev B.R. Molekuljarnye markery, primenjaemye dlja opredelenija geneticheskogo raznoobrazija i vidoidentifikacii dikorastushhih rastenij // *Biomics*, 2018, vol. 10, no. 3, pp. 290–318. (In Russian)
8. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // *Phytochemistry bulletin*, 1987, no. 19(1), pp. 11–15.
9. Zvjagin A.S. Vydelenie DNK iz gerbarnyh list'ev *Vitis vinifera* L // *Politematicheskij setevoj jelektronnyj nauchnyj zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*, 2010, no. 58, pp. 436–447. (In Russian)
10. Aljanabi, S.M. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques / S.M. Aljanabi, I. Martinez // *Nucleic Acids Resource*, 1997, no. 25, pp. 4692–4693.
11. Devey M.E., Bell J.S., Smith D.N. A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD and microsatellite markers // *Theoretical and Applied Genetics*, 1996, no. 92, pp. 673–679.
12. Semerikov V.L., Lascoux M. Nuclear and cytoplasmic variation within and between Eurasian *Larix* species // *American Journal of Botany*, 2003, no. 90, pp. 1113–1123.
13. Smith J.S. C., Chin E.C., Shu H., Smith O.S., Wall S.J., Senior M.L., Mitchell S.E., Kresovich S., Ziegler J. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.) comparisons with data from RFLPS and pedigree // *Theoretical and Applied Genetics*, 1997, no. 95, pp. 163–173.
14. Nei M., Li W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1979, vol. 76(10), pp. 5269–5273.
15. Semerikova S.A., Isakov I.Ju., Semerikov V.L. Izmenchivost' hloroplastnoj DNK otrazhaet istoriju *Tilia cordata* s. l. v vostochnoj chasti areala // *Genetika*, 2020, vol. 56, no. 2, pp. 188–200.
16. Hisamov R.R., Farhutdinov R.G., Hasanov F.R. Monitoring estestvennyh medonosnyh resursov Bugul'minsko-Belebeevskoj vozvyshennosti v predelah Respubliki Bashkortostan // *Fundamental'nye issledovaniya*, 2014, no. 5 (chast' 1), pp. 84–88. (In Russian)

Дендрограммы сходства образцов липы мелколистной (*Tilia Cordata* Mill.)
на территории Республики Башкортостан

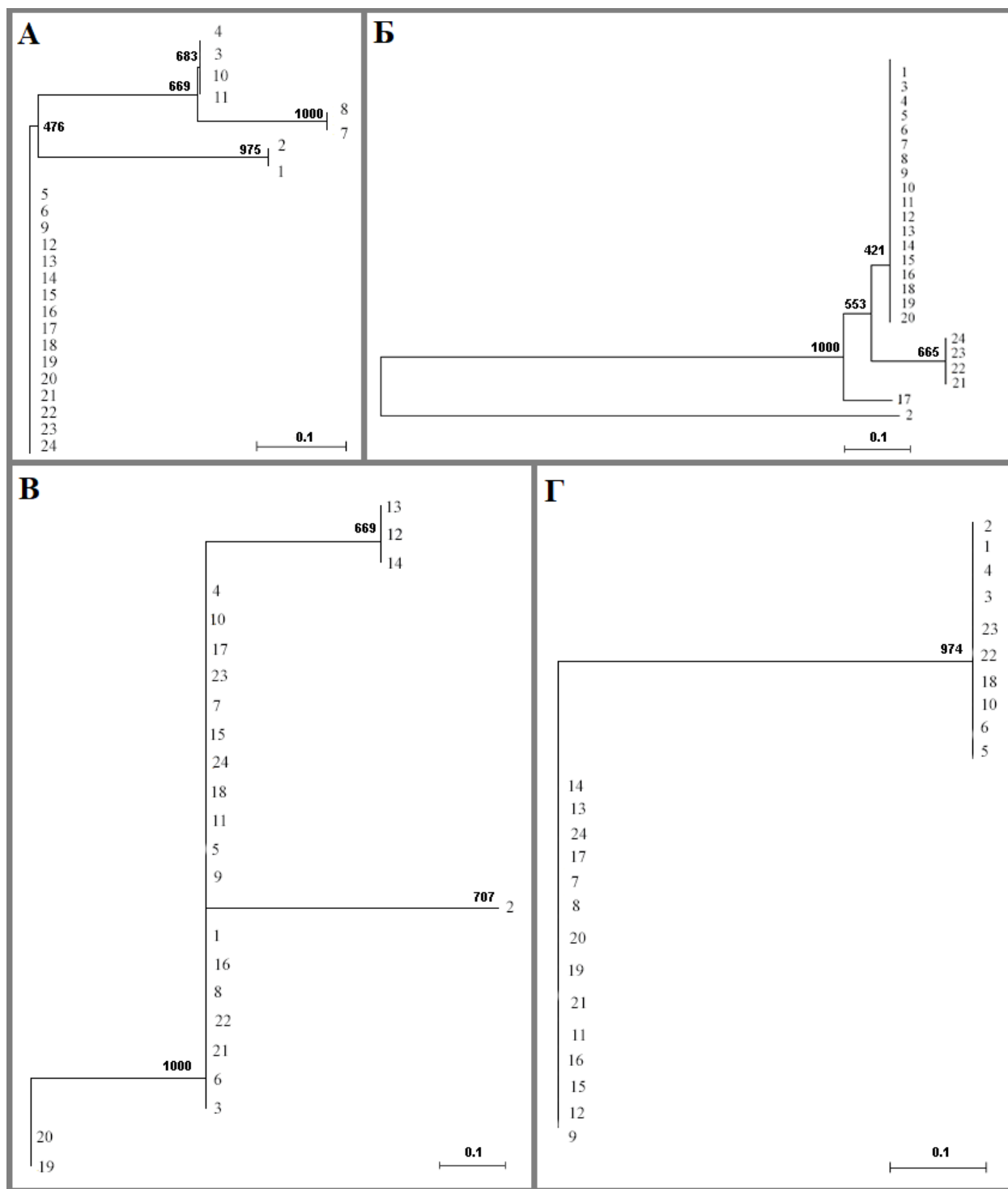


Рис. S1. Дендрограмма сходства образцов *T. cordata* на территории Республики Башкортостан, полученных в результате ISSR-анализа с использованием праймеров NB10 (А), NB14 (Б), IS16 (В), IS17 (Г). 1–24 – образцы лип (см. табл. 1)

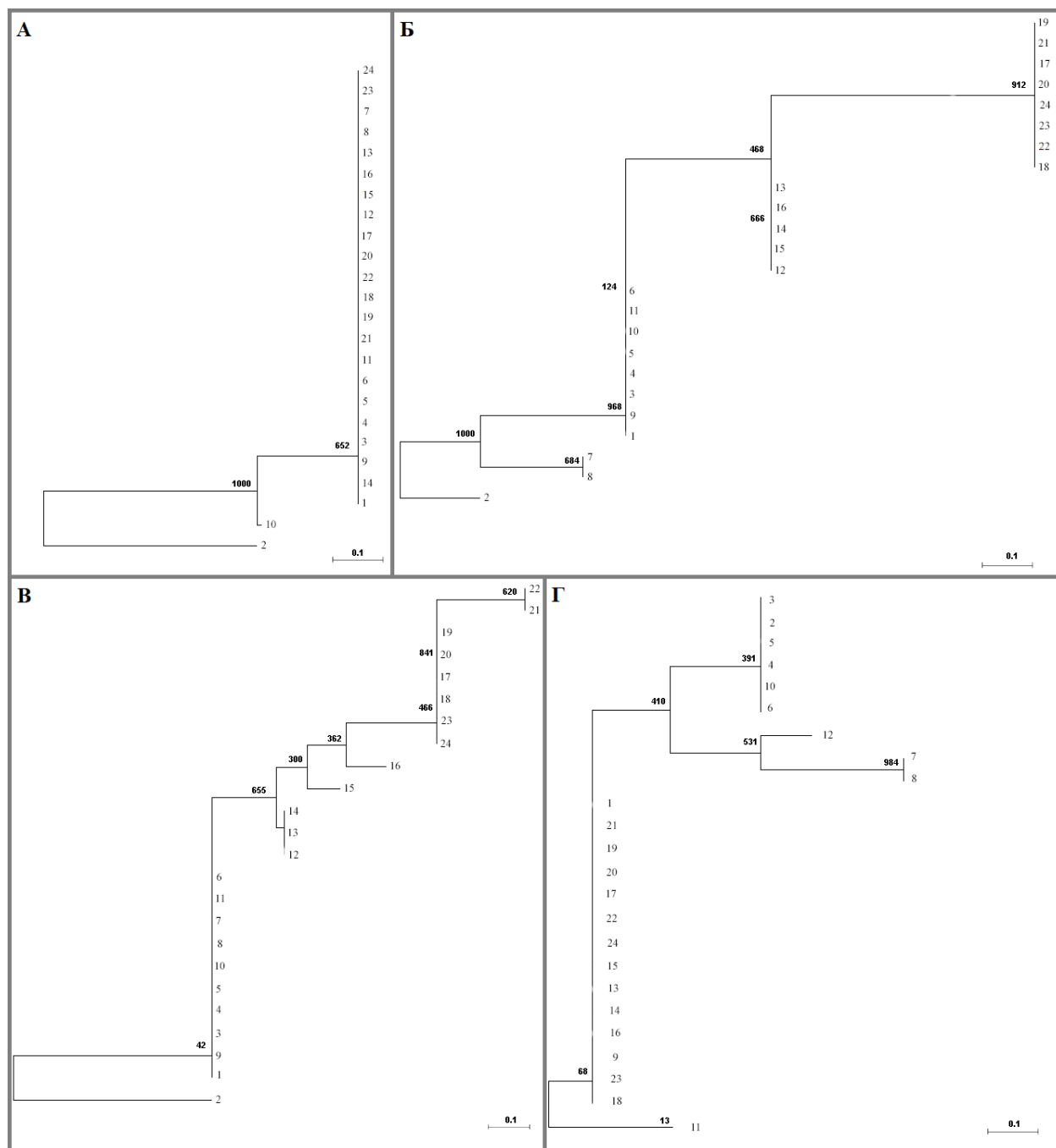


Рис. S2. Дендрограмма сходства образцов *T. cordata* на территории Республики Башкортостан, полученных в результате ISSR-анализа с использованием праймеров IS24 (А), IS34 (Б), IS38 (В), LK7 (Г). 1–24 – образцы лип (см. табл. 1)

**Протокол модифицированного ЦТАБ-метода выделения ДНК липы мелколистной
(*Tilia Cordata Mill.*)**

Экстрагирующий буфер: Трис-НСI (рН 8.0) – 100 мМ, ЭДТА – 4 мМ, ЦТАБ – 2%, аскорбиновая кислота – 50 мМ, РVP – 1,375%, NaCl – 8.175%, меркаптоэтанол – 0.5% (по объему).

1. Для выделения ДНК можно использовать листья, высушенные при комнатной температуре, высушенные в сушильном шкафу при 60°C или свежие листья.

2. Образец массой 50.0 мг (точная навеска) растереть до гомогенного состояния в холодной (4°C) ступке в присутствии 600–800 мкл холодного буфера для экстракции ДНК. Для увеличения выхода можно растирать с использованием стерильного песка или жидкого азота.

3. Перенести смесь в микропробирки типа «Eppendorf». Инкубировать на твердотельном термостате (или на термошейкере) при 65°C 60–80 минут с периодическим перемешиванием.

4. Образцы охладить до комнатной температуры и прилить равный объем смеси «хлороформ : изоамиловый спирт» (24:1).

5. Встряхивать на шейкере 10 мин. Во время встряхивания должна образоваться эмульсия.

6. Центрифугировать при 8000g 3–8 мин. При более длительном центрифугировании интерфаза становится более плотным, что облегчает отбор водной фазы, однако не рекомендуется увеличивать скорость вращения во избежание повреждения пробирок.

7. Отобрать около 80% водной фазы в новую микропробирку и повторить данную процедуру до полного исчезновения интерфазы (в среднем еще 2 раза). При последующих этапах хлороформной очистки нужно отбирать максимально возможное количество водной фазы.

8. К водной фазе прилить равный объем холодного (–20°C) изопропанола, перемешать пере-

ворачиванием пробирки (без интенсивного встряхивания).

9. Инкубировать при –20°C 2 часа (можно оставить на ночь – это не влияет на количество и качество выделенной ДНК).

10. Осадить ДНК при 15000g и 4°C, 15 мин. Осадок должен быть плотным, белого, желтоватого или коричневатого цвета (цвет зависит от особенностей листового материала). Возможно образование вязкого желеобразного осадка, который можно расплавить в буфере ТЕ (при 60°C) и пересадить ДНК двойным объемом этилового спирта. Такая манипуляция позволяет уменьшить количество желеобразного осадка, но не избавляет от него полностью.

11. Осадок растворить в 100 мкл буфера ТЕ (можно расплавить осадок при 65°C) и добавить 50 мкл 7,5М ацетата аммония.

12. Инкубировать на льду (0°C) 1.5–2 часа.

13. Центрифугировать при 14000g и 4°C 15–20 мин. После чего отобрать супернатант.

14. К супернатанту добавить равный объем изопропилового или двойной объем этилового спирта.

15. Центрифугировать при 15000g 30 минут. Осадок должен получиться плотным.

16. Промыть осадок 75% этиловым спиртом. Для этого следует добавить около 200 мкл 75% этанола, осторожно встряхнуть, и центрифугировать при 15000g 5–10 мин. (Осадок должен прилипнуть на дно пробирки)

17. Просушить осадок при комнатной температуре или при 65°C. (Все капли спирта должны испариться)

18. Растворить осадок в воде (для дальнейшего использования) или в буфере ТЕ (для хранения).



**THE MODIFIED CTAB METHOD FOR DNA ISOLATION FROM *TILIA CORDATA* MILL.
TO DETECT MULTILOCUS POLYMORPHISM**

© Kh.G. Musin¹, R.R. Khisamova², R.G. Farkhutdinov², A.A. Yamaleeva², B.R. Kuluev¹

¹ Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre
of Russian Academy of Sciences,
71, prospect Oktyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

² Ufa University of Science and Technology,
32, ulitsa Zaki Validi, 450076, Ufa, Russian Federation

Small-leaved linden (*Tilia cordata* Mill.) is the main honey plant in the Republic of Bashkortostan (RB). Linden forests, forming the basis of the entire forest fund of the RB, grow in a wide range of climatic and geographical conditions. This suggests the presence of many linden populations in RB, which, moreover, may differ in nectar quality and productivity. Therefore, studies to identify the genetic polymorphism and population structure of *T. cordata* in RB using various methods of molecular genetics seem to be relevant. Dried leaves are most suitable for DNA isolation of various plants, but they contain a large amount of PCR inhibitors in linden. Based on this, the purpose was to select and test the optimal method for isolating high-quality total DNA from dry leaves of *T. cordata*. The quality of the isolated DNA was assessed spectrophotometrically, by agarose gel electrophoresis, and by ISSR-PCR. Of the six DNA extraction methods tested, the most suitable for *T. cordata* was the method modified by us using CTAB, which differs from the standard approaches by using mercaptoethanol, polyvinylpyrrolidone, and ascorbic acid in the extraction buffer, homogenize the leaves in the cold, and partial sampling of the aqueous phase during treatment with chloroform. Using this method, DNA was isolated from 24 samples of *T. cordata* from different regions of the RB, and ISSR analysis was performed using eight primers. According to the results of the analysis, two large groups of populations of small-leaved linden were identified, the northern group was associated with the Ufa River basin, and the southern one with the Belaya River basin.

Keywords: cetyltrimethylammonium bromide, DNA isolation, DNA contamination, ISSR, multilocus PCR, polymorphism, *Tilia cordata*.