НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ
РАСТИТЕЛЬНЫЙ МИР АЗИАТСКОЙ РОССИИ

Растительный мир Азиатской России, 2012, № 2(10), с. 62–65 http://www.izdatgeo.ru

УДК 582.736:575.22

ПРИМЕНЕНИЕ АНАЛИЗА МЕЖМИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ УЧАСТКОВ ГЕНОМНОЙ ДНК ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ НА ПРИМЕРЕ *HEDYSARUM THEINUM* (*FABACEAE*)

Н.С. Звягина, О.В. Дорогина

Центральный сибирский ботанический сад СО РАН,
630090, Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101, e-mail: zviagnat@rambler.ru

Приведены сведения о генетической изменчивости эндемичного вида *Hedysarum theinum* Krasnob., выявленные методом межмикросателлитных участков геномной ДНК. Для анализа двух популяций *H. theinum* применялись три ISSR-маркера. Выявленный высокий полиморфизм ДНК позволяет рекомендовать ISSR-анализ для изучения внутрипопуляционной изменчивости и генотипирования отдельных образцов.

Ключевые слова: *генетическая изменчивость, Hedysarum theinum, ISSR-анализ.*

APPLICATION OF INTER-SIMPLE SEQUENCE REPEAT MARKERS FOR INVESTIGATION OF GENETIC DIVERSITY: A CASE STUDY OF *HEDYSARUM THEINUM* (*FABACEAE*)

N.S. Zvyagina, O.V. Dorogina

Central Siberian Botanical Garden, SB RAS,
630090, Novosibirsk, Zolotodolinskaya str., 101, e-mail: zviagnat@rambler.ru

The objective of the research described in this paper was to evaluate genetic diversity of endemic species *Hedysarum theinum* Krasnob. by inter-simple sequence repeats (ISSR) analysis of genomic DNA. Three ISSR markers were used to analyze the genetic structure of two *H. theinum* populations from Altai Republic, Russia. Revealed high DNA polymorphism allows using ISSR technique as a powerful and efficient approach for research an interpopulation diversity and genotype fingerprinting.

Key words: *genetic diversity, Hedysarum theinum, ISSR markers.*

ВВЕДЕНИЕ

Hedysarum theinum Krasnob. (*Fabaceae*) – Копеечник чайный, или Красный корень, – является Алтае-Саянским эндемиком и произрастает в гумидных высокотравных альпийских и субальпийских лугах Юго-Западного Алтая, Восточного Казахстана и Западной Монголии (Курбатский, 1994). Вид был описан на основании ряда морфологических признаков: высокий габитус, красный окрас многолетних корней на срезе, широкая окраина бобов и др. (Красноборов и др., 1985). Авторами было отмечено широкое использование отваров "красного корня" среди местного населения в качестве сильного тонизирующего средства, что нашло свое отражение в научном названии вида. Изучение биохимических особенностей корней копеечника чайного показало высокое содержание вторичных метаболитов группы изофлавоноидов: ононина, малонил ононина, тесказин гликозида, формононетина (Володарская и др., 1998; Вдовитченко и др., 2007; Высочина и др., 2011). За последние десятилетия возрастающие и неконтролируемые сборы этого растения привели к почти полному уничтожению некоторых наиболее доступных популяций вида, что послужило причиной для внесения его в региональную Красную книгу (Красная книга..., 1996, 2007) со статусом – 3(R). Вид охраняется на территории ряда природоохранных объектов Республики Горный Алтай: Катунского биосферного заповедника, Сумультинского республиканского комплексного заказника, памятников природы "Мультинские озера" и "Источник Большой Яломанский" (Красная книга..., 2000).

В недавних исследованиях, посвященных вопросам интродукции *H. theinum*, выявлен значительный потенциал вида для выращивания в открытом грунте (Свиридова, Зиннер, 2008) и получения культуры ткани корней, способной к аккумуляции ценных вторичных метаболитов *in vitro* (Вдовитченко и др., 2007; Новикова и др., 2008). Однако для разработки эффективных программ по сохранению генофонда *H. theinum* необходимым условием является определение полиморфизма и генетической структуры вида на внутри- и межпопуляционном уровне. Метод анализа межмикросателлитных последовательностей (ISSR)

© Н.С. Звягина, О.В. Дорогина, 2012

ядерного генома зарекомендовал себя как весьма эффективный, воспроизводимый и чувствительный среди анонимных методов молекулярного анализа (Lei et al., 2006; Hakki et al., 2010) и был успешно использован при решении вопросов систематики средиземноморских представителей близкородственных родов *Hedysarum* L. и *Sulla* Medik. (Chennaoui-Kourda et al., 2007).

Цель настоящей работы – показать возможности ISSR-маркирования для выявления изменчивости *Hedysarum theinum* и оценить разрешающую способность и информативность праймеров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор растительного материала производился из двух популяций: с территории биосферного заповедника "Катунский" (Kat) и из окрестностей горы Красная Усть-Коксинского района Республики Горный Алтай (Kras). Для молекулярного анализа из каждой популяции были отобраны восемь образцов. Растительный материал высушивали с помощью силикагеля. Экстракция геномной ДНК проводилась CTAB-методом (Doyle J.J., Doyle J.L., 1987). Чистоту экстрактов определяли как соотношение величин оптической силы (A) экстракта при длине волн 260 и 280 нм, полученных с помощью спектрофотометра Biophotometer plus (Eppendorf, Germany). Концентрацию матрицы определяли спектрофотометрически. Для амплификации использовали три ISSR-праймера, подобранных для работы с *H. theinum*: HB14, 814 и M1. Температура плавления (T_m) для праймеров рассчитывалась по формуле

$$T_m = 4 \times (C + G) + 2 \times (A + T),$$

где C, G, A, T – количество нуклеотидов с соответствующими азотистыми основаниями.

Опираясь на рассчитанную величину температуры плавления, эмпирическим путем подбирались оптимальные температуры для отжига (T_a) праймеров, способствующие получению отчетливого полиморфного паттерна на электрофореграмме.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) проводилась в амплификаторе C 1000 Thermal Cycler (BioRad Laboratories, USA) по следующему протоколу: первичная денатурация ДНК 1.30 мин при 94 °C; 35 циклов амплификации, включающие денатурацию ДНК при 94 °C – 0.40 мин, отжиг праймера при 41–51 °C – 0.45 мин и элонгацию цепи при 72 °C – 1.30 мин; заключительный этап при 72 °C – 5 мин. Для амплификации готовилась смесь ПЦР-реактивов, содержащая приблизительно 400 нг матрицы и 1 ед. Taq – полимеразы (Медиген, Россия). Для оценки чистоты амплификационной смеси применялся отрицательный контроль, не содержащий матрицу.

Продукты амплификации разделялись при помощи электрофореза в 1.5%-м агарозном геле (рис. 1). На основе электрофореграмм были построены бинарные матрицы, где каждый ампликон рассматривается

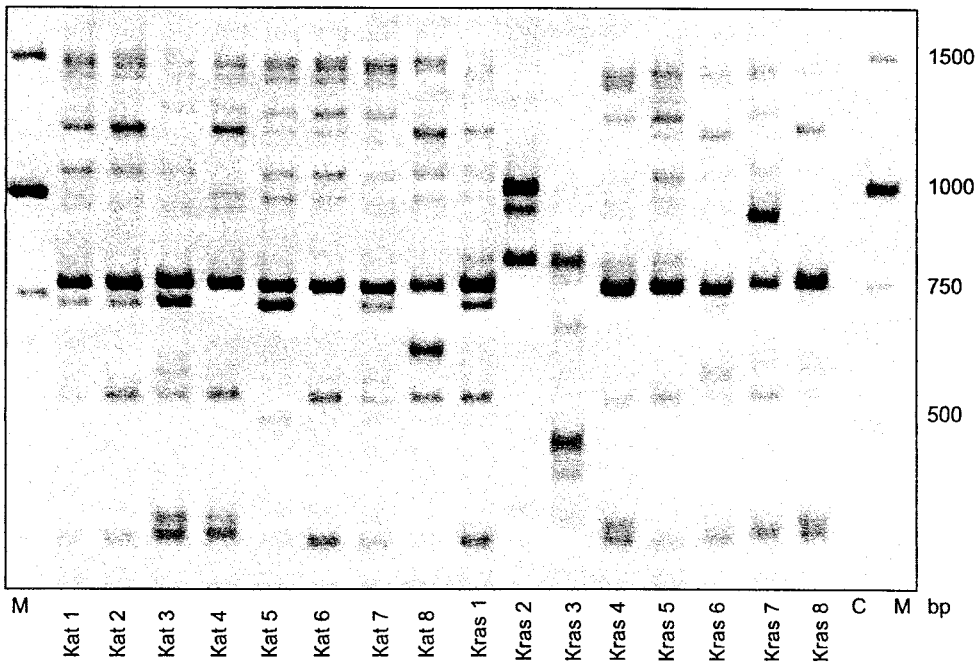

Рис. 1. Электрофоретический профиль продуктов ISSR–ПЦР для ДНК *Hedysarum theinum*, полученных при использовании праймера HB14.

Обозначены образцы из популяций: Kat 1–Kat 8 – "Катунская", Kras 1–Kras 8 – "гора Красная". C – отрицательный контроль; M – молекулярный маркер; bp – пары нуклеотидных оснований.

как признак (маркер) и для всех образцов отмечалось его наличие (1) или отсутствие (0). Расчет интервала M. Nei (1972) и построение UPGMA-дендрограмм производились в программе TFPGA 1.3 (Miller, 1997).

Разрешающую силу праймеров (Resolving power, Rp) и их информативность (Average band Informativeness, AvIb) рассчитывали по формуле (Prevost, Wilkinson, 1999)

$$Rp = \Sigma\, Ib,$$

$$Ib = 1 - (2 \times |0.5 - p|),$$

где Ib – информативность каждого маркера, полученного при амплификации данного праймера; p – доля генотипов, содержащих данный маркер.

$$AvIb = Rp/N.$$

Здесь N – количество маркеров, полученных при амплификации праймера.

Для расчета количества генотипов, которое может быть идентифицировано праймером, определялась величина x (Prevost, Wilkinson, 1999):

$$x = (Rp - 1.8)/0.15.$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Средняя величина чистоты полученных экстрактов геномной ДНК *Hedysarum theinum* составила 1.74. Концентрация матрицы варьировала в широком диапазоне – от 60 до 560 кг/мл.

Характеристики использованных ISSR-праймеров приведены в таблице. Длина праймеров составляет от 8 до 16 нуклеотидов. Температура отжига (T_a) варьирует от 41 до 51°. Температура отжига для праймеров 814 и M1 оказалась ниже температуры плавления (T_m) на 3 и 9 °C соответственно, а для праймера HB14 – выше, чем температура плавления, на 3 °C. Применение этих праймеров позволило выявить 11, 17 и 24 маркера, что в сумме составило 52. Все полученные маркеры полиморфные. Разрешающая сила (Rp) и количество генотипов, которое может быть диагностировано (x), были наибольшими у праймера M1 (Rp = 10.625, x = 59), а наименьшими у HB14 (Rp = 5.375, x = 24). В то же время праймер HB14 оказался наиболее информативным (AvIb = 0.489), что отражает значительную величину информативности каждого из маркеров, полученных при амплификации, при их небольшом числе (N = 11). Среднее значение разрешающей силы изученных праймеров равно 7.7, среднее значение информативности – 0.450, что является удовлетворительным показателем эффективности праймеров. Так, H. Chennaoui-Kourda et al. (2007) для восьми ISSR-праймеров приводит среднее значение Rp = 7.507, среднее значение AvIb = 0.594.

Характеристики ISSR-праймеров, использованных в работе

Праймер	Нуклеотидная последовательность	T_m, °C	T_a, °C	Кол-во маркеров (N)	Разрешающая сила (Rp)	Информативность (AvIb)	x
HB14	$(CTC)_3GC$	38	41	11	5.375	0.489	24
814	$(CT)_8TG$	54	51	17	7.125	0.419	35
M1	$(AC)_8CG$	56	47	24	10.625	0.443	59
Итого:				52	В среднем: 7.7	В среднем: 0.450	118

Примечание. T_m – температура плавления; T_a – температура отжига; x – количество генотипов, которое может быть идентифицировано праймером.

Общее количество генотипов *H. theinum*, которое теоретически может быть идентифицировано при использовании праймеров M1, 814 и HB14, равно 118, что наполовину обеспечивается работой одного праймера – M1.

Абсолютный полиморфизм ампликонов (100 %), полученных в результате ПЦР, свидетельствует о высокой разрешающей способности ISSR-маркеров, что позволяет предположить возможности идентификации каждого генотипа и определения филогенетического родства близкородственных форм. UPGMA-дендрограмма, построенная методом расчета коэффициента Nei (1972), демонстрирует генетическое расстояние между образцами, варьирующее от 0.148 до 0.427 (рис. 2). Среднее значение составило 0.269, что означает высокий уровень генетического сходства между изученными популяциями. Так, например, для девяти видов рода *Hedysarum* и *Sulla* флоры Средиземноморья средний уровень генетического родства оказался равным 0.640 (Chennaoui-Kourda et al., 2007).

Из рис. 2 следует, что изученные образцы *H. theinum* образуют три основных кластера. В первый кластер вошли образцы из популяции "Катунская", во второй – образцы из популяции "гора Красная" и один

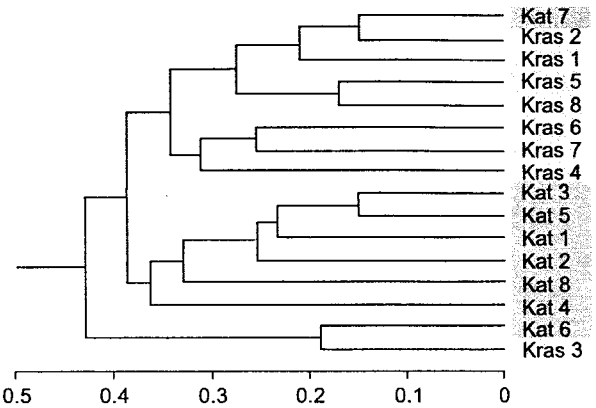

Рис. 2. UPGMA-дендрограмма, отражающая взаимоотношения между представителями двух популяций *Hedysarum theinum*, построенная методом расчета коэффициента Nei (1972).

Усл. обозн. см. на рис. 1.

образец из популяции "Катунская" (Kat 7). Третий кластер образуют два образца из разных популяций (Kat 6 и Kras 3). Таким образом, по данным ISSR-анализа 3 образца из 16 не были отнесены к соответствующим им популяциям. Следовательно, для более точного и достоверного анализа генетической структуры *H. theinum* необходимо применение большего числа праймеров.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования позволяют охарактеризовать СТАВ-метод выделения геномной ДНК у *H. theinum* как оптимальный, позволяющий получить экстракты, содержащие незначительное количество примесей ($A_{260}/A_{280ср} = 1.74$) и с высокой концентрацией матрицы (60–560 мкг/мл). Для определения генетической изменчивости вида подобраны три ISSR-праймера. Их длина составляет от 8 до 16 нуклеотидов, температура отжига варьирует от 41 до 51 °С.

На основании полученных результатов можно утверждать, что ISSR-маркирование является перспективным методом при изучении генотипического разнообразия *H. theinum*. Применение праймеров M1, HB14, 814 позволяет диагностировать отдельные генотипы *H. theinum*, что может быть использовано при идентификации и паспортизации хозяйственно ценных представителей этого вида, например, при отборе перспективных для селекции форм, обладающих высоким содержанием изофлавоноидов. Однако для анализа межпопуляционных связей требуется большое число маркеров, которые позволят дифференцировать обширное генотипическое разнообразие, выявленное для *H. theinum*.

Авторы выражают благодарность за помощь, оказанную при сборе материала, сотрудникам ЦСБС СО РАН канд. биол. наук И.А. Артемову и С.Б. Нечепуренко, научному сотруднику Катунского биосферного заповедника канд. биол. наук Т.В. Яшиной и его директору А.В. Затееву, а также сотрудникам Горно-Алтайского ботанического сада (Алтайский филиал ЦСБС СО РАН) и его директору канд. биол. наук А.А. Ачимовой. За консультации и помощь при постановке экспериментальных работ и при обработке данных авторы признательны сотрудникам ЦСБС СО РАН д-ру биол. наук А.В. Агафонову, канд. биол. наук Д.Е. Никоновой (Герус) и С.В. Асбаганову.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта № 23 Программы Президиума РАН "Биологическое разнообразие" и Интеграционному проекту СО РАН № 20.

ЛИТЕРАТУРА

Вдовитченко М.Ю., Кузовкина И.Н., Пэтц Х., Шнайдер Б. Культивируемые *in vitro* корни копеечника чайного и образование в них фенольных соединений // Физиология растений. 2007. Т. 54, № 4. С. 604–613.

Володарская С.Б., Винокурова Е.Ю., Шульц Е.Е. Химическое исследование *Hedysarum theinum* // Материалы Междунар. конф., посвящ. памяти В.Г. Минаева "Физические и биохимические аспекты изучения лекарственных растений". Новосибирск, 1998. С. 18–19.

Высочина Г.И., Кукушкина Т.А., Карнаухова Н.А., Селютина И.Ю. Флавоноиды дикорастущих и интродуцированных растений некоторых видов рода *Hedysarum* L. // Химия в интересах устойчивого развития. 2011. № 19. С. 365–371.

Красная книга Республики Алтай (растения). Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды растений / А.Г. Манеев, И.Н. Пшеничная, Н.В. Федоткина и др. Новосибирск, 1996. С. 23–24.

Красная книга Республики Алтай: особо охраняемые территории и объекты. Горно-Алтайск, 2000. С. 31, 48, 159, 198.

Красная книга Республики Алтай (растения). Горно-Алтайск, 2007. С. 29–30.

Красноборов И.М., Азовцев Г.Р., Орлов В.П. Новый вид рода *Hedysarum* L. (*Fabaceae* L.) из Южной Сибири // Бот. журн. 1985. Т. 70, № 7. С. 968–973.

Курбатский В.И. Род *Hedysarum* L. // Флора Сибири. Новосибирск, 1994. Т. 9. С. 165.

Новикова Т.И., Набиева А.Ю., Полубоярова Т.В. Сохранение редких и полезных растений в коллекции *in vitro* Центрального сибирского ботанического сада // Вестн. ВОГиС. 2008. Т. 12, №4. С. 564–572.

Свиридова Т.П., Зиннер Н.С. Перспективы выращивания *Hedysarum alpinum* L. и *Hedysarum theinum* Krasnob. в условиях Томской области // Вестн. Том. гос. ун-та. Биология. 2008. № 2(3). С. 5–11.

Chennaoui-Kourda H., Marghali S., Marrakchi M., Trifi-Farah N. Genetic diversity of *Sulla* genus (*Hedysarea*) and related species using Inter-simple Sequense Repeat (ISSR) markers // Biochem. System. Ecol. 2007. V. 35. P. 682–688.

Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation of fresh leaf tissue // Phytochem. Bull. 1987. V. 19. P. 11–15.

Hakki E.E., Dogan B., Duran A., Martin E., Dinc M. Phylogenetic relationship analysis of *Genista* L. (*Fabaceae*) species from Turkey as revealed by inter-simple sequence repeat amplification // African J. Biotechnol. 2010. V. 9(18). P. 2627–2632.

Lei Y., Gao H., Tsering T., Shi S., Zhong Y. Determination of genetic variation in *Rhodiola crenulata* from the Hengduan Mountains Region, China using inter-simple sequence repeats // Genetics and Molecular Biology. 2006. V. 29, No. 2. P. 339–344.

Miller M.P. Tools for populations genetic analyses (TFPGA). 1.3: A Windows programm for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. 1997.

Nei M. Genetic distance between populations // Amer. Naturalist. 1972. V. 106. P. 283–292.

Prevost A., Wilkinson M.J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting to potato cultivars // Theor. and Appl. Genet. 1999. V. 98. P. 107–112.