

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 575.8:582.724.1

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕЖМИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ
ДЛЯ АНАЛИЗА ПОЛИМОРФИЗМА ОБЛЕПИХИ КРУШИНОВИДНОЙ
(*HIPPOPHAË RHAMNOIDES* L.) РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ****К.Д. Боне^{1,2}, Ю.В. Бочаркина³, Г.И. Карлов¹, О.В. Разумова^{3,*}**¹Лаборатория генной инженерии растений, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Россия, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42;²Кафедра генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства, факультет агрономии и биотехнологии, РГАУ–МСХА имени К.А. Тимирязева, Россия, 127550, г. Москва, ул. Лиственничная аллея, д. 3;³Лаборатория прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Россия, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская д. 42

*e-mail: razumovao@gmail.com

Облепиха крушиновидная (*Hippophaë rhamnoides* L.) – двудомный кустарник или дерево. Это многолетнее растение, ювенильный период которого продолжается от 3 до 5 лет. Облепиха широко используется в косметологии, биотехнологии, фармакологии, сельском хозяйстве; она распространена во многих странах Европы и Азии. Это источник ценных витаминов, минералов, каротиноидов и флавоноидов. Фенотипическое описание не дает точную характеристику таксона, в т.ч. вида, подвида, разновидности, популяции, поэтому возникает необходимость использовать молекулярные методы анализа. Для исследования была собрана коллекция облепихи различного эколого-географического происхождения, состоящая из гербарных образцов и образцов, собранных авторами из природных популяций; подобраны межмикросателлитные маркеры, наиболее эффективно выявляющие генотипические различия; составлены бинарные матрицы, на основании которых построена дендрограмма. В результате анализа был выявлен высокий уровень внутривидового полиморфизма, а также установлено, что образцы со сходным эколого-географическим происхождением имеют тенденцию объединяться в кластеры и находятся на разном генетическом расстоянии. Результаты исследования помогут оценить разнообразие форм данной культуры, степень родства между ними, их эколого-географическое происхождение, эволюцию определенных (низших) таксонов, а также произвести паспортизацию и идентификацию сортов до достижения ими генеративного периода, подбирать пары для скрещивания.

Ключевые слова: облепиха крушиновидная, ISSR-маркеры, ПЦР, полиморфизм ДНК, филогенетика, популяционная генетика, дендрограмма

Анализ генетической структуры таксона является очень важным инструментарием популяционной генетики и сельскохозяйственной биологии, поскольку позволяет изучить биоразнообразие культуры, а также установить ее эколого-географическое происхождение, что поможет подбирать пары для скрещивания и устанавливать принадлежность к определенным разновидностям, сортам, экотипам [1].

Семейство Elaeagnaceae включает в себя 3 рода: *Elaeagnus*, *Hippophaë* и *Shepherdia*, представители которых, как правило, являются двудомными [2]. Род *Hippophaë* включает, по разным данным, от 3 до 7 видов. Некоторые ученые выделяют подвиды и экотипы [3]. Таким образом, общепринятого определения подвидов и низших таксонов

облепихи до сих пор нет. Одним из представителей семейства *Hippophaë* является облепиха крушиновидная (*H. rhamnoides* L.) – это колючий кустарник или дерево, плоды которого являются важным источником минералов и масел, богаты углеводами, белками (альбуминами и глобулинами), органическими кислотами, витаминами [4, 5], содержат каротиноиды, а листья – дубильные вещества. Таким образом, облепиха – ценное сельскохозяйственное и лекарственное растение, различные части которого могут быть полезны. Так, в производстве используют семена, ягоды, листья и кору. Из семян получают масло, листья и кору применяют в косметологии и фармацевтике, ягоды – в приготовлении сока и изотонических напитков, эфирные масла используют в медицине, а остав-

шиеся после переработки отходы используют в качестве поливитаминного корма для животных.

Облепиха широко распространена в России, странах Европы и Азии. Она может адаптироваться к различным условиям: произрастать в климатических поясах от тропического до субарктического (выдерживать температуры от -43°C до $+40^{\circ}\text{C}$), выдерживать избыток и недостаток влаги, способна расти на засоленных, щелочных и кислых почвах [6, 7], благодаря чему может быть использована для рекультивирования карьеров, борьбы с почвенной эрозией и посадки лесозащитных полос [6]. Это свидетельствует о ее широких адаптивных способностях, богатом генофонде, а также делает ее полезной в сельскохозяйственной деятельности [8]. Несмотря на то, что облепиха — ценное сельскохозяйственное растение, в культуру она введена сравнительно недавно (в 30-х гг. прошлого века) и, возможно, поэтому мало изучена.

Так как далеко не все изменения в геноме проявляются фенотипически, для изучения эволюции и степени полиморфности определенного вида, входящих в него подвидов, разновидностей и популяций целесообразно использовать молекулярные методы анализа генетического разнообразия: амплификация случайных подобранных нуклеотидных последовательностей — RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA), полиморфизм длин рестрикционных фрагментов — RFLP (Restricted Fragment Length Polymorphism), полиморфизм длин амплифицированных рестрикционных фрагментов ДНК — AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), полиморфизм длин межмикросателлитных последовательностей — ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats), полиморфизм длин микросателлитных последовательностей — SSR (Simple Sequence Repeats).

Использование ISSR-маркеров не требует предварительного знания нуклеотидных последовательностей геномов [9–11], а также, ввиду высокого содержания микросателлитных повторов в геномах растений, данный тип маркера подходит для анализа генетического разнообразия. ISSR-маркирование предполагает использование более длинных праймеров по сравнению с RAPD, вследствие чего температура отжига увеличивается [10, 12] и обнаруживается большее количество полиморфных локусов [8]. Таким образом, этот метод дает возможность исследовать происхождение различных видов и их эволюцию, а также проводить паспортизацию сортов.

В связи с этим, необходимо было собрать коллекцию облепихи различного эколого-географического происхождения, подобрать подходящие молекулярные маркеры, провести полимеразную цепную реакцию (ПЦР), на основе данных электрофореза о наличии или отсутствии ампликона определенного размера построить би-

нарные матрицы, построить филогенетическое древо.

Материалы и методы

Коллекция, имеющаяся у нас в наличии, состоит из образцов (*Hippophaë rhamnoides*) различного эколого-географического происхождения, собранных в Российской Федерации (Костромская область, Ивановская область, Волгоградская область, Карачаево-Черкессия, Ставропольский край, Москва, Московская область, Краснодарский край, Красноярский край, Новосибирская область, Иркутская область), Румынии, Польше, Австрии, Германии, Бельгии и Нидерландах, а также 11 сортообразцов (рис. 1).

ДНК выделяли из листьев (свежих или сухих) и почек СТАВ-методом (цетилтриметиламмоний бромид) [13]. Наличие ДНК и ее чистоту проверяли с помощью спектрофотометра NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, США) и электрофореза.

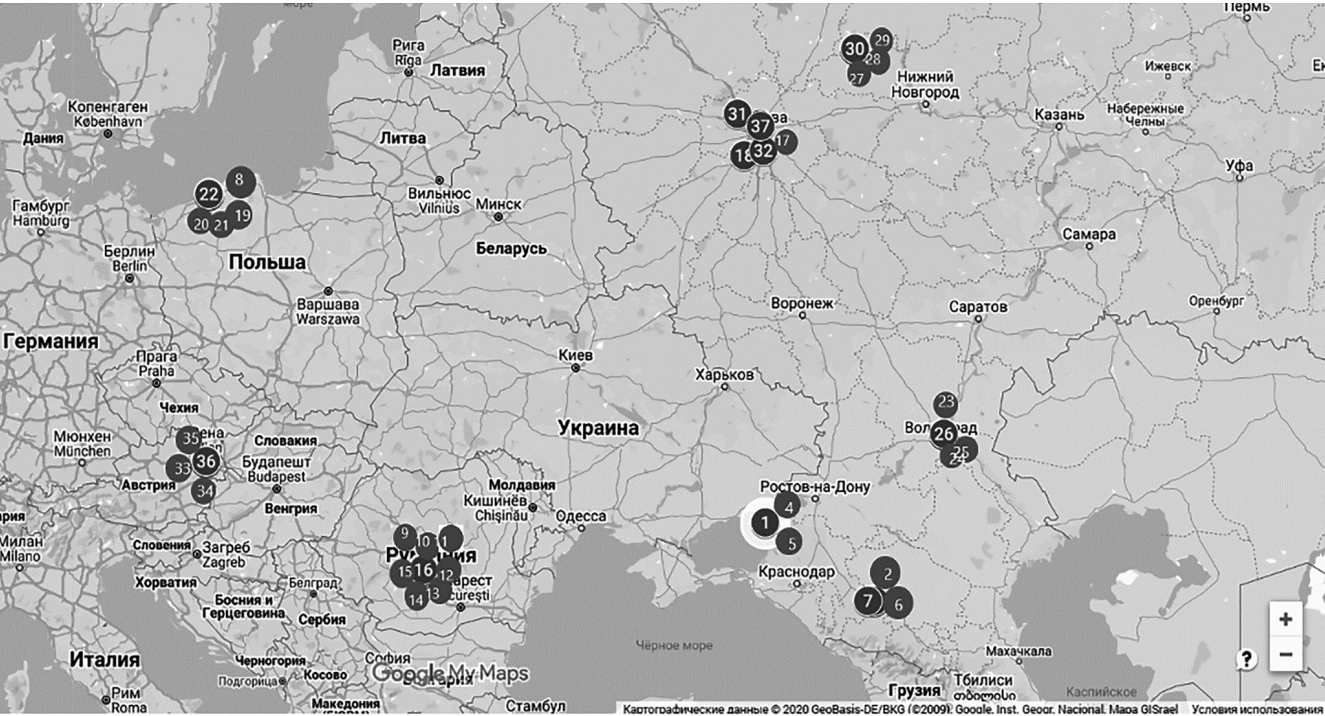
Для молекулярного анализа полиморфизма были отобраны следующие праймеры: K 25, ISSR 3, ISSR 10, UBC 807, UBC 810, UBC 826, UBC 840. Для каждого опытным путем подбирали оптимальную температуру отжига праймера (таблица).

Реакционная смесь для ПЦР объемом 25 мкл состояла из 2,5 мкл 10x ПЦР-буфера, 3,5 мкл 25 mM MgCl_2 , 2,5 мкл 2 mM dNTP — водного раствора четырех высокоочищенных 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов (dATP, dTTP, dGTP, dCTP); 0,5 мкл 2,5 ед./мкл ColoredTaq-полимеразы (Силекс, Россия); 0,5 мкл праймера; 100 нг ДНК. ПЦР проводили в амплификаторе SimpliAmp (Thermo Fisher Scientific, США) по следующей программе: предварительная денатурация — 94°C , 5 мин; далее 44 цикла: денатурация — 94°C , 1 мин, отжиг праймеров (температуру отжига устанавливали в зависимости от последовательности праймера — таблица) — 1 мин, элонгация — 72°C , 2 мин; затем один цикл окончательной элонгации — 72°C , 5 мин. Для достоверности полученных результатов опыты проводили в трехкратной повторности.

Амплификат разделяли при помощи электрофореза в горизонтальной камере Sub-Cell GT Cell (Bio-Rad, США), в 2%-ном агарозном геле, 0,5 кратном буфере TBE (0,089 M Трис, 0,089 борная кислота, 0,002 M ЭДТА) с добавлением бромистого этидия до конечной концентрации 0,5 мкг/мл, при напряжении 180 В, в течение 3 ч.

При анализе электрофореграмм были составлены бинарные матрицы, в которых наличие определенной длины амплифицированного фрагмента ДНК отмечали цифрой 1, отсутствие — цифрой 0.

Анализ матриц проводили в программе Past 3.20 (Музей естественной истории, Университет Осло, Финляндия), филогенетическое древо строили на основе алгоритма UPGMA.



Координаты

- 1

46.656674, 37.769940
- 2

44.613958, 41.973525
- 3

44.587198, 41.930796
- 4

46.659142, 37.769415
- 5

46.658669, 37.769548
- 6

44.587198, 41.930796
- 7

44.590612, 41.670778
- 8

54.409946, 16.393850
- 9

45.453308, 24.625256
- 10

45.454471, 24.633055
- 11

45.453326, 24.630819
- 12

45.450139, 24.625662
- 13

45.447791, 24.626255
- 14

45.443715, 24.626936
- 15

45.443553, 24.626854
- 16

45.442838, 24.625405
- 17

55.874227, 37.550507
- 18

55.241341, 36.930473
- 19

54.401595, 16.419596
- 20

54.393613, 16.400442
- 21

54.393629, 16.400256
- 22

54.393434, 16.400482
- 23

48.855611, 44.621333
- 24

48.855361, 44.621667
- 25

48.855139, 44.621944
- 26

48.855139, 44.622278
- 27

57.422622, 41.191225
- 28

57.422967, 41.191104
- 29

57.422523, 41.191227
- 30

57.422643, 41.191148
- 31

56.0853165, 36.7020585
- 32

55.3249354, 37.6738509
- 33

48.181389, 16.304754
- 34

48.180372, 16.304794
- 35

48.181546, 16.304133
- 36

48.181703, 16.304341
- 37

55.84426, 37.58993

Рис. 1. Точки сбора образцов облепихи различного эколого-географического происхождения

Таблица

Праймеры, использованные для ISSR-анализа

Праймеры	Последовательность праймера*	Температура отжига, °С	Количество локусов	Число полиморфных фрагментов	Отношение числа полиморфных локусов к общему числу локусов, %
UBC810	5'GAGAGAGAGAGA GAGAT	52,4	22	22	100
UBC840	5'GAG AGAGAGAGA GAGAYT	53	18	17	94,4
UBC807	5'AGAGAGAGAGAGAGAGT	53	31	14	45,1
UBC826	5'ACACACACACACACC	53,4	30	20	66
K25	5'AGAGAGAGAGAGAGAGG	52	23	17	73,9
ISSR 10	5'AGAGAGAGAGAGAGAGAGG	52,4	21	13	61,9
ISSR3	5'CTCTCTCTCTCTCTCTCTA	54	23	16	69,5

* Y = C or T, R = A or G

Результаты и обсуждение

Различными учеными был проведен ряд исследований по изучению полиморфизма между популяциями *Hippophaë rhamnoides* L. Например, в статье Даса и др. [2] были проанализированы филогенетические отношения между 18 популяциями, содержащими в сумме 92 образца. Все 18 популяций локализованы в северной части Индии, в гористой местности (максимальная разница высот составляет 400 м). Дерево неультраметрическое и неукорененное, построено методом NJ (Neighbour Joining — метод присоединения соседей) с использованием Bootstrap-теста, поддержка которого является низкой, о чем упоминают сами авторы. Коэффициент сходства между популяциями варьируется от 0,63 до 0,93. Из каждой популяции было выбрано по 2 образца: женский и мужской. Таким образом, по данным этой статьи не представляется возможным оценить полиморфизм внутри каждой популяции. Ученые указывают, что нашли различия между мужскими и женскими растениями, однако на дендрограмме это не отражается: образцы объединяются в кластеры независимо от пола.

В статье Тиана и др. [8] коллекция насчитывала более 200 образцов из двух китайских провинций, ученые не обнаружили высокого уровня генетической гетерогенности между популяциями, но утверждают, что уровень полиморфизма внутри популяций был высок и составлял от 0,1558 до 0,2135 по коэффициенту Нея. Коэффициент генной дифференциации (G_{ST}) среди 11 популяций

составил 0,0679. Это указывает на то, что 6,79% общего генетического разнообразия существовало между популяциями, в то время как 93,21% существовали внутри популяций.

В статье Ли и др. [6] была представлена достаточно широкая выборка — 200 образцов из Китая, России, Финляндии и Германии, часть из которых выращивалась в месте происхождения, а часть — в Китае, происхождение остальной части семян неизвестно. Коэффициент сходства Соренсена-Дайса варьируется от 0,23 до 0,93. Укорененная по среднему значению дендрограмма была построена методом NJ на основе результатов амплификации ISSR-праймеров. Большинство популяций объединялось в кластеры согласно происхождению. Образовалось 2 основных кластера и 1 изолированный (состоящий из родственного вида *Hippophae salicifolia* L.).

После изучения справочного материала было принято решение об использовании маркеров ISSR (межмикросателлитных). Было проанализировано 37 таких маркеров, 7 были отобраны для анализа полиморфизма *H. rhamnoides*. На основании полученных данных была построена бинарная матрица, затем с помощью алгоритма UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages, невзвешенного попарно-группового метода расстояний) построена дендрограмма.

ПЦР проводилась в трехкратной повторности, результаты подтвердились. Все ампликоны, которые в дальнейшем включали в матрицу, присутствовали во всех повторностях со всеми прай-

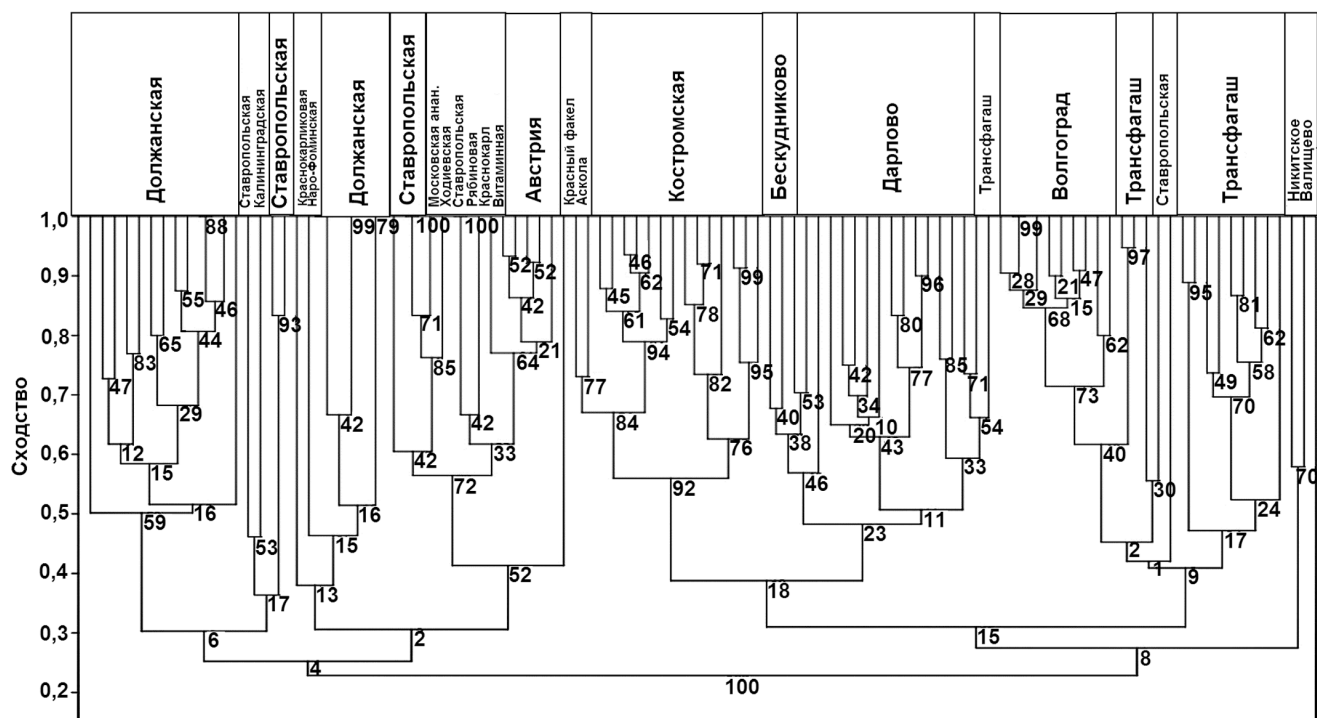


Рис. 2. Дендрограмма межпопуляционных и внутрипопуляционных взаимоотношений *Hippophaë rhamnoides* L., построенная методом UPGMA с использованием коэффициента Жаккара с помощью программного обеспечения Past3. Числами обозначены значения Bootstrap, число повторений 1000.

мерами. Всего было выявлено 157 локусов, из которых 144 были полиморфными. Число амплифицированных фрагментов по каждому из праймеров варьировало от 18 (UBC 840) до 31 (UBC 807) в диапазоне размеров от 200 до 1200 п.н. С помощью бинарных матриц и с помощью программы Past3 на основе UPGMA была построена дендрограмма (рис. 2).

Общий уровень полиморфизма варьировал от 45,1% (UBC 807) до 100,0% (UBC 810) со средним уровнем 62,4%.

На дендрограмме UPGMA особи из географически близких популяций формировали кластеры (популяции Костромская, Дарлово, Волгоградская). Генетическое сходство между другими представителями различного эколого-географического происхождения, а также между вышеупомянутыми природными популяциями составляло от 0,825 (Витаминная и Австрийская) до 0,230 между двумя крупнейшими кластерами по коэффициенту Жаккара. Можно отметить, что сорта одинакового происхождения предсказуемо кластеризовались вместе, а наибольшим разнообразием отличались образцы, взятые из природных популяций. При этом у популяций из Румынии и Краснодарского края (коса Долгая) отмечен больший уровень внутривидового полиморфизма, чем у остальных популяций, собранных в Европейской части России. Возможно, это связано с тем, что территория центральной России не является естествен-

ным ареалом облепихи. По-видимому, все обнаруженные в этой части популяции (Нижний Новгород, Костромская и Ивановская области, Московская область) ведут свое происхождение от сортов, которые, в свою очередь, имели также достаточно ограниченный генофонд. В то же время территории, в популяции которых уровень генетического полиморфизма был очень высок (K_j — коэффициент Жаккара равен 0,23 в Ставропольской популяции), традиционно включаются ботаниками в зону естественного ареала облепихи. Между отдельными образцами в пределах некоторых популяций (Должанская, Костромская) разницы не было обнаружено; по-видимому, эти растения являются клонами, что в целом характерно для облепихи, склонной к вегетативному размножению путем образования поросли.

Таким образом, в процессе выполнения работы были подобраны праймеры, позволяющие эффективно выявлять межпопуляционный полиморфизм у *H. rhamnoides*, продемонстрирован высокий уровень генетического разнообразия вида.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (соглашение № 17-76-10060).

Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Комиссия по генетическим ресурсам в сфере продовольствия и сельского хозяйства. Состояние всемирных генетических ресурсов животных в сфере продовольствия и сельского хозяйства. ФАО, 2010. ВИЖ РАСХН, 2010. Москва. С. 359–380.

2. Das K., Hussain G.Sh., Mangla Y., Dar T.U.H., Chaudhary M., Thakur R.K., Tandon R., Raina S.N., Goel Sh. ISSR markers for gender identification and genetic diagnosis of *Hippophaë rhamnoides* ssp. *turkestanica* growing at high altitudes in Ladakh region (Jammu and Kashmir) // Protoplasma. 2017. Vol. 254. N 2. P. 1063–1077.

3. Rousi A. The genus *Hippophaë* L. A taxonomic study // Ann. Bot. Fennici. 1971. Vol. 8. N 3. P. 177–227.

4. Li T.S.C., Schroeder W.R. Sea Buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.): A multipurpose plant // HortTechnology. 1996. Vol. 6. N 4. P. 370–380.

5. Bernarth J., Foldesi D. Sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.): a promising new medicinal and food crop // J. Herbs Spices Med. Plants. 1992. Vol. 1. N 1–2. P. 27–35.

6. Li H., Ruan Ch.-J., Teixeira da Silva J.A. Identification and genetic relationship based on ISSR analysis in a germplasm collection of sea buckthorn (*Hippophaë* L.) from China and other countries // Sci. Hortic. 2009. Vol. 123. N 2. P. 263–271.

7. Ruan C.J., Xie Q.L., Li D.Q. Function and benefit of sea buckthorn improving eco-environment of Loess Plateau // Proceedings of 12th ISCO Conference. Beijing. 2002. URL: <http://www.tucson.ars.ag.gov> (дата обращения: 19.02.2020).

8. Tian Ch., Lei Y., Shi S., Nan P., Chen J., Zhong Y. Genetic diversity of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) populations in northeastern and northwestern China as revealed by ISSR markers // New Forest. 2004. Vol. 27. N 3. P. 229–237.

9. Земцова А.Я., Зубарев Ю.А., Гунин А.В., Иванова М.С. Оценка генетического полиморфизма образцов рода облепихи (*Hippophaë* L.) различного эколого-географического происхождения посредством ISSR-маркеров // Вавил. ж. генет. и селекции. 2017. Vol. 21. N 6. С. 623–629.

10. Tikunov Yu.M., Khrustaleva L.I., Karlov G.I. Application of ISSR markers in the genus *Lycopersicon* // Euphytica. 2003. Vol. 131. N 1. P. 71–81.

11. Nybom H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants // Mol. Ecol. 2004. Vol. 13. N 5. P. 1143–1155.

12. Kojima T., Nagaoka T., Noda K., Ogihara Y. Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in einkorn wheat in relation to that of RFLP markers // Theor. Appl. Genet. 1998. Vol. 96. N 1. P. 37–45.

13. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // Focus. 1990. Vol. 12. N 1. P. 13–15.

Поступила в редакцию
22.05.2019 г.

После доработки
24.12.2019 г.

Принята в печать
05.02.2020 г.

RESEARCH ARTICLE

THE USE OF ISSR MARKERS FOR THE ANALYSIS OF POLYMORPHISM IN SEA BUCKTHORN (*HIPPOPHAË RHAMNOIDES* L.) OF DIFFERENT ORIGINK.D. Bone^{1, 2}, I.V. Bocharkina³, G.I. Karlov¹, O.V. Razumova^{3, *}¹ Laboratory of Plant Genetic Engineering, All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Timiryazevskaya st., 42, Moscow, 1275550, Russia;² Faculty of Agronomy and Biotechnology, Department of Genetics, Biotechnology, Breeding and Seed Production, Russian State Agrarian University—Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Timiryazevskaya st., 49, Moscow, 1275550, Russia;³ Laboratory of Applied Genomics and Crop Breeding, All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Timiryazevskaya str. 42, Moscow, 127550, Russia

*e-mail: razumovao@gmail.com

Sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) is a dioecious shrub, or tree. It is the perennial plant, the juvenile period of which continues from 3 to 5 years. Sea buckthorn is widely used in cosmetology, biotechnology, pharmacology, agriculture. It grows in many countries of Europe and Asia. This crop is a source of different vitamins, minerals, carotenoids and flavonoids. Phenotypic description does not give an accurate description of the taxon (species, subspecies, varieties, populations) so it means that we have to use molecular methods of analysis. The collection of Sea buckthorn with different ecological and geographical genesis was selected. It consists of herbarium specimens and natural populations. We selected ISSR-markers which are able to detect genotypic differences effectively. The dendrogram was built on the PCR basis. We revealed a high level of interspecies polymorphism, and it was also established that samples with similar ecological-geographical genesis tend to group into clusters, which are located at different genetic distances. The result of the research will help us to evaluate the gene pool of this crop, the diversity of forms, the similarity between them and it will help us to determine ecological and geographical origin of sea buckthorn, its evolution. So we will be able to select pairs for crossing and to define certification and identification of varieties before they reach the generative period.

Keywords: *Hippophaë rhamnoides*, ISSR markers, PCR, DNA polymorphism, phylogenetics, population genetics, dendrogram

Сведения об авторах

Боне Карина Даниэлевна — аспирант, лаборант-исследователь лаборатории генной инженерии растений Всероссийского НИИ сельскохозяйственной биотехнологии. Тел.: 8-499-976-65-44; e-mail: karinabone@mail.ru

Бочаркина Юлия Владимировна — магистр факультета биотехнологии (Life Sciences), Сколковский институт науки и технологий; лаборант-исследователь лаборатории прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии. Тел.: 8-499-976-18-25; e-mail: ju_football@mail.ru

Карлов Геннадий Ильич — чл.-корр. РАН, проф., д.б.н., директор Всероссийского НИИ сельскохозяйственной биотехнологии. Тел.: 8-499-976-65-44; e-mail: karlov@iab.ac.ru

Разумова Ольга Владимировна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр, лаборатории прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений Всероссийского НИИ сельскохозяйственной биотехнологии. Тел.: 8-499-976-65-44; e-mail: razumovao@gmail.com