

ISSR-PCR анализ генетической изменчивости популяций видов рода *Achillea* L. в южной части Красноярского края и Республики Хакасии

ISSR-PCR analysis of genetic variation in populations of *Achillea* L. species in southern part of Krasnoyarsk Territory and Republic of Khakassia

Стоянова Э. Е.¹, Ямских И. Е.²

Stoyanova E. E.¹, Yamskikh I. E.²

Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, Россия. E-mails: skiforever09@mail.ru, iyamskikh@mail.ru
Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia

Реферат. Проведен ISSR-PCR анализ популяций двух видов рода *Achillea*, произрастающих в южной части Красноярского края и Республике Хакасии. Результаты исследования показали, что высокий уровень внутривидовой изменчивости характерен для тысячелистника азиатского и обыкновенного. Относительно низкие показатели генетической вариабельности отмечены для популяций Аа3 (*Achillea asiatica*) и Ак (*A. kuprijanovii*). Генофонды всех изученных популяций характеризуются удовлетворительным состоянием и могут самостоятельно воспроизводиться. Большая часть генетической изменчивости *Achillea millefolium*, *A. asiatica* и *A. kuprijanovii* (74,7 %) приходится на долю внутривидового разнообразия, а 25,3 % является межвидовой, таким образом изученные популяции характеризуются высоким уровнем дифференциации и разделяются по систематическому признаку.

Ключевые слова. Генетическое разнообразие, полиморфизм, *Achillea asiatica*, *Achillea millefolium*, ISSR-ПЦР.

Summary. ISSR-PCR analysis of populations of two species of the genus *Achillea*, growing in the southern part of the Krasnoyarsk Territory and the Republic of Khakassia, was carried out. The results of the study showed that a high level of intrapopulation variability is characteristic of *Achillea asiatica* and *A. millefolium*. Relatively low indicators of genetic variability are noted for populations Аа3 (*A. asiatica*) and Ак (*A. kuprijanovii*). The gene pool of all the studied populations is characterized by a satisfactory state and can independently reproduce. Most of the genetic variability of *Achillea millefolium*, *A. asiatica*, and *A. kuprijanovii* (74.7 %) accounts for the share of intrapopulation diversity, and 25.3 % is a minor variation. The studied populations are characterized by a high level of differentiation and are divided according to a systematic criterion.

Key words. *Achillea asiatica*, *Achillea millefolium*, genetic diversity, ISSR-PCR, polymorphism.

Achillea millefolium L. является самым распространенным видом рода *Achillea* L. (тысячелистник) в Сибири, а также полиморфным видом, и имеет много форм различного таксономического значения, обычно неясно отграниченных друг от друга (Афанасьев, 1961). Данное растение представляет большой интерес в связи с широким спектром фармакологических свойств (Соколов, 1993). Для решения проблем таксономии данного вида требуются комплексные исследования, включающие изучение модификационной и генетической изменчивости и степени его обособленности от других видов р. *Achillea*.

Исследований, посвященных изучению генетического полиморфизма растений рода *Achillea*, проведено сравнительно мало (Gharibi et al., 2011; Rahimmalek et al., 2011; Farajpour et al., 2012). Объектом данных исследований является *A. millefolium* ввиду его распространенности. Данные по изучению *A. asiatica*, *A. kuprijanovii* отсутствуют.

В последнее время актуально проведение популяционных исследований с использованием различных ДНК-маркеров. Нами был выбран ISSR-ПЦР метод, который является наиболее чувствительным для обнаружения генетического различия между популяциями и близкородственными видами, произрастающими в схожих условиях (Pojaraz, 2016).

Целью работы было изучение генетического полиморфизма популяций видов рода *Achillea*, произрастающих в южной части Красноярского края и Республике Хакасии.

Сбор материала для исследования был проведен в июле – августе 2017 г. Объектами исследований служили две популяции *Achillea millefolium* (Am1 – г. Красноярск, окр. Сибирского федерального университета (СФУ), березняк разнотравный; Am2 – Емельяновский район, окр. д. Зелеево, обочина трассы); 3 популяции *A. asiatica* (Aa1 – Емельяновский район, окр. д. Дрокино, луг злаковый; Aa2 – Большеулуйский район окр. с. Большой Улуй, луг разнотравно-злаковый; Aa3 – окр. с. Краснотуранск, остепненный луг). Одна популяция *A. kuprijanovii* (Ak, Ермаковский район, Усинская котловина, остепненный луг) была исследована нами для сравнения.

На первом этапе исследований возникли проблемы с выделением качественной ДНК, связанные с обилием эфирных масел, фенольных соединений и алкалоидов в используемом для анализа сырье тысячелистника. Нужные качество и концентрация ДНК были достигнуты при выделении СТАВ методом (Doyle, 1987). ISSR-PCR проводили в 20 мкл смеси (6 мкл ddist H₂O, 10 мкл смеси БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color 2x, 2 мкл ДНК, 2 мкл 10 мМ праймера) по следующей программе: 95 °C – 5 мин., 95 °C – 20 сек., 13 циклов, с понижением температуры на 0,7 °C каждый цикл: 55 °C – 45 сек., 72 °C – 90 сек.; 25 циклов: 95 °C – 20 сек., 44 °C – 30 сек., 72 °C – 90 сек., завершающая стадия: 72 °C – 7 мин., охлаждение при 4 °C. Разделение продуктов амплификации производилось в агарозном геле в горизонтальной электрофорезной камере Bio-Rad Sub-cell GT при 75V. После электрофореза гель окрашивали раствором бромид этидия и фотографировали в проходящем УФ-излучении. В анализе использовали 6 праймеров, обладающих высоким уровнем полиморфизма и дающих воспроизводимый результат: HB12 (CAC)3GC), HB14 (CTC)3GC), 17899A (CAC)4AG), 17899B (CAC)4GG), 17898A (CAC)4AC) и 17898B (CAC)4GT).

Статистическую обработку результатов анализа проводили с помощью программы Popgene version 1.32. Уровень подразделенности популяций оценивали по градации Райта (Wright, 1978). Дендрограмму сходства строили при помощи компьютерной программы TFGA version 1.3 (Miller, 1997) невзвешенным парно-групповым методом (UPGMA). Генетическое расстояние между популяциями рассчитывали по формуле М. Нея (Nei, 1978).

ISSR-PCR анализом выявлено 96 фрагментов ДНК, процент полиморфизма которых суммарно составляет 100 %. Максимальный уровень полиморфизма ДНК зафиксирован при использовании всех шести праймеров (по 100 %). Число амплифицированных фрагментов ДНК, в зависимости от праймера, варьирует от 13 (17898A и 17898B) до 21 (HB14). Число полиморфных фрагментов по каждому праймеру в суммарной выборке изменяется от 8 до 21.

Уровень общего внутривидового генетического разнообразия варьирует от 70,83 до 92,71 %. Наибольшее количество полиморфных амплифицированных фрагментов ДНК (P = 92,71 %) наблюдается для красноярской популяции *A. millefolium* (Am1, березняк разнотравно-злаковый). Минимальные значения данного показателя зафиксированы для популяции Aa7, произрастающей в окр. г. Краснотуранска (P = 70,83 %).

Генное разнообразие Нея (Ne) в суммарной выборке составляет 0,4015. Информационный индекс Шеннона (I) равен 0,5852. Максимальные значения данные показатели имеют в популяции Am1 (г. Красноярск, Ne = 0,3394, I = 0,5052). Минимальные значения также отмечены для Aa7 (г. Краснотуранск, Ne = 0,2573, I = 0,3846).

Коэффициент подразделенности популяций (Gst) составляет 0,2530. Следовательно, на долю межвидового разнообразия приходится 25,3 %, а изученные популяции демонстрируют очень высокую степень дифференциации. Генетические дистанции М. Нея минимальны между популяциями, относящимися к одному виду: Am1 и Am3 (0,0835) и Aa1 и Aa4 (0,0969) (табл.).

Дендрограмма сходства изученных популяций *Achillea millefolium*, *A. asiatica* и *A. kuprijanovii* отчасти отражает систематические принципы кластеризации (рис.). Первый кластер с высоким уровнем достоверности (бутстреп-индекс – 97,42) образуют особи популяций *A. millefolium* (Am1, Am2). Во второй кластер входят популяции *A. asiatica* (Aa1, Aa2, бутстреп-индекс – 96,8). Географически удаленная краснотуранская популяция Aa7 занимает обособленное положение. Так же удалена от остальных популяция тысячелистника Куприянова, выделенная Н. В. Степановым (2016) в отдельный вид.

Таблица

Генетические дистанции Нея (под диагональю) между популяциями тысячелистников на основе ISSR-PCR анализа

П	Ak	Aa3	Am1	Am2	Aa1	Aa2
Aa3	0,1704	****	-	-	-	-
Am1	0,1607	0,1696	****	-	-	-
Am2	0,1806	0,1680	0,0835	****	-	-
Aa1	0,2380	0,2152	0,1806	0,1488	****	-
Aa2	0,1901	0,1857	0,1736	0,1614	0,0969	****

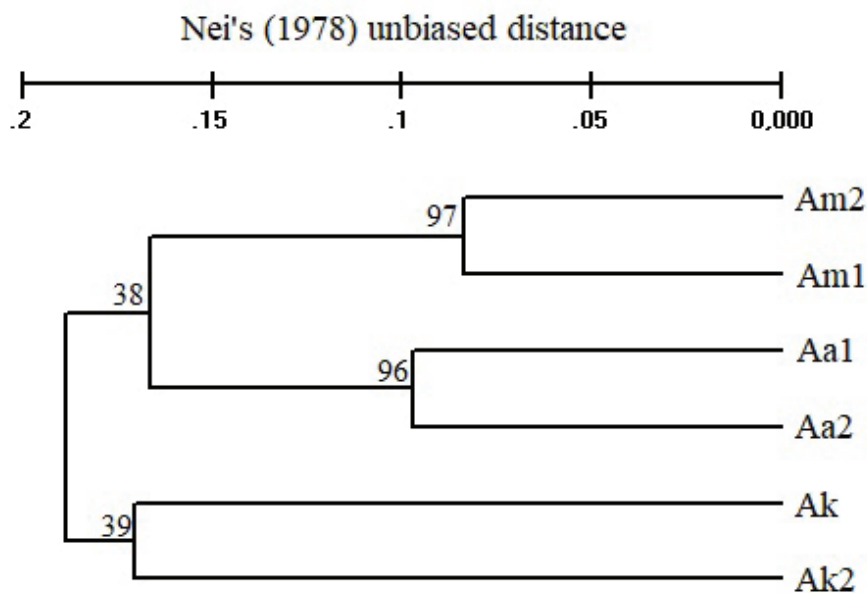


Рис. Дендрограмма сходства популяций *Achillea millefolium*, *A. asiatica* и *A. kuprijanovii* на основе данных ISSR-PCR анализа.

Таким образом, проведенный анализ генетической изменчивости популяций *Achillea millefolium*, *A. asiatica* и *A. kuprijanovii* на основе ISSR-PCR анализа показал, что высокий уровень внутрипопуляционной изменчивости, рассчитанный с помощью различных показателей (P, He, I), характерен для тысячелистника обыкновенного (Am1 и Am3). Относительно низкие показатели генетической вариабельности отмечены для краснотуранской популяции *A. asiatica* (Aa7) и *A. kuprijanovii* (Ak). Большая часть генетической изменчивости тысячелистников (74,7 %) приходится на долю внутрипопуляционного разнообразия, а 25,3 % является межпопуляционной, таким образом, изученные популяции обнаруживают высокий уровень дифференциации (Wright, 1978). Генофонды популяций характеризуются удовлетворительным состоянием, согласно классификации С. В. Боронниковой (2009), и могут самостоятельно воспроизводиться. Отмечено разделение популяций тысячелистника по систематическому принципу.

ЛИТЕРАТУРА

- Афанасьев К. С.** Род *Achillea* L. – тысячелистник // Флора СССР. – М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1961. – Т. 26. – С. 78–86.
- Боронникова С. В.** Молекулярно-генетический анализ генофондов редких и исчезающих растений Пермского края: дис.... докт. биол. наук. – Пермь, 2009. – 356 с.
- Соколов П. Д.** Растительные ресурсы СССР. Цветковые растения, их химический состав, использование: Семейство Asteraceae. – СПб.: Наука, 1993. – 349 с.

Степанов Н. В. Разнообразие тысячелистников (род *Achillea* L. – Asteraceae) в приенисейских Саянах // Вестник КрасГАУ. – Красноярск: Изд-во КрасГАУ, 2016. – № 6. – С. 31–38.

Doyle J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochemistry Bulletin, 1987. – № 19. – Pp. 11–15.

Farajpour M., Ebrahimi M., Amiri R., Golzari R., Sanjari S. Assessment of genetic diversity in *Achillea millefolium* accessions from Iran using ISSR marker // Biochemical systematic and ecology, 2012. – Vol. 43. – Pp. 73–79.

Gharibi S., Rahimmalek M., Mirlohi A., Majidi M. M., Tabatabaei B. E. S. Assessment of genetic diversity in *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* and *Achillea millefolium* subsp. *elbursensis* using morphological and ISSR markers // Journal of Medical Plants Research, 2011. – Vol. 5(11). – Pp. 2413–2423.

Miller M. P. Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3: a Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data // Computer software distributed by the author, 1997. – Pp. 30.

Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // Genetics, 1978. – Vol. 89 (3). – Pp. 583–590.

Poyaraz I. Comparison of ITS, RAPD and ISSR from DNA-based genetic diversity techniques // Comptes Rendus Biologies (May-June 2016). – Vol. 339, Iss. 5–6. – Pp. 171–178.

Rahimmalek M., Tabatabaei B. E. S., Arzani A., Khorrami M. Development and characterization of microsatellite markers for genomic analysis of yarrow (*Achillea millefolium* L.) // Genes & Genomics, 2011. – Vol. 33. – Pp. 475–483.

Wright S. Evolution and the genetics of population. Vol. 4. – Chicago, 1978. – 580 pp.