

**ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ISSR-МАРКЕРОВ
ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ПОПУЛЯЦИЙ РЕДКОГО ВИДА
ASTRAGALUS SERICEOCANUS (FABACEAE)**

И.Ю. Селютина, Е.С. Кониченко, О.В. Дорогина

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

Метод анализа межмикросателлитных участков геномной ДНК (ISSR) был использован для оценки генетического разнообразия в шести популяциях *Astragalus sericeocanus* – редкого эндемичного вида побережий оз. Байкал. При амплификации ДНК с пятью праймерами получен 91 фрагмент ДНК, из которых 86 (94.1 %) полиморфны. Установлен низкий уровень сходства популяции Турка со всеми остальными популяциями, коэффициент сходства Nei составил 0.145. Малая величина сходства популяции Турка с другими популяциями свидетельствует о достаточно длительной ее изоляции на восточном побережье оз. Байкал. На основе полученных результатов предложена стратегия охраны *Astragalus sericeocanus*.

Ключевые слова: *Fabaceae*, *Astragalus sericeocanus*, генетическая изменчивость, ISSR, редкий вид, охрана растений, оз. Байкал.

**THE POSSIBILITY OF USING ISSR-MARKERS
FOR DETECTION OF GENETIC DIFFERENTIATION OF POPULATIONS OF RARE SPECIES
OF ASTRAGALUS SERICEOCANUS (FABACEAE)**

I.Yu. Selyutina, E.S. Konichenko, O.V. Dorogina

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

Inter-simple sequence repeats (ISSR) markers of genomic DNA were used to assess the genetic diversity in six populations of *Astragalus sericeocanus* – rare endemic species to the shore of Lake Baikal. Five primers amplified 91 bands with 86 (94.1 %) being polymorphic. A low level of genetic similarity among population Turka and other populations was detected, based on the Nei's distance (0.145). The low genetic connectivity was found among population Turka and other populations is an evidence of enough long-term insulation this population on the eastern coast of Lake Baikal. Based on these results the conservation strategy of *Astragalus sericeocanus* was proposed.

Key words: *Fabaceae*, *Astragalus sericeocanus*, genetic diversity, ISSR, rare species, plant conservation, Lake Baikal.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время проблема сохранения биологического разнообразия становится все более актуальной. Интенсивность воздействия человека на природу носит глобальный характер и приводит к исчезновению множества видов.

К числу редких, нуждающихся в охране видов относится астрагал шелковисто-седой – *Astragalus sericeocanus* Gontsch. (рис. 1).

Эндемичный вид с узколокальным распространением по северному и восточному побережью оз. Байкал, *A. sericeocanus* относится к числу плейстоценовых степных реликтов (Редкие и исчезающие..., 1980; Малышев; Пешкова, 1984).

Вид внесен в Красную книгу Республики Бурятия (Алексеева, Бойков, 2002). Встречается близ Байкала – между с. Гремячинск и р. Турка и на о. Ярки в ус-

тье р. Верхняя Ангара, в прибойной полосе Байкала, а также в котловинах выдувания, где обитает на открытых участках прибрежных песков. Произрастает на ограниченной территории в изолированных местах нахождения. Большинство известных популяций находится на северном побережье оз. Байкал, популяция Турка, расположенная на восточном побережье, удалена от основной части ареала на 300 км (рис. 2).

Популяция *A. sericeocanus*, расположенная близ пос. Турка, находится под охраной в Забайкальском национальном парке. Однако в последние годы на данной территории идет активное развитие туристско-рекреационной зоны “Байкальская гавань”, в связи с чем антропогенная нагрузка в местах произрастания *A. sericeocanus* увеличивается с каждым годом (Тулохонов, 2009). Часть популяций на северном по-



Рис. 1. *Astragalus sericeocanus* – Астрагал шелковисто-седой.

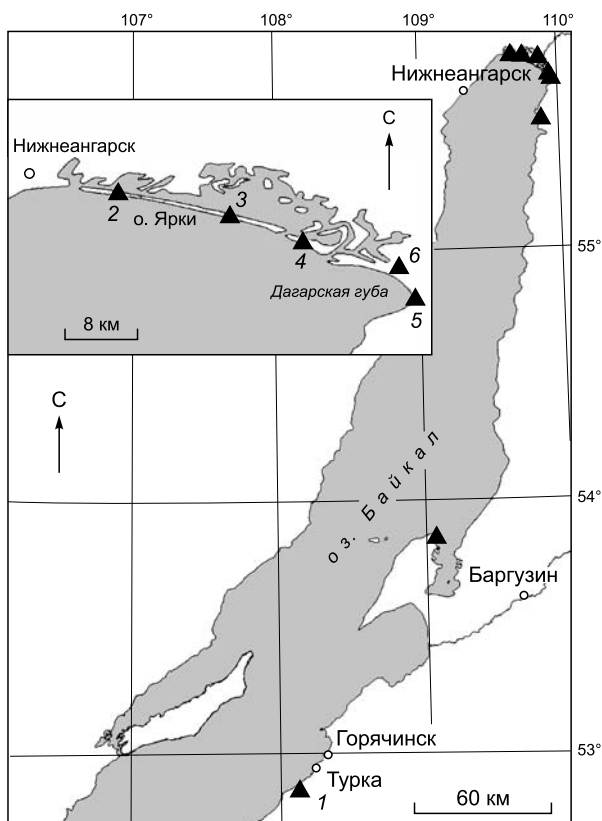


Рис. 2. Распространение *Astragalus sericeocanus* на побережье оз. Байкал:

1–6 – местонахождения *Astragalus sericeocanus*.

бережье охраняется на территории Верхнеангарского заказника.

Этот вид астрагала произрастает в экстремальных местах обитания и поэтому любое антропогенное воздействие может приводить к резкому сокращению численности популяции и ставить под угрозу ее дальнейшее выживание. *A. sericeocanus* – вид с перекрестным типом опыления и размножается исключительно семенным путем. Завязываемость семян в разные годы сильно изменяется и зависит от погодных условий (Санданов и др., 2014). Так, растения в популяции Турка в 2008 г. в среднем формировали 938 семян на особь, в 2009 г. – 489 семян, а в 2012 г. – 2168 семян на особь. Часто семена бывают плохо выполнены и сильно повреждены насекомыми (доля полноценных семян в популяции Турка в годы наблюдений варьировала в пределах 9–22 %).

Изучение генетического разнообразия играет важную роль для сохранения биологических видов. Международный союз охраны природы и природных ресурсов (МСОП) признал важность исследования генетической составляющей при планировании и проведении природоохранных мероприятий наряду с изучением видового разнообразия и разнообразия экологических систем (Frankel, 1974).

Для разработки стратегии охраны редких видов растений необходимо иметь максимально полную информацию об уровнях генетической изменчивости и генетической дифференциации популяций дан-

ных видов. Это важно, в первую очередь, для выявления центров наибольшего генетического разнообразия у изучаемых видов.

С целью изучения генетического разнообразия редких видов для их охраны в последнее время достаточно широко используются молекулярные методы.

Метод ISSR-маркирования широко применяется в популяционных и таксономических исследованиях, так как ISSR-маркеры обладают большой вариабельностью (Gupta et al., 1994; Nybom, 2004). Данный метод хорошо воспроизводим, менее трудоемкий и более простой в исполнении по сравнению с другими методами изучения полиморфизма ДНК (Harris, 1999). Метод изучения межмикросателлитных мар-

керов (ISSR-метод) позволяет обнаруживать большее число полиморфных локусов, чем это возможно другими методами (Esselman et al., 1999). ISSR-маркеры относятся к маркерам доминантного типа наследования, они дешевы в использовании, не требуют предварительных данных о последовательности ДНК и вместе с тем дают более воспроизводимые результаты, чем RAPD-маркеры (Wolfe et al., 1998).

В связи с этим актуально изучение генетической изменчивости и генетической дифференциации популяций *A. sericeocanus*.

Цель настоящей работы – изучить генетическую дифференциацию редкого эндемичного вида *A. sericeocanus* методом анализа межмикросателлитных участков геномной ДНК (ISSR).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Нами изучены выборки растений в шести из семи известных природных популяций *A. sericeocanus*: одна популяция с восточного побережья, остальные – с северного.

Восточное побережье оз. Байкал

Популяция Турка. Бурятия, Прибайкальский район, окрестности с. Турка, урочище Пески. Внешний борт котла выдувания, разнотравно-остролодочниковая ассоциация.

Северное побережье оз. Байкал

Популяция Ярки 1. Бурятия, Северобайкальский район, окрестности пос. Нижнеангарск, западная оконечность о. Ярки, разнотравно-хвощовая ассоциация.

Популяция Ярки 2. Бурятия, Северобайкальский район, окрестности пос. Нижнеангарск, восточная оконечность о. Ярки, ржанокolosняковая ассоциация.

Популяция Миллионный. Бурятия, Северобайкальский район, окрестности пос. Нижнеангарск, западная оконечность о. Миллионный, ржанокolosняковая ассоциация.

Популяция Дагары 1. Бурятия, Северобайкальский район, окрестности пос. Нижнеангарск, урочище Дагарская губа, недалеко от кордона Верхнеангарского заказника, разнотравно-астроголовая ассоциация.

Популяция Дагары 2. Бурятия, Северобайкальский район, окрестности пос. Нижнеангарск, урочище Дагарская губа, разнотравно-астроголовая ассоциация.

Анализировали от 6 до 8 образцов из каждой популяции. ДНК выделяли из 7–9 мг растительной ткани высушенных проростков с помощью СТАВ-метода (Doyle J.J., Doyle J.L., 1987) с некоторыми модификациями. В процессе работы выяснилось, что в качестве материала для выделения ДНК астрогола шелковисто-седого можно использовать зеленые листья растений любой фазы развития. Но наиболее пригодным материалом оказались 5–7-дневные пророст-

ки, так как их можно вырастить в лабораторных условиях в любое время года. К тому же выделенная из проростков ДНК содержит меньшее количество примесей.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в амплификаторе C1000 Thermal Cycler (BioRad Laboratories, USA) по следующему протоколу: первичная денатурация ДНК 1.30 мин при 94 °С; 35 циклов амплификации, включающих денатурацию ДНК при 94 °С – 0.40 мин, отжиг праймера при 41–54 °С – 0.45 мин и элонгацию цепи при 72 °С – 1.30 мин; заключительный этап при 72 °С – 5 мин. Для амплификации готовили смесь ПЦР-реактивов, содержащих около 50 нг матрицы и 1.5 ед. Таq-полимеразы (Медиген, Россия).

Для амплификации использовали 21 праймер. Для оценки чистоты амплификационной смеси применяли отрицательный контроль, контрольная проба содержала полную амплификационную смесь, но без добавления ДНК. В качестве внешней группы использовали *Gueldenstaedtia monophylla*.

Продукты амплификации разделяли при помощи электрофореза в 1%-м агарозном геле в 1×TBE буфере. В качестве красителя использовали SYBR-Green, который добавляли непосредственно в каждый образец перед нанесением на гель. Гели фотографировали в УФ-излучении (Bio-Rad GelDoc XR+).

На основе электрофореграмм были построены бинарные матрицы, где каждый ампликон рассматривался как маркер и отмечалось его наличие (1) или отсутствие (0). Ампликоны, которые показали сходную подвижность в геле, считали гомологичными, как это обычно делается в исследованиях с использованием методов RAPD и ISSR (O'Hanlon, Peakall, 2000). Следуя рекомендациям (Rossello et al., 2002), мы не принимали во внимание интенсивность окраски ампликонов. ДНК-фрагменты демонстрировали различную интенсивность свечения, но в нашей работе мы учитывали только четкие, хорошо различимые ампликоны.

Мерой сходства между образцами была выбрана величина дистанции (Nei, Li, 1979):

$$D = 2N_{ab}/N_a + N_b,$$

где N_a и N_b – число амплифицированных фрагментов у образцов а и b; N_{ab} – число совпадающих по элект-

рофоретической подвижности фрагментов у образцов а и b.

Кластерный анализ данных был выполнен методом UPGMA с помощью программы TreeCon 3.1. Значения бутстреп рассчитывали для 1000 повторов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При проведении ПЦР-реакции с геномной ДНК *A. sericeocanus* нами был испытан 21 праймер, различающийся по нуклеотидной последовательности. Из числа изученных праймеров с 17 была получена амплификация и только 14 праймеров оказались наиболее эффективными для изучения генотипического разнообразия *A. sericeocanus*. Эти праймеры продуцировали множественные четкие и хорошо воспроизводимые ампликоны, вследствие чего и были выбраны для дальнейшего генетического анализа. Межпопуляционные отличия наилучшим образом выявлялись с помощью пяти маркеров (табл. 1).

При амплификации ДНК с использованием пяти праймеров был получен 91 фрагмент ДНК (ампликонов), из которых 86 полиморфны. Доля полиморфных локусов по всем праймерам составила 94.1 % для вида. Число фрагментов, полученных при амплификации ДНК растений из шести изученных популяций с каждым из использованных праймеров, варьировало от 14 (814, 99А) до 25 (М10). Среднее число ампликонов на праймер составило 18.2, среднее число полиморфных ампликонов – 17.2.

Мерой сходства между популяциями выбрана величина дистанции Nei (D). Значения коэффициента сходства между всеми изученными популяциями изменялись от 0 до 0.909 (табл. 2). Наименьшие значения генетического сходства свойственны популяции Турка. Коэффициент сходства между данной популяцией и всеми остальными популяциями по различным праймерам варьировал от 0 до 0.333. В данном случае наибольшие отличия продемонстрировал праймер 99А – коэффициент сходства D составил от 0.166 (Турка–Миллионный) до 0.333 (Турка–Ярки 1), по совокупности всех пяти праймеров от 0.129 до 0.178 (в среднем 0.145).

Наибольшее генетическое сходство обнаружено между популяциями Ярки 1 и Ярки 2, значение коэффициента сходства составило от 0.750 (М1) до 1.00 (М10) и в среднем D = 0.851. Популяция Миллионный имеет значительное сходство с популяцией Ярки 2 – от D = 0.666 (М1, НВ11) до 0.909 (99А, М10), в среднем по пяти праймерам D = 0.790 и немного меньшее сходство с популяцией Ярки 1 – от D = 0.500 (М1) до D = 0.909 (99А, М10), в среднем по пяти праймерам D = 0.747.

Таблица 1

Характеристика праймеров, использованных в ISSR-PCR для изучения межпопуляционной дифференциации

Маркер	Последовательность (5'→3')	$t_{отж}^{\circ C}$	Количество амп. фрагментов	Кол-во пол. фрагментов	P, %
814	(СТ) ₇ СТГ-<G>	51	14	13	92.9
99А	(СА) ₆ А-<G>	47	14	13	92.9
НВ11	(ГТ) ₆ С-<C>	50	16	15	93.7
М1	(АС) ₈ С-<G>	56	22	21	95.5
М10	(СА) ₆ R-<G>	42	25	24	96.0

Таблица 2

Генетическая дистанция Nei между популяциями *A. sericeocanus* на основе пяти праймеров, демонстрирующих максимальную межпопуляционную дифференциацию

Популяция	Турка	Дагары 1	Дагары 2	Ярки 1	Ярки 2	Миллионный
Турка		0.137	0.178	0.153	0.129	0.130
Дагары 1			0.777	0.558	0.550	0.465
Дагары 2				0.503	0.423	0.493
Ярки 1					0.851	0.747
Ярки 2						0.790

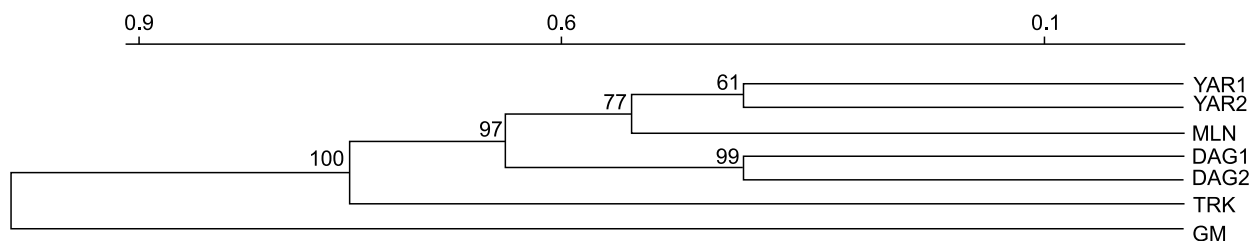


Рис. 3. UPGMA-дендрограмма, построенная на основе матрицы генетических значений коэффициента (Nei, Li, 1972) между шестью популяциями *A. sericeocanus*.

Цифрами обозначена величина бутстреп-поддержки (%).

Между популяциями Дагары 1 и Дагары 2 коэффициент сходства составил от 0.545 (M1) до 1.00 (99A), среднее значение этого коэффициента по пяти праймерам $D = 0.777$. Высокие значения D указывают на близкое генетическое родство данных популяций. Группа популяций Ярки 1, Ярки 2 и Миллионный с группой популяций Дагары 1–Дагары 2 дистанцированы географически, коэффициент сходства

между ними по всем праймерам составляет $D = 0.423–0.558$.

Данные UPGMA-дендрограммы наглядно демонстрируют значительную генетическую дифференциацию популяции Турка (с бутстреп-поддержкой 100 %) от популяций в основной части ареала (рис. 3).

Также показывают высокую степень сходства популяции Ярки 1 и Ярки 2 и близость к ним популяции Миллионный, Дагары 1 и Дагары 2.

ОБСУЖДЕНИЕ

Генетическая дифференциация растительных популяций отражает взаимодействие долговременной эволюционной истории вида (т. е. изменение ареала, фрагментация мест обитания и изоляция популяций) с генетическими процессами, протекающими в нем, такими как мутации, генетический дрейф, поток генов и отбор (Schaal et al., 1998).

Различные виды растений значительно различаются по структуре распределения генетического разнообразия между популяциями. Географическое положение, экологические условия, сокращение мест обитания и их фрагментация являются факторами, действие которых способно повышать популяционную дифференциацию у видов с ограниченным распространением (Travis et al., 1996).

Наиболее удаленной от основной (центральной) части ареала является популяция в Турке, расположенная в восточной части ареала *A. sericeocanus*. Сильная генетическая дифференциация, выявленная нами между популяциями основной части ареала, с одной стороны, и популяцией Турка – с другой, есть, по нашему мнению, результат долговременной географической изоляции этой популяции на восточном побережье оз. Байкал в отличающихся экологических условиях.

Немногочисленная популяция на о. Миллионный находится в изоляции в течение последних 50–60 лет. Она была изолирована от других популяций о. Ярки в результате повышения уровня воды в оз. Байкал, которое произошло после строительства ГЭС на р. Ангаре. Несмотря на то что популяция Миллионный находилась в изоляции в течение 50 лет, значительной

генетической дифференциации между ней и популяциями Ярки 1 и Ярки 2, с которыми в прошлом она составляла единую популяцию, не обнаружено. Сходство двух пар популяций (Дагары 1–Дагары 2 и Ярки 1–Ярки 2) связано с тем, что они расположены недалеко друг от друга и, вероятно, обладают общим генофондом.

Su et al. (2003) выявили значительную генетическую дифференциацию между субпопуляциями некоторых многолетних перекрестноопыляемых таксонов только после 600 лет изоляции. Эти данные согласуются с полученными нами результатами, выявившими максимальную генетическую подразделенность между основной группой популяций и популяцией из Турки, изолированной от остальных в течение длительного времени.

Полученные данные указывают на существенную дифференциацию между изолированными и географически удаленными популяциями, средняя степень сходства между парами популяций составила 0.459. Полученная нами характеристика популяционно-генетической подразделенности *A. sericeocanus* имеет важное значение для разработки стратегии охраны данного вида. Принимая во внимание высокий уровень генетической дифференциации популяций *A. sericeocanus*, приоритетным должно быть сохранение всех существующих популяций *in situ*. Выявленная высокая степень дивергенции популяций *A. sericeocanus* должна учитываться при создании генетического банка и при проведении работ по интродукции и реинтродукции данного вида.

ЛИТЕРАТУРА

- Алексеева Е.В., Бойков Т.Г. Астрагал шелковисто-седой – *Astragalus sericeocanus* Gontsch. // Красная книга Республики Бурятия: Редкие и исчезающие виды растений и грибов. Новосибирск, 2002. С. 39.
- Мальшев Л.И., Пешкова Г.А. Особенности и генезис флоры Сибири (Предбайкалье и Забайкалье). Новосибирск, 1984. 265 с.
- Редкие и исчезающие растения Сибири. Новосибирск, 1980. 223 с.
- Санданов Д.В., Селютина И.Ю., Дулепова Н.А. Структура сообществ и ценопопуляций *Astragalus sericeocanus* Gontsch. на побережье Байкала // Сиб. экол. журн. 2014. № 2. С. 295–305.
- Тулохонов А.К. Системный подход к природопользованию в Байкальском регионе // География и природные ресурсы. 2009. № 3. С. 17–22.
- Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation of fresh leaf tissue // Phytochemistry Bull. 1987. V. 19. P. 11–15.
- Esselman E.J., Jianqiang L., Crawford D.J. et al. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* subsp. *Inesperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers // Mol. Ecol. 1999. V. 8. P. 443–451.
- Frankel O.H. Genetic conservation: our evolutionary responsibility // Genetics. 1974. V. 78. P. 53–65.

- Gupta M., Chyi Y.-S., Romero-Severson J., Owen J.L.** Amplification of DNA markers from evolutionary diverse genomes using single primers of simple sequence repeats // *Theoret. Appl. Gen.* 1994. V. 89. P. 998–1006.
- Harris J.** RAPDs in systematics – a useful methodology? // P.M. Hollingsworth, R.M. Bateman, R.J. Gornall. *Molecular systematics and Plant Evolution*. 1999. P. 221–228.
- Nei M., Li W.H.** Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1979. V. 76, No. 10. P. 5269–5273.
- Nybom H.** Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants // *Mol. Ecol.* 2004. V. 13. P. 1143–1155.
- O’Hanlon P.C., Peakall R.** A simple method for detection of size homoplasy among amplified fragment length polymorphism fragments // *Mol. Ecol.* 2000. V. 9. P. 815–816.
- Rossello J.A., Cebrian M.C., Mayol M.** Testing taxonomic and biogeographical relationship in a narrow Mediterranean endemic complex (*Hippocrepis balearica*) using RAPD markers // *Ann. Bot.* 2002. V. 89. P. 321–327.
- Schaal B.A., Haywotth D.A., Olsen K.M. et al.** Phylogeographic studies in plants: problem and prospects // *Mol. Ecol.* 1998. V. 7. P. 465–474.
- Su H., Qu L.J., He K. et al.** The Great Wall of China: a physical barrier to gene flow? // *Heredity*. 2003. V. 90. P. 212–219.
- Travis S.E., Maschinski J., Keim P.** An analysis of genetic variation in *Astragalus cremnophylax* var. *Cremnophylax*, a critically endangered plant, using AFLP markers // *Mol. Ecol.* 1996. V. 5. P. 735–745.
- Wolfe A.D., Xiang Q.Y., Kephart S.R.** Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable inter-simple sequence repeat (ISSR) bands // *Ibid.* 1998. V. 7. P. 1107–1125.