

А. С. ЧЕРУШЕВА¹, Е. Е. АШИРБЕКОВ¹, Т. Г. КИСЕЛЕВА¹,
А. Ж. ПРНАЗАРОВА¹, М. А. МЕНДЕШ¹, Т. С. БАЛМУХАНОВ¹,
Г. М. КУДАБАЕВА², Р. О. ЗАКИРОВА², Н. А. АЙТХОЖИНА¹

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТЕНИЯ *PEGANUM HARMALA* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ RAPD- И ISSR-МАРКЕРОВ

Проведен молекулярно-генетический анализ генома 7 популяций вида *Peganum harmala* с помощью RAPD- и ISSR-методов. На основании электрофоретических спектров с использованием невзвешенного парно-группового метода с арифметическим усреднением (UPGMA) построена дендрограмма родственных отношений популяций. Рассчитаны показатели, характеризующие уровень полиморфизма, а также внутри- и межпопуляционного генетического разнообразия. Показано, что основная доля генетического разнообразия приходится на межпопуляционную изменчивость.

Введение. К промышленно ценным лекарственным растениям Казахстана относится *Peganum harmala* – дикорастущее цветковое растение, принадлежащее к семейству *Zygophyllaceae*, произрастающее в степях Восточной Европы, Центральной Азии и Северной Африке. В Казахстане растения распространены, в основном, в южных районах республики [1, 2].

Лекарственные растительные средства на основе алкалоидов *P. harmala*, к которым относятся гармалин, гармин, пеганин, дезоксипеганин используются при лечении последствий эпидемического энцефалита, дрожательного паралича, поражениях периферической нервной системы и болезни Паркинсона [3], а также и в гомеопатии [4]. В азиатской медицине семена применяют как наркотическое, антиспастическое, снотворное, противорвотное и противоглистное средство. Имеются литературные данные, подтверждающие широкий спектр фармакологической активности *P. harmala*, в качестве антибактериального и фунгицидного компонента [5], а также при лечении дерматозов [6], гипотермии [7] и рака [8].

Одними из наиболее распространенных методов выявления генетического полиморфизма у растений является RAPD- и ISSR-анализ. Метод RAPD (random amplified polymorphic DNA – произвольно амплифицируемая полиморфная ДНК) основан на использовании полимеразной цепной реакции (ПЦР) со случайными (неспецифическими) одиночными 9–10-членными праймерами и достаточно низкими температурами отжига [9]. Основой метода ISSR (inter simple sequence repeat) является ПЦР с олигонуклеотидными праймерами, состоящими из повторяющихся еди-

ниц, так называемого якоря, на 3'- или 5'-конце нуклеотидной последовательности, амплифицирующими фрагменты ДНК, которые находятся между двумя достаточно близко расположенными микросателлитными последовательностями [10].

В настоящей работе представлены результаты анализа полиморфизма семи популяций *P. harmala* с помощью RAPD-метода и анализа полиморфизма межмикросателлитной ДНК (ISSR).

Материалы и методы. В исследовании использованы образцы растений семи популяций, собранные на подгорных равнинах Киргизского, Заилийского, Джунгарского Алатау, а также на песчаных массивах региона Мойынкум. Сбор материала проведен в 2008 году. Для исследования генетической изменчивости из каждой популяции случайным образом отобраны по десять растений (табл. 1).

Таблица 1. Исследованные образцы семи популяций *P. Harmala*

№ популяции	Место сбора	Дата отбора
П1	Предгорная равнина Киргизского Алатау в окр. с. Акыртобе	29.07.08
П2	Подгорная равнина Киргизского Алатау	28.08.08
П3	Подгорная равнина Киргизского Алатау в окр. с. Каракемер	31.08.08
П4	Подгорная равнина Киргизского Алатау в окр. с. Мерке	31.08.08
П5	Подгорная равнина Заилийского Алатау, с. Сулу-Тор	01.09.08
П6	Подгорная равнина Джунгарского Алатау в окр. с. Шенгельды	10.09.08
П7	Мойынкумы, бассейн р. Талас, на улицах с. Коккозек	31.08.08

Для выделения ДНК использовали методику, описанную Doyle J. 1987 [11] с небольшими модификациями.

Реакционная смесь, объемом 20 мкл, содержала 10 нг ДНК, 2,5 mM Mg Cl₂, 8 пМ праймера, дезоксинуклеотидтрифосфаты по 200мкМ каждого и 2 ед. Taq-ДНК-полимеразы (Сибэнзим) в буфере, рекомендованном фирмой-производителем. Для RAPD- и ISSR-ПЦР использовали по 4 и 2 отобранных праймера соответственно. Амплификацию проводили в следующем режиме: предварительная денатурация 3 мин при 95°C; 35 циклов амплификации: 95°C – 30 с, 37°C (50°C, 52°C – для ISSR) – 30 с, 72°C – 40 с; последний цикл элонгации – 10 мин при 72°C.

Продукты ПЦР разделяли путем электрофореза в 8 % акриламидном геле в 1x TBE-буфере. Первичная обработка и сравнительный анализ полученных паттернов, а также определение длин фрагментов проводилось с использованием программного обеспечения Quantity One 4.4.0.

Для оценки степени полиморфизма и уровня дивергенции между изученными популяциями полученные данные были представлены в виде матрицы бинарных признаков, в которой наличие или отсутствие в спектре одинаковых по размеру фрагментов рассматривалось соответственно как состояние «1» или «0». При этом учитывали только воспроизводимые в повторных экспериментах фрагменты. Полиморфизм по интенсивности не брали в расчет. По матрице бинарных признаков были рассчитаны матрицы различий и построены дендрограммы сходства невзвешенным парно-групповым методом с арифметическим усреднением (UPGMA). Расчет генетической дистанции проводился по формуле:

$$GD_{XY} = 1 - \frac{2N_{XY}}{N_X + N_Y},$$

где GD_{XY} – генетическое расстояние по Nei и Li [12]; N_X – число фрагментов в спектре X; N_Y – число фрагментов в спектре Y; N_{XY} – число общих фрагментов.

Определение частот встречаемости локусов и расчет внутри- и межпопуляционного полиморфизма проведено с применением программы Popgene 32 [13].

Результаты и обсуждение. Для RAPD-маркирования 7 популяций лекарственного вида *P. harmala* было отобрано 4 праймера (табл. 2), позволяющих детектировать внутри- и межпопуляционный полиморфизм. При анализе амплифицированных фрагментов ДНК в семи изученных популяциях выявлен 51 амплифицированный фрагмент, 34 из которых являлись полиморфными. Число амплифицированных фрагментов в суммарной выборке варьировало, в зависимости от праймера, от 8 (ОРА-09) до 17 (ОРА-01). В среднем, при RAPD-анализе на один праймер синтезировалось 13 фрагментов. Число полиморфных фрагментов в суммарной выборке растений варьировало от 3 до 14, а уровень полиморфизма, в зависимости от праймера, колебался от 37,5% до 82,35%. RAPD-спектры 10 представителей популяции П1, полученные с праймером ОРА-01 представлены на рис. 1.

Общее число RAPD-фрагментов для каждой популяции, а также уровень полиморфизма представлены в табл. 3. Самый высокий уровень полиморфизма наблюдался в П2 (30%), а самый низкий – в П4 (5,13%). Для популяции 7 выявлено два уникальных, т.е. встречающихся только в

Таблица 2. Характеристика праймеров и амплифицированных ими фрагментов

Праймеры	Нуклеотидная последовательность (5'–3')	Число амплифицированных фрагментов в суммарной выборке	Число и доля полиморфных фрагментов в суммарной выборке
RAPD			
ОРА-01	TGC CGA GCT G	17	14 (82,35%)
ОРА-02	GGG TAA CGC C	11	7 (63,64%)
ОРА-08	GTG ATC GCA G	15	10 (66,67%)
ОРА-09	CAA TCG CCG T	8	3 (37,50%)
Всего		51	34 (66,67%)
ISSR			
1	(AG) ₈ T	8	6 (75%)
2	(GA) ₈ C	10	8 (80%)
Всего		18	14 (77,78%)

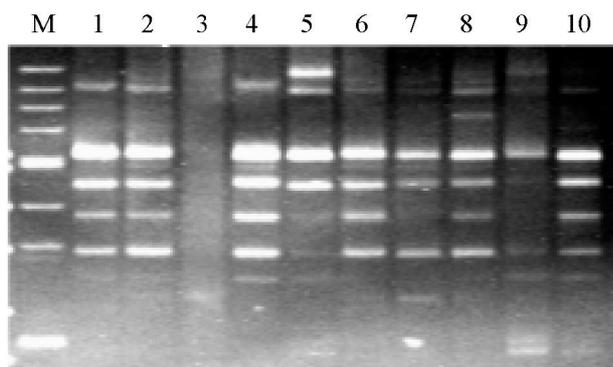


Рис. 1. RAPD-спектры ПП *P. harmala* с праймером ОРА-01. М – маркер молекулярной массы, номера дорожек соответствуют образцам популяции

этой популяции, RAPD-фрагмента (ОРА-01 – 270 п.н., ОРА-08 – 165 п.н.). Эта популяция также обладает самым высоким уровнем полиморфизма.

При ISSR-анализе в 7 исследованных популяциях *P. harmala* обнаружено 18 амплифицированных фрагмента ДНК, 14 из которых были полиморфными. Число ISSR-фрагментов составило 8 для праймера 1 и 10 – для праймера 2, а полиморфных – 6 и 8 соответственно. ISSR-спектры 10 представителей первой популяции, полученные с праймером 1, представлены на рис. 2. Для П4 отмечено наличие одного уникального фрагмента (праймер 1 – 680 п.н.). Уровень поли-

Таблица 3. Показатели генетического разнообразия в популяциях *P. harmala*, полученные при использовании RAPD-метода

	Популяция							Суммарная выборка
	1	2	3	4	5	6	7	
n	34	40	41	39	41	38	47	51
P	9 (0,2647)	12 (0,300)	8 (0,1951)	2 (0,0513)	5 (0,1220)	8 (0,2105)	14 (0,2979)	34 (0,6667)
n _a	1,1765 (0,3850)	1,2353 (0,4284)	1,1569 (0,3673)	1,0392 (0,1960)	1,0980 (0,3003)	1,1569 (0,3673)	1,2745 (0,4507)	1,6667 (0,4761)
n _e	1,1412 (0,3080)	1,1882 (0,3427)	1,1255 (0,2938)	1,0314 (0,1568)	1,0784 (0,2403)	1,1255 (0,2938)	1,2196 (0,3606)	1,3512 (0,3418)
H _o	0,1123 (0,2451)	0,1498 (0,2727)	0,0998 (0,2338)	0,0250 (0,1248)	0,0624 (0,1912)	0,0998 (0,2338)	0,1747 (0,2869)	0,3295 (0,2641)
H _{pop}				0,1034				
H _{pop} /H _{sp}				0,3138				
(H _{sp} -H _{pop})/H _{sp}				0,6861				

Примечание: P – число полиморфных фрагментов (доля полиморфных фрагментов); n_a – абсолютное число аллелей на локус (станд. откл.); n_e – эффективное число аллелей на локус (станд. откл.); H_o – индекс разнообразия Шенона для популяции; H_{pop} – среднее значения индекса Шенона для популяций; H_{pop}/H_{sp} – внутривидовое разнообразие; (H_{sp}-H_{pop})/H_{sp} – межпопуляционное разнообразие.

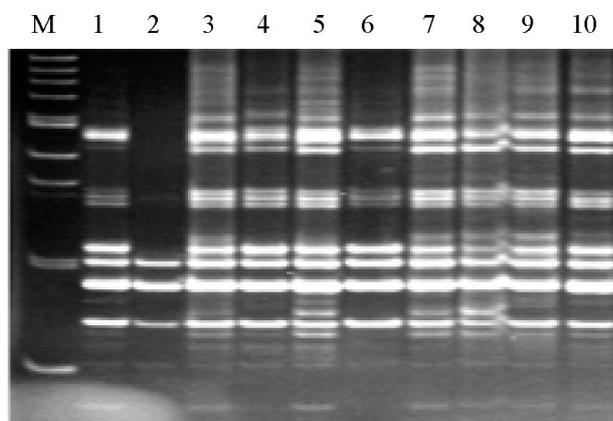


Рис. 2. ISSR-спектры популяции ПП *P. harmala* с праймером 1. М – маркер молекулярной массы, номера дорожек соответствуют образцам популяции

морфизма амплифицированных фрагментов ДНК, полученных в результате ПЦР со всеми ISSR-праймерами, изменялся от 7,14% в П7 до 31,25% в П3 (табл. 4).

Эффективное число аллелей n_e, которое является мерой генетического разнообразия популяции, в суммарной выборке составило 1,3512 при RAPD-анализе и – 1,3945 при ISSR-анализе. Абсолютное число аллелей на локус n_a в этой же выборке равно 1,6667 для RAPD и 1,7778 для ISSR. Таким образом, данные показатели при использовании обоих методов показали близкие результаты.

Общее генное разнообразие Ht для суммарной выборки составило 0,2150 и 0,2427 для RAPD

Таблица 4. Показатели генетического разнообразия в популяциях *P. harmala*, полученные при использовании ISSR-метода

	Популяция							Суммарная выборка
	1	2	3	4	5	6	7	
n	9	15	16	15	16	12	14	18
P	2 (0,2220)	4 (0,2670)	5 (0,3125)	2 (0,1330)	2 (0,1250)	2 (0,1670)	1 (0,0714)	14 (0,7778)
n_a	1,1111 (0,3234)	1,2222 (0,4278)	1,2778 (0,4609)	1,1111 (0,3234)	1,1111 (0,3234)	1,1111 (0,3234)	1,0556 (0,2357)	1,7778 (0,4278)
n_c	1,0786 (0,2287)	1,1571 (0,3025)	1,1964 (0,3259)	1,0786 (0,2287)	1,0786 (0,2287)	1,0786 (0,2287)	1,0393 (0,1667)	1,3945 (0,3374)
H_o	0,0672 (0,1956)	0,1344 (0,2587)	0,1680 (0,2787)	0,0672 (0,1956)	0,0672 (0,1956)	0,0672 (0,1956)	0,0336 (0,1425)	0,3733 (0,2505)
H_{pop}				0,0864				
H_{pop}/H_{sp}				0,2314				
$(H_{sp} - H_{pop})/H_{sp}$				0,7686				

и ISSR соответственно, что значительно выше показателей среднего выборочного генного разнообразия по популяциям H_s (0,0722 – RAPD, 0,0592 – ISSR).

Коэффициент подразделенности популяций G_{st} для двух типов анализа показал, что на межпопуляционное генетическое разнообразие приходится 66,42% для RAPD и 75,61% для ISSR, что говорит о высокой межпопуляционной дифференциации. Полученный результат подтверждается значениями индекса разнообразия Шеннона, по которому рассчитаны доля внутри- и межпопуляционного разнообразия для RAPD- и ISSR-праймеров. Среднее значение индекса Шеннона для популяций составляет 0,1034 и 0,0864 для RAPD и ISSR соответственно, тогда как его значение для суммарной выборки в несколько раз больше. При RAPD-анализе установлено, что в среднем 31,38% разнообразия приходится на внутривидовую изменчивость и 68,61% - на межпопуляционную изменчивость. Данные ISSR-анализа

показали, что большая часть (76,86%) генетического разнообразия также приходится на межпопуляционную изменчивость (табл. 3, 4).

На основе объединенных данных, полученных для RAPD- и ISSR-праймеров методом кластерного анализа UPGMA, построена дендрограмма семи изученных популяций *P. harmala* (рис. 3). Из данных, представленных на дендрограмме, следует, что популяция П1 наиболее отличается по генетической структуре от всех остальных. Генетические дистанции, рассчитанные по М. Nei, [12] показывают, что наиболее отдаленными являются популяции П1 и П7 (0,4361), а более идентичными П2 и П4 (0,0700). Полученные результаты указывают на то, что уровень генетического разнообразия не зависит от ареала произрастания.

В данной работе впервые в Казахстане изучена генетическая структура и разнообразие семи отобранных природных популяций *P. harmala* с использованием RAPD- и ISSR-анализа. Полу-

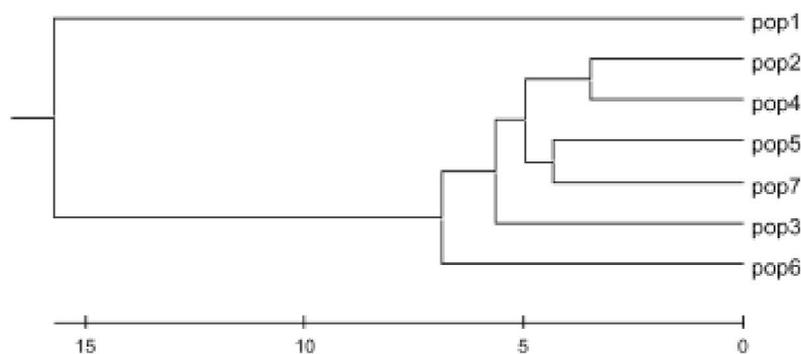


Рис. 3. Дендрограмма родственных взаимоотношений, полученная на основе данных RAPD- и ISSR-анализа семи популяций *P. harmala*

ченые данные могут быть использованы для генетической паспортизации популяций вида *P. harmala* как ценного лекарственного сырья.

ЛИТЕРАТУРА

1. Monsef H.R., Ghobadi A., Iranshahi M. Antinociceptive effects of *Peganum harmala* L. alkaloid on mouse formalin test // J. Pharm. Pharmaceut. Sci. 2004. V. 7(1). P. 65-69.
2. Курочкина Л.Я. Растительность песчаных пустынь Кызылкума // Растительный покров Казахстана. Алма-Ата: Наука, 1966.
3. Astulla A., Zaima K., Matsuno Y. Alkaloids from the seeds of *Peganum harmala* showing antiplasmodial and vasorelaxant activities // J. Nat. Med. 2008. V. 62. P. 470-472.
4. Энциклопедический словарь лекарственных растений / Под ред. Г. П. Яковлева и К. Ф. Блиновой. 2-е изд. СПб.: Изд. СПбФА, 2002. С. 104.
5. Abdel-Fattah A.F.M., Matsumoto K., Murakami Y. General serotonin level-dependent changes in body temperature following administration of tryptophan to pargyline- and harmaline- pretreated rats // Gen. Pharmacol. 1997. V. 28. P. 405-409.
6. Saad E.L., Rifaie M. *Peganum harmala*: its use in certain dermatoses // Int. J. Dermatol. 1980. V. 19. P. 221-2222.
7. Abdel-Fattah A.F.M., Matsumoto K., Gammaz H.A.K., Watanabe H. Hypothermic effect of harmala alkaloid in rats: involvement of serotonergic mechanism // Pharmacol. Biochem. Behav. 1995. V. 52. P. 421-426.
8. Adams S.M. The antineoplastic effects of prunusarneniaca and *Peganum harmala* // Diss. Abstr. Int. (Sci). 1983. V. 44. P. 1052-1055.
9. Welsh J., McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers // Nucl. Acids. Res. 1991. V. 18. P. 7213-7218.
10. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics. 1994. V. 20. P. 176-183.
11. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochemical Bulletin. 1987. V. 19. P. 11-15.
12. Nei M., Li W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 5269-5273.
13. <http://www.ualberta.ca/~fyeh/index.htm>

Резюме

RAPD және ISSR әдістерінің көмегімен *Peganum harmala* түрінің 7 популяциясы геномының молекулярлық-генетикалық талдауы жүргізілді. Таразыланбаған жұптық-топтау әдісін қолдана отырып алынған арифметикалық орта мәні есептелінген спектрлерінің негізінде популяцияның туыстық қатынасының дендрограммасы құрылды. Популяцияаралық және популяцияішілік генетикалық түрлілігі мен полиморфизм деңгейін сипаттайтын көрсеткіштер есептелінді. Генетикалық түрлілігінің негізгі бөлігі популяцияаралық өзгеріштігіне келетінін көрсетті.

Summary

The molecular-genetic analysis of seven *Peganum harmala* populations was performed by means of RAPD- and ISSR-methods. On the basis of the electrophoretic spectrums using unweighed pair group method with arithmetic mean (UPGMA) the dendrogramme of populations was created. The indexes of the polymorphism level and genetic variety of inter population and between populations are calculated. It is shown that a main part of genetic variety is determined by interpopulation diversity.

УДК 577.1:582

¹Институт молекулярной биологии и биохимии им. М. А. Литхожина, г. Алматы;

²Институт ботаники и фитоинтродукции, г. Алматы
Поступила 15.12.10г.