

УДК 575.174.015.3

¹А.Н. Калиева*, ¹Г.У. Дюскалиева, ²А.Ньюсам¹Казахский государственный женский педагогический университет,
Республика Казахстан, г. Алматы²Миссисипи Валлей государственный Университет, США, Ита-Бена

*E-mail: anar_kaliev65@mail.ru

Изучение полиморфизма различных популяций *Agrimonia asiatica juz.* и *Agrimonia pilosa ldb.*, распространенных в Юго-Восточном Казахстане

Для сохранения и расширения генофонда растений, имеющих медицинское или сельскохозяйственное значение, а также для проведения генетического мониторинга их природных популяций применяются различные методы генетического маркирования. RAPD-анализ может служить своеобразным экспресс-методом выявления генетического полиморфизма и геномного маркирования в популяционных исследованиях. Полученные результаты показали, что каждый из анализируемых видов *Agrimonia L.* находится на значительном генетическом расстоянии (дистанция более 0,4), что свидетельствует о наличии существенных генетических различий между ними. Данные RAPD анализа показали, наличие высокого уровня внутри видового полиморфизма у различных популяций растений *Agrimonia asiatica Juz.* и значительные отличия их ДНК-профилей в сравнении с другим видом *Agrimonia pilosa Ldb.* Результаты изучения компонентного состава изоферментных маркеров различных популяций растений *Agrimonia asiatica Juz.* и *Agrimonia pilosa Ldb.* показали наличия различий в компонентном составе эстераз у двух нами исследуемых видов растений.

Ключевые слова: *Agrimonia l.*, популяция, rapd-анализ, амплификация, праймеры, геномная днк.

A.N. Kaliyeva, G.U. Dyuskaliev, A. Newsome

The study of polymorphism different populations *Agrimonia asiatica Juz.* and *Agrimonia pilosa Ldb.* common in the south-east of Kazakhstan

As is known, to store and extend the gene pool of plants having medical or agricultural importance, as well as for genetic monitoring of their natural populations of different methods of genetic marking. RAPD-analysis can serves as a rapid method to identify genetic polymorphisms and genomic labeling in population research. The results showed that each of the analyzed species *Agrimonia L.* are at significant genetic distance (a distance greater than 0,4), which indicates there are significant genetic differences between them. RAPD data analysis showed the presence of high levels of polymorphism within species in different plant populations *Agrimonia asiatica Juz.* and significant differences in their DNA profiles in comparison with other species *Agrimonia pilosa Ldb.* Results of the component composition of isoenzyme markers of different populations of plants *A. asiatica Juz.* and *A. pilosa Ldb.* showed the presence of differences in the component composition of esterase in two plant species that studied.

Key words: *agrimonia l.*, population, rapd-analysis, amplification, primers, genomic dna.

А.Н. Калиева, Г.У. Дюскалиева, А.Ньюсам

Оңтүстік-шығыс Қазақстанда өсетін *Agrimonia asiatica Juz.* өсімдігінің әртүрлі популяциясының және *Agrimonia pilosa Ldb.* өсімдігінің полиморфизмін сараптау

Медицинада немесе ауылшаруашылығында маңызы бар өсімдіктердің генофондын кеңейту және сақтауда, сонымен қатар олардың табиғи популяциясының генетикалық мониторингі үшін генетикалық маркерлеудің түрлі әдістері қолданылады. RAPD – анализ популяциялық зерттеулерде ге-

нетикалық полиморфизм және гендік маркірлеуді айқындаудың бірден-бір әдісі болып табылады. Алынған нәтижелер *Agrimonia* L. әрбір түрінің белгілі генетикалық аралығын көрсетті (аралық 0,4-тен астам), бұл олардың арасында едәуір генетикалық айырмашылықтың барын айғақтайды. RAPD – анализі *Agrimonia asiatica* Juz. өсімдігінің түрлі популяциясының тұраралық полиморфизмінің жоғары деңгейін және *Agrimonia pilosa* Ldb. түрімен салыстырғанда олардың ДНҚ-профилінің едәуір өзгешеліктерін көрсетті. *Agrimonia asiatica* Juz. өсімдігінің түрлі популяциясында және *Agrimonia pilosa* Ldb. өсімдігіндегі изоферменттік маркерлердің компонентті құрамын байқау нәтижелері зерттелген өсімдіктің екі түрінде эстеразаның компонентті құрамында айырмашылық барын көрсетті.

Түйін сөздер: *agrimonia* L., популяция, гард-анализ, амплификация, праймерлер, гендік ДНҚ.

Для практического здравоохранения во всем мире характерен возрастающий интерес к лекарственным средствам растительного происхождения и многовековому опыту их применения в медицине. Лекарственные растения становятся очень популярными во всем мире в качестве пищевых добавок, растительных препаратов и основных источников фармацевтических препаратов. Около 70-80% мирового населения применяет методы традиционной медицины при лечении различных заболеваний и недомоганий [1, 2].

В последние десятилетия в России и за рубежом возрастает интерес к поиску и введению в культуру новых лекарственных растений. Одной из перспективных групп для получения ценного лекарственного сырья является род *Agrimonia* L. [3]. Один из представителей рода *Agrimonia eupatoria* наиболее полно изучен с точки зрения фармакологии. Для медицинских целей используется надземная часть растения, которую заготавливают в начале цветения. В растении содержатся дубильные вещества, эфирное масло, гликозиды, минеральные соли, горечи, следы алкалоидов, флавоноиды, витамины. Включенный в фармакопеи, *A. eupatoria* в течение многих лет используется в научной медицине стран Европы и Северной Америке [4].

Agrimonia pilosa Ldb. является лекарственным растением с противораковыми, антиоксидантное, ингибирующие ацетилхолинэстеразы и противовоспалительной активностью. Некоторые химические исследования показали, что *A. pilosa* Ldb. содержит фенольные соединения, такие, как агримонин, катехин, кверцетин и рутин. *A. pilosa* Ldb. могут быть использованы для улучшения дефицита эстрогена связанных симптомов менопаузы или для лечения заболеваний у женщин в постменопаузы [5].

В Казахстане проводится системная исследовательская работа по инвентаризации видов полезных растений. Определен состав как фармакопейных, так и перспективных видов лекарственных растений и эфиромасленичных видов

состав, утончен и составлен их ареал. Начаты работы и по этноботаническим исследованиям. Эти исследования позволят установить виды растений, применяемые в народной медицине, а затем проводить глубокие научные исследования по выявлению их свойства и возможности их использования [6]. На территории Казахстана растут два вида *Agrimonia* L.- *A. asiatica* Juz., *A. pilosa* Ldb. [7]. В частности, установлено, что в состав *A. asiatica* Juz. входят достаточно в больших количествах дубильные вещества, которые обладают антимикробным и противовоспалительным действием. Также в значительных количествах идентифицированы флавоноиды, которые являются пищевыми антиоксидантами. Получило свое подтверждение и наличие фенолокислот, которые обладают вяжущим действием, что способствует быстрому заживлению ран и язв а также способствуют желчегонному, мочегонному и капилляроукрепляющему действиям. Присутствующие в растении полисахариды обеспечивает иммуномоделирующее действие растения [8].

Целью настоящего исследования является оценки уровня внутривидовых и межвидовых различий природных популяций растений *A. asiatica* Juz. и *A. pilosa* Ldb. с помощью результатов RAPD-маркирования.

Материалы и методы

Образцы растений *Agrimonia asiatica* Juz. собраны из трех различных популяций (1-3), произрастающих на территории с. Кольди (30 км от города Алматы, на высоте 832 м над уровнем моря, Главного ботанического сада (г. Алматы, на высоте 856-906 м над уровнем моря), а также вблизи урочища Бутаковка, соответственно (22 км от города Алматы, на высоте 1870 м над уровнем моря). Тогда как образцы растений популяции вида *Agrimonia pilosa* Ldb. собраны на территории с. Саты (270 км от города Алматы, на высоте 1300 м над уровнем моря).

Выделение тотальной ДНК из растительного материала проводилось по СТАВ (cetyl trimethylammonium bromide) методу [9]. Измерение концентрации выделенной ДНК было проведено спектрометрически на приборе NanoDrop 2000с (Thermo Scientific, США) при длине волны 260 nm. Чистота полученных ДНК-препаратов проверялась на основе соотношения OD260\280 и составляла 1,6–1,9. Кроме того, качество геномной ДНК проверяли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле с дальнейшим окрашиванием в растворе этидиум бромид.

Амплификация геномной ДНК была произведена на термоциклере Eppendorf Mastercycler ep gradient S (Eppendorf North America, Germany) в КазНУ им. аль-Фараби, НИИ Проблем биологии и биотехнологии. Для RAPD-ПЦР анализа были выбраны следующие пять ОРА праймеров: 5'-СТГТАСССССС-3'; 5'-АСГСГССАГГ-3'; 5'-АСТСГГССССС-3'; 5'-ГГССССАТСГ-3' и 5'-АСГСГСГГТС-3'. Реакцию амплификации проводили в реакционной смеси объемом 25 мкл, содержащей 2 мм MgCl₂, 0,2 мм каждого dNTP; 2,5 мкм праймера; 0,625 единиц Taq полимеразы («Thermo scientific», Латвия), 1х буфер из соответствующего набора, и 20 нг геномной ДНК. ПЦР режим состоял из ДНК денатурации в течении 60 сек. при 94°C; а также отжига праймеров – 60 с. при 42°C; синтез ДНК – 90 секунд при 72°C с числом циклов – 30 и предварительной денатурацией – 5 мин (94°C). Заключительный цикл элонгации осуществляли при 72°C – 5 минут. Продукты реакции разделяли электрофорезом в 11% полиакриламидном геле (ПААГ) и фотографировали с помощью профессиональной высокочувствительной геледокументирующей системы Infinity-1500/36M. Размеры амплифицированных фрагментов определяли относительно ДНК-маркера 1 kb Gene Ruler (Thermo scientific, Латвия).

Статистический анализ включал составление бинарных матриц по каждому из праймеров, в которых отмечалось «присутствие» (1) или «отсутствие» (0) фрагментов с одинаковой молекулярной массой на электрофореграмме. Каждый RAPD фрагмент рассматривался как отдельный генетический локус. На основании суммарной матрицы RAPD спектров с помощью компьютерного программного пакета POPGENE версией 1,32 [10] были определены основные показатели генетической структуры популяции: процент полиморфных фрагментов (ППФ), наблюдаемое число аллелей на локус (Ao), эффек-

тивное число аллелей на локус (ne), ожидаемая гетерозиготность (He), и информационный индекс Шеннона [11]. Для анализа взаимоотношений популяций и построения дендрограммы на основе генетических дистанций Нея (D) [12] использовался метод не взвешенного попарного среднего (UPGMA) программой Treeconw.

Для экстракции неспецифичной эстеразы свежую ткань корней растений *A.asiatica Juz.* и *A.pilosa Ldb.* (300мг) гомогенизировали в жидком азоте. Затем проводили экстракцию в экстракционном буфере (600 мкл), содержащем 18% сахарозу, 10 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 40 mM β-меркаптоэтанол. Гомогенат выдерживали при 4°C в течение часа и периодически перемешивали. Для удаления остатков клеточной стенки полученный экстракт центрифугировали при 14 000 об/мин в течение 15 минут. Содержание белка определяли по методу Бредфорда [13].

Разделение изоферментов проводили методом электрофореза в нативных условиях. Активность эстеразы выявляли с помощью инкубирования геля после электрофореза красящим раствором (0,1 М Na-фосфатный буфер pH 6,0, 2,4 М прочно синий РР соль, 0,5 М альфа-нафтилацетат и 0,5 М бэта-нафтилацетат) в течение 4-8 часов до проявления зон активности фермента [14].

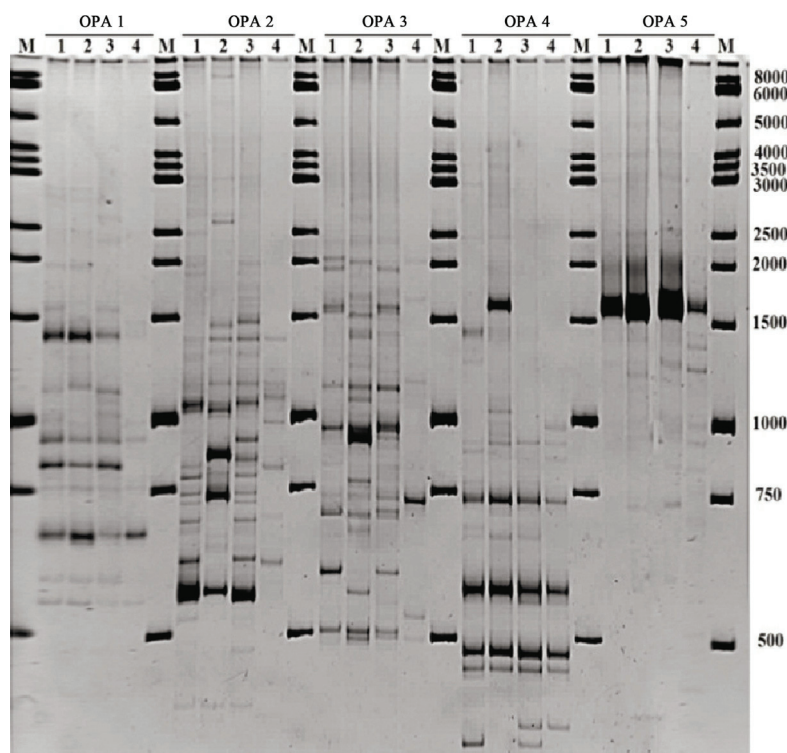
Результаты и их обсуждение

На рисунке 1 представлены ДНК-профили трех различных популяций растений вида *A.asiatica Juz.* (см. 1-3 дорожки), а также одной природной популяции другого вида *A.pilosa Ldb.* (см. на рис. 1, дорожка 4), произрастающих на территории Юго-Восточного Казахстана.

Как видно из рисунка 1, ДНК-профили различных популяций обеих видов растений различались по длине и количеству ПЦР-фрагментов. В результате амплификации пяти ДНК-образцов растений с 5-тью ОРА праймерами получены презентативные фрагменты, длина которых варьировала в пределах от 200 до 3500 п.н. Показано, что у трех популяций вида *A.asiatica Juz.* фрагменты ДНК, полученные с помощью использованных праймеров и имеющие размеры ≤720, 750, 900, 1200 и 1400 п.н., неpolиморфные, в то время как остальные ампликоны характеризовались присутствием или отсутствием в зависимости от ДНК-образца и соответственно могут считаться полимо-

рфными. Данные RAPD-анализа показывают наличие высокого уровня внутривидового полиморфизма у различных популяций растений

A. asiatica Juz. и значительные отличия их ДНК-профилей в сравнении с другим видом *A. pilosa* Ldb.



1 – 3 – ДНК-образцы растений *A. asiatica* Juz., произрастающих на территории с. Колди, Главного ботанического сада (г. Алматы) и вблизи урочища Бутаковка, соответственно; 4 – ДНК-образцы растений *A. pilosa* Ldb., прорастающих на территории с. Саты; М – ДНК-маркер 1 kb GeneRuler

Рисунок 1 – RAPD-паттерны растений вида *A. asiatica* Juz. и *A. pilosa* Ldb.

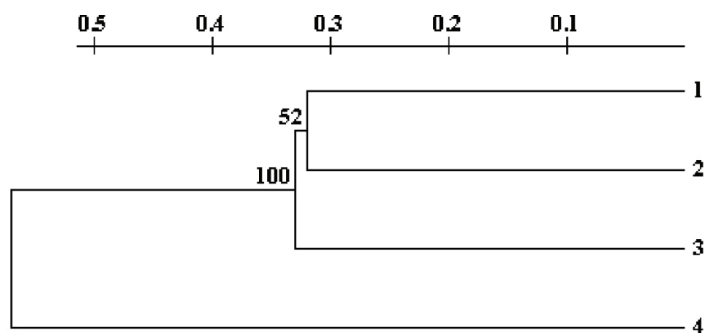
Для оценки уровня внутривидовых и межвидовых различий природных популяций растений *A. asiatica* Juz. и видом *A. pilosa* Ldb. с помощью результатов RAPD-маркирования проведено построение филогенетического дерева, представленного на рисунке 2.

На дендрограмме показано, что каждый из анализируемых видов *Agrimonia* L. находится на значительном генетическом расстоянии (дистанция более 0,4), что свидетельствует о наличии существенных генетических различий между ними. В то время, как на основе RAPD-анализа вычисление генетических дистанций трех популяций одного вида *A. asiatica* Juz. показало различия в пределах 48% с генетическим расстоянием в пределах 0,3-0,33.

Результаты изучения компонентного состава изоферментных маркеров различных популяций растений *A. asiatica* Juz. и *A. pilosa* Ldb. представлены на рисунке 3.

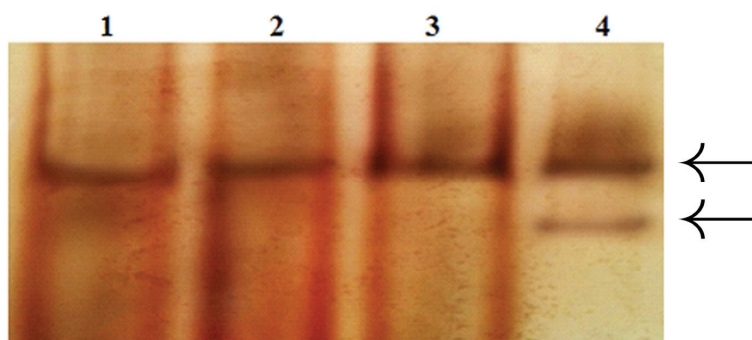
Электрофореграмма показывает наличие различий в компонентном составе эстераз у двух исследуемых видов растений. Так, для всех трех популяций вида *A. asiatica* Juz. было характерно наличие одного бэнда со средней электрофоретической подвижностью, тогда как у растений вида *A. pilosa* Ldb. выявлено два белковых компонента, один из которых является специфичным для обоих видов.

Таким образом, в работе приведены данные ПЦР-анализа с RAPD-праймерами, а также изучен компонентный состав неспецифичной эстеразы различных популяций *A. asiatica* Juz. и *A. pilosa* Ldb.. Если с помощью энзиматического анализа выявлены межвидовые маркеры растений рода *Agrimonia* L., то RAPD-анализ, кроме этого, позволил выявить внутривидовые отличия трех исследуемых популяций вида *A. asiatica* Juz.



1 – 3 – ДНК-образцы растений *A. asiatica* Juz., произрастающих на территории с. Колди, Главного ботанического сада (г. Алматы) и вблизи урочища Бутаковка, соответственно; 4 – ДНК-образцы растений *A. pilosa* Ldb., прорастающих на территории с. Саты.

Рисунок 2 – Дендрограмма, построенная на основе RAPD-профилей популяций *A. asiatica* Juz. и *A. pilosa* Ldb.



1 – 3 – образцы растений *A. asiatica* Juz., произрастающих на территории с. Колди, Главного ботанического сада (г. Алматы) и вблизи урочища Бутаковка, соответственно; 4 – образцы растений *A. pilosa* Ldb., прорастающих на территории с. Саты.

Рисунок 3 – Электрофореграмма компонентного состава неспецифичной эстеразы растений *A. asiatica* Juz. и *A. pilosa* Ldb.

Литература

- 1 Fransworth N.R., Soejarto D.D. Global importance of medicinal plants. In: O., Akerele, V. Heywood, H. Synge, (Eds): The conservation of medicinal plants: proceedings of an international consultation, Chiang Mai, Thailand. – Cambridge University Press, Cambridge, 1991. – P. 25-51.
- 2 Pei S. Ethno botanical approaches of traditional medicine studies: some experiences from Asia. *Pharmaceutical Botany*. -2001 -Vol. 39. PP. 74-79.
- 3 Skalicky V. *Agrimonia* L. *Flora Europaia*. Vol. 2 Cambridge: Cambridge Univ. press, 1968. – P. 32-33.
- 4 Куликова М.В. Лекарственные растения Подмосковья: Интродукционные, экологические и образовательные аспекты: дисс. канд. биол. наук – М., 2001. – 204 с. <http://www.dissercat.com/content/>
- 5 Lee YM, Kim JB, Bae JH, Lee JS, Kim PS, Jang HH, Kim HR. Estrogen-like activity of aqueous extract from *Agrimonia pilosa* Ledeb. in MCF-7 cells. *BMC Complement Altern Med*. 2012 Dec 21;12:260. doi: 10.1186/1472-6882-12-260.
- 6 Байтулин И.О. Тенденции развития в мире ботанической науки, ее состояние и перспективы развития в Казахстане // Ботанические исследования в Казахском Алтае. Сборник материалов Международной конференции, посвященной 70-летию Алтайского ботанического сада и 70-летию Котухова Ю.А. – Алматы, 2005. – С. 6-7.
- 7 Флора Казахстана. – Алма-Ата: Изд. Академии наук Казахской ССР, 1961. – том IY. 548 с.
- 8 Гадецкая А.В. Фармакологические свойства Репешка азиатского (*Agrimonia asiatica* Juss) // III международная конференция: Инновационное развитие и востребованность науки в современном Казахстане. Естественно-технические науки. Сб. статей Межд. Науч. Конф.- Алматы, 2009. – С. 234-235.
- 9 Hewitt, G Doyle J.J. DNA protocols for plants CTAB total DNA isolation. In: M., Johnston, A. (Eds.) // *Molecular Techniques in Taxonomy*. – Springer-Verlag, Berlin, 1991. – P. 283-293.

- 10 Yeh F.C., Boyle T.J. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits //Belg. J. Bot. – 1997. – Vol. 129. – P. 157.
- 11 Lewinton R.C. The apportionment of human diversity //Evol. Biol. – 1972. – Vol. 6. – P. 381-398.
- 12 Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations //Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 1973. – Vol.70. – P. 3321-3323.
- 13 Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding //Anal. Biochem – 1976. – 72:248-254.
- 14 Серов О.Л., Корочкин Л.И., Манченко Г.П. Электрофоретическое методы изучения изоферментов. – М.: Наука, 1986. – 75 с.

References

- 1 Fransworth N.R., Soejarto D.D. Global importance of medicinal plants. In: O., Akerele, V.Heywood, H.Synge, (Eds): The conservation of medicinal plants: proceedings of an international consultation, Chiang Mai, Thailand. – Cambridge University Press, Cambridge, 1991.-P.25-51.
- 2 Pei S. Ethno botanical approaches of traditional medicine studies: some experiences from Asia. Pharmaceutical Botany. – 2001 – Vol.39. – PP.74-79.
- 3 Skalicky V. Agrimonia L. Flora Europaia. Vol. 2 Cambridge: Cambridge Univ. press, 1968. – P. 32-33.
- 4 Kulikova M.V. Lekarstvennye rastenija Podmoskov'ja: Introdukcionnye, jekologicheskie i obrazovatel'nye aspekty. Diss. kand.biol. nauk Moskva. 2001. –204 s. <http://www.dissercat.com/content/>
- 5 Lee YM, Kim JB, Bae JH, Lee JS, Kim PS, Jang HH, Kim HR. Estrogen-like activity of aqueous extract from Agrimonia pilosa Ledeb. in MCF-7 cells. BMC Complement Altern Med. 2012 Dec 21;12:260. doi: 10.1186/1472-6882-12-260.
- 6 Bajtulin I.O. Tendencii razvitija v mire botanicheskoy nauki, ee sostojanie i perspektivy razvitija v Kazahstane //Botanicheskie issledovanija v Kazahskom Altae. Sbornik materialov Mezhdunarodnoj konferencii, posvjashhennoj 70-letiju Altajskogo botanicheskogo sada i 70-letiju Kotuhova Ju.A. –Almaty, 2005. –P.6-7.
- 7 Flora Kazahstana. –Izd. Akademii nauk Kazahskoj SSR. – Alma-Ata. 1961. – tom IY. –548 p.
- 8 Gadeckaja A.V. Farmakologicheskie svojstva Repeshka aziatskogo (Agrimonia asiatica Juss) //III mezhdunarodnaja konferencija: Innovacionnoe razvitie i vostrebovannost' nauki v sovremennom Kazahstane. Estestvenno-tehnicheskie nauki. Sb. statej Mezhd. Nauch. Konf. – Almaty, 2009. –P. 234-235.
- 9 Hewitt, G Doyle J.J. DNA protocols for plants CTAB total DNA isolation. In: M., Johnston, A. (Eds.) // Molecular Techniques in Taxonomy. –Springer-Verlag. – Berlin, 1991. –P. 283-293.
- 10 Yeh F.C., Boyle T.J. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits //Belg. J. Bot. –1997. –Vol. 129. –P. 157.
- 11 Lewinton R.C. The apportionment of human diversity //Evol. Biol. –1972. –Vol. 6. –P. 381-398.
- 12 Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations //Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. –1973. –Vol.70. –P. 3321-3323.
- 13 Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding //Anal. Biochem –1976. – Vol. 72. – P. 248-254.
- 14 Serov O.L., Korochkin L.I., Manchenko G.P. Elektroforeticheskoe metody izuchenija izofermentov. –M.: Nauka, 1986. – 75 p.