

Генотипирование представителей рода *Artemisia*, произрастающих на территории Якутии

Genotyping of representatives of the genus *Artemisia* growing on the territory of Yakutia

Егоров Ю. А.¹, Алаганчакова Л. В.², Заболоцкая А. П.¹, Охлопкова Ж. М.¹

Egorov Y. A.¹, Alaganchakova L. V.², Zabolotskaya A. P.¹, Okhlopkova Z. M.¹

¹ Северо-Восточный федеральный университет, г. Якутск, Россия
E-mails: egorov.y.a@s-vfu.ru; anitazabolotskaya@icloud.com; zh.m.okhlopkova@s-vfu.ru
¹ North-Eastern Federal University, Yakutsk, Russia

² МОБУ «Себян-Кюельская национальная эвенская СОШ», Себян-Кюель, Россия
E-mail: biotechnologyysu@rambler.ru
² MEBI "Sebyan-Kyuel National Even Secondary School", Sebyan-Kyuel, Russia

Реферат. На территории Республики Саха (Якутия) произрастает 22 вида рода *Artemisia* L. (семейство Asteraceae). Генетическое разнообразие и внутривидовые изменения у представителей рода *Artemisia* рассматривают как зависимость от климатических факторов. Целью данного исследования является генотипирование представителей рода *Artemisia*, произрастающих на территории Якутии, с помощью RAPD-анализа. Метод RAPD позволяет эффективно работать с ранее не изученными видами. Рассмотрены и проанализированы образцы ДНК из растительного материала 10 дикорастущих видов *Artemisia*, произрастающих в Центральной (Амгинский, Мегино-Кангаласский районы), Северо-Восточной (Оймяконский район) и Южной Якутии (Олекминский район), и 4 видов, интродуцированных в условиях Ботанического сада СВФУ. Образцы растительного материала были собраны во время стационарно-маршрутных экспедиционных работ в течение 2016–2022 гг. С помощью RAPD-анализа с произвольным праймером в продуктах амплификации обнаружены 101 бенд, большинство из которых полиморфны. Получена первичная дендрограмма с распределением на пять соответствующих кластеров. Получены данные возможного межвидового сходства и полиморфизма среди рассмотренных дикорастущих и интродуцированных видов полыни. Результаты исследования требуют дальнейшей оценки с помощью биоинформационного анализа.

Ключевые слова. Генотипирование, Якутия, *Artemisia*, RAPD, UPGMA.

Summary. On the territory of the Republic of Sakha (Yakutia) there are 22 species of the genus *Artemisia* L. (family Asteraceae). Genetic diversity and intraspecific changes in representatives of the genus *Artemisia* are considered as a dependence on climatic factors. The aim of this study is to genotype representatives of the genus *Artemisia* growing in Yakutia using RAPD analysis. The RAPD method allows it to work effectively with previously unstudied species. DNA samples from plant material of 10 wild species of *Artemisia* growing in Central (Amginsky and Megino-Kangalassky districts), North-Eastern (Oymyakonsky district) and Southern Yakutia (Olekminsky district) and 4 species introduced in the conditions of the Botanical Garden of the North-Eastern Federal University of Yakutia were considered and analyzed. Samples of plant material were collected during stationary-route expeditionary works during 2016–2022. Using RAPD analysis with arbitrary primer, 101 bands, most of which are polymorphic, were detected in the amplification products. A primary dendrogram with distribution into five corresponding clusters was obtained. Data on possible interspecific similarity and polymorphism among the considered wild and introduced species of wormwood were obtained. The results of the study require further evaluation using bioinformatic analysis.

Key words. *Artemisia*, genotyping, RAPD, UPGMA, Yakutia.

Введение. Род *Artemisia* L. (семейство Asteraceae) представлен в основном лекарственными растениями (Badr et al., 2012). На сегодняшний день известно о произрастании около 500 видов полыни в умеренных регионах Австралии, Азии, Европы, Северной Америки и Северной Африки. Во флоре Якутии (северо-восток РФ) насчитывается 22 вида данного рода (Захарова, 2005).

Многие представители рода *Artemisia* обладают антидиабетической (Dabe, Kefale, 2017), антибактериальной, антисептической, гепатопротекторной, противомаларийной, противоопухолевой, противоревматической, спазмолитической (Koul, Taak, 2017; Pandey, Singh, 2017; Mohammed et al., 2021; Hussain et al., 2022), антиоксидантной и цитотоксической активностью (Madhav et al., 2018; Cheraif et al., 2020; Jakovljević et al., 2020; Melguizo-Melguizo et al., 2020). Кроме того, эфирные масла различных видов полыней использовались для пищевой продукции, медицины и косметологии (Kazmi et al., 2022; Bendifallah, Merah, 2023; Naceiri Mrabti et al., 2023).

Таким образом, наличие лечебных и терапевтических свойств у представителей рода *Artemisia* актуализирует на поиск, к примеру, генетической информации. В своих исследованиях группы ученых сообщают о генетическом разнообразии и внутривидовых изменениях у рассмотренных представителей рода в зависимости от климатических факторов (Gaafar et al., 2016; Younsi et al., 2018; Sedibe et al., 2024).

Целью настоящего исследования является генотипирование представителей рода *Artemisia*, произрастающих на территории Якутии, с использованием метода RAPD-анализа.

Материалы и методы. Образцы надземной фитомассы видов *Artemisia*, произрастающих в Якутии, были собраны в zip-файлы с силикагелем во время стационарно-маршрутных полевых работ в 2016–2022 гг. на территории Амгинского, Мегино-Кангаласского, Оймяконского и Олекминского районов, а также видов растений, интродуцированных на территории Якутского ботанического сада СВФУ (ЯБС СВФУ). Подробная информация о рассматриваемых видах приведена в таблице 1.

Выделение геномной ДНК. ДНК выделяли из 20 мг высушенного образца с помощью набора GeneJET Plant Genomic DNA purification Mini Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Выделенная этим набором ДНК обладает высокой чистотой и стабильным качеством. Выделенные образцы геномной ДНК хранились в лабораторном морозильнике при $-38\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Качественный и количественный анализ ДНК. Качественное определение выделенных образцов ДНК проводили на спектрофотометре SPECTROstar Omega (BMG LABTECH, Германия) на микропланшете LVsplate. Количественно выделенную ДНК анализировали на флуориметре Qubit 2.0 (Invitrogen, США).

RAPD-анализ. При RAPD-ПЦР основную роль играют подбор произвольного праймера, оптимальной программы амплификации и состава ПЦР-смеси. После нескольких предварительных испытаний нами был подобран праймер с произвольной нуклеотидной последовательностью: 5'-3' GTTTCGCTCC. ПЦР проводили на термоциклере C1000TM Thermal Cycler (BioRad, США), придерживаясь реакционных условий и температурных режимов. Рабочая ПЦР-смесь общим объемом 25 мкл содержала 12 мкл реакционной смеси (BioLabMix, РФ), 1 мкл праймера, 1 мкл матрицы ДНК, 11 мкл стерильной бидистиллированной воды. Отрицательный контроль содержал 12 мкл реакционной смеси, 1 мкл праймера, 12 мкл стерильной бидистиллированной воды. Режим ПЦР включал 5 мин предварительной денатурации при $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 сек денатурации при $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ (40 циклов), 30 сек отжига при $27\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 мин удлинения при $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ и 5 мин финального удлинения при $72\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Гель-электрофорез и кластерный анализ. Продукты амплификации разделяли с помощью электрофореза на 1,5%-м агарозном геле в течение 110 мин при 70В с окрашиванием бромистым этидием (Wolfe, Liston, 1998). Электрофоретические данные анализировали в гель-документирующей системе GelDoc XR (Bio-Rad, США). В качестве стандарта использовали линейку маркеров молекулярных весов ДНК от 100 до 3 т. п. н. (BioLabMix, РФ).

В работе использован метод анализа средних связей (UPGMA, Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Данный метод является популярным алгоритмом иерархической кластеризации. Для начала кластеризации файл с генетическими данными в формате FASTA был загружен в биоинформатическое программное обеспечение PyElph 1.4 для группировки рассматриваемых образцов представителей рода *Artemisia* и для построения дендрограммы генетического сходства (Pavel, Vasile, 2012).

Результаты и обсуждение. Всего было рассмотрено 10 видов дикорастущих и 4 вида интродуцированных полыней. Качественные и количественные характеристики отобранных для исследования образцов ДНК представлены в таблице 1.

Характеристика образцов ДНК, выделенных из надземной фитомассы представителей рода *Artemisia* L., произрастающих в Якутии

№	Видовое название растения	Происхождение	Дата сбора	Место сбора	А 260/280	Концентрация, в нг/мл
1	<i>Artemisia jacutica</i> Drobow	Дик.	02.07.2019	Оймяконский р-н, окр. с. Оймякон	1,8	560
2	<i>Artemisia vulgaris</i> L.	Дик.	25.06.2019	Амгинский р-н, Болугурский наслег, окр. уч. Сырдык	1,92	<600
3	<i>Artemisia leucophylla</i> Turcx. ex Besser	Дик.	12.07.2019	Оймяконский р-н, окр. с. Оймякон	1,78	<600
4	<i>Artemisia leucophylla</i> Turcx. ex Besser	Дик.	12.07.2019	Оймяконский р-н, окр. с. Оймякон	1,79	<600
5	<i>Artemisia commutata</i> Besser	Дик.	01.08.2021	Мегино-Кангаласский р-н, Батаринский наслег, окр. уч. Тылба	1,8	<600
6	<i>Artemisia macrantha</i> Ledeb.	Дик.	01.08.2021	Мегино-Кангаласский р-н, Батаринский наслег, окр. уч. Тылба	1,72	<600
7	<i>Artemisia commutata</i> Besser	Дик.	01.08.2021	Мегино-Кангаласский р-н, Батаринский наслег, окр. уч. Тылба	1,81	<600
8	<i>Artemisia dracunculus</i> L.	Дик.	01.08.2021	Мегино-Кангаласский р-н, Батаринский наслег, окр. уч. Тылба	1,77	<600
9	<i>Artemisia macrantha</i> Ledeb.	Дик.	01.08.2021	Мегино-Кангаласский р-н, Батаринский наслег, окр. уч. Тылба	1,79	<600
10	<i>Artemisia santolinifolia</i> Turcz. ex Bess. (корень)	Дик.	04.08.2016	Олекминский р-н., окр. с. Бэс-Кеюль, каменистый берег р. Чара	1,8	309
11	<i>Artemisia santolinifolia</i> Turcz. ex Bess.	Дик.	25.06.2019	Амгинский р-н, Болугурский наслег, окр. уч. Сырдык	1,75	<600
12	<i>Artemisia santolinifolia</i> Turcz. ex Bess.	Дик.	01.07.2017	Амгинский р-н, Болугурский наслег, окр. уч. Сырдык	1,77	<600
13	<i>Artemisia santolinifolia</i> Turcz. ex Bess.	Интр.	16.09.2020	ЯБС СВФУ	1,81	<600
14	<i>Artemisia kruhsiana</i> Besser s. l.	Дик.	15.07.2017	Оймяконский р-н, берег р. Кюбеме	1,81	<600
15	<i>Artemisia kruhsiana</i> Besser s. l.	Дик.	13.07.2017	Оймяконский р-н, берег р. Кюбеме	1,79	<600
16	<i>Artemisia borealis</i> Pall.	Дик.	14.07.2017	Оймяконский р-н, в 30 км от уч. Кюбеме (Мертвое озеро)	1,76	<600
17	<i>Artemisia sieversiana</i> Ehrh. ex Willd.	Дик.	15.07.2017	Оймяконский р-н, окр. уч. Кюбеме	1,81	<600
18	<i>Artemisia frigida</i> Willd.	Интр.	16.09.2020	ЯБС СВФУ	1,76	<600
19	<i>Artemisia gmelinii</i> Weber ex Stechm.	Интр.	16.09.2020	ЯБС СВФУ	1,80	<600
20	<i>Artemisia martjanovii</i> Krasch. ex Poljakov	Интр.	17.07.2022	ЯБС СВФУ	1,82	<600

Примеч.: дик. – дикорастущий вид; интр. – интродуцированный вид.

Продукты амплификации были рассмотрены в программе гель-документирующей системы, где были выявлены соответствующие бенды. Использованным праймером был проявлен 101 бенд, из которых 97,02 % были полиморфные. Размер ампликонов, согласно линейке маркеров молекулярного веса ДНК, варьировал от 400 п. н. до 1800 п. н. (рис. 1).

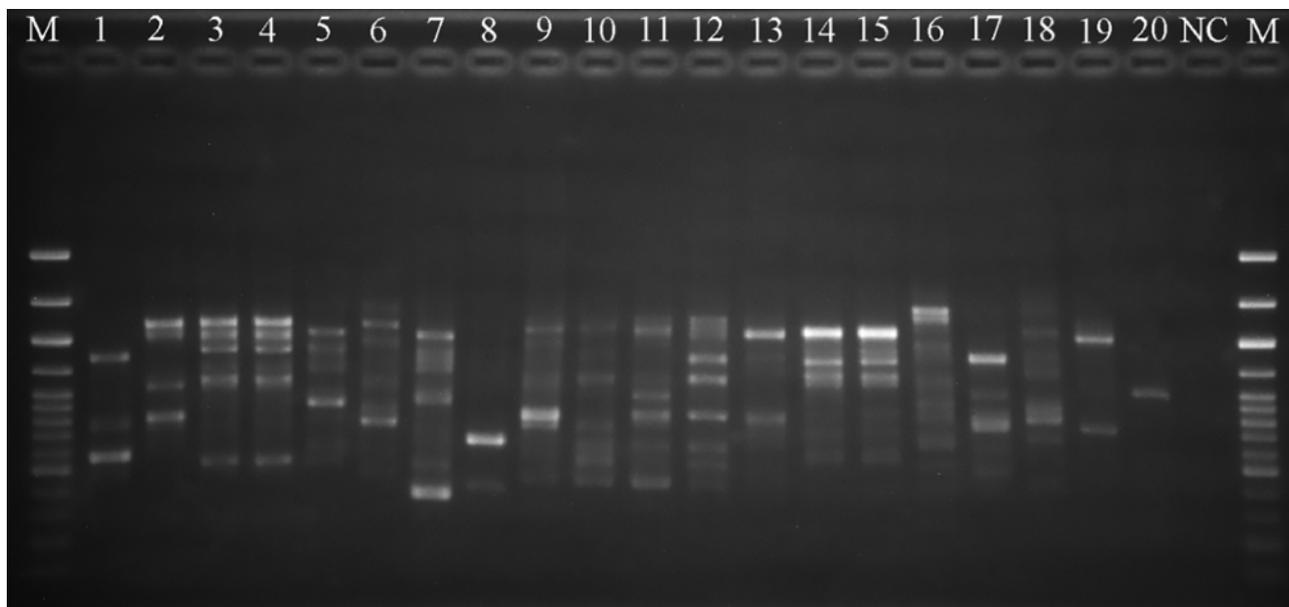


Рис. 1. Электрофореграмма ПЦР-продуктов представителей рода *Artemisia*, полученных с использованием праймера (5'-3'GTTTCGCTCC), в 1,5%-м агарозном геле: М – линейка маркеров молекулярных весов ДНК от 100 до 3000 п. н.; 1–20 – образцы *Artemisia* (наименование образцов по табл. 1); NC – «отрицательный» контроль.

Полученные результаты RAPD-анализа были вложены в программу для построения дендрограммы, где выявили пять кластеров (рис. 2). В первый кластер (1) вошел образец, полученный из полыни Мартъянова (№ 20), которая интродуцирована в условиях ЯБС СВФУ. Во второй кластер (2) вошел образец из полыни эстрагон (№ 8), данный вид произрастает в условиях Центральной Якутии (Мегино-Кангаласский район). Третий кластер (3) включил три подкластера (3а, 3б, 3с). В подкластер 3а вошли образцы, полученные из полыни крупноцветковой (№ 6), дикорастущей в условиях Центральной Якутии (Мегино-Кангаласский район), и полыни Гмелина (№ 19), интродуцированной в условиях ЯБС СВФУ. В подкластер 3б вошел образец из полыни якутской (№ 1), дикорастущей в условиях Северо-Восточной Якутии (Оймяконский р-н). В подкластер 3с вошли образцы из полыни крупноцветковой (№ 9), дикорастущей в условиях Центральной Якутии (Мегино-Кангаласский р-н), и из полыни Сиверса (№ 17), дикорастущей в условиях Северо-Восточной Якутии (Оймяконский р-н). Четвертый кластер (4) дендрограммы состоял из 4 подкластеров (4а, 4б, 4с, 4д). В подкластер 4а вошли образцы из полыни Крузе (№№ 14, 15), дикорастущих в условиях Северо-Восточной Якутии (Оймяконский р-н). В подкластер 4б вошли образцы из полыни обыкновенной (№ 2), дикорастущей в Центральной Якутии (Амгинский р-н), и из полыни сантолинолистной (№ 13), интродуцированной в условиях ЯБС СВФУ. В подкластер 4с вошли образцы из полыни сантолинолистной (№№ 11, 12), дикорастущих в условиях Центральной Якутии (Амгинский р-н). В подкластер 4д вошли образцы из полыни белолистной (№№ 3, 4), дикорастущих в условиях Северо-Восточной Якутии (Оймяконский р-н), а также из полыни замещающей (№ 7), дикорастущей в условиях Центральной Якутии (Мегино-Кангаласский р-н). Пятый кластер (5) состоял из образца полыни северной (№ 16), дикорастущей в условиях Северо-Восточной Якутии (Оймяконский р-н), а также включал два подкластера (5а, 5б). В подкластер 5а вошел образец из полыни замещающей (№ 5), дикорастущей в условиях Центральной Якутии (Мегино-Кангаласский р-н). В подкластер 5б вошли образцы из полыни сантолинолистной (№ 10), дикорастущей в условиях Южной Якутии (Олекминский р-н), и из полыни холодной (№ 18), интродуцированной в условиях ЯБС СВФУ.

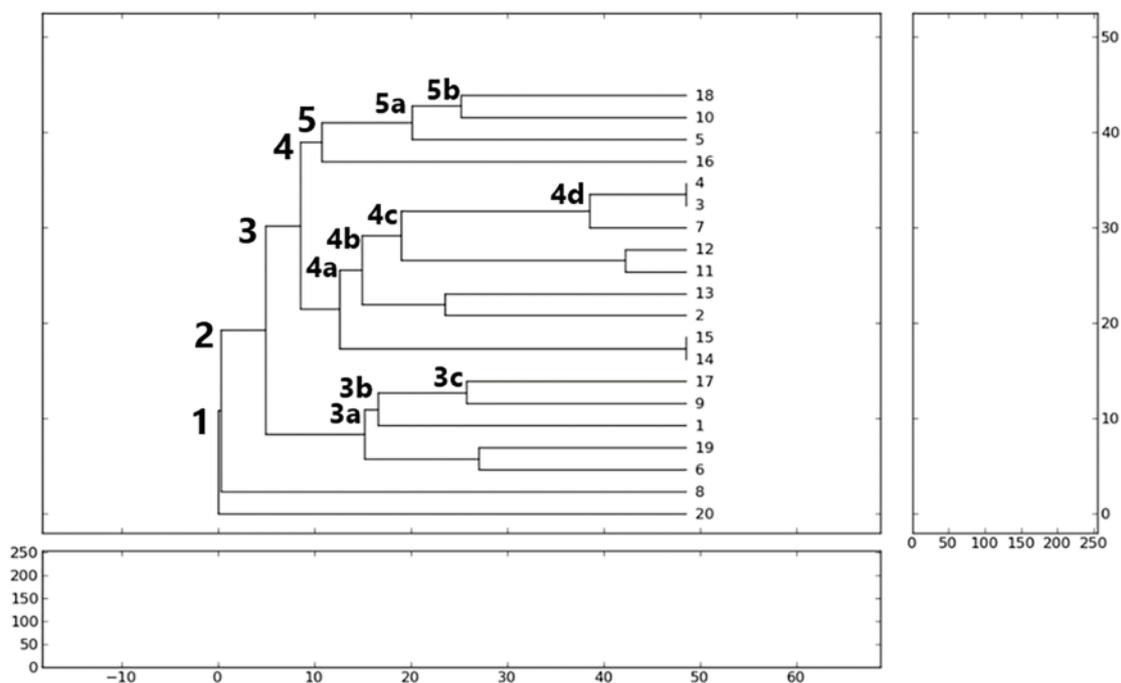


Рис. 2. Первичная дендрограмма (UPGMA), построенная по результатам электрофоретического разделения амплифицированных фрагментов образцов ДНК, выделенных из растительного материала представителей рода *Artemisia*, произрастающих в Якутии.

Дендрограмма сгруппировала такие виды, как полынь якутская и полынь Сиверса, произрастающих на территории Оймяконского района, в один кластер (3), но с некоторым разделением на близкородственные подкластеры, как 3b и 3c. Это еще раз говорит об открытости вопроса по таксономической классификации указанных видов. Также следует отметить, что представитель реликтовой флоры, один из редких видов Якутии, как полынь Мартыанова (Красная книга РС(Я), 2017), находится в достаточном отдалении от остальных выявленных кластеров.

Заключение. С помощью RAPD-анализа получена первичная дендрограмма с распределением на пять соответствующих кластеров представителей рода *Artemisia*, произрастающих на территории Якутии. Рассмотрены и проанализированы образцы ДНК из растительного материала 10 дикорастущих видов и 4 интродуцированных видов *Artemisia*. Метод RAPD позволяет эффективно работать с ранее неизученными видами. Получены данные возможного межвидового сходства и полиморфизма среди рассмотренных дикорастущих и интродуцированных видов полыни. Результаты данного исследования требуют дальнейшей оценки с помощью биоинформационного анализа.

Благодарности. Авторы выражают признательность г. н. с. ИБПК СО РАН, д. б. н. Николину Е. Г. за консультацию и содействие при выполнении настоящего исследования.

Финансирование. Исследование выполнено в Северо-Восточном федеральном университете за счет гранта Российского научного фонда № 22-14-20031 (<https://rscf.ru/project/22-14-20031/>).

ЛИТЕРАТУРА

- Захарова В. И.** Разнообразие растительного мира Якутии. – Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2005. – 328 с.
- Красная книга Республики Саха (Якутия)*. Т. 1: Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды растений и грибов / Отв. ред. Н. С. Данилова. – М.: Изд-во «Репарт», 2017. – 412 с.
- Badr A., El-Shazly H. H., Helail N. S., Ghanim W.** Genetic diversity of *Artemisia* populations in central and north Saudi Arabia based on morphological variation and RAPD polymorphism // *Plant Systemat. Evol.*, 2012. – Vol. 298. – P. 871–886. DOI: 10.1007/s00606-012-0597-5
- Bendifallah L., Merah O.** Phytochemical and biocidal properties of *Artemisia campestris* subsp. *campestris* L. (Asteraceae) essential oil at the southern region of Algeria // *Journal of Natural Pesticide Research*, 2023. – Vol. 4. – 100035. DOI: 10.1016/j.napere.2023.100035
- Cheraif K., Bakchiche B., Gherib A., Bardaweel S. K., Çol Ayyaz M., Flamini G., Ascrizzi R., Ghareeb M. A.** Chemical composition, antioxidant, anti-tyrosinase, anti-cholinesterase and cytotoxic activities of essential oils of six Algerian plants // *Molecules*, 2020. – Vol. 25. – P. 1710. DOI: 10.3390/molecules25071710

- Dabe N. E., Kefale A. T.** Antidiabetic effects of *Artemisia* species: a systematic review // *Anc. Sci. Life*, 2017. – Vol. 36. – P. 175–181. DOI: 10.4103/asl.ASL_87_17
- Gaafar R.-M., Hamouda M.-M., Sayed Ahmed H. I., El-Shazly H. I., Badr A.** Genetic differentiation in the medicinal plant *Artemisia judaica* L. populations in Saint-Catherine area, South Sinai, Egypt // *Plant Gene*, 2017. – Vol. 12. – P. 80–87. DOI: 10.1016/j.plgene.2017.08.004
- Hussain A., Sajid M., Rasheed H., Hassan M., Khan M. A., Bokhari S. A. I.** Phytochemistry and antibacterial efficacy of Northeastern Pakistani *Artemisia rutifolia* Stephan ex Spreng. extracts against some clinical and phyto-pathogenic bacterial strains // *Acta Pharm. Sci.*, 2022. – Vol. 60. – P. 247–271. DOI: 10.23893/1307-2080.APS.6017
- Jakovljević M. R., Grujić D., Vukajlović J. T., Marković A., Milutinović M., Stanković M., Vuković N., Vukić M., Milošević-Djordjević O.** In vitro study of genotoxic and cytotoxic activities of methanol extracts of *Artemisia vulgaris* L. and *Artemisia alba* Turra // *South Afr. J. Bot.*, 2020. – Vol. 132. – P. 117–126. DOI: 10.1016/j.sajb.2020.04.016.
- Kazmi S. T. B., Naz I., Zahra S. S., Nasar H., Fatima H., Shuja Farooq A., Ihsan-ul Haq I.** Phytochemical analysis and comprehensive evaluation of pharmacological potential of *Artemisia brevifolia* Wall. ex DC. // *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2022. – Vol. 30(6). – P. 793–814. DOI: 10.1016/j.jsps.2022.03.012.
- Koul B., Taak P.** The *Artemisia* genus: A review on traditional uses, phytochemical constituents, pharmacological properties and germplasm conservation // *J. Glycom. Lipido*, 2017. – Vol. 7. – P. 142. DOI: 10.4172/2153-0637.1000142
- Madhav K., Kunal M., Zafar H., Ujjwal B., Gaurav N.** Antioxidant analysis of essential oils and methanolic extracts of *Artemisia vulgaris* // *Int. J. Agric. Sci.*, 2018. – Vol. 10. – P. 5710–5713.
- Melguizo-Melguizo D., Diaz-de-Cerio E., Quirantes-Piné R., Švarc-Gajić J., Segura-Carretero A.** The potential of *Artemisia vulgaris* leaves as a source of antioxidant phenolic compounds // *J. Funct. Foods*, 2020. – Vol. 5. – P. 192–200. DOI: 10.1016/j.jff.2014.05.019
- Mohammed M. J., Anand U., Altemimi A. B., Tripathi V., Guo Y., Pratap-Singh A.** Phenolic composition, antioxidant capacity and antibacterial activity of white wormwood (*Artemisia herba-alba*) // *Plants*, 2021. – Vol. 10. – P. 164. DOI: 10.3390/plants10010164
- Naceiri Mrabti H., El Hachlafi N., Al-Mijalli S. M., Jeddi M., Elbouzidi A., Abdallah E. M., Flouchi R., Assaggaf H., Qasem A., Zengin G., Bouyahya A., Ouazzani Chahdi F.** Phytochemical profile, assessment of antimicrobial and antioxidant properties of essential oils of *Artemisia herba-alba* Asso., and *Artemisia dracunculoides* L.: Experimental and computational approaches // *Journal of Molecular Structure*, 2023. – Vol. 1294(1). – P. 136479. DOI: 10.1016/j.molstruc.2023.136479
- Pandey A. K., Singh P.** The genus *Artemisia*: a 2012–2017 literature review on chemical composition, antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities of essential oils // *Medicines*, 2017. – Vol. 4. – P. 68. DOI: 10.3390/medicines4030068
- Pavel A. B., Vasile C. I.** PyElph – a software tool for gel images analysis and phylogenetics // *BMC Bioinformatics*, 2012. – Vol. 13(9). DOI: 10.1186/1471-2105-13-9
- Sedibe M. M., Rafiri M. A., Dikane G. M. H., Achilonu M. C., Nkosi S. M., Ngubane V. X., Pierneef R.** Diversity analysis of southern African *Artemisia afra* using a single nucleotide polymorphism derived from diversity arrays // *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2024. – Vol. 38. – P. 100523. DOI: 10.1016/j.jarmap.2023.100523
- Wolfe A. D., Liston A.** Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology // *Molecular Systematics of Plants II*, 1998. – P. 43–86. DOI: 10.1007/978-1-4615-5419-6_2
- Younsi F., Rahali N., Mehdi S., Boussaid M., Messaoud C.** Relationship between chemotypic and genetic diversity of natural populations of *Artemisia herba-alba* Asso growing wild in Tunisia // *Phytochemistry*, 2018. – Vol. 148. – P. 48–56. DOI: 10.1016/j.phytochem.2018.01.014