

УДК 575.2+58.009 (470.67)

DOI: 10.33580/24092444\_2024\_2\_46

## Генетическая изменчивость шиповника острозубого (*Rosa oxyodon*) по ISSR-маркерам

Б. А. Рамазанова✉

Горный ботанический сад – ОП ДФИЦ РАН, Махачкала, Россия

✉baizana@mail.ru

Поступила в редакцию / Received: 29.10.2024

После рецензирования / Revised: 14.11.2024

Принята к публикации / Accepted: 03.12.2024

**Резюме:** На практике тяжело отличить близкие виды друг от друга, что, как правило, связано с высоким внутривидовым полиморфизмом. Целью данной работы является оценка изменчивости видов *R. oxyodon*, *R. prokhanovii* и *R. sosnovskyana*. На первом этапе было проанализировано 42 морфологических признака. Эти же образцы были изучены в отношении полиморфизма ISSR маркеров и изменчивости хлоропластного спейсера *trnL-trnF*. Анализ морфологических признаков *R. oxyodon*, *R. prokhanovii* и *R. sosnovskyana* методом главных координат показал невозможность их строгой дифференциации, как самостоятельных и равнозначных видов. Такой же результат получен при анализе полиморфизма 115 ISSR маркеров. Данные по изменчивости хлоропластного спейсера *trnL-trnF* вышеназванных видов также показывали, что существующий полиморфизм не связан с разделением на три вида.

**Ключевые слова:** изменчивость, ISSR-маркеры, хлоропластный спейсер *trnL-trnF*, шиповник.

**Для цитирования:** Рамазанова Б. А. Генетическая изменчивость шиповника острозубого (*Rosa oxyodon*) по ISSR-маркерам. *Ботанический вестник Северного Кавказа*, 2024, 2: 46–56.

## Genetic variability of wild rose (*Rosa oxyodon*) by ISSR-markers

B. A. Ramazanova✉

Mountain Botanical Garden of the DFRC RAS, Makhachkala, Russia

✉baizana@mail.ru

**Abstract:** In practice, it is difficult to distinguish closely related species from each other, which is usually associated with high intraspecific polymorphism. The aim of this work is to assess the variability of the species *R. oxyodon*, *R. prokhanovii* and *R. sosnovskyana*. At the first stage, 42 morphological characters were analyzed. The same samples were studied in relation to the polymorphism of ISSR markers and the variability of the chloroplast spacer *trnL-trnF*. Analysis of the morphological characters of *R. oxyodon*, *R. prokhanovii* and *R. sosnovskyana* by the principal coordinates method showed the impossibility of their strict differentiation as independent and equivalent species. The same result was obtained when analyzing the polymorphism of 115 ISSR markers. Data on the variability of the chloroplast spacer *trnL-trnF* of the above-mentioned species also showed that the existing polymorphism is not associated with division into three species.

**Keywords:** variability, ISSR markers, chloroplast spacer *trnL-trnF*, rose hip.

**For citation:** Ramazanova B. A. Genetic variability of wild rose (*Rosa oxyodon*) by ISSR-markers. *Botanical Journal of the North Caucasus*, 2024, 2: 46–56.

## Введение

«Каждое растение, с которым имеет дело исследователь, должно быть определено с точностью до вида, а во многих случаях даже точнее» (Таhtadzhyuan, 1974). Но на практике порой тяжело отличить близкие виды друг от друга. Как правило, это связано с высоким внутривидовым полиморфизмом. Все это в полной мере можно отнести к близким по родству видам *Rosa oxyodon* Boiss., *R. prokhanovii* Galushko и *R. sosnovskyana* Tamamsch. (Buzunova, Kamelin, 2004). Надежная идентификация этих видов затруднена из-за значительной изменчивости диагностических морфологических признаков – железисто-щетинистого опушения цветоножек, формы плодов, формы, размеров и расположения шипов, считающихся диагностическими признаками. Чем больше образцов вышеназванных видов попадает в поле зрения, тем сильнее размываются границы между ними.

В связи с этим нами была предпринята попытка изучить изменчивость *R. oxyodon*, *R. prokhanovii* и *R. sosnovskyana* по ISSR-маркерам. ISSR-маркеры основаны на межмикросателлитных повторах. Микросателлиты представляют собой очень короткие последовательности ДНК, которые являются гиперполиморфными и выражены как различные варианты в пределах популяции одного вида и среди различных видов (Kusev, 2009). К основным свойствам ISSR относятся относительно высокая точность и воспроизводимость (Neve, Meglecz, 2000; Kalendar', Glazko, 2002; Kusev, 2009). В целом, этот

метод успешно используется для выявления меж- и внутривидовой изменчивости. При помощи ISSR-метода показан генетический полиморфизм *Prunus armeniaca* L. (Kumar et al, 2009; Li et al, 2013; Zahid NabiSheikh et al., 2021); *Linum usitatissimum* L., *Trollius europaeus* L., *Calluna vulgaris* L., *Polypodium vulgare* L. (Grushechkaya i dr., 2013); *Rosa gallica* L. (Fedorova, 2014); *Tulipa gesneriana* L. (Kashin, Kurickaya, Shancer, 2016); *Descurainia Sophia* L. (Saki et al., 2016); *Rosa damascene* Mill. (Tharwat Redwan at al., 2018); *Prunus avium* L., *P. cerasus* L., *P. mahaleb* L., *P. incana* Pall., *P. microcarpa* Boiss., *P. brachypetala* Boiss. (Shahi-Gharahlar, 2020); *Punica granatum* L. (Gadzhieva, 2020).

Цель данной работы – оценка изменчивости *R. oxyodon*, *R. prokhanovii* и *R. sosnovskyana*.

## Материал и методика

Материалом для исследования полиморфизма ДНК и использования ISSR-маркеров послужили сборы *R. oxyodon*, *R. prokhanovii* и *R. sosnovskyana* сделанные во Внутреннегорном и Высокогорном Дагестане. Объем выборки составил 69 образцов. С каждого растения брался гербарный образец с цветками или плодами. Также в работе были использованы образцы *R. oxyodon* Гербария ГБС РАН из разных точек Северного Кавказа и Закавказья (табл. 1). Все использованные в работе образцы, хранятся в гербарии Горного ботанического сада ДФИЦ РАН, Главного ботанического сада РАН и в личной коллекции автора.

Таблица 1 / Table 1

Образцы *Rosa oxyodon*, использованные для исследования полиморфизма ДНК  
Samples used for DNA polymorphism studies

Обозначение образцов Designation of samples	Происхождение образца Sample origin
C1, C2, C3	Левашинский р-н, окр. с. Цудахар, высота 1100 м
GP1, GP2, GP3, GP4, GP5, GP6	Гунибский р-н, окр. с. Гуниб, высота 1700 м
DM1, Dm3, Dm5, DM6, DM7, DM8	Гергебельский р-н, окр. с. Дарада-Мурада, высота 1400 м
B-or	Гунибский р-н, Бец-Ор, высота 1300 м
B81, B153, B154, B155	Чародинский р-н, окр. с. Бацада, высота 1200 м
Ch01, Ch02, Ch210, Ch211, Ch213	Чародинский р-н, окр. с. Чарода, высота 1425 м
GU1, GU2	Чародинский р-н, окр. с. Гунух, высота 1900 м
KD1, KD2	Чародинский р-н, Карахская дача, высота 2060 м
T161, T164, T165, T166, T167, T169	Чародинский р-н, окр. с. Тлималало, высота 1480 м
S179, S180, S183, S184, S185, S186	Чародинский р-н, окр. с. Сумета, высота 1711 м
U190, U192, U193, U195, U198, U199, U200, U202, U203, U204, U206	Чародинский р-н, окр. с. Урух-Сота, высота 1820 м

Uh01, Uh02, Uh03, Uh04, Uh05,	Шамильский р-н, окр. с. Урчух, высота 1650 м
SV1, SV2	Цумадинский р-н, окр. станции Сулак Высокорный, высота 2000 м
MNA12	Унцукульский р-н, окр. с. Унцукуль, высота 1970 м
MNA13	Акушинский р-н, окр. с. Балхар, высота 1800 м
MNA14	Гунибский р-н, Гуниб. плато, 1600 м
MNA15	Акушинский р-н, окр. с. Бутри, высота 2000 м
MNA17	Лакский р-н, ур. Ухракаду
MNA18	Граница с Чечней, пер. Харамы, высота 1800 м
MNA19	Акушинский р-н, окр. с. Гапшима, высота 1600 м
MNA20	Гунибский р-н, окр. с. Гуниб, высота 1800 м
MNA21	Северная Осетия, Цей, Сказское ущелье, высота 2200 м
MNA22	Северная Осетия, Главный кавказский хребет, Цей, под скалой "Монах", высота 1900 м
MNA23	Северная Осетия, Цей, Сказский ледник
MNA24	р. Подкумок, 43-й км тр. Кисловодск-Карачаевск, высота 1600 м
MNA25	Северная Осетия, Главный кавказский хребет, Цей, под скалой "Монах", высота 1900 м
MNA26	Закалальский заповедник, ур. Ах-Кимал, с.-в. склон, высота 1750 м
MNA27	Северная Осетия, Алагирский р-н, Цей, ущелье реки Саз
MNA28	Кабардино-Балкария, окр. Нальчика
MNA29	долина Цейдон, буково-сосновый лес

#### Методика изучения полиморфизма ДНК с использованием ISSR-маркеров

Видовая принадлежность определялась по А.И. Галушко «Флора Северного Кавказа» (1980), И.О. Бузуновой, Р.В. Камелину «Виды рода *Rosa* L. (*Rosaceae*) секции *Cinnamomeae* DC. во флоре Кавказа» (2004). Собранные экземпляры были определены как *R. oxyodon*. Часть образцов, однако, по существующим ключам не удалось определить с полной однозначностью из-за несоответствия наблюдаемых сочетаний морфологических признаков приводимым в ключах. Растения были определены, как *R. prokhanovii* и *R. sosnovskyana*:

*R. cf. prokhanovii* – GP3, DM6, Ch211, T161, T169, S186, U190;

*R. cf. sosnovskyana* – C1, DM5, DM8, B153, B154, Ch210, GU2, S180, U200.

На первом этапе у всех образцов было изучено 44 морфологических признака: высота куста (см); наличие шипов; форма шипов; расположение шипов; опушение листочка простыми волосками снизу; железистость листочка снизу; опушение листочка простыми волосками сверху; железистость листочка сверху; длина листочка (мм); ширина листочка (мм); отношение единицы к ширине листочка; длина листочка до положения максимальной ширины (мм); отношение единицы к положению максимальной ширины; характер зубчатости края концевой листочка непарноперистого листа; длина

внутренней стороны зубца посередине края листочка (мм); длина внешней стороны зубца (мм); длина от основания листочка по 1-го зубца (мм); отношение единицы к длине от основания до первого зубца; отношение длины листочка к положению первого зубца; отношение единицы к длине внутренней стороны зубца; отношение длины внешней стороны зубца к длине внутренней стороны; число зубцов вдоль края концевой листочка листа; отношение единицы к числу зубцов; отношение длины листочка к числу зубцов; максимальное число железок на 1мм зубца; рассеченность чашелистиков; цвет лепестков; длина цветоножки (мм); железистость цветоножки; сохранность чашелистиков при зрелых плодах; положение чашелистиков при плодах; цвет плода; длина плода (мм); ширина плода (мм); отношение единицы к ширине плода; отношение длины плода к ширине; железистость гипантия; отношение единицы к длине плода; отношение длины цветоножки к длине плода; максимальное число цветков в соцветии; плоды на более-менее или явно поникающих плодоножках.

Для отбора количественных признаков, значимых для разделения образцов, применялся метод множественного сравнения средних – тест Тьюки для неравных групп. Затем матрицы по отобраным признакам анализировались методом главных координат в программе PAST (Hammer et al., 2001).

*ISSR-маркирование генома*

Выделение ДНК из высушенных листьев проводили СТАВ-методом (Doyle, Doyle, 1987). Для изучения полиморфизма ДНК были использованы 8 праймеров (табл. 2).

**Таблица 2 / Table 2**

Последовательности использованных в работе ISSR праймеров (Y= T C (пиримидины), R= G A (пурины))  
Sequences of the ISSR primers used in the work (Y= T C (pyrimidines), R=G A (purines))

Последовательности использованных в работе ISSR праймеров Sequences of used ISSR primers	Название праймера Name of primer	Последовательность праймера Sequence of primer
1	M1	((AC)8CG)
2	M2	((AC)8C/TG)
3	M3	(GA)8YC
4	M4	((AG)8C/TG)
5	M8	(GTG)5
6	M9	(GACAC)4
7	UBC840	(GAG)5AAAT
8	UBC855	ACA CAC ACA CAC ACA CCA

В качестве праймеров были использованы олигонуклеотидные последовательности, комплементарные микросателлитным повторам. Праймеры были отобраны после предварительного скрининга.

Реакционная смесь (20 мкл) содержала 1мкл ДНК, 20 пикомолей праймера и 4 мкл готового реакционного микса MaGMix (200 μM каждого dNTP, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,5 U SmarTaq ДНК-полимеразы и реакционный буфер; Диалат Лтд., Москва, Россия). ПЦР с предварительной денатурацией (95°C, 3 мин) проводили в амплификаторе MJ Research PTC-220 DNA Engine Dryad Thermal Cycler (BioRad Laboratories, США) в течение 35 циклов в режиме: денатурация при 94°C – 30 с, отжиг при соответствующей температуре – 30 с, элонгация при 72°C – 40 с + прибавление 2 с на каждый цикл. Разделение ПЦР-продуктов проводили с помощью электрофореза в 1,7% агарозном (Amresco Inc., США) геле в 0,5-крантном трис-боратном буфере с окрашиванием бромидом этидия (0,5 мкг/мл) при 90В и фотографировали с помощью гель-документирующей системы Gel DocIt (UVP, США). Полученные фото-

графии гелей анализировали в программе Cross Checker 2.91 (Buntjer, 2000). В результате анализа была получена бинарная матрица присутствия/отсутствия фрагментов одинаковой длины, которая подвергалась дальнейшему анализу.

Матрица, построенная по молекулярным данным, была предварительно проанализирована в Microsoft Excel, а затем методом главных координат в программе PAST (Hammer et al., 2001).

Анализ популяционной структуры и оценку вероятности гибридной природы образцов проводили методом Байеса в программах STRUCTURE 2.2 (Pritchard, Stephens, Donnelly, 2000; Falush et al., 2007) и NewHybrids (Anderson, Thompson, 2002).

*Методика анализа хлоропластной ДНК*

У 44 исследованных образцов *R. oxyodon* s.l., 30 образцов *R. majalis* и 2 образцов *R. donetzica* (образцы с территории европейской части России из Гербария ГБС РАН, МНА) была секвенирована последовательность хлоропластного межгенного спейсера *trnL-trnF*. Для этого использовали праймеры e и f (Taberlet et al., 1991), синтезированные в ПКЗАО «Синтол» (Москва). Реакционная смесь (20 мкл) содержала 1мкл ДНК, 10 пикомолей праймера и 4 мкл готового реакционного микса. ПЦР с предварительной денатурацией (95°C, 3 мин) проводили в амплификаторе MJ Research PTC-220 DNA Engine Dryad Thermal Cycler (BioRad Laboratories, США) в течение 35 циклов в режиме: денатурация при 94°C – 30 с, отжиг при температуре 59,8°C – 30 с, элонгация при 72°C – 40 с + прибавление 2 с на каждый цикл. Секвенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3730 Applied Biosystems на базе ПКЗАО «Синтол». Полученные последовательности размещены в базе данных Genbank под номерами JQ281909–JQ281995.

*Анализ данных*

Секвенированные последовательности хлоропластного спейсера *trnL-trnF* были выровнены вручную в программе BioEdit v7.0.5 (Hall, 1999). Анализ данных проводили ме-

тодом статистической парсимонии (Templeton et al., 1992), реализованном в программе TCS v. 1.21 (Clement et al., 2000), которая строит неориентированную сеть гаплотипов. Внутренние гаплотипы сети являются более древними, концевые – более молодыми и производными от внутренних.

Молекулярные исследования проводились в Главном ботаническом саду им. Н.В. Цицина РАН (г. Москва).

### Результаты и их обсуждение

На первом этапе было проведено определение собранных гербарных образцов по ключу, предложенному И. О. Бузуновой и Р. В. Камелиным в статье «Виды рода *Rosa* L. (*Rosaceae*) секции *Cinnamomeae* DC. во флоре Кавказа» (2004). В итоге собранные образцы были сгруппированы в соответствии с полученными видовыми определениями:

*R. oxyodon* – C2, C3, GP1, GP2, GP4, GP5, GP6, DM1, DM2, DM4, DM7, B-or1, B81, B155, Ch213, GU1, KD1, KD3, T164, T165, T166, T167, S179, S183, S184, S185, U192, U193, U195, U198, U199, U202, U203, U204, U206, Uh02, Uh03, Uh04, MHA13, MHA14, MHA15;

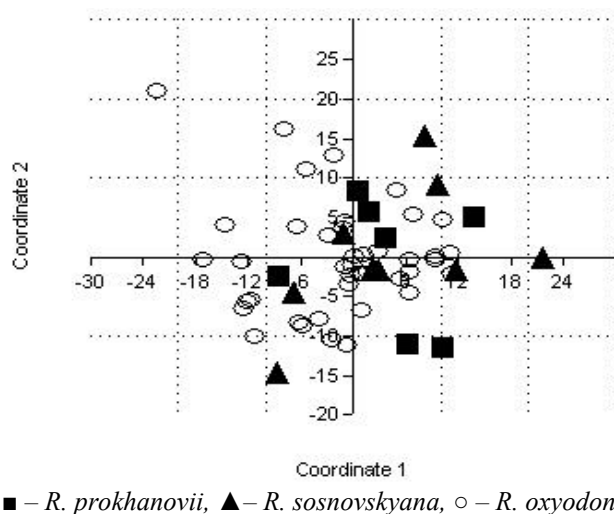
*R. prokhanovii* – GP3, DM6, Ch211, T161, T169, S186, U190;

*R. sosnovskyana* – C1, DM5, DM8, B153, B154, Ch210, GU2, S180, U200.

У всех образцов было изучено 42 морфологических признака: 11 количественных и 31 качественный признак. Результаты анализа методом главных координат по всем учтенным признакам показаны на рисунке 1. Так как в анализ были включены как количественные, так и качественные признаки, использовалась дистанция Говера.

Как видно из диаграммы разброса (рис. 1), все выделенные на основании определения по ключу в работе И.О. Бузуновой и Р.В. Камелина (2004) группы полностью перекрываются. Первые три координаты описывают 29,4%, 20,9% и 12,7% расстояний соответственно. Аналогичную картину мы получаем при использовании только количественных признаков в анализе методом главных координат. Они никак не сказываются на разделении групп. Анализ, проведенный только по качественным признакам с использованием дистанции Хамминга,

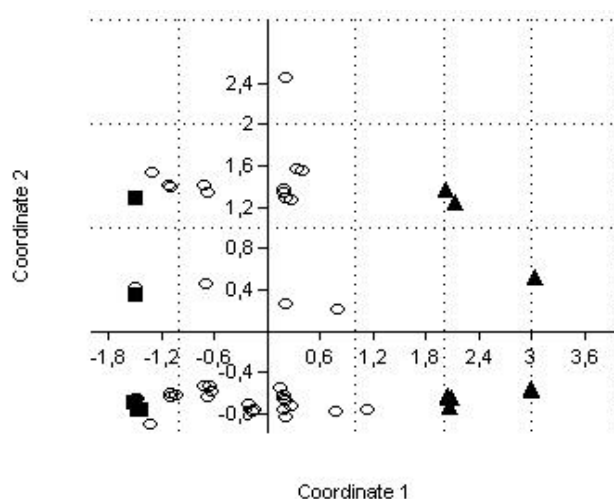
позволяет разделить исследованные образцы на две группы (рис. 2).



■ – *R. prokhanovii*, ▲ – *R. sosnovskyana*, ○ – *R. oxyodon*

**Рис. 1.** Результаты анализа методом главных координат по 42 морфологическим признакам для 57 образцов с использованием дистанции Говера.

**Fig. 1.** Results of the principal coordinates analysis for 42 morphological features for 57 samples using the Gower distance.



■ – *R. prokhanovii*, ▲ – *R. sosnovskyana*, ○ – *R. oxyodon*

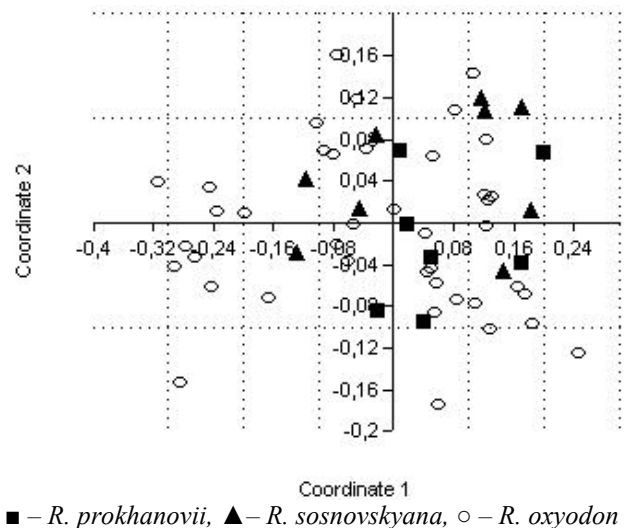
**Рис. 2.** Результаты анализа методом главных координат по качественным признакам для 57 образцов с использованием дистанции Хамминга.

**Fig. 1.** Results of the principal coordinates analysis for qualitative features for 57 samples using the Hamming distance.

Как видно из диаграммы разброса (рис. 2), выделяется группа *R. sosnovskyana*, в то время как *R. prokhanovii* и *R. oxyodon* частично перекрываются. *R. sosnovskyana* отличается от двух других видов вверх направленными, рассеянными по стеблю шипами, и густо железисто-щетинистыми плодоножками и плодами.

Эти же образцы были изучены в отношении полиморфизма ISSR маркеров. В результате реакций, проведенных с 8 праймерами, было получено 115 маркеров, которые оказались потенциально информативными, т.е. ни один маркер не встречался у всех без исключения образцов. Анализ матрицы присутствия/отсутствия ампликонов одинаковой длины методом главных координат в программе PAST с использованием дистанции Жаккара (рис. 3) показывает, что разделение видов *R. sosnovskyana*, *R. prokhanovii* и *R. oxyodon* по молекулярно-генетическим маркерам невозможно. *R. sosnovskyana* и *R. prokhanovii* в своем распределении оказываются в области рассеивания *R. oxyodon*.

Результаты прямого подсчета ампликонов для отдельных видов (*R. sosnovskyana*, *R. prokhanovi*, *R. oxyodon*) приведены в таблице 3.



**Рис 3.** Результаты анализа методом главных координат по 115 ISSR маркерам для 57 образцов.  
**Fig. 3.** Results of the principal coordinates analysis for 115 ISSR markers for 57 samples.

**Таблица 3 / Table 3**

Число ампликонов у образцов *R. sosnovskyana*, *R. prokhanovii* и *R. oxyodon*  
Number of amplicons in *R. sosnovskyana*, *R. prokhanovii* and *R. oxyodon*

	<i>R. sosnovskyana</i>	<i>R. prokhanovii</i>	<i>R. oxyodon</i>
Общее число ISSR ампликонов в пределах группы Total number of ISSR amplicons within a group	101	98	114
Полиморфных в пределах выборки Polymorphic within the sample	94	85	114
Характерных / Typical	1	0	9
Специфических / Specific	0	0	0

При подсчете учитывались маркеры специфические и характерные для отдельных выборок. Специфическими считались такие маркеры, которые присутствовали у всех образцов анализируемой группы и отсутствовали у всех образцов других групп. Маркеры, присутствовавшие у всех образцов анализируемой группы, но отсутствовавшие в других группах, считались характерными. Как видно из таблицы 3 один характерный маркер при-

сутствует в группе *R. sosnovskyana*, 9 – в группе *R. oxyodon* и 0 – в группе *R. prokhanovii*. При этом ни одна из групп не обладает специфическими маркерами.

Анализ в программе Structure 2.2 методом Байеса в двух повторностях дал следующие значения логарифма апостериорной вероятности  $\ln P(D)$  для априорно заданных значений  $K$  – числа генетических групп (табл. 4).

**Таблица 4 / Table 4**

Значения логарифма апостериорной вероятности  $\ln P(D)$   
Values of the logarithm of the posterior probability  $\ln P(D)$

Число генетических групп, $K$ Number of genetic groups, $K$	1	2	3	4
$\ln P(D)$	-4781,8	-4396,1	-4394,6	-4673,5

Максимальное значение логарифма апостериорной вероятности было получено для числа групп  $K=3$ , то есть с максимальной вероятностью данные образцы могут быть раз-

делены на три группы. Для  $K=3$  вероятностью больше 0,95% характеризуются лишь небольшое количество образцов: Uh-03; U-206; U-202; U-193; S-184; S-185; S-180; T-169;

T-165. Остальные образцы имеют генетически смешанную природу. Для генетических групп был проведен подсчет ISSR маркеров (табл. 5).

**Таблица 5 / Table 5**

Число ампликонов у изученных образцов *R. oxyodon*  
Number of amplicons in the studied *R. oxyodon* samples

	I	II	III
Общее число ISSR ампликонов в пределах группы / Total number of ISSR amplicons within a group	57	53	113
Полиморфных в пределах выборки / Polymorphic within the sample	30	52	93
Характерных / Typical	0	1	24
Специфических / Specific	0	0	0

Подсчет ISSR маркеров показал, что у всех групп отсутствуют специфические маркеры. Характерные маркеры присутствуют во II группе – 1 и в III – 24. В I группе характерные маркеры отсутствуют. Все группы достаточно полиморфны и не коррелируют с разделением на виды по морфологическим признакам.

Наличие мономорфных специфических маркеров в группах, классифицированных по морфологическим данным, или полученных в результате разделения на генетические группы по итогам программы Structure 2.2, характеризовало бы их как отдельные виды. Отсутствие мономорфных специфических ампликонов характеризует *R. oxyodon* как единый полиморфный вид.

Общая длина выравнивания секвенированной последовательности хлоропластного спейсера *trnL-trnF* составила 293 позиции. Анализ этих данных для 41 образца *R. oxyodon* s.l. в программе TCS выявил у исследованных образцов 4 гаплотипа, которым были даны следующие обозначения: P\_A (*R. pendulina*, гаплотип A); M\_1 (*R. majalis*, гаплотип 1), который отличается от P\_A 5 мутациями; Oх\_1 (*R. oxyodon*, гаплотип 1), отличающийся от M\_1 четырьмя мутациями; и Oх\_2 (*R. oxyodon*, гаплотип 2), отличающийся от P\_A одной мутацией. Наиболее многочисленным из них является гаплотип P\_A, который включает 30 исследованных образцов, затем гаплотип M\_1 – 8 и два гаплотипа – Oх\_1, Oх\_2 – представлены единичными образца-

ми. В качестве внешних групп были использованы 30 образцов *R. majalis* Herrm. и 45 образцов *R. pendulina* L., взятые из работы Tomáš Fèr & al. (2007). Распределение гаплотипов среди изученных образцов, показано в таблице 6.

**Таблица 6 / Table 6**

Распределение гаплотипов среди изученных образцов  
Distribution of haplotypes among the studied samples

	P A	M 1	Ox 1	Ox 2
предполагаемые виды / expected species				
<i>R. sosnovskyana</i>	7	1	-	-
<i>R. prokhanovii</i>	5	1	1	-
<i>R. oxyodon</i>	18	6	-	1
генетические группы при K=3 genetic groups at K=3				
I	1	-	-	-
II	1	1	-	1
III	11	3	-	-

Таким образом, анализ морфологических признаков не позволяет строго дифференцировать виды *R. sosnovskyana*, *R. prokhanovii* и *R. oxyodon*. Использованные нами качественные признаки могут лишь частично разграничить виды *R. sosnovskyana* и *R. oxyodon*, количественные же признаки не сказываются на разделении групп. Такой же результат мы получили в результате анализа полиморфизма 115 ISSR-маркеров методом главных координат. При подсчете числа маркеров с учетом специфических и характерных ни одна из генетических групп, полученных при K=3, и ни один из предполагаемых видов не обнаружили специфических маркеров. Использование данных по изменчивости хлоропластного спейсера *trnL-trnF* (табл. 6) показывают, что существующий полиморфизм не связан с разделением на три вида. В противном случае для каждого из трех видов был бы характерен один специфичный гаплотип.

Как известно из литературных источников и собственных исследований, *R. oxyodon* представляет собой перекрестно-опыляемый самонесовместимый вид (Kolobov, 1985, Vuzunova, Kamelin, 2004, Ramazanova, 2012). Полиморфизм в популяциях таких растений широко распространен и обеспечивает большую экологическую пластичность вида (Zavadskiy, 1968; Grant, 1983). Эти данные позволяют сделать следующий вывод о том,

что *R. oxyodon* представляет собой один полиморфный вид. Сходные результаты были получены И.А. Шанцером и В.Н. Войлоковой (2008) для евразийского вида секции *Cinnamomeae R. majalis* на территории Европейской части России.

### Заключение

Анализ морфологических признаков *R. oxyodon*, *R. prokhanovii* и *R. sosnovskyana* методом главных координат показал невозможность их строгой дифференциации, как самостоятельных и равнозначных видов. Такой же результат получен при анализе полиморфизма 115 ISSR маркеров. Их прямой подсчет в группах, классифицированных по морфологическим данным, и в генетических группах по итогам программы Structure 2.2 показал отсутствие специфических марке-

ров. Данные по изменчивости хлоропластного спейсера *trnL-trnF* также показывают, что существующий полиморфизм не связан с разделением на три вида. Полученные результаты не дают оснований для выделения *R. prokhanovii* и *R. sosnovskyana* в качестве самостоятельных видов и, вероятно, представляют *R. oxyodon*, как один морфологически полиморфный вид, довольно широко представленный на Кавказе.

### Благодарности

Автор выражает признательность и глубокую благодарность И. А. Шанцеру, познакомившему меня с молекулярно-генетическими методами и З. М. Асадулаеву за помощь на всех этапах, полезные советы и замечания.

### Литература

- Anderson E. C., Thompson E. A. 2002. *A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data*. *Genetics* 160: 1217–1229.
- Buntjer J. B. 2000. Cross Checker: computer assisted scoring of genetic AFLP data. *Plant & Animal Genome VIII Conference*. San Diego: 945–959.
- [Buzunova] Бузунова И. О., Камелин Р. В. 2004. Виды рода *Rosa* L. (*Rosaceae*) секции *Cinnamomeae* DC. во флоре Кавказа. *Новости систематики высших растений* 36: 112–122.
- Clement M., Posada D., Crandall K. A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657–1659.
- Doyle J. J., Doyle J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: P. 11–15.
- Falush D., Stephens M., Pritchard J. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molec. Ecol. Notes* 7: 574–578.
- [Fedorova] Федорова А. В. 2014. *Систематика и география видов рода Rosa L. секц. Galliscanae DC*. Автореферат. дис. ... канд. биол. наук. Москва: 21с.
- [Gadzhieva] Гаджиева С. В. 2020. Изучение генетического разнообразия генотипов дикого граната (*Punica granatum* L.) Азербайджана с использованием маркеров ISSR. *Вестник КрасГАУ* 3: 20–28.
- [Grant] Грант В. 1984. *Видообразование у растений*. Москва: 528 с.
- [Grusheckaia] Грушецкая З. Е., Никитинская Т. В., Кубрак С. В., Дзюбан О. В., Кухарева Л. В., Поликсенова В. Д., Титок В. В., Лемеш В. А., Парфенов В. И., Хотылева Л. В. 2012. Использование ISSR-анализа для изучения внутри- и межвидового генетического полиморфизма различных таксонов высших растений. *Вестник БГУ* 3: 50–56.
- Hall A. T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Oxford University Press. Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
- Hammer O., Harper D.A.T., Ryan P. D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica* 1: 49.
- [Kalendar'] Календарь Р. Н., Глазко В. И. 2002. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение. *Физиология и биохимия культурных растений* 4: 279–293.
- [Kashin] Кашин А. С., Крицкая Т. А., Шанцер И. А. 2016. Генетический полиморфизм *Tulipa gesneriana* L. по данным ISSR маркирования. *Генетика* 10: 1134–1145.



- [Kolobov] Колобов Е. С. *Шиповники Дагестана*. 1985. Автореф. дис. ... канд. биолог. наук. Москва: 11 с.
- [Kucev] Куцев Г. М. 2009. *Фрагментарный анализ ДНК растений: RAPD, DAF, ISSR*. Барнаул: 164 с.
- Kumar M., Mishra G. P., Singh R., Kumar J., Naik P. K., Singh S. B. 2009. Correspondence of ISSR and RAPD markers for comparative analysis of genetic diversity among different apricot genotypes from cold arid deserts of trans-Himalayas. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 3: 225–236.
- Neve G., Meglecz E. 2000. Microsatellite frequencies in different taxa. *Trends in Ecology & Evolution* 15: 3321–3323.
- [Ramazanova] Рамазанова Б. А. 2012. *Структура, ресурсный потенциал дагестанских популяций и филогенетические связи шиповника острозубого (*Rosa oxyodon* Boiss.)*. Автореф. дис. ... канд. биолог. наук. Ставрополь: 20 с.
- Saki S., Bagheri H., Deljou A., Zeinalabedini M. 2016. Evaluation of genetic diversity amongst *Descurainia sophia* L. genotypes by inter-simple sequence repeat (ISSR) marker. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 22: 97–105.
- Shahi-Gharahlar A., Zamani Z., Fatahi R., Bouzari N. 2011. Estimation of genetic diversity in some Iranian wild *Prunus* subgenus *Cerasus* accessions using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Biochem Syst Ecol* 4–6: 826–833.
- [Shancer] Шанцер И. А., Войлокова В. Н. 2008. Сколько видов, родственных *Rosa majalis*, растет в Европейской части России? *Ботанический журнал* 93: 1690–1704.
- Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105–1109.
- [Tahtadzhyan] Тахтаджян А. Л. *Жизнь растений*. Т. 1. 1974. М.: 49–57.
- Templenton A. R., Crandall K. A., Sing C. F. 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data III. Cladogram estimation. *Genetics* 132: 619–633.
- Tharwat R., Mazen N., Hafez M. 2018. Genetic Diversity of *Rosa Damascena* Mill. in Latakia Province as Reveled by ISSR Analysis. *SSRG International Journal of Agriculture & Environmental Science* 6: 18–22.
- Zahid N. S., Vikas S., Rafiq A. S., Neha S., Baby S., Fahad A., Hamed A., Javid I. M. 2021. Genetic diversity analysis and population structure in apricot (*Prunus armeniaca* L.) grown under north-western Himalayas using ISSR markers. *Saudi Journal of Biological Sciences* 10: 5986–5992.
- [Zavadskiy] Завадский К.М. 1968. *Вид и видообразование*. Л: 404 с.

## References

- Anderson E. C., Thompson E. A. 2002. A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. *Genetics* 160: 1217–1229.
- Buntjer J. B. 2000. Cross Checker: computer assisted scoring of genetic AFLP data. *Plant & Animal Genome VIII Conference*. San Diego: 945–959.
- Buzunova I. O., Kamelin R. V. 2004. Species of the genus *Rosa* L. (Rosaceae) section *Cinnamomeae* DC. in the flora of the Caucasus. *Novosti Sistematiki Vysshikh Rastenii* 36: 112–122. (In Russ.).
- Clement M., Posada D., Crandall K. A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657–1659.
- Doyle J. J., Doyle J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: P. 11–15.
- Falush D., Stephens M., Pritchard J. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molec. Ecol. Notes* 7: 574–578.

- Fedorova A. V. 2014. *Sistematika i geografiya vidov roda Rosa L. sekc. Gallicanae DC* [Taxonomy and geography of species of the genus *Rosa* L. section *Gallicanae* DC. Abstr. Cand. Diss.]. Moscow: 21 p. (In Russ.).
- Gadzhieva S. V. 2020. Diversity of Wild Pomegranate (*Punica granatum* L.) Genotypes in Azerbaijan Using ISSR Markers. *Vestnik KrasSAU* 3: 20–28.
- Grant V. 1984. *Vidoobrazovanie u rastenij*. [Speciation in plants]. Moscow: 528 p. (In Russ.).
- Grusheckaya Z. E., Nikitinskaya T. V., Kubrak S. V., Dzyuban O. V., Kukhareva L. V., Poliksenova V. D., Titok V. V., Lemesh V. A., Parfenov V. I., Khotyleva L. V. 20012. Using ISSR analysis to study intra- and interspecific genetic polymorphism of different taxa of higher plants. *Vestnik BGU* 3: 50–56. (In Russ.).
- Hall A. T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Oxford Unifersity Press. Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
- Hammer O., Harper D.A.T., Ryan P. D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica* 1: 49.
- Kalendar R. N., Glazko V. I. 2002. Types of molecular genetic markers and their application. *Fiziologiya i biohimiya kul'turnyh rastenij* 4: 279–293. (In Russ.).
- Kashin A. S., Kritskaya T. A., Shantzer I. A. 2016. Genetic polymorphism of *Tulipa gesneriana* L. according to ISSR labeling data. *Genetika* 10: 1134–1145. (In Russ.).
- Kolobov E.S. *Rose hips of Dagestan*. Avtoref. Cand. Diss. [Shipovniki Dagestana. Abstr. Cand. Diss.] 1985. Moscow: 11 p. (In Russ.).
- Kumar M., Mishra G. P., Singh R., Kumar J., Naik P. K., Singh S. B. 2009. Correspondence of ISSR and RAPD markers for comparative analysis of genetic diversity among different apricot genotypes from cold arid deserts of trans-Himalayas. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 3: 225–236.
- Kutsev G. M. 2009. *Fragmentarnyj analiz DNK rastenij: RAPD, DAF, ISSR*. [Fragmentary analysis of plant DNA: RAPD, DAF, ISSR]. Barnaul: 164 p. (In Russ.).
- Neve G., Meglecz E. 2000. Microsatellite frequencies in different taxa. *Trends in Ecology & Evolution* 15: 3321–3323.
- Ramazanova B. A. 2012. *Struktura, resursnyj potencial dagestanskih populyacij i filogeneticheskie svyazi shipovnika ostrozubogo (Rosa oxyodon Boiss.)*. [Structure, resource potential of Dagestan populations and phylogenetic relationships of *Rosa oxyodon* Boiss. Abstr. Cand. Diss.]. Stavropol: 20 p. (In Russ.).
- Saki S., Bagheri H., Deljou A., Zeinalabedini M. 2016. Evaluation of genetic diversity amongst *Descurainia sophia* L. genotypes by inter-simple sequence repeat (ISSR) marker. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 22: 97–105.
- Shahi-Gharahlar A., Zamani Z., Fatahi R., Bouzari N. 2011. Estimation of genetic diversity in some Iranian wild *Prunus* subgenus *Cerasus* accessions using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Biochem Syst Ecol* 4–6: 826–833.
- Shancer I. A., Voilokova V. N. 2008. How many species related to *Rosa majalis* grow in the European part of Russia? *Botanicheskii zhurnal* 93: 1690–1704. (In Russ.).
- Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105–1109.
- Tahtadzhyan A. L. *Zhizn' rastenij*. [Life of Plants]. Vol. 1. 1974. Moscow: 49–57. (In Russ.).
- Templenton A. R., Crandall K. A., Sing C. F. 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data III. Cladogram estimation. *Genetics* 132: 619–633.
- Tharwat R., Mazen N., Hafez M. 2018. Genetic Diversity of *Rosa Damascena* Mill. in Latakia Province as Reveled by ISSR Analysis. *SSRG International Journal of Agriculture & Environmental Science* 6: 18–22.
- Zahid N. S., Vikas S., Rafiq A. S., Neha S., Baby S., Fahad A., Hamed A., Javid I. M. 2021. Genetic diversity analysis and population structure in apricot (*Prunus armeniaca* L.) grown under

north-western Himalayas using ISSR markers. *Saudi Journal of Biological Sciences* 10: 5986–5992.

Zavadskiy K. M. 1968. *Vid i vidoobrazovanie*. [Species and Speciation]. L: 404 p. (In Russ.).

#### **Информация об авторах**

**Рамазанова Байзанат Абакаровна**, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник Лаборатории интродукции и генетических ресурсов древесных растений Горного ботанического сада ДФИЦ РАН; Россия, 367000, г. Махачкала, ул. М. Гаджиева, 45; ✉[baizana@mail.ru](mailto:baizana@mail.ru)

#### **Information about the authors**

**Ramazanova Bayzanat Abakarovna**, Candidate of Biology, Junior researcher of the Laboratory of introduction and genetic resources of woody plants of the Mountain Botanical Garden of Dagestan Federal Research centre, Russian academy of sciences; Russia, 367000, Makhachkala, M. Gadzhieva St., 45; ✉[baizana@mail.ru](mailto:baizana@mail.ru)