



Оценка генетического полиморфизма образцов рода облепихи (*Hippophae* L.) различного эколого-географического происхождения посредством ISSR-маркеров

А.Я. Земцова¹✉, Ю.А. Зубарев¹, А.В. Гунин¹, М.С. Иванова²

¹ Научно-исследовательский институт садоводства Сибири им. М.А. Лисавенко, Барнаул, Россия

² Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия

Облепиха, несмотря на всю ее популярность, не является массовым объектом генетических исследований. Предпринятые рядом зарубежных авторов попытки генотипирования этой культуры относятся исключительно к крупным систематическим группам – видам и подвидам. Вместе с тем чрезвычайно актуальным представляется изучение внутривидового генетического разнообразия облепихи *Hippophae rhamnoides* ssp. *mongolica*, произрастающей в Сибири, что обусловлено наличием большого количества так называемых экотипов, приуроченных к различным эколого-географическим провинциям. Отсутствие проверенной и отработанной методики определения структуры генома сибирской облепихи усложняет обозначенную задачу. В этой связи целью настоящего исследования была отработка методики ISSR-анализа применительно к образцам облепихи, произрастающим в условиях Сибири, а также предварительная оценка генетического полиморфизма сортообразцов облепихи различной популяционно-систематической принадлежности посредством методов молекулярного маркирования. В результате проведенных исследований отработана методика ISSR-анализа для облепихи, произрастающей в Сибири. Из 32 протестированных ISSR-маркеров выявлены шесть эффективных для анализа полиморфизма ISSR-локусов облепихи. Установлена оптимальная температура отжига для каждого праймера. Выполнен анализ полиморфизма ISSR-маркеров и генетического разнообразия 17 сортообразцов облепихи коллекции НИИ садоводства Сибири. Анализ ISSR-спектров растений облепихи выявил 56 амплифицированных фрагментов ДНК, из которых 36 были полиморфными. На основе полученных данных построена дендрограмма генетического сходства исследуемого материала, где растения одного сорта образуют один кластер и которая в целом согласуется с представлениями, согласно которым вид разделяется на подвиды, а подвид – на разные экотипы. По результатам кластерного анализа исследуемые образцы разделились на две группы: первая – относящиеся к *H. rhamnoides* ssp. *mongolica*, *H. rhamnoides* ssp. *rhamnoides* и *H. rhamnoides* ssp. *caucasica*; вторая – сортообразцы дунайского и ютландского экотипов, относящиеся к *H. rhamnoides* ssp. *carpatica*. Вхождение *H. rhamnoides* ssp. *rhamnoides* и *H. rhamnoides* ssp. *caucasica* в первую группу позволяет предполагать их более близкое генетическое родство с *H. rhamnoides* ssp. *mongolica*, что подтверждается схожими морфологическими особенностями. Полученные данные в части выявленного полиморфизма ISSR-локусов, а также результаты кластерного анализа позволяют рекомендовать ISSR-анализ для установления систематической принадлежности и генотипирования образцов облепихи.

Ключевые слова: облепиха; систематика; полиморфизм ДНК; ISSR-анализ.

Assessment of genetic polymorphism in sea buckthorn (*Hippophae* L.) of different environmentally-geographical origin by ISSR-markers

A.Y. Zemtsova¹✉, Y.A. Zubarev¹, A.V. Gunin¹, M.S. Ivanova²

¹ Lisavenko Research Institute of Horticulture for Siberia, Barnaul, Russia

² Altai State University, Barnaul, Russia

Sea buckthorn, despite of high popularity at the moment, is not a common object of genetic researches. Some efforts of foreign scientists in this field are concerned with only big systematic groups like species and subspecies. At the same time genetic researches inside of subspecies *mongolica* growing in Siberia till recently have not been started. There are too many so called ecotypes of sea buckthorn belonging to *Hippophae rhamnoides* ssp. *mongolica* growing in different environmentally-geographical areas. That is why the task of deep genetic research of that subspecies is very important. The absence of an approved procedure of genome definition for Siberian sea buckthorn makes the above task quite complicated. That is why the main aim of the current investigation was developing a procedure of ISSR-analysis for sea buckthorn growing in Siberia, as well as preliminary estimation of genetic polymorphism of sea buckthorn varieties belonging to different environmentally-geographical areas by methods of molecular markers. As a result, the procedure of ISSR-analysis for sea buckthorn growing in Siberia has been developed. From 32 estimated ISSR-markers only 6 have been educed as effective for ISSR-locus polymorphism evaluation of sea buckthorn. The annealing temperature for each primer has been found. Analyses of ISSR-markers polymorphism as well as genetic diversity of 17 sea buckthorn varieties have been done. ISSR-spectrum analyses of sea buckthorn plants have educed 56 amplified DNA fragments, 36 of them were polymorphic. According to obtained data a dendrogram of genetic affinity of evaluated varieties has been built, where one variety generates one cluster. In general, it conforms to the idea that one species is divided into subspecies and one subspecies is divided into different ecotypes. As a result of cluster



analyses all investigated varieties were divided into two big groups. The first includes varieties belonging to *H. rhamnoides* ssp. *mongolica*, *H. rhamnoides* ssp. *rhamnoides*, *H. rhamnoides* ssp. *caucasica*; the second includes Danube and Yutlandian ecotypes belonging to *H. rhamnoides* ssp. *carpatica*. The occurrence of *H. rhamnoides* ssp. *rhamnoides* and *H. rhamnoides* ssp. *caucasica* inside the first group allows us to make an assumption about their closer genetic relationship with *H. rhamnoides* ssp. *mongolica*, which is consistent with their similar morphological features. Revealed ISSR-locus polymorphism as well as the results of clusters analyses allows ISSR-analyses to be recommended for sea buckthorn variability evaluation as well as for genotyping varieties.

Key words: sea buckthorn; systematization; DNA polymorphism; ISSR-analyses.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Земцова А.Я., Зубарев Ю.А., Гунин А.В., Иванова М.С. Оценка генетического полиморфизма образцов рода облепихи (*Hippophae* L.) различного эколого-географического происхождения посредством ISSR-маркеров. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):623-629. DOI 10.18699/VJ17.278

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Zemtsova A.Y., Zubarev Y.A., Gunin A.V., Ivanova M.S. Assessment of genetic polymorphism in sea buckthorn (*Hippophae* L.) of different environmentally-geographical origin by ISSR-markers. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(6):623-629. DOI 10.18699/VJ17.278 (in Russian)

Признанным мировым центром по селекции облепихи является НИИ садоводства Сибири им. М.А. Лисавенко (НИИСС, г. Барнаул). К настоящему времени селекционерами института создано 49 сортов облепихи с использованием в гибридизации экотипов из различных мест естественного произрастания на Алтае, в том числе с берегов рек Катунь, Чулышман, Чуя, а также из Бурятии и Красноярского края, и сортообразцы, полученные с использованием химических мутагенов. Коллекция института одна из наиболее многочисленных в мире, в ней насчитывается порядка 50 тыс. гибридных семян и более 700 сортообразцов. Многие из созданных в институте сортов, в свою очередь, служат исходными формами в селекционных программах целого ряда стран Азии и Европы.

Ежегодно проводится масштабная работа по гибридизации, отбору, анализу гибридных семян, их размножению, комплексному изучению выделенных сортообразцов. Однако на сегодняшний день нет достоверных данных по геномному составу коллекции, четкого научно обоснованного представления о ее видовой принадлежности, что крайне важно как для идентификации сортов, так и для успешной дальнейшей селекции.

В последнее десятилетие все более широкое применение получают молекулярно-генетические методы, с помощью которых созданы ДНК-банки ценных, редких и исчезающих видов растений, проводятся исследования по изучению внутривидовой изменчивости сохраняемых объектов, уточнению спорных вопросов их систематики и классификации, разработке методик генетической паспортизации популяций и исследованию генетической стабильности таксонов. Параллельно с этим могут решаться вопросы паспортизации сортов растений на уровне генов, что весьма актуально в связи с усиливающимся вниманием к правовой охране селекционных достижений. Современные аналитические методы исследования специфичности биологических объектов позволяют на новой

основе решать проблему идентификации растений и их генотипов (Новикова и др., 2012).

Для оценки генетического разнообразия селекционного материала широко используются такие молекулярно-генетические методы анализа, как RAPD (random amplified polymorphic DNA), AFLP (amplified fragment length polymorphism), SSR (simple sequence repeats), ISSR (inter-simple sequence repeats).

Облепиха не является популярным объектом молекулярных исследований. Тем не менее в работах ряда зарубежных авторов предприняты попытки расшифровки генома этой культуры, относящиеся, однако, исключительно к крупным систематическим группам – видам и подвидам. Наиболее часто встречаемые молекулярные методы в исследовании генома облепихи – это RAPD, AFLP, ISSR, SSR (Yao et al., 1993; Bartish et al., 1999, 2000, 2003; Sun et al., 2002; Yongshan et al., 2003a, b; Tian et al., 2004; Chen et al., 2008; Li et al., 2009; Wang et al., 2011; Raina et al., 2012; Jain et al., 2014).

Следует отметить, что облепиха в Сибири с точки зрения хозяйственно-биологических особенностей и систематической принадлежности существенным образом отличается от китайского и европейского генофонда. Основной подвид, встречающийся в Сибири, – это *Hippophae rhamnoides* ssp. *mongolica*, однако известно множество экологических форм, типов, групп, что требует решения вопросов систематики на более узком уровне. В этой связи актуальными становятся две взаимосвязанные задачи: оптимизация методики ПЦР-анализа применительно к сибирскому генофонду и использование этого анализа для генетической идентификации коллекции облепихи НИИСС.

Именно коллекция НИИСС, в которой собраны образцы облепихи различного эколого-географического происхождения, как близкого (внутри одного подвида), так и весьма отдаленного, позволяет комплексно и с высоким

уровнем достоверности решить задачу применения ПЦР-анализа для генетической идентификации, уточнить представления о внутривидовой систематике сортообразцов этой культуры.

Генетическое разнообразие сортов облепихи коллекции НИИСС оценивалось методом ISSR-анализа (inter-simple sequence repeats – межмикросателлитные повторы последовательностей). Выбор этого метода объясняется тем, что ISSR-маркирование не требует предварительного знания нуклеотидной последовательности исследуемой ДНК. ISSR- и RAPD-спектры аналогичны, но обычно первые содержат больший набор полиморфных полос (до 97), позволяя выявлять более высокий уровень генного полиморфизма (Куцев, 2009), что чрезвычайно важно для решения наших задач. Для определения генома облепихи используются также SSR-маркеры (Lacis et al., 2014). Основным недостатком этого метода является высокая стоимость разработки SSR-праймеров, так как необходимо клонирование и секвенирование произвольных участков ДНК для выявления микросателлитных повторов и участков генома для определения специфического локуса (Омашева и др., 2013).

Метод ISSR-маркирования основан на использовании полимеразной цепной реакции (ПЦР) с одним или несколькими праймерами (длиной 15–24 нуклеотида), состоящими из tandemных коротких 2–4 нуклеотидных повторов и одного селективного нуклеотида на 3'-конце. В геномах растений и животных количество микросателлитных повторов очень велико, что делает этот метод удобным для генетического анализа. Микросателлитные последовательности окружают многие гены и могут быть использованы как якорные последовательности к ним. Метод не требует предварительного клонирования и секвенирования фрагментов ДНК для подбора праймеров и хорошо воспроизводим (Боронникова, 2009).

Целью нашего исследования была оценка генетического полиморфизма сортообразцов облепихи различной популяционно-систематической принадлежности посредством методов молекулярного маркирования.

Материалы и методы

Исследования проводились в лаборатории биоинженерии Алтайского государственного университета совместно с Институтом химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Сбор материала осуществляли на территории экспериментально-производственного отделения НИИСС (Барнаул).

Исследовали образцы листьев 17 сортообразцов облепихи различного эколого-географического происхождения, в том числе гибридного. Для расширения уровня варьирования изучаемых показателей и установления достоверных статистических различий рассматривали также образцы, не относящиеся к подвиду *mongolica*. Сортообразцы (экоотипы) в пределах подвида *H. rhamnoides* ssp. *mongolica*: 42-68-2, Живко (красноярский × саянский экоотип); Великан, Янтарная (саянский × катунский экоотип); Дар Катуня, Новость Алтая (катунский экоотип); Чуйская, 35-61-2244 (чуйский экоотип); Чулышманка, Любимая (саянский × чулышманский экоотип); Заря Дабат (бурятский экоотип); Елизавета, Иня – сорта, полученные

в результате химического мутагенеза путем обработки семян сорта Пантелеевская (саянский × катунский). Сортообразцы (экоотипы) вне пределов подвида *H. rhamnoides* ssp. *mongolica*: Pollmix 1 (сорт немецкой селекции), *H. rhamnoides* ssp. *rhamnoides*), Ютландская (ютландский экоотип, *H. rhamnoides* ssp. *carpatica*); Дунайская (дунайский экоотип *H. rhamnoides* ssp. *carpatica*); КП-686 (киргизский экоотип, *H. rhamnoides* ssp. *caucasica*).

ДНК выделяли из 20–30 мг растительной ткани листа с помощью набора Diamond DNA (ООО «НПФ «Алтай-биотех») и Nucleospin Plant II на колонках в соответствии с инструкциями фирмы-производителя. Наличие ДНК в полученном растворе проверяли при помощи электрофореза. Для проведения ПЦР-анализа использовали реакционную смесь объемом 25 мкл, содержащую 15.5 мкл H₂O; 2.5 мкл 10X-буфера с 2.5 мкл 25 mM MgCl₂; 2 мкл 10 mM раствора праймера; 1 мкл 10 mM dNTPs; 2 мкл Taq-полимеразы; 2 мкл ДНК. В качестве отрицательного (К–) контроля в реакционную смесь для проверки чистоты реактивов добавляли вместо ДНК 2 мкл деионизированной воды. Амплификацию проводили в термоциклере MyCycler BioRad с использованием реактивов производства ООО «Медиген» по следующей программе: предварительная денатурация при 94 °C в течение 3 мин; в последующих 35 циклах 95 °C – 10 с; 50 °C – 45 с; 72 °C – 1 мин 30 с; завершающая стадия: 70 °C – 7 мин, охлаждение при 4 °C. Для проверки достоверности полученных ДНК-спектров опыт повторяли не менее трех раз. Для выявления полиморфизма ДНК облепихи был произведен выбор информативных ISSR-праймеров. Каждый праймер индивидуально анализировали в ПЦР ISSR-методом с геномной ДНК. Нами протестировано 32 ISSR-праймера, из которых отобрано шесть наиболее информативных для дальнейшего анализа. Для повышения выхода амплифицированных фрагментов маркеров был проведен эксперимент по подбору оптимальной температуры отжига (Tm) праймеров – амплификация с градиентом температур отжига праймера от 45 до 55 °C.

Продукты амплификации разделяли в 3%-м агарозном геле и 0.5 M TAE-буфере в присутствии бромистого этидия при 50 В в течение 5 ч в горизонтальной электрофорезной камере Sub Cell GTSystem (Bio-Rad, США). После электрофореза гели были сфотографированы в системе гель-документации Gel-Doc XR (Bio-Rad, США). Для компьютерной обработки полученные результаты были представлены в виде матрицы бинарных данных. ISSR-профили анализировали по наличию (1) или отсутствию (0) полос на геле. Компьютерный анализ молекулярно-генетического полиморфизма ДНК проведен с помощью компьютерных программ NTSYSpc 2.1, TFGA 1.3. Для построения филогенетических деревьев на основе данных фрагментного анализа использовали UPGMA метод.

Результаты и обсуждение

Выделение ДНК – важный этап выполнения генетического анализа, так как от качества и количества выделенной ДНК зависит успешность его дальнейших этапов. Качественный анализ ДНК проводился путем электрофореза в агарозном геле, который позволяет выявить степень деградации. Вы-

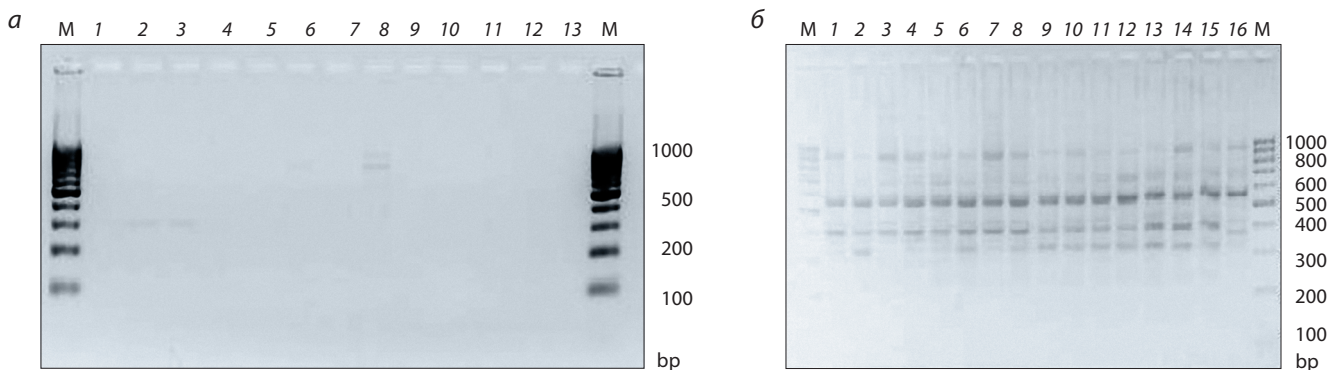


Рис. 1. Электрофореграмма PCR-ISSR: а – ДНК, выделенная с помощью набора Diamond DNA; б – с помощью набора Nucleospin Plant II. Цифрами обозначены номера проб, М – маркер молекулярной массы ДНК.

ПраЙмеры, использованные для изучения ДНК-полиморфизма образцов

ПраЙмер	Последовательность	Tm, °C	Размер фрагментов ДНК, п. н.	Кол-во амплифицированных фрагментов	Кол-во полиморфных фрагментов	Уровень полиморфизма, %
UBC873	5'GACAGACAGACAGACA3'	53.3	200–1000	11	9	81.8
HB12	5'CAACCACACGC3'	55.0	300–1000	10	6	60.0
HB14	5'CTCCTCCTCGC3'	51.0	200–1000	8	6	75.0
814	5'CTCTCTCTCTCTCTTG3'	48.9	200–1000	6	2	33.3
17899A	5'CACACACACAAG3'	51.3	200–1000	11	4	36.4
17899B	5'CACACACACAGG3'	54.4	200–1000	10	8	80.0

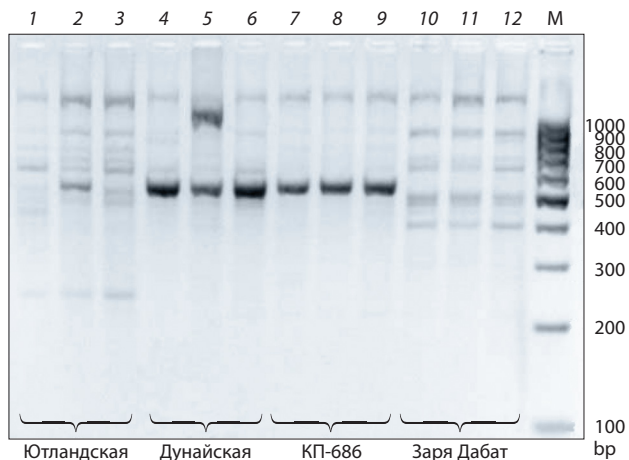


Рис. 2. Фрагмент электрофореграммы PCR-ISSR с праЙмером 17899B. Цифрами обозначены номера проб, М – маркер молекулярной массы ДНК.

деление ДНК с помощью набора Diamond DNA не дало ожидаемых результатов: для всех изучаемых образцов наблюдался слабый уровень амплификации, выраженный в отсутствии четких фрагментов на электрофореграмме (рис. 1, а). Наиболее качественным оказалось выделение ДНК на колонках набором Nucleospin Plant II. На электрофореграмме были видны четкие фрагменты (см. рис. 1, б).

Протестировано 32 ISSR-маркера, из которых шесть дали воспроизводимый результат со всеми изученными образцами облепихи. Для молекулярно-генетического анализа полиморфизма ДНК облепихи были отобраны следующие праЙмеры: UBC873, HB12, HB14, 814, 17899A, 17899B. С целью улучшения качества получаемых электрофореграмм проводили подбор оптимальной температуры отжига праЙмеров, устанавливая ее в диапазоне от 45 до 55 °C. Оптимальные температуры отжига для каждого праЙмера и количество амплифицированных фрагментов представлены в таблице.

В изученных образцах выявлено 56 амплифицированных ISSR-фрагментов ДНК, из которых 36 были полиморфными. Число амплифицированных фрагментов ДНК в общей выборке растений варьировало в зависимости от праЙмера от 6 (праЙмер 814) до 11 (UBC873, 17899A) (рис. 2). В среднем при ISSR-анализе один праЙмер инициировал синтез 9 фрагментов ДНК.

При анализе фотографий электрофорезного геля была составлена бинарная матрица признаков в программе Microsoft Excel (рис. 3): наличие фрагментов ДНК одинаковой длины отмечали цифрой 1, отсутствие – цифрой 0.

Анализ полиморфизма фрагментов ДНК при использовании данных ISSR-маркеров оказался достаточно информативным методом, благодаря которому удалось различить образцы облепихи и построить дендрограмму генетического сходства исследуемого материала (рис. 4).

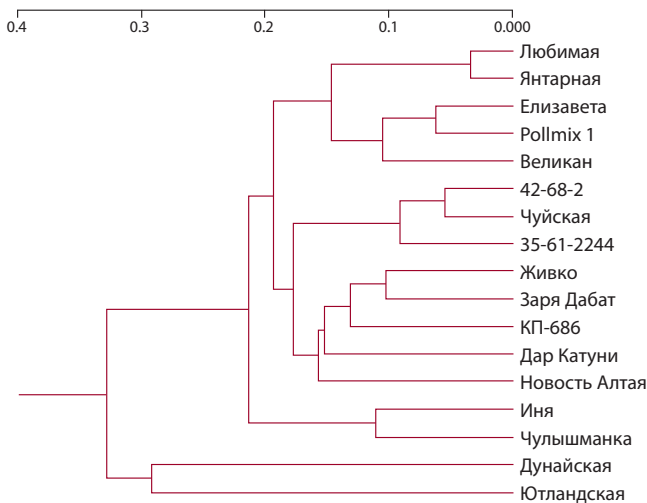


Рис. 5. UPGMA-дендрограмма для разных сортообразцов облепихи, построенная на основе ISSR-данных в программе TFPGA 1.3.

небольшого первого кластера оказались образцы ютландского, киргизского экотипа и сорт немецкой селекции Pollmix 1. Второй крупный кластер, за исключением двух образцов немецкой селекции (Pollmix 1) и одного киргизского образца (КП-686), составляют образцы, относящиеся к *ssp. mongolica* (см. рис. 4).

Полученная нами ранее бинарная матрица признаков была преобразована (наличие полосы представляется в виде «1», отсутствие – в виде «2») и проанализирована в программе TFPGA 1.3 (tools for population genetic analyses), разработанной М.Р. Miller (1997) специально для обработки популяционно-генетических данных. Полученная дендрограмма (рис. 5) имеет сходство с дендрограммой, построенной в программе NTSYSpc 2.1.

В результате проведенного кластерного анализа произошло разделение образцов на две отдельные группы: сортообразцы, относящиеся в основном к *ssp. mongolica*, и сортообразцы дунайского и ютландского экотипов. В первой группе сортообразцов обозначились три кластера. Первый кластер включает в себя пять сортов: Елизавета, Янтарная, Великан (два последних получены от скрещивания сорта Щербинки-1 (саянский экотип) с сеянцами катунского экотипа), сорт Любимая – от скрещивания сорта Щербинки-1 с сеянцами формы Кудырга (чулышманский экотип). В этот кластер также входит сорт немецкой селекции Pollmix 1, что представляется весьма интересным в связи с имеющимися морфологическими сходствами между *H. rhamnoides ssp. mongolica* (русские сортообразцы) и *H. rhamnoides ssp. rhamnoides* (немецкие). Возможно, эти два подвида более близки по происхождению, чем предполагалось ранее.

Самый обширный – второй кластер, состоящий из сортов чуйского, катунского, бурятского, киргизского экотипов и сортообразцов, полученных от скрещивания сорта Красноярская 22 (красноярский экотип) с формой саянского экотипа. Как и в первом кластере, во втором присутствует сортообразец киргизского экотипа, не принадлежащий к подвиду *mongolica*. Примечательно, что этот образец морфологически не менее близок к основной

группе изучаемых сортообразцов, чем немецкий экземпляр. Это также подводит нас к предположению о более высокой генетической близости данных подвидов.

В третий кластер объединились сорта Чулышманка (саянский × чулышманский экотип) и Иня (получен в результате использования химического мутагенеза путем обработки семян сорта Пантелеевская).

Во вторую группу, как уже было отмечено, вошли сортообразцы дунайского и ютландского экотипа, по морфологическим признакам существенно отличающиеся от основной группы исследуемых объектов.

Полученный результат позволяет рассматривать используемый метод как перспективный при изучении генетического разнообразия облепихи.

Заключение

Использование колонок Nucleospin Plant II для выделения ДНК из свежей растительной ткани позволяет извлечь ДНК в достаточном для ISSR-анализа количестве. Из 32 протестированных ISSR-маркеров выявлены шесть эффективных для анализа полиморфизма ISSR-локусов облепихи. Анализ ISSR-спектров сортообразцов облепихи выявил 56 амплифицированных фрагментов ДНК, из которых 36 полиморфны. На основе полученных результатов нами была построена дендрограмма генетического сходства исследуемого материала. В целом дендрограмма согласуется с данными нашей гипотезы, в соответствии с которой вид разделяется на подвиды и разные экотипы, а растения одного сорта образуют один кластер. На основании представленных результатов можно утверждать, что ISSR-маркирование является перспективным методом при изучении генотипического разнообразия облепихи.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Боронникова С.В. Исследование генетической изменчивости популяций редкого вида Урала *Adenophora lilifolia* (L.) DC. на основании анализа полиморфизма ISSR-маркеров. Генетика. 2009; 45(5):652-655.
- Куцев М.Г. Фрагментный анализ ДНК растений: RAPD, DAF, ISSR. Барнаул: Artika, 2009.
- Новикова А.А., Шейкина О.В., Новиков О.В., Доронина Г.У. Оценка возможности применения ISSR-маркеров для систематизации и генетической паспортизации растений рода *Rhododendron*. Науч. журн. КубГАУ. 2012;82(08):1-11.
- Омашева М.Е., Аубакирова К.П., Рябушкина Н.А. Молекулярные маркеры. Причины и последствия ошибок генотипирования. Биотехнология. Теория и практика. 2013;4:20-28.
- Bartish I.V., Jeppsson N. Application of molecular markers to study the systematic, phylogeny, biogeography, genetic diversity and population genetics of *Hippophae L.* Seabuckthorn (*Hippophae L.*): A Multipurpose Wonder Plant. 2003;1:64-71.
- Bartish I.V., Jeppsson T., Bartish G.I., Lu R., Nybom H. Inter- and intra-specific genetic variation in *Hippophae* (Elaeagnaceae) investigated by RAPD markers. Plant Syst. Evol. 2000;225:85-101.
- Bartish I.V., Jeppsson N., Nybom H. Population genetic structure in the dioecious pioneer plant species *Hippophae rhamnoides* investigated by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Mol. Ecol. 1999;8:791-802. DOI 10.1046/j.1365-294X.1999.00631x.
- Chen G., Wang Y., Zhao C., Korpelainen H., Li C. Genetic diversity of *Hippophae rhamnoides* populations at varying altitudes in the

- Wolong natural reserve of China as revealed by ISSR. *Silvae Genet.* 2008;57(1):29-36.
- Jain A., Chaudhary S., Sharma P.C. Application of DNA technologies for improvement of seabuckthorn. *Seabuckthorn (Hippophae L.): A Multipurpose Wonder Plant.* 2014;4:167-178.
- Lacis G., Kota I., Rungis D. Application of SSR markers for the assessment of genetic diversity in Latvian seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *Seabuckthorn (Hippophae L.): A Multipurpose Wonder Plant.* 2014;4:157-166.
- Li H., Ruan C.-J., Teixeira da Silva J.A. Identification and genetic relationship based on ISSR analysis in a germplasm collection of sea buckthorn (*Hippophae* L.) from China and other countries. *Sci. Hortic.* 2009;123(2):263-271.
- Miller M.P. Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author, 1997.
- Raina S.N., Jain S., Sehgal D., Kumar A., Dar T.H., Bhat V., Pandey V., Vaishnavi S., Bhargav A., Singh V., Rani V., Tandon R., Tewari M., Mahmoudi A. Diversity and relationships of multipurpose seabuckthorn (*Hippophae* L.) germplasm from the Indian Himalayas as assessed by AFLP and SAMPL markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* 2012;59:1033-1053. DOI 10.1007/s10722-011-9742-1.
- Sun K., Chen X., Ma R., Li C., Wang Q., Ge S. Molecular phylogenetics of *Hippophae* L. (Elaeagnaceae) based on the internal transcribed spacer (ITS) sequences of nrDNA. *Plant Syst. Evol.* 2002;235:121-134.
- Tian C., Lei Y., Shi S. Genetic diversity of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) populations in northeastern and northwestern China as revealed by ISSR markers. *New Forests.* 2004;27(3):229-237.
- Wang Y., Jiang H., Peng S., Korpelainen H. Genetic structure in fragmented populations of *Hippophae rhamnoides* ssp. *sinensis* in China investigated by ISSR and cpSSR markers. *Plant Syst. Evol.* 2011;295:97-107.
- Yao Y., Tigerstedt P.M.A. Isozyme studies of genetic diversity and evolution in *Hippophae*. *Genet. Resour. Crop Evol.* 1993;40:153-164.
- Yongshan L., Xuelin C., Hong L. Taxonomy of seabuckthorn (*Hippophae* L.). *Seabuckthorn (Hippophae L.): A Multipurpose Wonder Plant.* 2003a;1:35-46.
- Yongshan L., Xuelin C., Kun S., Ruijun M. A new subspecies of *Hippophae* (Elaeagnaceae) from China. *Novon.* 2003b;13(2):200-202.