

УДК 575.22

UDC 575.22

DOI 10.30679/2219-5335-2019-6-60-11-20

DOI 10.30679/2219-5335-2019-6-60-11-20

**ПОИСК ЭФФЕКТИВНЫХ IRAP
И ISSR МАРКЕРОВ
ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА
ПОДВОЕВ ЯБЛОНИ**

**SELECTION OF EFFECTIVE IRAP
AND ISSR MARKERS
FOR GENETIC ANALYSIS
OF APPLE ROOTSTOCKS**

Степанов Илья Владимирович
младший научный сотрудник
селекционно-биотехнологической
лаборатории

Stepanov Ilya Vladimirovich
Junior Research Associate
of Breeding and Biotechnology
Laboratory

Супрун Иван Иванович
канд. биол. наук
старший научный сотрудник
зав. селекционно-биотехнологической
лабораторией

Suprun Ivan Ivanovich
Cand. Biol. Sci.
Senior Research Associate
Head of Breeding and Biotechnology
Laboratory

Токмаков Сергей Вячеславович
канд. биол. наук
научный сотрудник
селекционно-биотехнологической
лаборатории

Tokmakov Sergey Vyacheslavovich
Cand. Biol. Sci.
Research Associate
of Breeding and Biotechnology
Laboratory

Лободина Елена Вадимовна
аспирант, младший научный сотрудник
селекционно-биотехнологической
лаборатории

Lobodina Elena Vadimovna
Post Graduate, Junior Research Associate
of Breeding and Biotechnology
Laboratory

*Федеральное государственное
бюджетное научное учреждение
«Северо-Кавказский федеральный
научный центр садоводства,
виноградарства, виноделия»,
Краснодар, Россия*

*Federal State Budget
Scientific Institution
«North Caucasian Federal
Scientific Center of Horticulture,
Viticulture, Winemaking»,
Krasnodar, Russia*

Богатство генетического
инструментария даёт возможность
осуществлять анализ филогении
и генетического полиморфизма
у исследуемых таксонов.
К важным генетическим
компонентам, встречающимся
в большинстве геномов эукариот,
можно отнести ретротранспозоны.
Исходя из особенностей этих мобильных
элементов генома исследование
ретротранспозонов актуально
для создания генетических маркеров.

The wealth of genetic tools makes
it possible to analyze phylogeny
and genetic polymorphism
in the studied taxa. The genetic
components include retrotransposons.
The study of retrotransposons is relevant
for the creation of genetic markers.
At the moment, DNA markers,
whose polymorphism is due
to retrotransposon inserts, have gained
distribution in genetic work.
The aim of this work is to search
and detect effective IRAP

На данный момент распространение в генетических работах получили ДНК-маркеры, чей полиморфизм обусловлен ретротранспозонными вставками. Целью данной работы является поиск и обнаружение эффективных IRAP и ISSR маркеров для генотипирования подвоев яблони. Исходя из качества полученного ДНК-фингерпринта, по каждому из задействованных в работе маркеров был осуществлен отбор наиболее информативных маркеров. Праймеры отобранных IRAP и ISSR маркеров будут использованы в дальнейшем для генотипирования подвоев. В результате выполненной работы на генотипах подвоев яблони из 5 IRAP маркеров 4 дали ДНК-фрагменты при постановке ПЦР. При этом 2 маркера из общей выборки были определены как перспективные для дальнейшей работы. В группу перспективных маркеров вошли IRAP, обладающие наибольшим количеством амплифицированных фрагментов и легко интерпретируемым видом ДНК-фингерпринтов. К данной группе отнесены: Cass 1 и Cass 2. В случае апробации 8 ISSR для дальнейшей работы были отобраны 3 маркера. Дальнейшая работа будет направлена на проведение оценки генетического полиморфизма отобранных маркеров с последующим расширением объема анализируемой выборки образцов.

Ключевые слова: ПОДВОИ ЯБЛОНИ, ISSR, IRAP, ДНК-АНАЛИЗ, ГЕНОТИПИРОВАНИЕ

and ISSR markers for the genotyping of apple rootstocks. Based on the quality of the obtained DNA fingerprint, the selection of the most informative markers was carried out for each of the markers involved in the work. The primers of the selected IRAP and ISSR markers will be used in the future for genotyping of stocks. As a result of the work performed on the genotypes of apple tree stocks, 5 IRAP markers 4 gave DNA fragments during PCR. At the same time, 2 markers from the general sample were identified as promising for further work. The group of promising markers includes IRAPs with the largest number of amplified fragments and an easily interpreted type of DNA fingerprints. As a result of the work performed on the genotypes of apple tree stocks, 5 IRAP markers 4 gave DNA fragments during PCR. At the same time, 2 markers from the general sample were identified as promising for further work. The group of promising markers includes IRAPs with the largest number of amplified fragments and an easily interpreted type of DNA fingerprints. This group includes: Cass 1 and Cass 2. In case of testing of 8 ISSR, 3 markers were selected for further work. Further work will be aimed at assessing the genetic polymorphism of the selected markers with the subsequent expansion of the volume of the analyzed sample of samples.

Key words: APPLE ROOTSTOCKS, ISSR, IRAP, DNA ANALYSIS, GENOTYPING

Введение. Количество типов ДНК-маркеров значительно увеличилось за несколько десятилетий широкого применения ДНК-технологий в генетике. Разнообразии ДНК-маркеров связано с полиморфизмом таких генетических структур, представленных в геноме, как гены, кодирующие рРНК сайты рестрикции, микросателлитная ДНК, точковые мутации и т.д.

Богатство генетического инструментария даёт возможность осуществлять анализ филогении и генетического полиморфизма у исследуемых таксонов. К важным генетическим компонентам, встречающимся в большинстве геномов эукариот, можно отнести ретротранспозоны [1-6]. Для ретротранспозонов свойственен процесс транспозиции, в котором отсутствует механизм вырезания из генома последовательности транспозона. Однако для функционирующего ретротранспозона характерны этапы транскрипции, следующей за ней обратной транскрипции и встраивания вновь созданной копии ретротранспозона в геном [7-10].

Специфика циклов копирования ретротранспозонов способствует их равномерному распределению в большом количестве в хромосомах [11, 12]. Исходя из особенностей этих мобильных элементов генома исследование ретротранспозонов актуально для создания генетических маркеров. На данный момент распространение в генетических работах получили ДНК-маркеры, полиморфизм которых обусловлен ретротранспозонными вставками. К их числу можно отнести маркеры SSAP, IRAP, RBIP, REMAP, зарекомендовавшие себя в генетических исследованиях как эффективные инструменты для проведения ДНК-анализа на различных биологических объектах [13]. К мультилокусным маркерам, основанным на полиморфизме большого числа не идентифицированных участков ДНК в геноме, относятся три из вышеперечисленных маркерных систем: S-SAP, IRAP и REMAP.

В IRAP маркерах анализируется полиморфизм областей, расположенных между вставками ретротранспозонов. В свою очередь метод S-SAP позволяет устанавливать полиморфизм последовательностей между сайтом вставки ретротранспозона и сайтом рестрикции, который определяется с помощью специфических эндонуклеаз. REMAP позволяет проводить оценку полиморфизма областей, расположенных между вставками ретротранспозонов и микросателлитными последовательностями генома. В свою оче-

редь, применение RBIP маркеров, в отличие от вышеперечисленных мультилокусных маркеров, даёт возможность установить факт вставки ретро-транспозона в определённом участке генома.

Подобно SSR маркерам в методике применения RBIP маркеров анализируются отдельные локусы с установленным месторасположением в геноме. Для приведённых типов ДНК-маркеров возможен богатый выбор методов визуализации полученных результатов: электрофорез в полиакриламидном и агарозном геле, капиллярный электрофорез и микрочипы. Следовательно, можно заключить, что использование ДНК-маркеров, основанных на полиморфизме вставок ретротранспозонов, перспективно в изучении филогенитического родства и генетического полиморфизма [12].

Маркеры, основанные на полиморфизме ретротранспозонных вставок, используются в исследованиях рода *Malus*. В частности, 6 IRAP маркеров, созданных с помощью *Tu1-soria*-подобных ретротранспозонов LTR, были задействованы в анализе пятнадцать клонов сорта Red Delicious и шестнадцать клонов сорта Fuji [14]. Также была проведена работа на 12 стандартных сортах яблони, в которой было установлено, что, хотя ретротранспозоны TRIMs не кодируют белки, необходимые для осуществления жизненного цикла, и, следовательно, не являются автономными, они, по меньшей мере, столь же полиморфны, что и обычные автономные ретротранспозоны [15].

Чтобы исследовать потенциальную эффективность двух ретротранспозонов в качестве молекулярных маркеров для идентификации клонов сорта Fuji, были разработаны праймеры, комплементарные LTR *STcrn*. Установленный полиморфизм маркеров позволяет проводить генетическую идентификацию изученных клонов [16]. Мультилокусные ISSR маркеры, основанные на анализе полиморфизма межмикросателлитных участков генома, также нашли применение в генетических исследованиях рода *Malus* [17-19].

В связи с высоким уровнем информативности ISSR и IRAP ДНК-маркеров целью данной работы был отбор IRAP и ISSR маркеров, перспективных для ДНК-фингерпринтинга подвоев яблони, а также для анализа генетической однородности при их микроклональном размножении, исходя из их эффективности при генотипировании.

Объекты и методы исследований. Экстракция ДНК проводилась стандартной ЦТАБ методикой [17]. В качестве растительного материала были отобраны подвои яблони СК5; М2; СК3; М9. ПЦР была проведена согласно следующей программе: 3 минуты предварительной денатурации при температуре 95°C; последующие 45 циклов: денатурация 30 секунд при 95 °С, отжиг праймеров 30 секунд при 50 °С (ISSR) или 55 °С (IRAP), элонгация 2 минуты при 72°C и финальный цикл синтеза при температуре 72 °С в течение 10 минут.

Концентрации реагентов в ПЦР смеси: буфер для Taq ДНК-полимеразы в рабочей концентрации, предусмотренной производителем (ООО «Сибэнзим, Россия»), dNTP (0,25 мМ), 1 единица активности Taq ДНК-полимеразы, ISSR или IRAP праймер (0,32 мкМ), 40-50 нг тотальной ДНК. Для апробации маркеров электрофорез ПЦР-продуктов проводился при напряжении 120В в 2 % агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Визуализация продуктов амплификации осуществлялась в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе.

Обсуждение результатов. Высокое качество получаемых ДНК-фингерпринтов ISSR маркеров требуется для проведения эффективного анализа результатов генотипирования. В случае оценки родства исследуемых генотипов качество ДНК-фингерпринтов приобретает особенно большое значение, так как любая неточность может повлиять на результат и, как следствие, интерпретация данных будет не достоверна. Ошибки в определении количества ДНК-фрагментов на электрофореграмме, некор-

ректная оценка размера ДНК-фрагментов, выраженная в парах нуклеотидов, приводят к серьёзным неточностям в процессе молекулярно-генетического анализа. Сильное фоновое свечение дорожки и слабая интенсивность свечения ДНК-фрагмента способны стать причиной подобных ошибок. В связи с этим нами был проведен отбор IRAP маркеров, апробированных на четырёх генотипах подвоев, исходя из изложенных выше критериев. По каждому маркеру апробация была проведена в трехкратной повторности для максимальной достоверности оценки генотипирования.

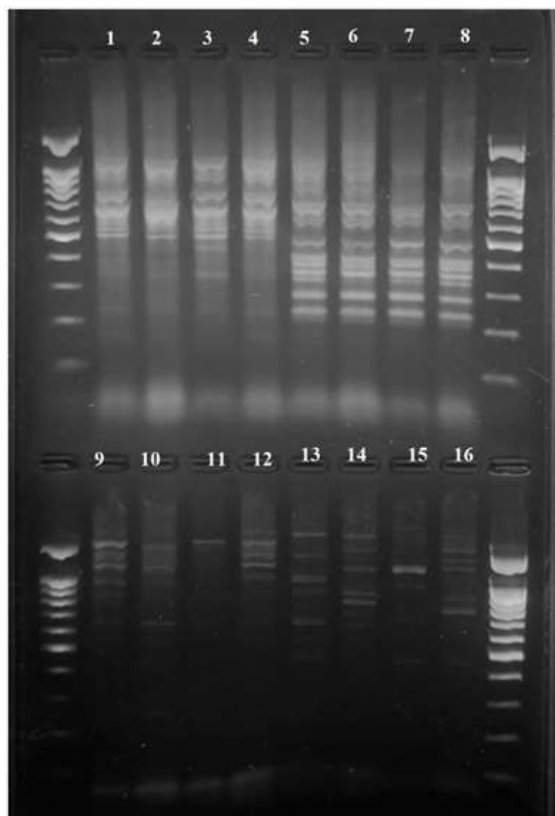
Был осуществлен отбор наиболее эффективных IRAP маркеров для оценки генетического полиморфизма подвоев яблони. В ходе апробации 5 маркеров на 4 генотипах установлено, что по 4 маркерам получены продукты амплификации (рис. 1). IRAP маркеры были разделены на 3 группы (табл. 1), исходя из качества полученных в результате генотипирования ДНК-фингерпринтов. В третью группу вошел маркер IRAP, у которого отсутствовала амплификация по 4 подвоям.

Маркеры, обладающие незначительным количеством ДНК-фрагментов или/и их слабой интенсивностью свечения, затрудняющей оценку результатов анализа, были включены во 2 группу. К таким маркерам можно отнести: LTR 3, LTR 23.

IRAP маркеры, отличающиеся большим количеством ДНК-фрагментов и легко интерпретируемым спектром амплифицированных продуктов ПЦР, вошли первую группу. К этой группе отнесены Cass 1 и Cass 2. Их применение в дальнейшей работе по анализу генетического разнообразия подвоев является приоритетным.

Во вторую группу изученных маркеров были включены ISSR маркеры – UBC 813, UBC 818, UBC 825 (рис. 2, табл. 2). Несмотря на относительно большое количество фрагментов ДНК, установленное у маркеров UBC 818, UBC 825, качество фингерпринтов не позволяет их определить в первую группу приоритетных маркеров.

В свою очередь, к первой группе отнесены: UBC 811 и UBC 841, UBC 843. Эти маркеры позволяют получить ДНК-фингерпринты, обладающие наибольшим количеством фрагментов и легко интерпретируемым видом. Исходя из этого, их применение в дальнейшей работе по анализу генетического разнообразия подвоев будет приоритетным.

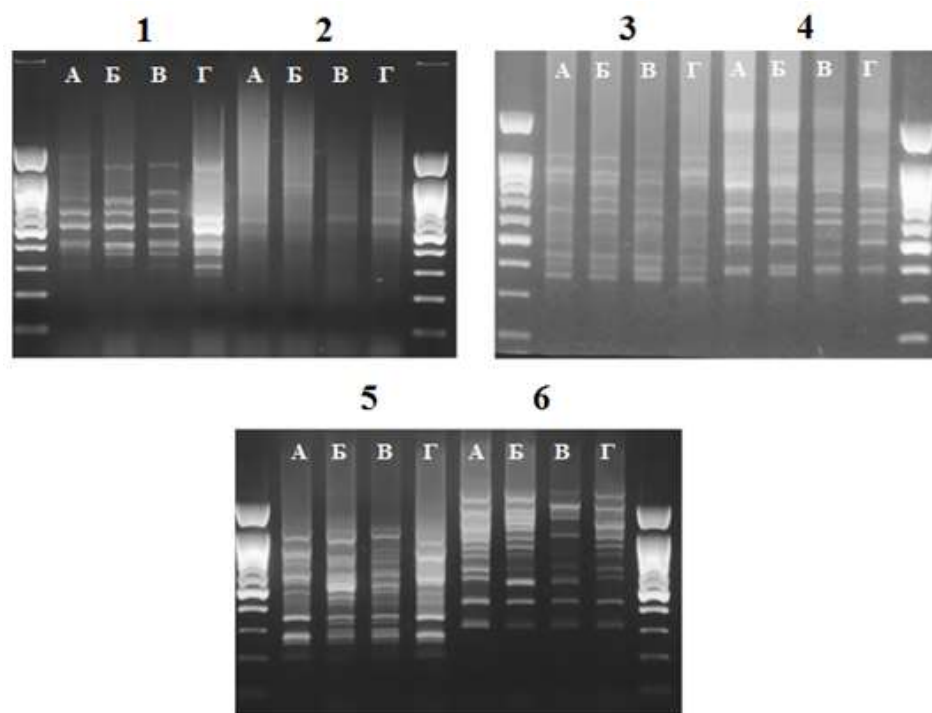


Подвои: СК5 – 1, 5, 9, 13; М2 – 2, 6, 10, 14; СК3 – 3, 7, 11, 15; М9 – 4, 8, 12, 16. Маркеры: Cass 1 1-4, Cass 2 5-8, LTR 3 9-12, LTR 23 13-16.

Рис. 1. Результаты IRAP-генотипирования подвоев яблони

Таблица 1 – Качество ДНК-фингерпринтов IRAP маркеров

Маркер	Количество ДНК-фрагментов	Качество ДНК-фингерпринта
Cass 1	9	I
Cass 2	15	I
LTR 3	9	II
LTR 23	7	II
IRAP TDK 2F	-	-



Маркеры: 1 – UBC 811, 2 – UBC 813, 3 – UBC 818, 4 – UBC 825, 5 – UBC 841, 6 – UBC 843. Подвои: СК5 – А; М2 – Б; СК3 – В; М9 – Г.

Рис. 2. Результаты ISSR-генотипирования подвоев яблони

Таблица 2 – Качество ДНК-фингерпринтов ISSR маркеров

Маркер	Количество ДНК-фрагментов	Качество ДНК-фингерпринта
UBC 811	11	I
UBC 813	5	II
UBC 818	10	II
UBC 825	11	II
UBC 841	15	I
UBC 843	14	I
3A59	-	III
ASSR02	-	III

Выводы. Проведённая в работе апробация позволила определить два перспективных IRAP ДНК-маркера из пяти использованных – Cass 1 и Cass 2. В свою очередь из восьми ISSR было выделено три маркера (UBC 811, UBC 841 и UBC 843), перспективных для использования при генотипировании образцов подвоев. Отобранные IRAP и ISSR ДНК-маркеры могут быть эффективно использованы для различных целей, включая генетическую

идентификацию образцов, анализ генетической однородности растений, получаемых в процессе микроклонального размножения, а также для выполнения исследования по изучению генетических взаимосвязей образцов.

Литература

1. Bennetzen J.L. The contributions of retroelements to plant genome organisation, function and evolution. // Trends Microbiol. 1996. № 4. P. 347–353
2. Boeke JD, Corces VG. Transcription and reverse-transcription of retrotransposons. Annu. Rev. Microbiol. 1989. № 43 P. 403–443
3. Kidwell MG, Lisch D. Transposable elements as sources of variation in animals and plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. №94 P. 7704–7711
4. White SE, Habera LF, Wessler SR. Retrotransposons in the flanking regions of normal plant genes—a role for copia-like elements in the evolution of gene structure and expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994. №91 P. 11792–11796
5. Sentry JW, Smyth DR. 1989. An element with long terminal repeats and its variant arrangements in the genome of *Lilium henryi*. Mol. Gen. Genet. №215 P.349–54
6. Pouteau S, Grandbastien MA, Boccara M. 1994. Microbial elicitors of plant defense response activate transcription of a retrotransposon. Plant j №5 P.535-542
7. Noma K, Ohtsubo E, Ohtsubo H. 1999. Non-LTR retrotransposon LINEs are ubiquitous components of plant genomes. Mol. Gen. Genet. №261 P.71-79
8. Hirochika H, Fukuchi A, Kikuchi F. Retrotransposon families in rice. Mol. Gen. Genet. 1992. №233 P.209–16
9. Higashiyama T, Noutoshi Y, Fujie M, Yamada T. Zepp, a LINE-like retrotransposon accumulated in the *Chlorella* telomeric region. EMBO J. 1995. №16 P. 3715–3723
10. Carrington JC, Kasschau K, Mahajan SK, Schaad MC. Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. Plant Cell 1996. №8 P. 1669–1681
11. Mohan M., Nair S., Bhagwat A., Krishna T. G. et al. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants // Mol. Breed. 1997. V.3 P.87-103
12. Kumar A., Bennetzen J.L. Plant retrotransposons // Annu. Rev. Genet. 1999. V.33 P.479-532
13. Kalendar R., Grob T., Regina M. et al. IRAP and REMAP: Two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques // Theor. Appl. Genet. 1999. V.98 P.704-711
14. Sun J., Zhou J. Y. , Sun Q. B., Wang K. IRAP identification of apple Red Delicious and Fuji bud sport clones // Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica 2010. V.30 P.1952-1958
15. Antonius-Klemola K., Kalendar R., Schulman A.H. TRIM retrotransposons occur in apple and are polymorphic between varieties but not sports // Theor Appl Genet. 2006. №112(6). P. 999-1008.
16. Zhao G., Dai H., Chang L. et al. Isolation of two novel complete Ty1-copia retrotransposons from apple and demonstration of use of derived S-SAP markers for distinguishing bud sports of *Malus domestica* cv. Fuji // Tree Genetics & Genomes 2010. №6: P.149.
17. Goulao L., Oliveira C. M. Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus × domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers // Euphytica. №122. P.81–89
18. Korbin M., Kuras A., Zurawicz E. Fruit plant germplasm characterisation using molecular markers generated in RAPD and ISSR-PCR. Cell Mol Biol Lett. 2002. №7(2B) P.785-794.
19. Smolik M, Krzysztozek O. Evaluation of genetic variability in chosen apple (*Malus x domestica* Borkh.) cultivars by ISSR-PCR analysis. Genetika. 2010. №46(7). P.923-31.

20. Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of higher weight DNA // *Nucleic Acids Research*. 1980. №8(19). P.4321-4325

References

1. Bennetzen J.L. The contributions of retroelements to plant genome organisation, function and evolution. // *Trends Microbiol.* 1996. № 4. P. 347–353
2. Boeke JD, Corces VG. Transcription and reverse-transcription of retrotransposons. *Annu. Rev. Microbiol.* 1989. № 43 P. 403–443
3. Kidwell MG, Lisch D. Transposable elements as sources of variation in animals and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. №94 P. 7704–7711
4. White SE, Habera LF, Wessler SR. Retrotransposons in the flanking regions of normal plant genes—a role for copia-like elements in the evolution of gene structure and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994. №91 P. 11792–11796
5. Sentry JW, Smyth DR. 1989. An element with long terminal repeats and its variant arrangements in the genome of *Lilium henryi*. *Mol. Gen. Genet.* №215 P.349–54
6. Pouteau S, Grandbastien MA, Boccara M. 1994. Microbial elicitors of plant defense response activate transcription of a retrotransposon. *Plant j* №5 P.535-542
7. Noma K, Ohtsubo E, Ohtsubo H. 1999. Non-LTR retrotransposon LINEs are ubiquitous components of plant genomes. *Mol. Gen. Genet.* №261 P.71-79
8. Hirochika H, Fukuchi A, Kikuchi F. Retrotransposon families in rice. *Mol. Gen. Genet.* 1992. №233 P.209–16
9. Higashiyama T, Noutoshi Y, Fujie M, Yamada T. Zepp, a LINE-like retrotransposon accumulated in the *Chlorella* telomeric region. *EMBO J.* 1995. №16 P. 3715–3723
10. Carrington JC, Kasschau K, Mahajan SK, Schaad MC. Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. *Plant Cell* 1996. №8 P. 1669–1681
11. Mohan M., Nair S., Bhagwat A., Krishna T. G. et al. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants // *Mol. Breed.* 1997. V.3 P.87-103
12. Kumar A., Bennetzen J.L. Plant retrotransposons // *Annu. Rev. Genet.* 1999. V.33 P.479-532
13. Kalendar R., Grob T., Regina M. et al. IRAP and REMAP: Two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques // *Theor. Appl. Genet.* 1999. V.98 P.704-711
14. Sun J., Zhou J. Y. , Sun Q. B., Wang K. IRAP identification of apple Red Delicious and Fuji bud sport clones // *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica* 2010. V.30 P.1952-1958
15. Antonius-Klemola K., Kalendar R., Schulman A.H. TRIM retrotransposons occur in apple and are polymorphic between varieties but not sports // *Theor Appl Genet.* 2006. №112(6). P. 999-1008.
16. Zhao G., Dai H., Chang L. et al. Isolation of two novel complete Ty1-copia retrotransposons from apple and demonstration of use of derived S-SAP markers for distinguishing bud sports of *Malus domestica* cv. Fuji // *Tree Genetics & Genomes* 2010. №6: P.149.
17. Goulao L., Oliveira C. M. Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus × domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers // *Euphytica.* №122. P.81–89
18. Korbin M., Kuras A., Zurawicz E. Fruit plant germplasm characterisation using molecular markers generated in RAPD and ISSR-PCR. *Cell Mol Biol Lett.* 2002. №7(2B) P.785-794.
19. Smolik M, Krzysztozek O. Evaluation of genetic variability in chosen apple (*Malus x domestica* Borkh.) cultivars by ISSR-PCR analysis. *Genetika.* 2010. №46(7). P.923-31.
20. Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of higher weight DNA // *Nucleic Acids Research*. 1980. №8(19). P.4321-4325