

УДК 575.22

UDC 575.22

DOI 10.30679/2219-5335-2019-6-60-21-30

DOI 10.30679/2219-5335-2019-6-60-21-30

**ПОИСК ЭФФЕКТИВНЫХ
ISSR МАРКЕРОВ
ДЛЯ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ
ВИДА *P. SERRULATA****

**SEARCH OF EFFECTIVE
ISSR MARKERS
FOR GENOTYPING
THE SPECIES OF *P. SERRULATA***

Степанов Илья Владимирович
младший научный сотрудник
селекционно-генетической
лаборатории

Stepanov Ilya Vladimirovich
Junior Research Associate
of Breeding and Biotechnology
Laboratory

Дрыгина Анна Игоревна
младший научный сотрудник
лаборатории питомниководства

Drygina Anna Igorevna
Junior Research Associate
of Laboratory of Nursery keeping

*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 for Horticulture,
Viticulture, Winemaking»,
Krasnodar, Russia*

К числу наиболее важных мультилокусных маркерных систем относятся ISSR маркеры, основанные на полиморфизме областей генома, расположенных между микросателлитными участками. Их эффективность в генетических работах была продемонстрирована в обширном списке исследований, в которых они были задействованы. Маркеры ISSR просты в использовании, не требуют значительных материальных затрат и методологически менее требовательны по сравнению со многими другими маркерными системами, что делает их надежными генетическими маркерами для начальных этапов исследования организмов, по которым генетическая информация отсутствует. Целью данной работы является поиск и обнаружение эффективных ISSR-маркеров для генотипирования представителей вида *P. serrulata*. Показаны результаты апробации ISSR маркеров на генотипах вида *P. serrulata*.

The most important multilocus marker systems include ISSR markers based on polymorphism of genome fields located between microsatellite areas. Their effectiveness in genetic work has been demonstrated in the extensive list of studies in which they were involved. ISSR markers are easy to use, low-cost and methodologically less demanding than many other marker systems, and it makes them good genetic markers for the initial stages of organisms research for which the genetic information is missing. The aim of this work is to search for and detect the effective ISSR markers for genotyping of representatives the *P. serrulata* species. The results of testing ISSR markers on the genotypes of the *P. serrulata* species are shown. Based on the quality of the DNA fingerprint

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 19-44-233011 p_мол_a.

Исходя из качества полученного ДНК-фингерпринта, по каждому из задействованных в работе маркеров был осуществлён отбор наиболее информативных ISSR. Праймеры отобранных ISSR маркеров будут использованы для генотипирования. В результате выполненной работы на генотипах сакуры из 35 ISSR маркеров 26 дали ДНК-фрагменты при постановке ПЦР. При этом 8 маркеров из общей выборки были определены как перспективные для дальнейшей работы. В группу перспективных маркеров вошли ISSR, обладающие наибольшим количеством амплифицированных фрагментов и легко интерпретируемым видом ДНК-фингерпринтов. К данной группе отнесены: UBC 811, UBC 813, UBC 818, UBC 825, UBC 843, UBC 864, 3A59, ASSR02. Дальнейшая работа будет направлена на проведение оценки генетического полиморфизма отобранных маркеров с последующим расширением объёма анализируемой выборки образцов.

Ключевые слова: САКУРА, *P. SERRULATA*, ISSR, ДНК-ТЕХНОЛОГИИ, ГЕНОТИПИРОВАНИЕ, ПЦР

obtained, the most informative ISSRs were selected for each of the markers involved in the work. Primers of ISSR markers selected will be used for genotyping. As a result of the work performed in the process of PCR from 35 ISSR markers, 26 gave DNA fragments on sakura genotypes. At the same time, 8 markers from the general sample were identified as promising for further work. The group of promising markers includes ISSRs with the largest number of amplified fragments and an easily interpreted type of DNA fingerprints. This group includes: UBC 811, UBC 813, UBC 818, UBC 825, UBC 843, UBC 864, 3A59, ASSR02. Further work will be aimed at assessing the genetic polymorphism of the selected markers with subsequent expansion of the volume of the analyzed samples.

Key words: SAKURA, *P. SERRULATA*, ISSR, DNA-TECHNOLOGY, GENOTYPING, PCR

Введение. Применение мультилокусных ДНК-маркеров в качестве инструмента генотипирования получило широкое распространение в исследовательской практике. Возможность провести быстрый и результативный генетический анализ образцов обуславливает востребованность мультилокусных ДНК-маркеров в настоящее время. ISSR маркеры отнесены к числу наиболее важных мультилокусных маркерных систем. Они отражают полиморфизм областей генома, расположенных между микросателлитными участками. Эффективность ISSR маркеров доказывается множеством генетических исследований [1-5]. Так как ISSR представляют собой области в геноме, фланкированные микросателлитными последовательностями с двух сторон, то при постановке ПЦР в реакционную смесь добавляют один тип праймера.

Последовательность праймера представляет собой тандемно повторяющийся набор нуклеотидов, комплиментарный микросателлитному участку. Таким образом, данный олигонуклеотид выступает в качестве как прямого, так и обратного праймера, ограничивая амплифицируемую область с двух сторон. ISSR маркирование позволяет получить множество продуктов амплификации, которые могут использоваться в качестве доминантной системы мультилокусных маркеров для изучения генетических вариаций у различных организмов.

Маркеры ISSR просты в применении, не требуют значительных затрат ресурсов и методологически менее сложны в исполнении по сравнению с большинством ДНК-маркеров. В связи с этим для начальных этапов исследования организмов, по которым генетическая информация отсутствует, ISSR маркирование является оптимальным инструментом генотипирования.

Вскоре после открытия полимеразной цепной реакции (ПЦР) в 1983 году появились новые системы маркеров ДНК на основе ПЦР, которые постоянно развивались. В начале 1990-х годов маркерные системы, основанные на полиморфизме участков, расположенных между микросателлитными последовательностями, которые в дальнейшем были названы ISSR-маркеры, были независимо представлены несколькими исследовательскими группами [6-9].

Микросателлиты, простые повторы последовательностей (SSR) или короткие тандемные повторы (STR), – это области в геноме, которые состоят из коротких мотивов ДНК (обычно длиной 2-5 нуклеотидов), повторяемых несколько раз подряд, например, ACACACACACAC. С помощью произвольно разработанных праймеров, которые содержат повторяющиеся последовательности, комплементарные микросателлитным областям в геноме (ISSR праймеры), случайные фрагменты ДНК в геноме могут быть амплифицированы с помощью ПЦР (при условии, что фрагмент находится

в допустимых для амплификации пределах диапазона размеров) и используются в качестве маркеров для исследований генетических вариаций.

Использование праймеров, разработанных в Университете Британской Колумбии (названия праймеров обычно начинаются с «UBC») является одним из наиболее популярных вариантов. Для оптимизации условий постановки ПЦР по ISSR маркерам важно апробировать ряд температурных режимов отжига в диапазоне стандартной ПЦР реакции: 45-60 °С. Это необходимо осуществить для выбора наиболее оптимальных условий, при которых амплифицированные фрагменты будут приемлемы для анализа. К недостаткам метода можно отнести высокий уровень субъективности при оценке результатов генотипирования на агарозном или акриламидном геле. Данные, полученные в ходе анализа, могут сильно варьировать в зависимости от человека, оценивающего результаты.

В исследованиях представителей рода *Prunus* ISSR нашли широкое применение, о чем свидетельствует большое количество опубликованных работ [10-15]. Так, ISSR маркеры в связке с SSR маркерами были задействованы в работе по генотипированию греческой генплазмы черешни [16]. Применение ISSR/SSR дало возможность прогнозировать положительную корреляцию между данными, генерируемыми молекулярными маркерами, и морфофизиологическими признаками. Методика ISSR была успешно применена для идентификации сортов черешни, вишни и их подвоев [12]. Небольшая исследовательская работа проведена турецкими учёными на генотипах, относящихся к различным подородам *Prunus* [11].

В исследовании генетического разнообразия иранского генофонда вишни исследовано и идентифицировано 12 сортов с использованием 23 ISSR маркеров. Результаты также подтвердили, что ISSR является надёжными ДНК-маркерами, которые можно использовать для генетических исследований и проведения селекционных программ [17]. Генетическое разнообразие и структура 10 природных популяций

Prunus pseudocerasus Lindl. были исследованы с использованием ISSR [18]. К числу видов, на которых были апробированы ISSR маркеры, также относится *P. yedoensis* [19].

Приведённые выше сведения демонстрируют актуальность применения ISSR в генетической практике. В связи с этим целью данной работы является поиск и обнаружение эффективных ISSR-маркеров для генотипирования представителей вида *P. serrulata*.

Объекты и методы исследований. Выделение ДНК проводилось стандартной ЦТАБ методикой [20]. ПЦР была проведена согласно следующей программе: 3 минуты предварительной денатурации при температуре 95 °С; последующие 45 циклов: денатурация 30 секунд при 95 °С, отжиг праймеров 30 секунд при 50 °С, элонгация 2 минуты при 72 °С 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 праймер (0,32 мкМ), 40-50 нг тотальной ДНК. Для апробации маркеров электрофорез ПЦР-продуктов проводился при напряжении 120 В 2 % агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Визуализация ДНК осуществлялась в ультрафиолете.

Обсуждение результатов. Для эффективного анализа результатов мультилокусного маркирования, в частности ISSR маркеров, необходимо высокое качество получаемых ДНК-фингерпринтов. Особенно большое значение это приобретает при анализе родства исследуемых генотипов, так как на результат может повлиять любая неточность в полученных результатах и, как следствие, недостоверная их интерпретация.

Ошибки в интерпретации могут быть вызваны как неправильным определением количества ДНК-фрагментов на электрофореграмме, так и

некорректной оценкой их размера в парах нуклеотидов. К причинам, способным вызвать подобные ошибки, можно отнести фоновое свечение дорожки и интенсивность свечения ДНК-фрагмента. Основываясь на изложенных выше критериях, и был проведен отбор ISSR маркеров, апробированных на двух генотипах. При этом, для максимальной достоверности амплификацию по каждому из маркеров при апробации проводили в трехкратной повторности.

Был проведен поиск ISSR маркеров, перспективных для использования в изучении генетического полиморфизма *P. serrulata*. Предварительный анализ 35 маркеров на 2 сортах сакуры выявил 26 маркеров, дающих продукты амплификации в ходе ПЦР (рис.).

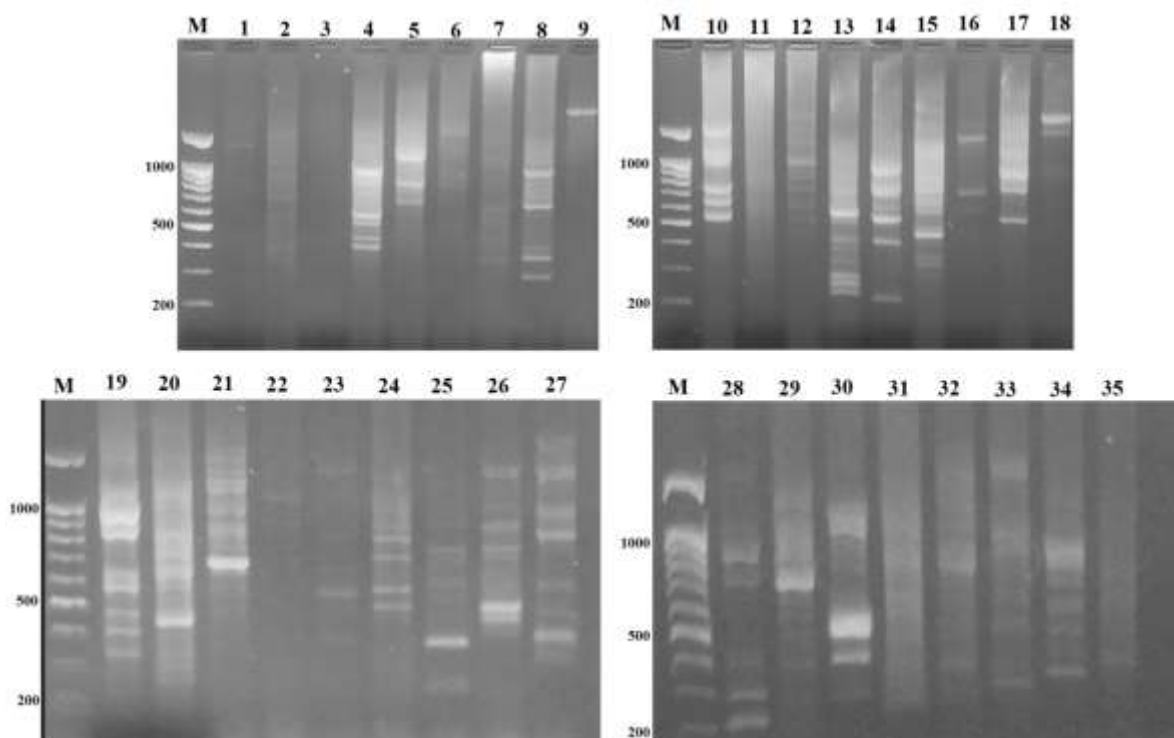


Рис. Результаты апробации ISSR маркеров

Условные обозначения: М – маркер молекулярной массы,
1) UBC 807 2) UBC 808 3) UBC 810 4) UBC 811 5) UBC 813 6) UBC 815 7) UBC 817 8) UBC 818 9) UBC 824 10) UBC 825 11) UBC 826 12) UBC 827 13) UBC 841 14) UBC 843 15) UBC 844 16) UBC 845 17) UBC 849 18) UBC 853 19) UBC 864 20) UBC 873 21) 3A21 22) 3A30 23) 3A35 24) 3A37 25) 3A39 26) 3A59 27) ASSR02 28) ASSR15 29) ASSR20 30) ASSR29 31) X9 32) X10 33) X11 34) M1 35) M8

Исходя из качества полученных в результате генотипирования ДНК-фингерпринтов, ISSR маркеры были разделены на 4 группы (табл.). 4 группа – отсутствие амплификации при постановке ПЦР у ISSR-маркера.

В 3 группу были включены маркеры, обладающие незначительным количеством ДНК-фрагментов (от 1 до 3) или/и их слабой интенсивностью свечения, затрудняющей оценку результатов анализа. К таким маркерам можно отнести: UBC 808, UBC 815, UBC 817, UBC 824, UBC 845, UBC 853, X9, X10, X11, M1.

Качество ДНК-фингерпринтов

№	Название маркера	Качество ДНК-фингерпринта*	№	Название маркера	Качество ДНК-фингерпринта
1	UBC 807	4	19	UBC 864	1
2	UBC 808	3	20	UBC 873	2
3	UBC 810	4	21	3A21	2
4	UBC 811	1	22	3A30	4
5	UBC 813	1	23	3A35	4
6	UBC 815	3	24	3A37	2
7	UBC 817	3	25	3A39	2
8	UBC 818	1	26	3A59	1
9	UBC 824	3	27	ASSR02	1
10	UBC 825	1	28	ASSR15	2
11	UBC 826	4	29	ASSR20	2
12	UBC 827	3	30	ASSR29	2
13	UBC 841	2	31	X9	3
14	UBC 843	1	32	X10	3
15	UBC 844	2	33	X11	3
16	UBC 845	3	34	M1	3
17	UBC 849	2	35	M8	4
18	UBC 853	3			

*условно определено четыре группы от 4 к 1 по степени улучшения качества ДНК-фингерпринта.

Во вторую группу включены маркеры, которые по качеству ДНК-фингерпринтов превосходят ISSR, включённых в третью группу, но уступают по количеству и выраженности ДНК-фрагментов маркерам, включённым в 1 группу.

Таким образом, маркеры 2 группы занимают промежуточное положение между маркерами 1 и 3 группы. Так как они превосходят по качественным показателям ISSR 3 группы, их можно использовать в качестве дополнительных маркеров для генотипирования совместно с ISSR первой группы.

В первую группу вошли ISSR маркеры, обладающие наибольшим количеством амплифицированных фрагментов и легко интерпретируемым видом ДНК-фингерпринтов. К первой группе отнесены: UBC 811, UBC 813, UBC 818, UBC 825, UBC 843, UBC 864, 3A59, ASSR02. Их применение в дальнейшей работе по анализу генетического разнообразия сакур является приоритетным.

Выводы. В результате выполненной работы на генотипах сакуры из 35 ISSR маркеров было отобрано 8 перспективных для дальнейшей работы. Дальнейшая работа будет направлена на проведение оценки генетического полиморфизма отобранных маркеров с последующим расширением объёма анализируемой выборки образцов.

Литература

1. Adibah A.B., Liew P.L., Tan S.G., Faridah Q.Z., Christianus A. Development of single-locus DNA microsatellite markers using 5 anchored ISSR-PCR method for the mangrove horseshoe crab, *Carcinoscorpius rotundicauda* (Latreille, 1802) in Peninsular Malaysia // *Molecular Biology Reports*. 2012. № 39. P. 3815-3820.
2. Guichoux E., Lagache L., Wagner S., Chaumeil P., Leger P., Lepais O., Lepoittevin C., Malausa T., Revardel E., Salin F., Petit R.J., Current trends in microsatellite genotyping // *Molecular Ecology Resources*. 2011. № 11. P. 591-611.
3. Kalia R.K., Rai M.K., Kalia S., Singh R., Dhawan A.K. Microsatellite markers: An overview of the recent progress in plants // *Euphytica*. 2011. № 177. P. 309-334.
4. Lian C., Zhou Z., Hogetsu T. A simple method for developing microsatellite markers using amplified fragments of intersimple sequence repeat (ISSR) // *Journal of Plant Research*. 2001. № 114. P. 381-385.
5. Mariette S., Le Corre V., Austerlitz F., Kremer A. Sampling within the genome for measuring within population diversity: trade-offs between markers. // *Molecular Ecology*. 2002. № 11. P. 1145-1156.
6. Meyer W., Mitchell T.G., Freedman E.Z., Vilgays R. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans* // *Journal of Clinical Microbiology*. 1993. № 31. P. 2274-2280.
7. Gupta M., Chyi Y.S., Romero-Severson J., Owen J.L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats // *Theoretical and Applied Genetics*. 1994. № 89. P. 998-1006.

8. Wu K.S., Jones R., Danneberger L., Scolnik P.A., Detection of microsatellite polymorphisms without cloning // *Nucleic Acids Research*. 1994. № 22. P. 3257-3258.
9. Zietkiewicz, E, Rafalski, A & Labuda, D 1994, 'Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification', *Genomics*, vol. 20, pp. 176-183.
10. Carrasco B., Díaz C., Moya M., Gebauer M., García-Gonzalez R. Genetic characterization of Japanese plum cultivars (*Prunus salicina*) using SSR and ISSR molecular markers // *Cien. Inv. Agr.* 2012. № 39(3). P.533-543.
11. Yilmaz K.U., Bayram S.E., Yıldız M.A., Kafkas D.S. Genetic Relatedness in *Prunus* Genus Revealed by Inter-simple Sequence Repeat Markers // *Hortscience* 2009. № 44(2). P. 293-297.
12. Lisek A., Rozpara E. Identification and genetic diversity assessment of cherry cultivars and rootstocks using the ISSR-PCR technique // *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*. 2009. № 17(2). P. 95-106
13. W. Liu D. Liu and A. Zhang C Feng and J Yang J Yoon S Li Genetic Diversity and Phylogenetic Relationships among Plum Germplasm Resources in China Assessed with Inter-simple Sequence Repeat Markers // *J. AMER. SOC. HORT. SCI.* 2007. № 132(5). P. 619-628.
14. M. Li, Zhao Z., Jun X., Miao Genetic variability of wild apricot (*Prunus armeniaca* L.) populations in the Ili Valley as revealed by ISSR markers // *Genet. Resour. Crop Evol.* 2013. № 60 P. 2293-2302
15. Sarhan S., Hamed F., Lawand S., Al-Youssef W. Relationships among Peach, almond, and related species as detected by SSR/ ISSR markers // *International Journal of Chem Tech Research*. 2015. № 8. № 1, P. 82-88.
16. Ganopoulos I.V., Kazantzis K., Chatzicharisis I., Karayiannis I., Tsaftaris A.S. Genetic diversity, structure and fruit trait associations in Greek sweet cherry cultivars using microsatellite based (SSR/ISSR) and morpho-physiological markers *Euphytica* DOI 10.1007/s10681-011-0416-z
17. Najafzadeh R., Arzani K., Bouzari N., Saei A. Genetic Diversity Assessment and Identification of New Sour Cherry Genotypes Using Intersimple Sequence Repeat Markers // *International Journal of Biodiversity*. 2014. Article ID 308398, 8 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/308398>
18. Li M-M., Cai Y.-L., Qian Z.-Q., Zhao G.-F. Genetic diversity and differentiation in Chinese sour cherry *Prunus pseudocerasus* Lindl., and its implications for conservation // *Genet Resour Crop Evol.* 2009. № 56. P.455-464
19. Roh M. S., Cheong E. J., Choi I.-Y., Joung Y. H. Characterization of wild *Prunus yedoensis* analyzed by inter-simple sequence repeat and chloroplast DNA *Scientia Horticulturae*. 2007. №114. P.121-128
20. Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of higher weight DNA *Nucleic Acids Research*. 1980. №8(19). P.4321-4325

References

1. Adibah A.B., Liew P.L., Tan S.G., Faridah Q.Z., Christianus A. De-velopment of singlelocus DNA microsatellite markers using 5 anchored ISSR-PCR method for the mangrove horseshoe crab, *Carcinoscorpius rotundicauda* (Latreille, 1802) in Peninsular Malaysia // *Molecular Biology Reports*. 2012. № 39. P. 3815–3820.
2. Guichoux E., Lagache L., Wagner S., Chaumeil P., Leger P., Lepais O., Lepoittevin C., Malausa T., Revardel E., Salin F., Petit R.J., Current trends in microsatellite genotyping // *Molecular Ecology Resources*. 2011. № 11. P. 591–611.
3. Kalia R.K., Rai M.K., Kalia S., Singh R., Dhawan A.K. Microsatellite markers: An overview of the recent progress in plants // *Euphytica*. 2011. № 177. P. 309–334.

4. Lian C., Zhou Z., Hogetsu T. A simple method for developing microsatellite markers using amplified fragments of intersimple sequence repeat (ISSR) // *Journal of Plant Research*. 2001. № 114. P. 381–385.
5. Mariette S., Le Corre V., Austerlitz F., Kremer A. Sampling within the genome for measuring within population diversity: trade-offs between markers. // *Molecular Ecology*. 2002. № 11. P. 1145–1156.
6. Meyer W., Mitchell T.G., Freedman E.Z., Vilgays R. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans* // *Journal of Clinical Microbiology*. 1993. № 31. P. 2274–2280.
7. Gupta M., Chyi Y.S., Romero-Severson J., Owen J.L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats // *Theoretical and Applied Genetics*. 1994. № 89. P. 998–1006.
8. Wu K.S., Jones R., Danneberger L., Scolnik P.A., Detection of microsatellite polymorphisms without cloning // *Nucleic Acids Research*. 1994. № 22. P. 3257–3258.
9. Zietkiewicz, E, Rafalski, A & Labuda, D 1994, 'Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification', *Genomics*, vol. 20, pp. 176–183.
10. Carrasco B., Díaz C., Moya M., Gebauer M., García-Gonzalez R. Genetic characterization of Japanese plum cultivars (*Prunus salicina*) using SSR and ISSR molecular markers // *Cien. Inv. Agr.* 2012. № 39(3). P.533–543.
11. Yılmaz K.U., Bayram S.E., Yıldız M.A., Kafkas D.S. Genetic Relatedness in *Prunus* Genus Revealed by Intersimple Sequence Repeat Markers // *Hortscience* 2009. № 44(2). P. 293–297.
12. Lisek A., Rozpara E. Identification and genetic diversity assessment of cherry cultivars and rootstocks using the ISSR-PCR technique // *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*. 2009. № 17(2). P. 95–106
13. W. Liu D. Liu and A. Zhang C Feng and J Yang J Yoon S Li Genetic Diversity and Phylogenetic Relationships among Plum Germplasm Resources in China Assessed with Intersimple Sequence Repeat Markers // *J. AMER. SOC. HORT. SCI.* 2007. № 132(5). P. 619–628.
14. M. Li, Zhao Z., Jun X., Miao Genetic variability of wild apricot (*Prunus armeniaca* L.) populations in the Ili Valley as revealed by ISSR markers // *Genet. Resour. Crop Evol.* 2013. № 60 P. 2293–2302
15. Sarhan S., Hamed F., Lawand S., Al-Youssef W. Relationships among Peach, almond, and related species as detected by SSR/ ISSR markers // *International Journal of Chem Tech Research*. 2015. № 8. № 1, P. 82–88.
16. Ganopoulos I.V., Kazantzis K., Chatzicharisis I., Karayiannis I., Tsiftaris A.S. Genetic diversity, structure and fruit trait associations in Greek sweet cherry cultivars using microsatellite based (SSR/ISSR) and morpho-physiological markers *Euphytica*. DOI 10.1007/s10681-011-0416-z
17. Najafzadeh R., Arzani K., Bouzari N., Saei A. Genetic Diversity Assessment and Identification of New Sour Cherry Genotypes Using Intersimple Sequence Repeat Markers // *International Journal of Biodiversity*. 2014. Article ID 308398, 8 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/308398>
18. Li M-M., Cai Y.-L., Qian Z.-Q., Zhao G.-F. Genetic diversity and differentiation in Chinese sour cherry *Prunus pseudocerasus* Lindl., and its implications for conservation // *Genet Resour Crop Evol.* 2009. № 56. P.455–464
19. Roh M. S., Cheong E. J., Choi I.-Y., Joung Y. H. Characterization of wild *Prunus yedoensis* analyzed by inter-simple sequence repeat and chloroplast DNA *Scientia Horticulturae*. 2007. №114. P.121–128
20. Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of higher weight DNA *Nucleic Acids Research*. 1980. №8(19). P.4321–4325