

УДК 581.1:633/635

**ПОИСК ОПТИМАЛЬНЫХ
ISSR МАРКЕРОВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ
ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ПАНКРАЦИЯ
МОРСКОГО***

Супрун Иван Иванович
канд. биол. наук
старший научн. сотрудник,
зав. лабор. генетики и микробиологии

*ФГБНУ «Северо-Кавказский зональный
научно-исследовательский институт
садоводства и виноградарства», Краснодар,
Россия*

Коломиец Татьяна Михайловна
канд. с.-х. наук.
ведущий научный сотрудник
tat851@yandex.ru

Соколов Роман Николаевич
аспирант
quiproduct@gmail.com

Маляровская Валентина Ивановна
канд. биол. наук
зав. лабораторией биотехнологии,
физиологии и биохимии растений,
malyarovskaya@yandex.ru

Самарина Лидия Сергеевна
канд. биол. наук
младший научный сотрудник
q11111w2006@yandex.ru

*ГНУ Всероссийский научно-
исследовательский институт цветоводства
и субтропических культур, Сочи, Россия
e-mail: subplod@mail.ru*

Молекулярно-генетические методы анализа
генетического полиморфизма обладают
высокой перспективностью для оценки
разнообразия природных популяций редких

UDC 581.1:633/635

**THE SEARCH OF OPTIMAL
ISSR MARKERS
FOR GENOTYPING
OF SEA DAFFODIL**

Suprun Ivan
Cand. Sci. Biol.
Senior Research Associate
of Laboratory

*FSBSO «North Caucasian
Regional Research Institute
of Horticulture and Viticulture»,
Krasnodar, Russia*

Kolomiets Tatiana
Cand. Agr. Sci.
Leading Research Associate
tat851@yandex.ru

Sokolov Roman
Post Graduate Student
quiproduct@gmail.com

Malyarovskaya Valentine
Cand. Sci. Biol.
Head of Laboratory of Biotechnology
and Physiology and Biochemistry of Plants
malyarovskaya@yandex.ru

Samarina Lydia
Cand. Sci. Biol.
Junior Research Associate
q11111w2006@yandex.ru

*SSI All-Russian Research Institute
of Floriculture and Subtropical Crops, ,
Sochi, Russia
e-mail: subplod@mail.ru*

Molecular and genetic methods
of analysis of genetic polymorphism
are highly promising for the evaluation
of the diversity of natural populations

* Исследования проводились при финансовой поддержке РФФИ
(грант № 13-04-96572)

видов растений, к которым относится и *Pancratium maritimum*. Работы в этом направлении позволяют установить состояние видов на генетическом уровне и выявить процессы обеднения генофонда, вызванные сокращением численности вида, наблюдаемые в последнее десятилетие. Широкое распространение в данном анаучном направлении получили ISSR (inter simple sequence repeat)-маркеры. Настоящее исследование направлено на подбор эффективных ISSR маркеров для генотипирования образцов панкрация морского культивируемого *in vitro*. Панкраций морской является видом, занесенным в Красную книгу. В России он встречается только в Краснодарском крае. Исходя из поставленной цели, в ходе работы был выполнен отбор ISSR маркеров, позволяющих получать воспроизводимые ПЦР – фрагменты. Далее нами проведено последующее определение наиболее полиморфных маркеров из числа отобранных. В ходе выполнения исследования были апробированы ISSR-маркеры UBC818, UBC864, UBC813, UBC825, UBC880, UBC811, UBC827 на 9 образцах панкрация морского. Отобраны маркеры UBC818 и UBC864, которые дали четкие легко интерпретируемые ПЦР-продукты. У маркера UBC818 на исследованных образцах панкрация морского выявлен высокий уровень полиморфизма. По данному маркеру для использованных образцов *Pancratium maritimum* было выявлено три уникальных набора фрагментов. Отобранные маркеры, как UBC818, так и UBC864 будут в дальнейшем использованы для анализа стабильности генотипа при длительном культивировании *in vitro*, а также оценки генетического полиморфизма панкрация морского, произрастающего на Черноморском побережье Кавказа.

Ключевые слова: PANCRATIUM MARITIMUM, ISSR-МАРКЕРЫ, КУЛЬТУРА IN VITRO, ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ

of rare plant species, including *Pancratium maritimum*. The works in this direction allow to establish the state of species on the genetic level and to identify the processes of depletion of the gene pool, due to the reduction of the number of species observed in the last decade. The ISSR-markers (inter simple sequence repeat) are widely distributed in the scientific field. The direction of the present study is the selection of effective ISSR markers for genotyping samples *Pancratium maritimum* cultured *in vitro*. *Pancratium maritimum* is a species in a Red book. In the Russia it is only in the Krasnodar Region. Based on the goal of the work the selection of ISSR-markers was carried out to obtain reproducible PCR-fragments. The subsequent determination of the most polymorphic markers from the number selected was conducted further. In the course of the study ISSR-markers UBC818, UBC864, UBC813, UBC825, UBC880, UBC811, UBC827 were tested on 9 samples of *Pancratium maritimum*. UBC818 and UBC864 markers that showed the clear easily interpretable PCR products were selected. A high level of polymorphism was revealed for marker UBC818 on these samples of *Pancratium maritimum*. By this marker for used samples of *Pancratium maritimum* 3 unique fragments were revealed. Selected markers will be further used to estimate the genetic polymorphism of *Pancratium maritimum* growing on the Black Sea coast of the Caucasus, as well as to analyze the stability of the genotype in a long-term culture *in vitro*.

Key words: PANCRATIUM MARITIMUM, ISSR-MARKERS, CULTURE IN VITRO, GENETIC POLYMORPHISM

Введение. В настоящее время широкое распространение в оценке генетического разнообразия получили методы, основанные на использовании полимеразной цепной реакции – ПЦР. Положительно себя зарекомендовали при изучении генетического разнообразия популяций ISSR-маркеры. При ISSR анализе используется один или несколько праймеров длиной 15-24 нуклеотида. Праймеры комплементарны повторяющимся участкам генома (микросателлитам). Микросателлиты – последовательности, состоящие из многократно повторяющегося элемента (мотива), например, ди-, три-, тетрануклеотида.

ISSR праймеры состоят из тандемных коротких 2-4 нуклеотидных повторов и одного селективного нуклеотида на 3-м конце праймера. Продукты ISSR – амплификации содержат на флангах инвертированную микросателлитную последовательность праймера.

Выявляемый полиморфизм с использованием праймеров ISSR более четко воспроизводим, чем в RAPD [1]. Относительно высокая точность и улучшенная воспроизводимость по сравнению с RAPD связана с большей длиной праймера и более высокой температурой отжига. Однако локализация в геноме продуктов амплификации, так же, как и функция, остаются неизвестными. Как RAPD маркеры, так и ISSR относятся к доминантным ДНК-маркерам [2, 3].

В отличие от SSR, тип маркирования ISSR не требует предварительного клонирования и секвенирования фрагментов для подбора праймеров и обладает воспроизводимостью между разными видами, в том числе и принадлежащими к генетически отдаленным таксонам. Однако важным этапом при использовании ISSR маркеров является апробация их применительно к целевому виду и отбор наиболее полиморфных маркеров.

Молекулярно-генетические исследования важны для оценки разнообразия природных популяций редких видов, к которым относится и *Panocratium maritimum*. Работы в этом направлении позволяют установить

состояние видов на генетическом уровне и выявить процессы обеднения генофонда, вызванные сокращением численности вида, наблюдаемые в последнее десятилетие.

Панкраций морской является видом, занесенным в Красную книгу. В России он встречается только в Краснодарском крае, на южном участке Черноморского побережья Кавказа (в районе Большого Сочи) [4].

По данным Красной книги Краснодарского края (2007), в начале XXI века в России сохранилось около 10 экземпляров *Pancratium maritimum* [5]. В связи с чем во ВНИИЦиСК (г. Сочи) проводятся исследования по усовершенствованию приемов размножения и сохранения растений этого вида в условиях *in vitro* [6]. При этом важным преимуществом разрабатываемой технологии размножения редких генотипов в культуре *in vitro* должно явиться массовое воспроизводство генетически стабильных регенератов, не отличающихся по ряду морфологических, биохимических и генотипических признаков от исходных растений.

Выявление возможной изменчивости обеспечивается применением наиболее воспроизводимых и доступных методов экспресс-анализа. Использование молекулярно-генетических методов крайне актуально для решения проблем, связанных с контролем генетической стабильности медленно растущих и длительно хранящихся образцов при создании банков *in vitro* [7]. В настоящее время известно о проводимых генетических исследованиях панкрация морского с использованием AFLP маркеров во Франции, Испании, Италии и Греции [8]. Известно также, что для дальнейших исследований вида был разработан набор SSR маркеров [9].

Целью настоящего исследования является поиск, апробация и отбор эффективных ISSR маркеров для изучения генетического разнообразия панкрация морского. Исходя из поставленной цели, можно выделить два этапа работы: отбор ISSR маркеров, позволяющих получать воспроизводимые ПЦР-фрагменты, и последующее определение полиморфных маркеров из числа отобранных.

Объекты и методы исследований. К предмету исследований принадлежит редкий, исчезающий эндемичный вид флоры Западного Кавказа, который занесен в Красную книгу Краснодарского края и России [4,5]. Основными критериями отбора вида для исследований является: наличие вида в Красных книгах, охранных списках любого ранга; распространение и состояние популяции, практическое использование вида, который становится редким и исчезающим в результате массового истребления растений в естественной и находящейся в критическом состоянии среде (рис. 1).



Рис. 1. Цветение *Pancratium maritimum*

Для апробации ISSR- маркеров использовали 9 образцов *Pancratium maritimum* из культуры *in vitro*. ДНК экстрагировали из листовой ткани. Для экстракции ДНК использовали метод СТАВ, основанный на применении детергента цетил триметил аммоний бромида [10,11].

ПЦР проводили по следующей программе: 3 минуты предварительной денатурации при температуре 94 °С; последующие 35 циклов: денатурация 35 с при 94 °С, отжиг 35 с при 50°С, синтез 45 с при 72 °С и финальный цикл синтеза при температуре 72 °С в течение 5 минут.

ПЦР смесь содержала: 2,5 мкл 10 кратного буфера для Taq полимеразы, 1,5 мкл смеси олигонуклеотидов (2,5 мМ), 0,3 мкл Taq ДНК полимеразы, 3 мкл праймеров (3,5 мМ) и 50 нг тотальной ДНК. Анализ продуктов

ПЦР реакции проводили с помощью электрофореза в 2% агарозном геле с 0,5 кратным ТБЕ буфером. Продукты реакции окрашивали этидиум бромидом и визуализировали в ультрафиолете [8]. В ходе работы апробировали 7 ISSR-маркеров: UBC818, UBC864, UBC813, UBC825, UBC880, UBC811, UBC827.

Обсуждение результатов. При анализе образцов панкрация морского с использованием апробированных ISSR-маркеров был выявлен различный уровень информативности и полиморфизма.

Для маркеров UBC827 и UBC880 было характерно отсутствие продуктов амплификации. Маркеры UBC813, UBC825 и UBC811 дали слабые ДНК - фрагменты, не подлежащие идентификации (рис. 2). Это говорит о невозможности их дальнейшего использования для генотипирования образцов, принадлежащих изучаемому виду.

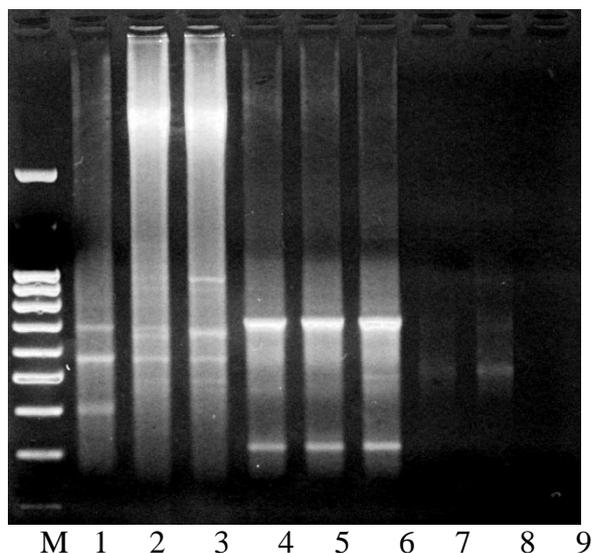


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации образцов *Pancratium maritimum* по ISSR маркерам UBC818 и UBC864 (М – маркер молекулярной массы, 1-3 – UBC818; 4-6 – UBC864; 7-9 – UBC813).

В то же время, как видно из рис. 2, маркеры UBC818, UBC864 показали воспроизводимые фрагменты на электрофорезе. По результатам апробации маркера UBC864 не было выявлено полиморфизма между тремя

изученными образцами, что видно по наличию двух одинаковых фрагментов у всех изученных образцов *Pancreatia* морского. В свою очередь маркер UBC818 показал высокий уровень полиморфизма между исследуемыми образцами – каждый образец характеризуется специфичным для него набором фрагментов в ISSR-спектре.

Заключение. Таким образом, в результате выполненной работы выявлены два ISSR маркера, позволяющие получать воспроизводимые ПЦР - фрагменты, включая высокополиморфный маркер UBC818, по которому для использованных образцов *Pancreatium maritimum* было выявлено три уникальных набора фрагментов.

Данный маркер перспективен для дальнейшего использования в изучении генетического полиморфизма целевого вида. Использование маркера UBC864 также представляется возможным, однако заключительный вывод о перспективности его использования можно будет сделать после апробации на большем количестве образцов данного вида. Кроме того, маркеры UBC818 и UBC864 могут быть использованы для анализа стабильности генотипа при длительном культивировании *in vitro*.

Литература

1. Manninen O., Kalendar R., Robinson J., Schulman A.H. Application of BARE-1 retrotransposon markers to the mapping of a major resistance gene for net blotch in barley // Mol. Gen. and Genet.– 2000. – 264, N 3. – P. 325-334.
2. Сиволап, Ю.М. Генетический полиморфизм злаковых растений при помощи ПЦР с произвольными праймерами / Ю.М. Сиволап, Р.Н. Календарь, С.В. Чеботарь // Цитология и Генетика. – М., 1994. – №28. – С. 54-61.
3. Zietkiewicz, E. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification / E. Zietkiewicz, A. Rafalski, D. Labuda // Genomics. – Canada, 1994. – №20 (2). – С. 176-183.
4. Красная книга Российской Федерации (Растения и грибы).– М.: Министерство природных ресурсов и экологии РФ и Росприроднадзор, 2008.– С. 56-57.– ISBN 958-5-87317-476-8.
5. Красная книга Краснодарского края (Растения и грибы). Изд. 2-е / В. Акатов, Т. Акатова, М. Вахрамеева и др. – ООО "Дизайн Бюро №1".– Краснодар, 2007. – С. 640.
6. Самарина, Л.С. Сохранение *in vitro* исчезающего псаммофита Черноморского побережья России *Pancreatium maritimum* L./ Л.С.Самарина, Т.М. Коломиец, Н.А. Слепченко // Сб. Трудов ГНУ ВНИИЦиСК, 2012.– Вып. 47.– С. 172-177.

7. Артюкова, Е.В. Анализ генетической изменчивости редкого эндемичного вида *Oxytropis chankaensis* Jurtz. (Fabaceae) на основе RAPD-маркеров / Е.В. Артюкова, А.Б. Холина, М.М. Козыренко, Ю.Н. Журавлев // Генетика, 2004.– Т. 40.– № 7.– С. 877-884.
8. Grassi, F. Evaluation of biodiversity and conservation strategies in *Pancreatum maritimum* L. for the Northern Tyrrhenian Sea / F. Grassi, E. Cazzaniga, L. Minuto et al // Biodiversity and Conservation – 2005. – №14 – С. 2159-2169.
9. Maio A.D. Development and characterization of 21 microsatellite markers for *Pancreatum maritimum* L. (Amaryllidaceae) / A.D. Maio, O. D. Castro // Conservation Genet Resour – 2013. – №5 – С. 911-914.
10. Murray, M. G. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA / M.G. Murray, W. F. Thompson // Nucleic Acids Research, 1980. – Vol. 10. – P. 4321-4325.
11. Остерман, Л.А. Методы исследования нуклеиновых кислот / Л.А. Остерман. - М.: Наука, 1981. - 288 с.

References

1. Manninen O., Kalendar R., Robinson J., Schulman A.H. Application of BARE-1 retrotransposon markers to the mapping of a major resistance gene for net blotch in barley // Mol. Gen. and Genet.– 2000. – 264, N 3. – P. 325-334.
2. Civolap, Yu.M. Geneticheskiy polimorfizm zlakovykh rasteniy pri pomoschi PTsR s proizvod'nymi praymerami / Yu.M. Civolap, R.N. Kalendar', S.V. Chebotar' // Tsitologiya i Genetika. – М., 1994. – №28. – S. 54-61.
3. Zietkiewicz, E. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification / E. Zietkiewicz, A. Rafalski, D. Labuda // Genomics. – Canada, 1994. – №20 (2). – S. 176-183.
4. Krasnaya kniga Rossiyskoy Federatsii (Rasteniya i griby).– М.: Ministerstvo prirodnih resursov i ekologii RF i Rosprirodnadzor, 2008.– S. 56-57.– ISBN 958-5-87317-476-8.
5. Krasnaya kniga Krasnodarskogo kraya (Rasteniya i griby). Izd. 2-e / V. Akatov, T. Akatova, M. Vahrameeva i dr. – ООО "Dizayn Byuro №1".– Krasnodar, 2007. – S. 640.
6. Samarina, L.S. Sohranenie in vitro ischezayuschego psammofita Chernomorskogo poberezh'ya Rossii *Pancreatum maritimum* L./ L.S.Samarina, T.M. Kolomiets, N.A. Slepchenko // Sb. Trudov GNU VNIITSiSK, 2012.– Vyp. 47.– S. 172-177.
7. Artyukova, E.V. Analiz geneticheskoy izmenchivosti redkogo endemichnogo vida *Oxytropis chankaensis* Jurtz. (Fabaceae) na osnove RAPD-markerov / E.V. Artyukova, A.B. Holina, M.M. Kozыrenko, Yu.N. Zhuravlev // Genetika, 20046.– Т. 40.– № 7.– S. 877-884.
8. Grassi, F. Evaluation of biodiversity and conservation strategies in *Pancreatum maritimum* L. for the Northern Tyrrhenian Sea / F. Grassi, E. Cazzaniga, L. Minuto et al // Biodiversity and Conservation – 2005. – №14 – S. 2159-2169.
9. Maio A. D. Development and characterization of 21 microsatellite markers for *Pancreatum maritimum* L. (Amaryllidaceae) / A. D. Maio, O. D. Castro // Conservation Genet Resour – 2013. – №5 – S. 911-914.
10. Murray, M. G. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA / M.G. Murray, W. F. Thompson // Nucleic Acids Research, 1980. – Vol. 10. – P. 4321-4325.
11. Osterman, L.A. Metody issledovaniya nukleinovykh kislot / L.A. Osterman. М.: Nauka, 1981.– 288 s.