

УДК 630.1 (575.22)

DOI: 10.25686/2306-2827.2019.4.59

ОЦЕНКА ПОЛИМОРФИЗМА И ПОДБОР SSR- И IPBS-МАРКЕРОВ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ БЕРЕЗЫ ПОВИСЛОЙ

О. В. Шейкина¹, Е. А. Гладкова², Ю. Ф. Гладков², И. А. Алексеев¹,
Р. И. Винокурова¹

¹ Поволжский государственный технологический университет,
Российская Федерация, 424000, Йошкар-Ола, пл. Ленина, 3

² Филиал ФБУ «Российский центр защиты леса» – «Центр защиты леса Республики Марий Эл»,
Российская Федерация, 424000, Йошкар-Ола, ул. Комсомольска, 83
E-mail: ShejkinaOV@volgatech.net

*Представлены результаты оценки уровня полиморфизма SSR- и iPBS-маркеров. У шести SSR-локусов обнаружили от четырёх до четырнадцати аллелей, а наблюдаемая гетерозиготность варьировала от 0,46 до 0,88. Показатели генетического разнообразия двенадцати iPBS-праймеров варьировали в следующих границах: количество полиморфных ПЦР-фрагментов 3–14, доля полиморфных праймеров 42,9–100,0 %, ожидаемая гетерозиготность 0,14–0,34. Отобрано четыре наиболее информативных микросателлитных локуса (L1.1, L2.3, L5.4 и L7.8) и четыре iPBS-праймера (iPBS2076, iPBS2078, iPBS2232 и iPBS2271) с высоким уровнем полиморфизма. Данные праймеры могут быть рекомендованы для молекулярно-генетических исследований берёзы повислой (*Betula pendula*).*

Ключевые слова: *Betula pendula*; SSR-маркеры; iPBS-маркеры; уровень полиморфизма.

Введение. ДНК-маркеры нашли широкое применение для решения многих задач в различных отраслях науки [1–3]. В отношении древесных видов различные типы ДНК-маркеров применяются в селекционных, популяционных, филогенетических и филогеографических исследованиях [4–6]. Выбор типа ДНК-маркера для решения тех или иных научных задач обусловлен рядом факторов, к которым относятся ожидаемый уровень полиморфизма, тип наследования маркеров, простота и доступность выполнения анализа, стоимость, наличие специализированного оборудования и навыков у исследователя [1].

Наибольшей популярностью в последние годы пользуются SSR-маркеры, или микросателлиты (Simple Sequence Repeats, microsatellites), которые представляют собой короткие 2- и 6-нуклеотидные

тандемно повторяющиеся последовательности [7]. Этот тип ДНК-маркеров показывает высокую изменчивость на индивидуальном и популяционном уровнях и считается одним из наиболее надёжных и высокопроизводимым [2, 8]. Однако современная модификация метода анализа изменчивости микросателлитов требует использования флуоресцентных меток и проведения капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе для определения длин аллелей, что делает SSR-маркеры более дорогими в использовании [2]. Другим фактором, ограничивающим использование SSR-маркеров, является их видоспецифичность. Хотя и есть примеры того, что праймеры, разработанные для амплификации микросателлитных последовательностей одних видов, успешно используются для других близкородственных

© Шейкина О. В., Гладкова Е. А., Гладков Ю. Ф., Алексеев И. А., Винокурова Р. И., 2019.

Для цитирования: Шейкина О. В., Гладкова Е. А., Гладков Ю. Ф., Алексеев И. А., Винокурова Р. И. Оценка полиморфизма и подбор SSR- и IPBS-маркеров для молекулярно-генетических исследований берёзы повислой // Вестник Поволжского государственного технологического университета. Сер.: Лес. Экология. Природопользование. 2019. № 4 (44). С. 59–69. DOI: 10.25686/2306-2827.2019.4.59

видов [9], однако, успешный трансфер праймеров с одного вида на другой наблюдается не во всех случаях [10]. Отмечается, что процент успешно амплифицированных микросателлитных локусов может снижаться при использовании невидоспецифичных праймеров [11].

Разработка видоспецифичных SSR-праймеров сложна из-за необходимости знаний нуклеотидной последовательности [1]. Праймеры для амплификации микросателлитных локусов разработаны для *Betula platyphylla* [12, 13], *Betula pendula* [14], *Betula pubescens ssp. tortuosa* [15], *Betula alnoides* [16], *Betula luminifera* [17]. Также есть примеры успешного использования видоспецифичных SSR-праймеров для других видов берёз [14, 16, 18].

Наиболее доступной альтернативой SSR-маркерам являются ДНК-маркеры, основанные на амплификации анонимных участков генома с использованием для полимеразной цепной реакции (ПЦР) произвольных праймеров, имеющих множественную локализацию. Несомненным преимуществом данных типов молекулярных маркеров является их универсальность и более низкая стоимость анализа, так как их визуализация осуществляется простым горизонтальным электрофорезом в агарозном геле [2]. Первым широко применяемым типом ДНК-маркеров из этой группы были RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), в основе которых лежит использование десяти нуклеотидных произвольных праймеров [19]. Основным их недостатком является низкая воспроизводимость из-за высокой чувствительности метода к условиям анализа [1, 20]. Немного позднее был разработан другой тип ДНК-маркеров – ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat), считающийся более надёжным по сравнению с RAPD, так как длина праймеров составляет уже 15–24 нуклеотидов [21]. ISSR-маркеры представляют собой амплифицированные фрагменты ДНК, расположенные между двумя одинаковыми микросате-

ллитными регионами [21, 22]. Уровень воспроизводимости ISSR-маркеров достигает 99 % [23]. RAPD- и ISSR- маркеры активно применяются для молекулярно-генетических исследований различных видов берёз [24–27].

Развитие метода ПЦР со случайными праймерами привело к разработке новых типов ДНК-маркеров, основанных на использовании длинных концевых последовательностей (LTR – long terminal repeat) ретротранспозонов [28–30]. Большое количество копий и широкое распространение ретротранспозонов в геномах эукариот делают ДНК-маркерные системы, разработанные на их основе, весьма перспективными [28]. К маркерным системам на основе последовательностей ретротранспозонов относят IRAP, REMAP, S-SAP, RBIP [2] и iPBS [31]. Из всех перечисленных маркерных систем для молекулярно-генетических исследований берёз были применены только IRAP-маркеры [32].

Цель работы – оценка уровня изменчивости SSR- и iPBS-маркеров и подбор наиболее информативных праймеров для проведения генетических исследований берёзы повислой.

Объекты и методика исследований. В работе были протестированы шесть пар SSR-праймеров, предложенных для амплификации микросателлитных локусов у берёзы повислой [14] и 14 iPBS-праймеров, протестированных ранее на ячмене и корове [31]. По мнению авторов, разработанный iPBS-метод применим к любому организму с ретротранспозонами, содержащими PBS-сайты [31].

При тестировании iPBS-праймеров были проведены эксперименты по подбору оптимальной температуры отжига, при этом диапазон апробированных температур составил от 48 до 60 °С. Характеристика использованных SSR-праймеров приведена в таблице 1, а iPBS-маркеров в таблице 3. Оценка полиморфизма SSR-праймеров выполнена с использованием 30 деревьев берёзы повислой. Тестирова-

ние и определение уровня изменчивости iPBS-праймеров проведено с использованием 9 генотипов берёзы повислой. Для получения препаратов ДНК применялся СТАВ-метод [33].

Полимеразная цепная реакция проводилась с использованием амплификатора CFX96 (Bio-Rad, США) и набора реактивов Epcuslo Plus PCR kit (Евроген, Россия). Для амплификации SSR-локусов использовали следующий состав полимеразной цепной реакции: стерильная вода – 11,3 мкл; ПЦР-буфер – 1,5 мкл; смесь дезоксирибонуклеотидфосфатов – 0,3 мкл; Tag-полимераза – 0,3 мкл; прямой и обратный праймеры по 0,3 мкл; ДНК-матрица – 1 мкл; общий объём реакции 15 мкл. Режим ПЦР: первичная денатурация 10 мин. при температуре 94 °С; 30 циклов – денатурация 60 сек. при 94 °С, отжиг праймеров 75 сек. при 57 °С и элонгация 1 мин. при 72 °С; финишная элонгация 10 мин. при 72 °С и охлаждение 15 мин. при 4 °С. Длина аллелей микросателлитных локусов определялась с помощью капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе ABI PRISM Genetic Analyser 3100 (Applied Biosystems, США). Визуализация результатов капиллярного электрофореза и расчёт длины аллелей сделаны в программе GeneMarker.

Общий объём реакции при iPBS-анализе составил 10 мкл, в том числе ПЦР-буфер – 1 мкл; dNTPs – 0,2 мкл; Tag-полимераза – 0,1 мкл; ДНК матрица – 1 мкл; праймер – 0,2 мкл; стерильная вода – 7,5 мкл. Режим амплификации: 4 мин. при 95 °С – первичная денатурация ДНК; 35 циклов: 30 сек. при 95 °С – денатурация; 45 сек. при 51–60 °С – отжиг праймера; 90 сек. при 72 °С – элонгация; 5 мин. при 72 °С – финишная элонгация; 15 мин. при 4 °С – охлаждение пробирок. Визуализация результатов ПЦР с iPBS-праймерами выполнена с помощью горизонтального электрофореза в 1,5 % агарозном геле в ацетатном буфере и с использованием гельдокументирующей системы GelDoc 2000 (Bio-

Rad, США). Расчёт длин ПЦР-фрагментов выполнен в специализированной программе Quantity One® Version 4.6.3.

Для расчёта показателей генетического полиморфизма использованы программа POPGENE 1.31 в случае iPBS-маркеров и программа GenA1EX6 в случае SSR-маркеров.

Результаты исследований. Анализ микросателлитных локусов у 30 деревьев берёзы повислой из Республики Марий Эл показал, что тестируемые SSR-праймеры позволяют выявить от 4 до 14 вариантов аллелей (табл. 1). Всего у шести микросателлитных локусов обнаружено 54 аллеля. Ранее при тестировании аналогичных SSR-праймеров на 30 деревьях берёзы повислой из Восточной Финляндии было выявлено 57 вариантов аллелей. Наибольшее различие по числу наблюдаемых аллелей установлено для локуса L7.8, у которого в Республике Марий Эл обнаружено 13 вариантов аллелей, в то время как в финской популяции пять. У четырёх микросателлитных локусов из шести (L2.3, L3.4, L5.4, L7.3) установлены близкие значения количества наблюдаемых аллелей у выборок деревьев из Республики Марий Эл и Финляндии.

Расчёты показали, что наибольший уровень гетерозиготности характерен для локусов L1.1 и L7.8, у которых наблюдаемая гетерозиготность достигает 0,83–0,88, а ожидаемая гетерозиготность составляет 0,86–0,89 (табл. 2). Судя по значениям индекса фиксации Райта, для всех локусов, кроме L5.4, характерен дефицит гетерозигот. Наибольший дефицит гетерозигот наблюдается у локусов L2.3 и L3.4, для которых получены наибольшие значения индекса фиксации Райта (0,309 и 0,326). Существенное различие по уровню наблюдаемой гетерозиготности между деревьями из Республики Марий Эл и Финляндии наблюдается только у локуса L3.4 (0,38 и 0,71). Для остальных микросателлитных локусов показатели гетерозиготности относительно близкие.

Таблица 1

Характеристика SSR-праймеров и результаты полимеразной цепной реакции*

Праймер	Мотив повтора	Сиквенс праймеров	Температура отжига, °С	Характеристика обнаруженных аллелей	
				количество наблюдаемых аллелей, Na	длина аллелей, п.н.
L1.1	(ga) _{4aa} (ga) ₁₀	f: acgctttcttgatgacagcc r: tcaccaagttcctggtggat	57	14 (20)	168–213 (168–209)
L2.3	(ag) ₁₆	f: cagtgttggacggtgagaa r: cgggtgaagtagacggaact	57	9 (8)	193–215 (198–220)
L3.4	(gtat) ₃ (gt) ₅	f: aaccctcgtttgctactga r: gaacagtactagtcaaaactgaaaacc	57	4 (6)	247–270 (258–274)
L5.4	(tc) ₂₆	f: aagggcacctgcagattaga r: aaaattgcaacaacacgtgc	57	8 (10)	236–254 (230–262)
L7.3	(gt) ₁₈ (ga) ₁₄	f: ggggatccagtaageggtat r: cacacgagatagatgaacggaa	57	6 (8)	187–218 (178–226)
L7.8	(ct) ₁₁ gc(aatg) ₂	f: ggccaacagatataaacgacg r: tttaaatgccacctccc	57	13 (5)	279–306 (295–307)
Итого				54 (57)	

* в скобках приведены данные К. К. М. Kulju, М. Pekkinen, S. Varvio [14].

В целом, сравнивая собственные экспериментальные и литературные данные, можно сказать, что результаты тестирования SSR-праймеров на 30 деревьях из Республики Марий Эл и Восточной Финляндии сопоставимы. Некоторые отличия в числе наблюдаемых аллелей и уровне гетерозиготности обусловлены прежде всего географической изменчивостью популяций берёзы повислой. Для молекулярно-генетических исследований берёзы повислой рекомендуются SSR-праймеры к локусам L1.1, L2.3, L5.4 и L7.8, у которых обнаружено наибольшее количество наблюдаемых аллелей, что позволит гено-

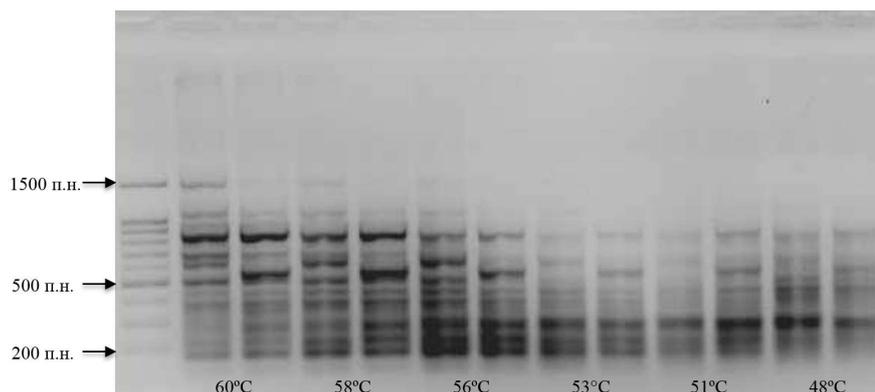
типировать большее число особей. Из всех обнаруженных вариантов аллелей на эти четыре микросателлитных локуса приходится 81,5 % (44 из 54 аллелей). Кроме того, для локусов L1.1 и L7.8 установлены наибольшие показатели гетерозиготности.

Качество амплификации ДНК при использовании iPBS-праймеров существенно зависело от температуры отжига. Например, из рисунка (с. 63) можно увидеть, что наиболее чёткий спектр ПЦР-фрагментов, полученный с праймером iPBS 2077, наблюдается при более высоких температурах.

Таблица 2

Показатели генетического полиморфизма микросателлитных локусов

Локус	Собственные экспериментальные данные			Данные К. К. М. Kulju et al. [14]	
	Наблюдаемая гетерозиготность, Но	Ожидаемая гетерозиготность, Не	Индекс фиксации Райта, F	Наблюдаемая гетерозиготность, Но	Ожидаемая гетерозиготность, Не
L1.1	0,83	0,86	0,032	0,92	0,96
L2.3	0,46	0,66	0,309	0,38	0,56
L3.4	0,38	0,56	0,326	0,71	0,60
L5.4	0,79	0,78	-0,013	0,92	0,86
L7.3	0,63	0,69	0,102	0,68	0,71
L7.8	0,88	0,89	0,005	0,83	0,72
Итого	0,66	0,74	0,127	-	-



Электрофорез продуктов ПЦР, полученных с праймером iPBS20775 при разных температурах отжига

Таблица 3

Характеристика iPBS-праймеров и результаты полимеразной цепной реакции

Праймер	Сиквенс праймеров	Подобранная температура отжига, °С	Количество ПЦР фрагментов		Длина ПЦР-фрагментов, п.н.
			всего	в т. ч. полиморфных	
iPBS2074	gctctgatacca	-	-	-	-
iPBS2075	ctcatgatgcca	53	13	8	140–940
iPBS2076	gctccgatgcca	60	11	10	170–1020
iPBS2077	ctcacgatgcca	60	12	8	150–1380
iPBS2078	gccgagtcgcca	56	17	14	230–1380
iPBS2224	atcctggcaatggaacca	53	10	7	210–1060
iPBS2232	agagaggctcgatacca	60	12	10	230–1100
iPBS2237	cccctacctggcgtgcca	-	-	-	-
iPBS2238	acctagctcatgatgcca	51	9	8	210–840
iPBS2270	acctggcgtgcca	56	9	7	240–920
iPBS2271	ggctcggatgcca	58	17	17	170–900
iPBS2272	ggctcagatgcca	58	9	7	180–530
iPBS2377	acgaagggacca	53	7	3	200–950
iPBS2378	ggctcctatcca	51	10	8	110–570
Итого			136	107	110–1380

Двенадцать iPBS-праймеров из 14 протестированных показали стабильную амплификацию (табл. 3). Для праймеров iPBS2074 и iPBS2237 не удалось получить чёткий и воспроизводимый спектр амплифицированных фрагментов ДНК. Оптимальная температура отжига остальных праймеров варьировала от 51 до 60 °С. Общее количество ПЦР-фрагментов варьировало в зависимости от праймера от семи у iPBS2377 до 17 у iPBS2078 и iPBS2271. Всего было обнаружено 136 ПЦР-фрагментов, из которых большая часть оказалась полиморфной (107). Длины ПЦР-фрагментов варьировали у раз-

ных iPBS-праймеров в пределах от 110 до 1380 пар нуклеотидов.

Для молекулярно-генетических исследований более эффективно использовать случайные праймеры, которые позволяют амплифицировать наибольшее количество фрагментов ДНК, при этом доля полиморфных локусов должна быть также высока. Ориентируясь на данный критерий оценки, для популяционных исследований и генетической идентификации отдельных генотипов берёзы повислой необходимо прежде всего использовать праймеры iPBS2076, iPBS2078, iPBS2232 и iPBS2271. У данных iPBS-праймеров

Таблица 4

Показатели генетического полиморфизма iPBS-праймеров

Праймер	Доля полиморфных локусов, P (%)	Количество наблюдаемых аллелей, Na	Ожидаемая гетерозиготность, He
iPBS2075	61,5	1,62	0,26
iPBS2076	90,9	1,91	0,27
iPBS2077	66,7	1,67	0,24
iPBS2078	82,4	1,82	0,32
iPBS2224	70,0	1,70	0,21
iPBS2232	83,3	1,83	0,27
iPBS2238	88,9	1,89	0,34
iPBS2270	77,8	1,78	0,26
iPBS2271	100,0	2,00	0,32
iPBS2272	77,8	1,78	0,29
iPBS2377	42,9	1,43	0,14
iPBS2378	80,0	1,80	0,25
Итого	79,4	1,78	0,27

было обнаружено наибольшее количество полиморфных ПЦР-фрагментов (от 10 до 17), в то время как у других праймеров этот показатель варьировал от трёх до восьми. Использование этих четырёх iPBS-праймеров из 12 позволит включить в анализ 47,7 % полиморфных фрагментов (51 из 107). При необходимости дополнительно в генетических исследованиях берёзы повислой также можно использовать ещё четыре праймера, у которых было детектировано восемь полиморфных ПЦР-фрагментов (iPBS2075, iPBS2077, iPBS2238 и iPBS2378). Увеличение количества использованных iPBS-праймеров до восьми позволит анализировать 77,6 % от всех полиморфных фрагментов (83 из 107).

Протестированные iPBS-праймеры показали разный уровень генетического полиморфизма (табл. 4). Показатели генетического разнообразия варьировали в следующих пределах: доля полиморфных локусов от 42,0 до 100,0 %; число наблюдаемых аллелей от 1,43 до 2,00; ожидаемая гетерозиготность от 0,14 до 0,34. Минимальные значения показателей генетической изменчивости установлены для праймера iPBS2377, а наибольшим полиморфизмом отличаются праймеры iPBS2076, iPBS2078, iPBS2232, iPBS2238 и iPBS2271.

Статья подготовлена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках выполнения базовой части государственного задания высшим учебным заведениям и научным организациям в сфере научной деятельности (г/б НИР 37.8531.2017).

Заключение. Протестированные SSR- и iPBS-праймеры существенно отличаются по уровню полиморфизма. Для проведения генетического анализа необходимо использовать прежде всего праймеры, позволяющие выявить наибольший полиморфизм растений берёзы повислой. Среди изученных SSR-праймеров к таким относят L1.1, L2.3, L5.4 и L7.8, при использовании которых у микросателлитных локусов обнаружено наибольшее количество аллелей (от 8 до 14 аллелей). В целом на микросателлитные локусы L1.1, L2.3, L5.4 и L7.8 приходится 81,5 % всех обнаруженных аллелей.

В работе впервые представлены результаты исследований по использованию iPBS-праймеров для генетического анализа берёзы повислой. Среди протестированных iPBS-праймеров наибольший интерес представляют iPBS2076, iPBS2078, iPBS2232 и iPBS2271, использование которых позволило выявить от 10 до 17 полиморфных ПЦР-фрагментов. Рекомендуемые SSR- и iPBS-праймеры могут быть использованы для оценки состояния генетических ресурсов берёзы повислой, популяционно-экологических исследований, генетической паспортизации ценных особей, идентификации древесины и частей стволов при судебно-криминалистической экспертизе.

Список литературы

1. Semagn K., Bjørnstad Å., Ndjiondjop M.N. An overview of molecular marker methods for plants // African Journal of Biotechnology. 2006. Vol. 5. No 25. P. 2540-2568.
2. Agarwal M., Shrivastava N., Padh H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences // Plant Cell Reports. 2008. No 27. P. 617-631. doi:10.1007/s00299-008-0507-z
3. Хлесткина Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013. Т. 17. № 4/2. С. 1044-1054.
4. Use of DNA markers in forest tree improvement research / D.B. Neal, M.E. Devey, K.D. Jermstad et al. // New Forest. 1992. No 6. P. 391-407.
5. Применение молекулярно-генетических методов в лесном хозяйстве Беларуси / В.Е. Падутов, О.Ю. Баранов, Д.И. Каган и др. // Сибирский лесной журнал. 2014. № 4. С. 16-20.
6. Porth I., El-Kassaby Y.A. Assessment of the genetic diversity in forest tree populations using molecular markers // Diversity. 2014. No 6. P. 283-295. doi:10.3390/d6020283
7. Tautz D., Renz M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes // Nucleic Acids Research. 1984. Vol. 12. No 10. P.4127-4138.
8. Молекулярные маркеры для видоидентификации и филогенетики растений / Т.В. Матвеева, О.А. Павлова, Д.И. Богомаз и др. // Экологическая генетика. 2011. Т. IX. № 11. С. 32-43.
9. A set of cross-species amplifying microsatellite markers developed from DNA sequence databanks in Picea (Pinaceae) / G. Besnard, V. Acheré, Faivre P. Rampant et al. // Molecular Ecology Notes. 2003. №3. Pp. 380-383. doi:10.1046/j.1471-8286.2003.00456.x
10. Microsatellite DNA as shared genetic markers among conifer species / C.S. Echt, G.G. Vendramin, C.D. Nelson et al. // Canadian Journal of Forest Research. 1999. No 29. Pp. 365-371.
11. Jarne P., Lagoda P.J.L. Microsatellites, from molecules to populations and back // Trends in Ecology & Evolution. 1996. No 11. Pp. 424-429.
12. Wu B., Lian C., Hogetsu T. Development of microsatellite markers in white birch (*Betula platyphylla* var. *japonica*) // Molecular Ecology Notes. 2002. No 2. P. 413-415. doi:10.1046/j.1471-8278.2002.00260.x
13. Development of SSR markers and genetic diversity in white birch (*Betula platyphylla*) / W. Hao, S. Wang, H. Liu et al. // PLoS ONE. 2015. 10(4): e0125235. doi:10.1371/journal.pone.0125235
14. Kulju K. K. M., Pekkinen M., Varvio S. Twenty-three microsatellite primer pairs for *Betula pendula* (Betulaceae) // Molecular Ecology Notes. 2004. No 4. P. 471-473. doi:10.1111/j.1471-8286.2004.00704.x
15. Isolation and characterization of microsatellite markers in the tetraploid birch, *Betula pubescens* ssp. *tortuosa* / C. Truong, A.E. Palmé, F. Felber et al. // Molecular Ecology Notes. 2004. No 5. P. 96-98.
16. Isolation and characterization of 19 microsatellite markers in a tropical and warm subtropical birch, *Betula alnoides* Buch.-Ham. ex D. Don / J.J. Guo, J. Zeng, S.L. Zhou, et al. // Molecular Ecology Resources. 2008. Vol. 8. No 4. P. 895-897.
17. Identification of SSR loci in *Betula luminifera* using birch EST data / Y. Lu, H. Li, Q. Jia et al. // Journal of Forestry Research. 2011. Vol. 22. No 2. Pp. 201-204. doi:10.1007/s11676-011-0150-3
18. Gürçan K., Mehlenbacher Sh. A. Transferability of microsatellite markers in the Betulaceae // Journal of the American Society for Horticultural Science. 2010. Vol. 135. No 2. P. 159-173. doi:10.21273/JASHS.135.2.159
19. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers / J.G. Williams, A.R. Kubelik, K.J. Livak et al. // Nucleic Acids Research. 1990. Vol. 18. No 22. Pp. 6531-6535. doi:10.1093/nar/18.22.6531
20. Perez T., Albornoz J., Dominguez A. An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature // Molecular Ecology. 1998. No 7. P.1347-1357.
21. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored PCR amplification // Genomics. 1994. No 20. P. 176-183.
22. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple sequence repeats / M. Gupta, Y. S. Chyi, J. Romero-Severson et al. // Theoretical and Applied Genetics. 1994. No 89. P. 998-1006.
23. Fang D.Q., Roose M.L. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers // Theor. Appl. Genet. 1997. No 95. P. 408-417.
24. RAPD analysis of genetic variation in natural populations of *Betula alnoides* from Guangxi, China / J. Zeng, Y. Zou, J. Bai et al. // Euphytica. 2003. No 134. P. 33. <https://doi.org/10.1023/A:1026113506563>
25. Genetic diversity of postglacial relict shrub *Betula nana* revealed by RAPD analysis / G. Dąbrowska, A. Działuk, O. Burnicka et al. // Dendrobiology. 2006. No 55. P. 19-23.
26. Genetic diversity and structure of the endangered *Betula pendula* subsp. *fontqueri* populations in the south of Spain / C. Martín, T. Parra, M. Clemente-Muñoz et al. // Silva Fennica. 2008. Vol. 42. No 4. P. 487-498.
27. Identification of Molecular Markers Differentiating *Betula papyrifera* and *B. pumila* Populations from Northern Ontario (Canada) / N. Moarefi, P. Michael, P. Beckett et al. // American Journal of

Environmental Sciences. 2018. Vol. 14. № 5. P. 246-256. doi:10.3844/ajessp.2018.246.256

28. Schulman A.H., Flavell A.J., Ellis T.H.N. The application of LTR retrotransposons as molecular markers in plants. In: Miller W.J., Capy P. (eds) Mobile Genetic Elements. Methods in Molecular Biology. Humana Press. 2004. No 260. P.145-173. doi: https://doi.org/10.1385/1-59259-755-6:145

29. Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers / R. Kalendar, A.J. Flavell, T.H.N. Ellis et al. // Heredity. 2011. No 106. Pp. 520-530.

30. Оценка разнообразия растений и изменчивости транскрипционной активности с использованием молекулярных маркеров на основе ретро-транспозонов / Р.Н. Календарь, К.С. Айжаркын, О.Н. Хапилина и др. // Вавиловский журнал гене-

тики и селекции. 2017. Т. 21. № 1. С. 128-134. doi:10.18699/VJ17.231

31. iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation / R. Kalendar, K. Antonius, P. Smýkal et al. // Theoretical and Applied Genetics. 2010. No 121. P.1419-1430. doi:10.1007/s00122-010-1398-2

32. Retrotransposons in *Betula nana*, and interspecific relationships in the Betuloideae, based on inter-retrotransposon amplified polymorphism (IRAP) markers / N.S. Roy, S. Lee, K. Nkongolo et al. // Genes and Genomics. 2018. Vol. 40. No 5. Pp.511-519. doi:10.1007/s13258-018-0655-7

33. Doyle J. J., Doyle J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochemical Bulletin. 1987. No 19. P. 11– 15.

Статья поступила в редакцию 30.10.19.

Принята к публикации 15.11.19.

Информация об авторах

ШЕЙКИНА Ольга Викторовна – кандидат сельскохозяйственных наук, доцент кафедры лесных культур, селекции, Поволжский государственный технологический университет. Область научных интересов – популяционная и экологическая генетика древесных видов, использование ДНК-технологий в лесном семеноводстве и селекции древесных видов. Автор 76 публикаций.

ГЛАДКОВА Елена Александровна – инженер, Филиал ФБУ «Российский центр защиты леса» – «Центр защиты леса Республики Марий Эл». Область научных интересов – использование ДНК-технологий в лесном семеноводстве и селекции березы. Автор одной публикации.

ГЛАДКОВ Юрий Федорович – начальник отдела защиты леса и государственного лесопатологического мониторинга, Филиал ФБУ «Российский центр защиты леса» – «Центр защиты леса Республики Марий Эл». Область научных интересов – использование ДНК-технологий в лесном семеноводстве и селекции сосны обыкновенной. Автор 16 публикаций.

АЛЕКСЕЕВ Иван Алексеевич – доктор сельскохозяйственных наук, профессор-консультант кафедры экологии, почвоведения и природопользования, Поволжский государственный технологический университет. Область научных интересов – защита растений и лесопатологический мониторинг. Автор 360 публикаций, в т. ч. 12 монографий, 8 учебных пособий, 26 патентов и авторских свидетельств на изобретения.

ВИНОКУРОВА Раиса Ибрагимовна – доктор биологических наук, профессор кафедры лесопромышленных и химических технологий, Поволжский государственный технологический университет. Область научных интересов – биогеохимия, биологический круговорот веществ, экология и физиология древесных растений. Автор 150 публикаций, в том числе пяти монографий.

UDC 630.1 (575.22)

DOI: 10.25686/2306-2827.2019.4.59

**POLYMORPHISM ASSESSMENT AND SELECTION OF SSR AND IPBS MARKERS
FOR BETULA PENDULA MOLECULAR GENETIC STUDY**

O. V. Sheikina¹, E. A. Gladkova², Yu. F. Gladkov², I. A. Alekseev¹, R. I. Vinokurova¹

¹Volga State University of Technology,

3, Lenin Sq., Yoshkar-Ola, 424000, Russian Federation

²Branch of FBI "Russian Office of Forest Protection" – "Office of Forest Protection in the Republic of Mari El",

83, Komsomolskaya St., Yoshkar-Ola, 424000, Russian Federation

E-mail: ShejkinaOV@volgatech.net

Keywords: *Betula pendula*; SSR markers; iPBS markers; level of polymorphism.

ABSTRACT

Introduction. To use the molecular markers successfully, it is obligatory to select carefully the type of DNA marker and the particular primers used in the polymerase chain reaction. To solve the considered problem, it is necessary to conduct the preliminary research to detect the most informative DNA markers that allow determining the deepest polymorphism of the studied object. The **goal** of the research is to assess the level of variability of SSR and iPBS markers, and select the most informative primers for the genetic research of *betula pendula*. Six pairs of SSR primers and 14 iPBS primers were the **object** of the research. The **methodology** of the research included the following actions, implemented consistently: performance of polymerase chain reaction (PCR) with all the primers, visualization of PCR results using the electrophoresis, definition of the length of alleles of SSR loci in SSR analysis and PCR fragments using the iPBS primers, calculation of genetic polymorphism figures. **Research results.** The tested SSR and iPBS primers substantially differ in terms of the level of polymorphism. Number of the observed alleles for different SSR-locuses varied from 4 to 14; the observed heterozygosity was 0.38-0.88; the expected heterozygosity - 0.56- 0.89. The values of indicators of genetic polymorphism of 12 iPBS primers for *Betula pendula* were defined for the first time. The following figures for the indicators of variability (number of PCR fragments 7–17, number of polymorphic PCR fragments 3–17; share of polymorphic loci 42.9–100.0 %; number of observed alleles 1.43–2.00; expected heterozygosity 0.14–0.34) were typical for the iPBS. **Conclusion.** To conduct the genetic analysis, it is necessary to use, above all, the primers that allow revealing the deepest polymorphism of *betula pendula*. Using the studied SSR primers L1.1, L2.3, L5.4, and L7.8 the SSR loci were found to have had the largest number of alleles (8 -14). Among the tested iPBSprimers, iPBS2076, iPBS2078, iPBS2232, and iPBS2271 primers are of greatest interest, application of these primers made it possible to reveal from 10 to 17 polymorphic PCR fragments.

The paper was prepared with the financial support of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation as accomplishment of a base part of state task for higher educational institutions and scientific organizations in the field of research activity (R&D 37.8531.2017).

REFERENCES

1. Semagn K., Bjørnstad Å., Ndjiondjop M.N. An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology*. 2006. Vol. 5. No 25. P. 2540-2568.
2. Agarwal M., Shrivastava N., Padh H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports*. 2008. No 27. P. 617-631. doi:10.1007/s00299-008-0507-z
3. Khlestkina E.K. Molekulyarnye markery v geneticheskikh issledovaniyakh i v selektsii [Molecular markers in the genetic researches and selection]. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i selektsii* [Vavilov Journal of Genetics and Breeding]. 2013. Vol. 17. No 4/2. Pp. 1044-1054. (In Russ).
4. Neal D.B., Devey M.E., Jermstad K.D. et al. Use of DNA markers in forest tree improvement research. *New Forest*. 1992. No 6. P. 391-407.
5. Padutov V.E., Baranov O.Yu., Kagan D.I. et al. Primenenie molekulyarno-geneticheskikh metodov v lesnom khozyaystve Belarusi [Application of mo-

- lecular genetic methods in forestry in Belarus]. *Sibirskiy lesnoy zhurnal* [Siberian Forestry Magazine]. 2014. No 4. Pp. 16-20. (In Russ).
6. Porth I., El-Kassaby Y.A. Assessment of the genetic diversity in forest tree populations using molecular markers. *Diversity*. 2014. No 6. P. 283-295. doi:10.3390/d6020283
7. Tautz D., Renz M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*. 1984. Vol. 12. No 10. P.4127-4138.
8. Matveeva T.V., Pavlova O.A., Bogomaz D.I. et al. Molekulyarnye markery dlya vidoidentifikatsii i filogenetiki rasteniy [Molecular markers for species identification and phylogenetics of plants]. *Ekologicheskaya genetika* [Ecological Genetics]. 2011. Vol. IX. № 11. Pp. 32-43. (In Russ).
9. Besnard G., Acheré V., Faivre Rampant P. et al. A set of cross-species amplifying microsatellite markers developed from DNA sequence databanks in *Picea* (Pinaceae). *Molecular Ecology Notes*. 2003. No 3. Pp. 380-383. doi:10.1046/j.1471-8286.2003.00456.x
10. Echt C.S., Vendramin G.G., Nelson C.D. et al. Microsatellite DNA as shared genetic markers among conifer species. *Canadian Journal of Forest Research*. 1999. No 29. Pp. 365-371.
11. Jarne P., Lagoda P.J.L. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution*. 1996. No 11. Pp. 424-429.
12. Wu B., Lian C., Hogetsu T. Development of microsatellite markers in white birch (*Betula platyphylla* var. *japonica*). *Molecular Ecology Notes*. 2002. No 2. P. 413-415. doi:10.1046/j.1471-8278.2002.00260.x
13. Hao W., Wang S., Liu H. et al. Development of SSR markers and genetic diversity in white birch (*Betula platyphylla*). *PLoS ONE*. 2015. 10(4): e0125235. doi:10.1371/journal.pone.0125235
14. Kulju K. K. M., Pekkinen M., Varvio S. Twenty-three microsatellite primer pairs for *Betula pendula* (Betulaceae). *Molecular Ecology Notes*. 2004. No 4. P. 471-473. doi:10.1111/j.1471-8286.2004.00704.x
15. Truong C., Palmé A.E., Felber F. et al. Isolation and characterization of microsatellite markers in the tetraploid birch, *Betula pubescens* ssp. *Tortuosa*. *Molecular Ecology Notes*. 2004. No 5. P. 96-98.
16. Guo J.J., Zeng J., Zhou S.L., et al. Isolation and characterization of 19 microsatellite markers in a tropical and warm subtropical birch, *Betula alnoides* Buch.-Ham. ex D. Don. *Molecular Ecology Resources*. 2008. Vol. 8. No 4. P. 895-897.
17. Lu Y., Li H., Jia Q. et al. Identification of SSR loci in *Betula luminifera* using birch EST data. *Journal of Forestry Research*. 2011. Vol. 22. No 2. Pp. 201-204. doi:10.1007/s11676-011-0150-3
18. Gürçan K., Mehlenbacher Sh. A. Transferability of microsatellite markers in the Betulaceae. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 2010. Vol. 135. No 2. P. 159-173. doi:10.21273/JASHS.135.2.159
19. Williams J.G., Kubelik A.R., Livak K.J. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 1990. Vol. 18. No 22. Pp. 6531-6535. doi:10.1093/nar/18.22.6531
20. Perez T., Alborno J., Dominguez A. An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. *Molecular Ecology*. 1998. No 7. P.1347-1357.
21. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored PCR amplification. *Genomics*. 1994. No 20. P. 176-183.
22. Gupta M., Chyi Y. S., Romero-Severson J. et al. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics*. 1994. No 89. P. 998-1006.
23. Fang D.Q., Roose M.L. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theor. Appl. Genet.* 1997. No 95. P. 408-417.
24. Zeng J., Zou Y., Bai J. et al. RAPD analysis of genetic variation in natural populations of *Betula alnoides* from Guangxi, China. *Euphytica*. 2003. No 134. P. 33. <https://doi.org/10.1023/A:1026113506563>
25. Dąbrowska G., Działuk A., Burnicka O. et al. Genetic diversity of postglacial relict shrub *Betula nana* revealed by RAPD analysis. *Dendrobiology*. 2006. No 55. P. 19-23.
26. Martín C., Parra T., Clemente-Muñoz M. et al. Genetic diversity and structure of the endangered *Betula pendula* subsp. *fontqueri* populations in the south of Spain. *Silva Fennica*. 2008. Vol. 42. No 4. P. 487-498.
27. Moarefi N., Michael P., Beckett P. et al. Identification of Molecular Markers Differentiating *Betula papyrifera* and *B. pumila* Populations from Northern Ontario (Canada). *American Journal of Environmental Sciences*. 2018. Vol. 14. No 5. Pp. 246-256. doi:10.3844/ajessp.2018.246.256
28. Schulman A.H., Flavell A.J., Ellis T.H.N. The application of LTR retrotransposons as molecular markers in plants. In: Miller W.J., Capy P. (eds) *Mobile Genetic Elements. Methods in Molecular Biology*. Humana Press. 2004. No 260. P.145-173. doi: <https://doi.org/10.1385/1-59259-755-6:145>
29. Kalendar R., Flavell A.J., Ellis T.H.N. et al. Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers. *Heredity*. 2011. No 106. Pp. 520-530.
30. Kalendar R.N., Aizharkyn K.S., Khapilina O. N. et al. Otsenka raznoobraziya rasteniy i izmenchivosti transkriptsionnoy aktivnosti s ispolzovaniem molekulyarnykh markerov na osnove retrotranspozonov [Assessment of plants diversity and variability of transcriptional activity using the mo-

lecular markers on the basis of retrotransposons.]. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i seleksii* [Vavilov Journal of Genetics and Breeding]. 2017. Vol. 21. No 1. Pp. 128-134. doi:10.18699/VJ17.231. (In Russ).

31. Kalendar R., Antonius K., Smýkal P. et al iPBS: a universal method for DNA finger-printing and retrotransposon isolation. *Theoretical and Applied Genetics*. 2010. No 121. P.1419-1430. doi:10.1007/s00122-010-1398-2

32. Roy N.S., Lee S., Nkongolo K. et al. Retrotransposons in *Betula nana*, and inter-specific relationships in the Betuloideae, based on inter-retrotransposon amplified polymorphism (IRAP) markers. *Genes and Genomics*. 2018. Vol. 40. No 5. Pp. 511-519. doi:10.1007/s13258-018-0655-7

33. Doyle J. J., Doyle J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 1987. No 19. Pp. 11– 15.

The article was received 30.10.19.
Accepted for publication 15.11.19.

For citation: Sheikina O. V., Gladkova E. A., Gladkov Yu. F., Alekseev I. A., Vinokurova R. I. Polymorphism Assessment and Selection of SSR and IPBS Markers for *Betula pendula* Molecular Genetic Study. *Vestnik of Volga State University of Technology*. Ser.: Forest. Ecology. Nature Management. 2019. No 4 (44). Pp. 59–69. DOI: 10.25686/2306-2827.2019.4.59

Information about the authors

Olga V. Sheikina – Candidate of Agricultural Sciences, Associate Professor of the Chair of Forest Plantations, Selection, and Biotechnology, Volga State University of Technology. Research interests – population and ecological genetics of woody species, use of DNA technologies in forest seedage and woody species selection. The author of 76 publications.

Elena A. Gladkova – Engineer, Branch of FBI “Russian Office of Forest Protection” – “Office of Forest Protection in the Republic of Mari El”. Research interests – use of DNA technologies in forest seedage and birch selection. The author of one publication.

Yuriy F. Gladkov – Head of the Department of Forest Protection and State Forest Health Monitoring, Branch of FBI “Russian Office of Forest Protection” – “Office of Forest Protection in the Republic of Mari El”. Research interests – use of DNA technologies in forest seedage and Scots pine selection. The author of 16 publications.

Ivan A. Alekseev – Doctor of Agricultural Sciences, Visiting Professor of the Chair of Ecology, Pedology, and Nature Management, Volga State University of Technology. Research interests – protection of plants and forest health monitoring. The author of 360 publications, including 12 monographs, 8 study guides, 26 patents and inventor's certificates.

Raisa I. Vinokurova – Doctor of Biological Sciences, Professor of the Chair of Pulp and Paper and Chemical Technologies, Volga State University of Technology. Research interests – biogeochemistry, biocycle of matters, ecology and physiology of woody plants. The author of 150 publications, including five monographs.