

ПРИМЕНЕНИЕ ISSR-АНАЛИЗА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИДОВ
РОДА КОЛЮЧЕЩЕТИННИК *CENCHRUS*С.В. СЫКСИН^{1,2,3}, С.А. БЛИНОВА^{2,3}, А.С. ЯШКИН³, В.Г. КУЛАКОВ⁴,
Ю.Ю. КУЛАКОВА⁴, О.Н. АЛАДИНА¹, А.А. СОЛОВЬЕВ^{1,2}¹ ФГБОУ ВО Российский государственный аграрный университет –
МСХА имени К.А. Тимирязева;² ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной биотехнологии;³ ООО «Синтол»; ⁴ ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений»)

Среди имеющихся в природе более 20 видов колючещети́нника для Российской Федерации особое значение приобретает Ценхрус длинноколочковый (*Cenchrus longispinus* (Nackel ex Kneuck.) Fernald) – однолетний злак североамериканского происхождения. Это растение широко распространено в странах умеренного климата как сорное растение. Засоряет посе́вы пропашных, овощных и бахчевых культур, виноградники и сады. Является карантинным объектом для Российской Федерации и стран Евразийского экономического союза. На территории нашей страны имеются небольшие разрозненные очаги, локализованные по железнодорожным путям и городским территориям. Идентификация объекта в прегенеративном состоянии трудна из-за морфологической схожести сорняка с другими злаками. Для ранней диагностики сорняка предлагается использовать молекулярно-генетический подход – на основе применения ISSR-маркеров. Целью данного исследования является поиск молекулярных ISSR-маркеров для дифференциации видов рода *Cenchrus* и идентификации карантинного вида *C. longispinus*. Исследовано 15 образцов, относящихся к 8 видам рода *Cenchrus*, полученных из коллекции ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»). Для выявления межвидового генетического разнообразия использован набор из 21 ISSR-маркера, из которых по 6 маркерам установлен полиморфизм, позволяющий провести идентификацию изучаемых видов рода *Cenchrus*. Видоспецифические профили ампликонов данных ISSR-маркеров позволяют идентифицировать изучаемые виды. По ряду маркеров выделены видоспецифические бэнды *C. longispinus*.

Ключевые слова: *Cenchrus*, колючещети́нник, ценхрус длинноколочковый, *C. longispinus*, *C. echinatus*, *C. ciliaris*, *Cenchrus myosuroides*, *C. spinifex*, *C. brownii*, *C. palmeri*, *C. pilosus*, ПЦР, ISSR-маркеры, молекулярные маркеры.

Введение

Род Ценхрус, Колючещети́нник, объединяет более 20 видов однолетних и многолетних злаков, часть из которых являются злостными сорными растениями, широко распространяющимися за пределы своего естественного ареала (Hitchcock, Chase, 1950; DeLisle, 1963; Stieber, Wipff, 2003; Mabblerley, 2008). Одним из таких сорных растений является ценхрус длинноколочковый.

Cenchrus longispinus (Hackel ex Kneuck.) Fernald – Ценхрус длинноколочковый – сорное растение, включенное в Единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза (Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 30.11.2016 № 158). Является крайне опасным карантинным растением, которое может причинять вред культурным растениям в агроценозах, домашним животным – на пастбищах, человеку – в городской среде. Ограниченно присутствует на территории Российской Федерации (Национальный доклад, 2018).

Несмотря на наличие в литературе различных названий карантинных видов ценхруса, распространенного на территории Российской Федерации, специалистами ФГБУ «ВНИИКР» установлено, что все представленные образцы являются представителями вида Ценхрус длинноколочковый, *C. longispinus* (Тохтарь, 2010; Кулаков, Кулакова, 2014).

Вредоносность *C. longispinus* связана с формированием колючих соплодий, которые при легком соприкосновении с шерстью животных или кожей человека, отделяются от материнского растения и вонзаются в живой объект. Колочки соплодия легко цепляются к колесам автотранспорта, одежде и обуви человека, шерсти и коже животных и таким путем распространяются в новые ареалы. На значительные расстояния соплодия разносятся с различными видами подкарантинной продукции – семенами, посадочным материалом; соевыми бобами и шротом, сеном, соломой, шерстью и шкурами, а также с почвой, песком и гравием. Большой урон ценхрус способен наносить на пастбища – попадание колючих соплодий в корм крупного рогатого скота приводит к повреждению слизистой ротовой полости животных, вплоть до образования язв и опухолей. Соплодия ценхруса ухудшают техническое качество шерсти овец из-за невозможности ее очистки.

Ценхрус длинноколочковый засоряет пропашные культуры (посевы кукурузы, подсолнечника и пр.), где его обилие может достигать 200 растений на 1 кв. м, а потери урожая доходят до 35% (Москаленко, Кудрявцева, 1987).

Растения ценхруса достаточно плодовиты, одно растение в среднем за сезон может образовывать до 3000 зерновок. Зерновки, заключенные в колючую обертку, прорастают в течение ряда лет, образуя банк семян в почве. Обертки ценхруса обладают аллелопатическим потенциалом, так как содержат вещества, тормозящие прорастание семян других растений. В лабораторных опытах было установлено, что соплодия ценхруса действовали отрицательно на прорастание семян кукурузы (Москаленко, Кудрявцева, 1985).

В составе импортной подкарантинной продукции растительного происхождения могут встречаться разные виды ценхрусов. Поэтому выявление *C. longispinus* и возможность достоверно отличить его от других морфологически близких видов является крайне актуальной задачей диагностики карантинных лабораторий. Развитие молекулярно-генетических методов позволяет проводить такого рода анализ. Анализ последовательностей ДНК может дать устойчивые характеристики организма, практически пригодные как для идентификации индивидуальной особи, так и выявления внутривидового, межвидового и межродового разнообразия. Для идентификации таких различий применяют различные подходы, включающие анализ нуклеотидных последовательностей мтДНК, хлДНК и ядерной ДНК. Ранее была показана возможность использования последовательностей хлДНК для характеристики видов ценхруса (Кулакова, Кулаков, 2015; Kulakova et al., 2015). Последовательности ядерной ДНК на примере SSR-, STS-, RAPD-маркеров использовали для выявления генетического разнообразия на разных объектах и для различных целей – включая культурные, сорные и древесные растения, насекомые и бактерии (Дивашук и др., 2010; Камаев и др., 2015; Крупин и др., 2011; Мазурин и др., 2010; Кулакова, Кулаков,

2015; Kulakova et al., 2015; Сахарова и др., 2011; Семенов и др., 2016; Соболев и др., 2009; Сурина и др., 2015; Хавкин, 1997; Чакина и др., 2010; Bartoš et al., 2008; Eivazi et al., 2008; Korzun et al., 1997).

ISSR-маркеры нашли достойное применение для оценки генетического разнообразия. Имеется ряд работ, выполненных на разных объектах, включая как сельскохозяйственные культуры, так и редкие и исчезающие виды (Боронникова, 2009; Гришин, Заякин, 2012; Соболев и др., 2009).

Цель работы заключается в поиске видоспецифичных ISSR-маркеров для дифференциации видов рода *Cenchrus* и идентификации карантинного вида ценхруса длинноколочкового *Cenchrus longispinus*.

Материал и методы

В работе исследованы 15 образцов растений, которые представлены 8 видами рода *Cenchrus* (табл. 1).

Таблица 1

Исследуемые виды рода *Cenchrus*

№ пп	Вид	№№ проб в эксперименте	Примечание
1	<i>C. longispinus</i> (Hackel ex Kneuck.) Fernald	1, 3, 4, 5, 8	карантинный
2	<i>C. spinifex</i> Cav.	2	
3	<i>C. echinatus</i> L.	6, 10	
4	<i>C. myosuroides</i> Kunth	7	
5	<i>C. ciliaris</i> L.	9.1, 9.2	
6	<i>C. brownii</i> Roem. & Schult	11	
7	<i>C. palmeri</i> Vasey	12, 13	
8	<i>C. pilosus</i> Kunth	14	

Исходные образцы некарантинных видов представляли собой зрелые соплодия или листья от дикорастущих растений, собранных специалистами ФГБУ «ВНИИКР» в ходе экспедиций и мониторинговых мероприятий. В случае карантинного объекта ценхруса длинноколочкового ФГБУ «ВНИИКР» предоставил образцы ДНК, выделенные из растений, собранных в очагах на территории РФ и Украины. Все ваучерные экземпляры хранятся в гербарной коллекции ФГБУ «ВНИИКР». В качестве отрицательного контроля использовали объединенные образцы ДНК *Echinochloa crus-galli*, *Setaria viridis*, собранные на территории Москвы и Московской области.

Молекулярно-генетические исследования выполнены на базе ФГБНУ ВНИИСБ.

Выделение ДНК проводили набором реагентов «ДНК ЭКСТРАН-3» производства компании «Синтол» (Россия).

В работе был апробирован 21 ISSR-маркер, последовательности праймеров которых представлены в таблице 2.

Список ISSR-маркеров, использованных в работе

№ п/п	Маркер	Последовательность нуклеотидов	T _m , °C
1	ISSR1	(AG) ₈ YG	54
2	ISSR2	(AC) ₈ G	52
3	ISSR3	(GA) ₈ C	52
4	ISSR4	(CA) ₈ A	50
5	ISSR5	(CA) ₇ RC	53
6	ISSR6	(AG) ₇ YT	48
7	ISSR7	(AG) ₈ G	56
8	ISSR8	(GA) ₈ T	46
9	ISSR9	(TC) ₈ C	54
10	ISSR10	(TC) ₈ G	48
11	ISSR11	(AC) ₈ C	58
12	ISSR12	(GA) ₈ YT	49
13	ISSR13	(AC) ₈ YG	56
14	ISSR14	(GA) ₈ YC	54
15	ISSR15	(AC) ₈ YA	54
16	ISSR16	(CA) ₈ GT	52
17	ISSR17	(AG) ₈ C	52
18	ISSR18	(TG) ₈ G	58
19	ISSR19	(CT) ₈ G	52
20	ISSR20	(GT) ₈ T	50
21	ISSR21	(GT) ₈ YT	52

ПЦР-амплификацию осуществляли по индивидуально модифицированным режимам для каждой пары праймеров в стандартной ПЦР-смеси (PCR Protocol for Taq DNA Polymerase with Standard Taq Buffer).

ПЦР-продукты были исследованы методом гель-электрофореза в 2% агарозном геле. Детекцию проводили с использованием системы гель-документирования Gel Doc™ XR+ (производство компании Bio-Rad).

Результаты и обсуждение

Первым этапом анализа был подбор маркеров для выявления межродовых различий. В качестве примера приведена электрофореграмма продуктов амплификации маркера ISSR1 (рис. 1). Данная электрофореграмма показывает наличие специфичных бэндов для *Echinochloa crus-galli* и *Setaria viridis*, которые отличают эти виды от видов рода *Cenchrus* и различают между собой. Данные виды были использованы как сорные растения, обитающие в том же ареале, имеющие сходное фенотипическое проявление с ценхрусом. Однако данный маркер имеет достаточно много общего для всех изучаемых видов рода *Cenchrus*, что не дает возможности его использовать для видовой идентификации.

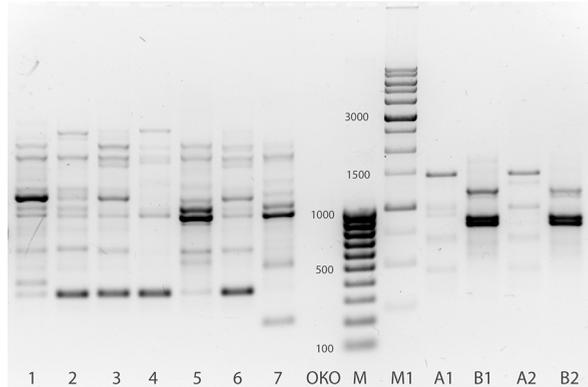


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации ISSR-маркера:
 1 – *C. longispinus*; 2 – *C. spinifex*; 3 – *C. echinatus*; 4 – *C. myosuroides*; 5 – *C. ciliaris*;
 6 – *C. brownii*; 7 – *C. palmerii*; OKO – отрицательный контрольный образец,
 M – маркер молекулярного размера (100–1000 п.н.),
 M1 – маркер молекулярного размера (250–10000 п.н.),
 A1, A2 – *Echinochloa crus-galli*, B1, B2 – *Setaria viridis*

Из использованных 21 ISSR-маркера только маркеры ISSR2, ISSR3, ISSR6, ISSR12, ISSR14 и ISSR19 дали профили, позволяющие проводить видовую идентификацию и выявлять внутривидовой полиморфизм.

Анализ результатов электрофоретического разделения ампликонов маркера ISSR2 показывает, что все изучаемые образцы *C. longispinus* имеют продукты амплификации размером около 300 и 900 п.н. и, напротив, у них отсутствует фрагмент размером более 1000 п.н. Так на рисунке 2 можно наблюдать внутривидовое разнообразие карантинного объекта *C. longispinus* разных мест произрастания (образцы 1, 3, 4, 5, 8).

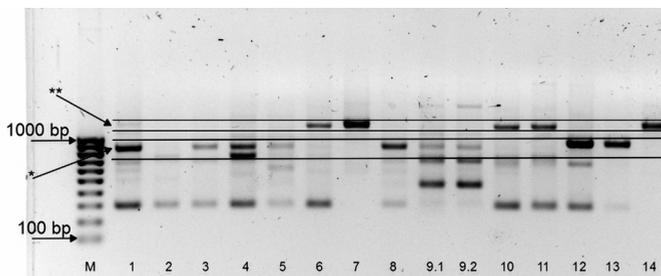


Рис. 2. Гель-электрофорез ампликонов маркера ISSR2:
 M – маркер молекулярного размера (100–1000 п.н.), 1, 3, 4, 5, 8 – *C. longispinus*;
 2 – *C. spinifex*; 6, 10 – *C. echinatus*; 7 – *C. myosuroides*; 9.1, 9.2 – *C. ciliaris*;
 11 – *C. brownii*; 12, 13 – *C. palmeri*; 14 – *C. pilosus*)

Видоспецифические профили по маркеру ISSR2 наблюдаются у образцов *C. echinatus* и *C. ciliaris*. В то же время образцы *C. palmeri* имели только один общий четко выраженный бэнд размером около 900 п.н., а по другим имели отличия. Сложность идентификации видов заключается в целом в очень схожей молекулярной организации геномов по ISSR-локусам родственных видов.

Анализ результатов электрофореза продуктов амплификации маркера ISSR3 показал сходные профили у всех образцов *C. longispinus*, имевших бэнды размером более 500, более 700 и около 900 п.н. (рис. 3). В то же время, все образцы других изученных видов имеют либо дополнительные бэнды, и/или у них отсутствует какой-либо из указанных. На рисунке 3 выделена линия бэндов размером около 900 п.н., совпадающих как с образцами карантинного вида (1, 3, 4, 5, 8), так и с образцами некарантинных – 6, 7, 10, 11, 12, 13, 14. Однако 6, 7, 10 и 11 образцы имеют второй специфичный бэнд. Если рассматривать другие виды, которые представлены несколькими образцами, то можно сказать, что образцы каждого из изученных видов *C. echinatus*, *C. ciliaris* и *C. palmeri* имели свои специфичные для вида профили (рис. 3).

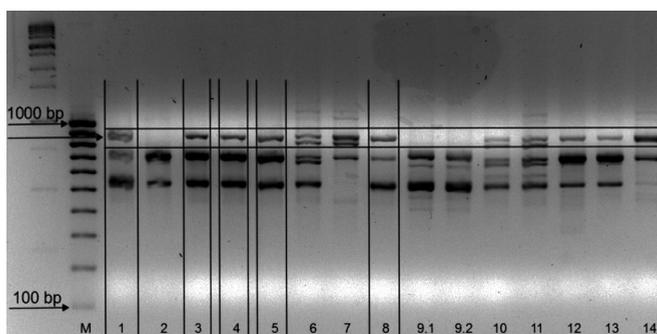


Рис. 3. Гель-электрофорез ампликонов маркера ISSR3. Здесь и далее: М1 – маркер молекулярного размера (250–10000 п.н.), М – маркер молекулярного размера (100–1000 п.н.), 1, 3, 4, 5, 8 – *C. longispinus*; 2 – *C. spinifex*; 6, 10 – *C. echinatus*; 7 – *C. myosuroides*; 9.1, 9.2 – *C. ciliaris*; 11 – *C. brownii*; 12, 13 – *C. palmeri*; 14 – *C. pilosus*)

Сходная картина по результатам электрофореза продуктов амплификации была получена и при использовании маркера ISSR6 (рис. 4). Каждый из видов имел специфичный спектр продуктов амплификации. На рисунке 4 бэнд размером 650 нуклеотидов специфичен только для образцов карантинного объекта *C. longispinus* (образцы 1, 3, 4, 5, 8). В то же время следует отметить, что среди видов, у которых были проанализированы не менее двух образцов, только у образцов вида *C. palmeri* были обнаружены разные профили продуктов амплификации.

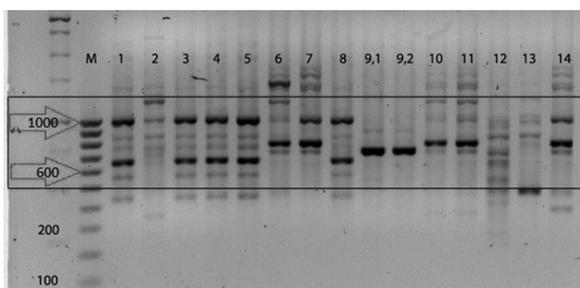


Рис. 4. Гель-электрофорез ампликонов маркера ISSR6. Описание см. рис. 3

Анализ результатов электрофореза продуктов амплификации маркера ISSR12 (рис. 5) позволил выделить фрагмент размером 650 п.н., специфичный только для карантинного вида *C. longispinus* (образцы 1, 3, 4, 5, 8). В целом все образцы этого вида имели сходный рисунок бэндов. Видоспецифичность рисунка бэндов проявилась и в отношении образцов *C. echinatus* (образцы 6, 10) и *C. ciliaris* (образцы 9.1, 9.2). Образцы *C. palmeri* (образцы 12 и 13) так же как и в случае маркера ISSR6 имели совершенно различный профиль продуктов амплификации (рис. 5).

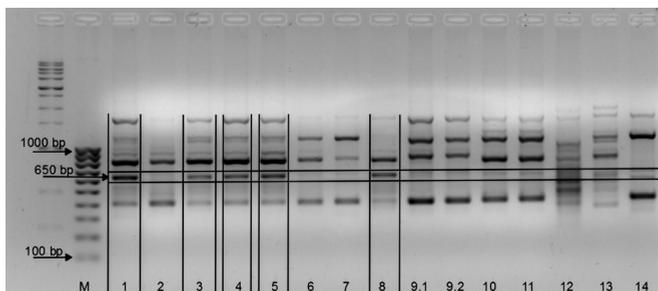


Рис. 5. Гель-электрофорез ампликонов маркера ISSR12.
Описание см. рис. 3

Анализ результатов гель-электрофореза ПЦР-продуктов маркера ISSR14, представленный на рис. 6, позволил также выделить специфичный для карантинного объекта *C. longispinus* (образцы 1, 3, 4, 5, 8) бэнд длиной приблизительно 190 п.н.

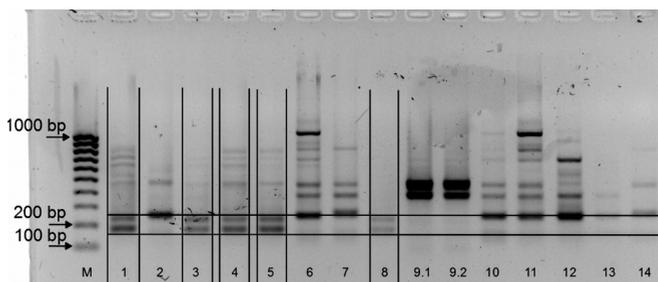


Рис. 6. Гель-электрофорез ампликонов маркера ISSR14.
Описание см. рис. 3

Возможно, бэнд длиной около 220 п.н. у карантинных объектов может быть схожим с образцами *C. echinatus* (6, 10), *C. brownii* (11) и *C. palmeri* (12). Следует отметить сохранение видоспецифичного распределения бэндов в отношении представителей видов *C. longispinus*, *C. echinatus* и *C. ciliaris*, что было отмечено и для маркеров ISSR6 и ISSR14.

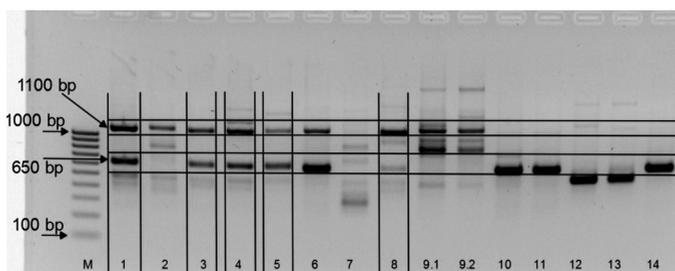


Рис. 7. Гель-электрофорез ампликонов маркера ISSR19.
Описание см. рис. 3

Результаты электрофореза ампликонов маркера ISSR19 показывают наличие видоспецифических продуктов для всех изученных образцов (рис. 7). Бэнд длиной около 650 п.н. проявляется у карантинных объектов *C. longispinus* (образцы 1, 3, 4, 5, 8), который возможно отличается от других образцов, что требует уточнения. Бэнд длиной 1100 п.н. так же встречается у всех карантинных образцов, совпадает с образцами *C. ciliaris* (образцы 9.1, 9.2) и немного отличается от *C. spinifex* (образец 2).

Выводы

По шести маркерам – ISSR2, 3, 6, 12, 14 и 19 получены видоспецифические профили, позволяющие идентифицировать образцы карантинного вида *C. longispinus*.

Для маркеров ISSR12, 14, 19 выделены видоспецифические бэнды, характерные только для *C. longispinus*, которые будут использованы в дальнейшей работе.

При исследовании нескольких образцов различного географического происхождения установлен внутривидовой полиморфизм *C. longispinus*, *C. echinatus* и *C. ciliaris*.

Библиографический список

1. Боронникова С.В. Генетическая паспортизация популяций редких видов растений рода *Adonis* с использованием ISSR- и IRAP-маркеров / С.В. Боронникова // Известия ТСХА. – 2009. – № 1. – С. 82–88.

2. Гришин С.Ю. Влияние температуры отжига и последовательности RAPD- и ISSR-праймеров на результаты ПЦР-анализа ДНК люпина узколистного / С.Ю. Гришин В.В. Заякин // Вестник Брянского Государственного Университета. – 2012. – № 4–2. – С. 136–140.

3. Дивашук М.Г. Молекулярно-цитогенетическая характеристика линии яровой тритикале 131/7, несущей ржано-пшеничную транслокацию / М.Г. Дивашук П.Ю. Крупин А.А. Соловьев Г.И. Карлов // Генетика. – 2010. – Т. 46. – № 2. – С. 211–217.

4. Единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза // Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 30 ноября 2016 г. № 158. Режим доступа: [https://docs.eaeunion.org/docs/en-us/01213201/cncd_06032017_158] – Дата обращения: 18.06.2017.

5. Камаев И.О. Непарный шелкопряд (*Lymantria dispar*): выделение внутривидовых комплексов и молекулярно-генетические подходы к идентификации азиатского подвида / И.О. Камаев Е.С. Мазурин А.В. Шипулин // Карантин растений. Наука и практика. – 2015. – № 1 (11). – С. 45–52.

6. Крупин П.Ю. Адаптация микросателлитных SSR-маркеров пшеницы для анализа геномов пырея среднего, пырея удлинённого и пшенично-пырейных гибридов / П.Ю. Крупин М.Г. Дивашук И.А. Фесенко Г.И. Карлов // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2011. – № 3. – С. 49–57.

7. Кулаков В.Г. Современная номенклатура и таксономия карантинного для России вида ценхруса / В.Г. Кулаков Ю.Ю. Кулакова // Карантин растений – 2014 – № 1 (7). – С. 11–15.

8. Кулакова Ю.Ю. Поиск молекулярных маркеров для идентификации сорных растений / Ю.Ю. Кулакова В.Г. Кулаков // Карантин растений. Наука и практика. – 2015. – № 1 (11). – С. 32–36.

9. Мазурин Е.С. Оценка штаммового разнообразия возбудителя сосудистого бактериоза капусты / Е.С. Мазурин А.Н. Игнатов Е.В. Матвеева Ф.С.У. Джалилов // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2010. – № 5. – С. 66–75.

10. Москаленко Г.П. Аллелопатические свойства карантинного сорняка *Cenchrus tribuloides* L. / Г.П. Москаленко А.Н. Кудрявцева // Тезисы докл. Всесоюзн. школы мол. ученых и специалистов. – Кишинев. – 1985. – С. 41–42.

11. Москаленко Г.П. Борьба с ценхрусом якорцевым в посевах кукурузы / Г.П. Москаленко, А.Н. Кудрявцева // Применение пестицидов и их воздействие на сельскохозяйственные культуры и сорные растения при интенсивной химизации. – М., 1986. – С. 28–32.

12. Москаленко Г.П. Борьба с ценхрусом малоцветковым на землях несельскохозяйственного пользования / Г.П. Москаленко А.Н. Кудрявцева // Применение новых химических и микробиологических препаратов в борьбе с карантинными вредителями, болезнями и сорными растениями. – М., 1987. – С. 194–196.

13. Национальный доклад о фитосанитарном состоянии территории Российской Федерации – МСХ РФ, Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору, 2017–24 с. Режим доступа: [<http://fsvps.ru/fsvps-docs/ru/usefulinf/files/nd2017.pdf>].

14. Распоряжение Правительства Российской Федерации от 13 мая 2017 года № 917-р. Режим доступа: [<http://government.ru/docs/27684/>].

15. Сахарова А.Н. Применение SSR-маркеров для оценки уровня гибридности семян F₁ огурца / А.Н. Сахарова Г.Н. Андреева И.А. Фесенко Л.И. Хрусталева Г.И. Карлов // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2011. – № 6. – С. 150–155.

16. Семенов А.Н. Сравнительный анализ полиморфизма микросателлитных маркеров у ряда видов рода *Fusarium* / А.Н. Семенов М.Г. Дивашук М.С. Баженов Г.И. Карлов В.И. Леунов А.Н. Ховрин А.А. Егорова Л.М. Соколова Т.А. Терешонкова К.Л. Алексеева В.М. Леунова // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2016. – № 1. – С. 40–50.

17. Соболев В.В. Оценка межвидового и межсортового полиморфизма малины и маркирование признака ремонтантности с использованием ISSR-ПЦР-анализа / В.В. Соболев А.Г. Соболева Г.Н. Андреева Г.И. Карлов // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2009. – № 2. – С. 103–109.

18. Сурина Т.А. Мониторинг фитофтороза древесных и кустарниковых растений / Т.А. Сурина С.Н. Еланский Е.С. Мазурин // Защита и карантин растений. – 2015. – № 1. – С. 42–43.

19. Тохтарь В.К. Ценхрус длинноколючковый – еще один американский «гость» Центрального Черноземья / В.К. Тохтарь О.В. Фомина // Защита и карантин растений. – 2010. – № 12. – С. 26–27.

20. Хавкин Э.Е. Молекулярные маркеры в растениеводстве // Сельскохозяйственная биология. – 1997. – № 5. – С. 3–21.

21. Чакина Е.А. Молекулярно-генетические методы исследования древесины кедра сибирского при решении задач судебно-ботанической экспертизы / Е.А. Чакина Г.Н. Андреева Г.И. Карлов А.А. Соловьев О.Б. Градусова Н.Н. Лобанов // Теория и практика судебной экспертизы. – 2010. – № 3 (19). – С. 188–197.

22. Bartoš J. A first survey of the rye (*Secale cereale*) genome composition through BAC end sequencing of the short arm of chromosome 1R // J. Bartoš E. Paux R. Kofler M. Havránková D. Kopecký P. Suchánková J. Šafář H. Šimková C.D. Town T. Lelley C. Feuillet J. Doležel // BMC Plant Biology. – 2008. – 8. – 95. – 12 p.

23. DeLisle D.G. Taxonomy and distribution of the genus *Cenchrus*. // Iowa State Journal of Science. – 1963. – Vol. 37. – P. 259–351.

24. Eivazi A.R. Assessing wheat (*Triticum aestivum* L.) genetic diversity using quality traits, amplified fragment length polymorphisms, simple sequence repeats and proteome analysis. / A.R. Eivazi, M.R. Naghavi, M. Hajheidari, S.M. Pirseyedi, M.R. Ghaffari,

S.A. Mohammadi, I. Majidi, G.H. Salekdeh1 & M. Mardi // *Annals of Applied Biology*. – 2008. 152:81–91.

25. *Hitchcock A.S., Chase A.* Manual of the grasses of the United States. Second Edition. Washington. – 1950. – 1051 p.

26. *Korzun V.* Application of microsatellite markers to distinguish inter-varietal chromosome substitution lines of wheat (*Triticum aestivum* L.) / V. Korzun A. Börner A.J. Worland C.N. Law & M.S. Roder // *Euphytica*. – 1997. – 95. – p. 149–155.

27. *Kulakova Yu.Yu.* Search for molecular markers for identification of weeds / Yu.Yu. Kulakova V.G. Kulakov E.S. Mazurin // *Карантин растений. Наука и практика*. – 2015. – № 1 (11). – С. 36–39.

28. *Mabberley D.J.* Mabberley's plant-book (3th ed.). Cambridge University Press, Cambridge: XVIII – 2008. + 1021 p.

29. PCR Protocol for Taq DNA Polymerase with Standard Taq Buffer [Электронный ресурс] / New England Biolabs. – Режим доступа: <https://www.neb.com/protocols/1/01/01/taq-dna-polymerase-with-standard-taq-buffer-m0273.html> – (Дата обращения: 18.02.2017).

30. *Stieber M.T. Cenchrus* / M.T. Stieber J.K. Wipff // *Flora of North America north of Mexico*, – 2003. – Vol. 25. – Oxford University Press, New York-Oxford. – P. 529–535.

APPLICATION OF ISSR-ANALYSIS TO IDENTIFY SPECIES OF THE *CENCHRUS* GENUS

S.V. SYKSIN^{1,2,3}, S.A. BLINOV^{2,3}, A.S. YASHKIN³, V.G. KULAKOV⁴,
YU.YU. KULAKOV⁴, O.N. ALADINA¹, A.A. SOLOVIEV^{1,2}

(¹Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy;

²All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology;

³LLC Syntol; ⁴All-Russian Center for Plant Quarantine)

Among more than 20 existing types of longspine sandbur, (Cenchrus longispinus (Hackel ex Kneuck.) Fernald), an annual cereal of North American origin, is of particular importance for the Russian Federation. This plant is widely distributed in temperate countries as a weed plant. It contaminates farm crops, vegetables and melons, vineyards and gardens. It is a quarantine object for the Russian Federation and the countries of the Eurasian Economic Union. On the territory of our country there are small disparate foci localized along railway lines and within urban areas. Identification of the object in the pre-generation state is difficult due to the morphological similarity of the weed with other grasses. For the early detection of the weeds, it is proposed to use a molecular genetic approach based on the use of ISSR markers. The purpose of this study is to search for molecular ISSR markers to differentiate species of the Cenchrus genus and identify the quarantine species of C. longispinus. The authors studied fifteen specimens belonging to eight species of the Cenchrus genus and obtained from the collection of the All-Russian Plant Quarantine Center (VNIKRR). To identify interspecific genetic diversity, a set of twentyone ISSR markers was used. Six of the markers showed polymorphism, which allows identifying the studied species of the Cenchrus genus. The species-specific profiles of the amplicons of these ISSR markers allow identifying the considered species. For a number of markers, species-specific C. longispinus bands have been identified.

Key words: *Cenchrus*, longspine sandbur, long-thorned sandbur, *C. longispinus*, *C. echinatus*, *C. ciliaris*, *Cenchrus myosuroides*, *C. spinifex*, *C. brownii*, *C. palmeri*, *C. pilosus*, PCR, ISSR markers, molecular markers.

References

1. *Boronnikova S.V.* Geneticheskaya pasportizatsiya populyatsiy redkikh vidov raseniy roda *Adonis* s ispol'zovaniyem ISSR- i IRAP-markerov [Genetic certification of populations of rare plant species of the *Adonis* genus using ISSR and IRAP markers] / S.V. Boronnikova // *Izvestiya TSKHA*. 2009. No. 1. Pp. 82–88. (In Russian)
2. *Grishin S.Yu.* Vliyaniye temperatury otzhiga i posledovatel'nosti RAPD- i ISSR-praymerov na rezul'taty PTSR-analiza DNK lyupina uzkolistnogo [Influence of annealing temperature and sequence of RAPD and ISSR primers on the PCR analysis results of the DNA of narrow-leaved lupine] / S.Yu. Grishin V.V. Zayakin // *Vestnik Bryanskogo Gosudarstvennogo Universiteta*. 2012. No. 4–2. Pp. 136–140. (In Russian)
3. *Divashuk M.G.* Molekulyarno-tsitogeneticheskaya kharakteristika linii yarovoy tritikale 131/7, nesushchey rzhano-pshenichnuyu translokatsiyu [Molecular-cytogenetic characteristics of the spring triticale 131/7 line carrying rye-wheat translocation] / M.G. Divashuk P.Yu. Krupin A.A. Solov'yev G.I. Karlov // *Genetika*. 2010. Vol. 46. No. 2. Pp. 211–217. (In Russian)
4. Yedinyy perechen' karantinnykh ob'yektov Yevraziyskogo ekonomicheskogo soyuza [Unified list of quarantine objects of the Eurasian Economic Union] // *Resheniye Soveta Yevraziyskoy ekonomicheskoy komissii ot 30 noyabrya 2016 g.* No. 158. Access mode: [https://docs.eaeunion.org/docs/en-us/01213201/cncd_06032017_158] – Access date: 18.06.2017. (In Russian)
5. *Kamayev I.O.* Neparniy shelkopryad (*Lymantria dispar*): vydeleniye vnutrividovykh kompleksov i molekulyarno-geneticheskiye podkhody k identifikatsii aziatskogo podvida [Gypsy moth (*Lymantria dispar*): isolation of intraspecific complexes and molecular genetic approaches to the identification of the Asian subspecies] / I.O. Kamayev Ye.S. Mazurin A.V. Shipulin // *Karantin rasteniy. Nauka i praktika*. 2015. No. 1 (11). Pp. 45–52. (In Russian)
6. *Krupin P.Yu.* Adaptatsiya mikrosatellitnykh SSR-markerov pshenitsy dlya analiza genomov pyreya srednego, pyreya udlinennogo i pshenichno-pyreynykh gibridov [Adaptation of microsatellite SSR markers of wheat for the genome analysis of wheatgrass medium, wheatgrass elongated and wheat wheatgrass hybrids] / P.Yu. Krupin M.G. Divashuk I.A. Fesenko G.I. Karlov // *Izvestiya Timiryazevskoy sel'skokhozyaystvennoy akademii*. 2011. No. 3. Pp. 49–57. (In Russian)
7. *Kulakov V.G.* Sovremennaya nomenklatura i taksonomiya karantinogo dlya Rossii vida tsenkhrusa [Modern nomenclature and taxonomy of the quarantine type of *Cenchrus* for Russia] / V.G. Kulakov Yu. Yu. Kulakova // *Karantin rasteniy*. 2014 No. 1 (7). Pp. 11–15. (In Russian)
8. *Kulakova Yu. Yu.* Poisk molekulyarnykh markerov dlya identifikatsii sornykh rasteniy [Search for molecular markers to identify weeds] / Yu. Yu. Kulakova V.G. Kulakov // *Karantin rasteniy. Nauka i praktika*. 2015. No. 1 (11). Pp. 32–36. (In Russian)
9. *Mazurin Ye.S.* Otsenka shtammovogo raznoobraziya vzbuditelya sosudistogo bakterioza kapusty [Evaluating the causative agent strain diversity of the vascular bacteriosis of cabbage] / Ye.S. Mazurin A.N. Ignatov Ye.V. Matveyeva F.S.U. Dzhililov // *Izvestiya Timiryazevskoy sel'skokhozyaystvennoy akademii*. 2010. No. 5. Pp. 66–75. (In Russian)
10. *Moskalenko G.P.* Allelopaticheskiye svoystva karantinogo sornyaka *Cenchrus tribuloides* L. [Allelopathic properties of quarantine weed *Cenchrus tribuloides* L.] / G.P. Moskalenko A.N. Kudryavtseva // *Tezisy dokl. Vsesoyuzn. shkoly mol. uchenykh i spetsialistov*. Kishinev. 1985. Pp. 41–42. (In Russian)
11. *Moskalenko G.P.* Bor'ba s tsenkhrusom yakortsevym v posevakh kukuruzy [Fighting against dune cenchrus in corn crops] / G.P. Moskalenko A.N. Kudryavtseva //

Primeneniye pestitsidov i ikh vozdeystviye na sel'skokhozyaystvennyye kul'tury i sornyye rasteniya pri intensivnoy khimizatsii. M., 1986. Pp. 28–32. (In Russian)

12. *Moskalenko G.P.* Bor'ba s tsenkhrusom malotsvetkovym na zemlyakh nesel'skokhozyaystvennogo pol'zovaniya [Fighting against pauciflorous cenchrus on non-agricultural land] / G.P. Moskalenko A.N. Kudryavtseva // *Primeneniye novykh khimicheskikh i mikrobiologicheskikh preparatov v bor'be s karantinnyimi vreditelyami, boleznyami i sornymi rasteniyami.* M., 1987. Pp. 194–196. (In English)

13. *Natsional'nyy doklad o fitosanitarnom sostoyanii territorii Rossiyskoy Federatsii – MSKH RF, Federal'naya sluzhba po veterinarnomu i fitosanitarnomu nadzoru* [National report on the phytosanitary status of the Russian Federation territory – Ministry of Agriculture of the Russian Federation, Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance], 2017. 24 p. Access mode: [<http://fsvps.ru/fsvps-docs/ru/usefulinf/files/nd2017.pdf>]. (In Russian)

14. *Rasporyazheniye Pravitel'stva Rossiyskoy Federatsii ot 13 maya 2017 goda № 917-p* [Order of the Government of the Russian Federation of May 13, 2017 No. 917-p.]. Access mode: [<http://government.ru/docs/27684/>]. (In Russian)

15. *Sakharova A.N.* Primeneniye SSR-markerov dlya otsenki urovnya gibridnosti semyan F1 ogurtsa [Use of SSR markers for assessing the level of hybridity of F1 cucumber seeds] / A.N. Sakharova G.N. Andreyeva I.A. Fesenko L.I. Khrustaleva G.I. Karlov // *Izvestiya Timiryazevskoy sel'skokhozyaystvennoy akademii.* 2011. No. 6. Pp. 150–155. (In Russian)

16. *Semenov A.N.* Sravnitel'nyy analiz polimorfizma mikrosatellitnykh markerov u ryada vidov roda *Fusarium* [Comparative analysis of the polymorphism of microsatellite markers in a number of species of the *Fusarium* genus] / A.N. Semenov M.G. Divashuk M.S. Bazhenov G.I. Karlov V.I. Leunov A.N. Khovrin A.A. Yegorova L.M. Sokolova T.A. Tereshonkova K.L. Alekseyeva V.M. Leunova // *Izvestiya Timiryazevskoy sel'skokhozyaystvennoy akademii.* 2016. No. 1. Pp. 40–50. (In Russian)

17. *Sobolev V.V.* Otsenka mezhvidovogo i mezhsortovogo polimorfizma maliny i markirovaniye priznaka remontantnosti s ispol'zovaniyem ISSR-PTSR-analiza [Evaluation of interspecific and intervartietal polymorphism of raspberry and labeling a sign of permanent flowering capacity using ISSR-PCR analysis] / V.V. Sobolev A.G. Soboleva G.N. Andreyeva G.I. Karlov // *Izvestiya Timiryazevskoy sel'skokhozyaystvennoy akademii.* 2009. No. 2. Pp. 103–109. (In Russian)

18. *Surina T.A.* Monitoring fitoftoroza drevesnykh i kustarnikovykh rasteniy [Monitoring foot rot of tree and shrub plants] / T.A. Surina S.N. Yelanskiy Ye.S. Mazurin // *Zashchita i karantin rasteniy.* 2015. No. 1. Pp. 42–43. (In English)

19. *Tokhtar V.K.* Tsenkhrus dlinnokolyuchkovyy – yeshche odin amerikanskiy “gost” Tsentral'nogo Chernozem'ya [Cenchrus longispinus as another American “guest” of the Central Chernozem Region] / V.K. Tokhtar' O.V. Fomina // *Zashchita i karantin rasteniy.* 2010. No. 12. Pp. 26–27. (In Russian)

20. *Khavkin E.Ye.* Molekulyarnyye markery v rasteniyevodstve [Molecular markers in crop production] // *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya.* 1997. No. 5. Pp. 3–21. (In Russian)

21. *Chakina Ye.A.* Molekulyarno-geneticheskiye metody issledovaniya drevesiny kedra sibirskogo pri reshenii zadach sudebno-botanicheskoy ekspertizy [Molecular genetic methods for studying Siberian cedar wood in solving problems of forensic botanical examination] / Ye.A. Chakina G.N. Andreyeva G.I. Karlov A.A. Solov'yev O.B. Gradusova N.N. Lobanov // *Teoriya i praktika sudebnoy ekspertizy.* 2010. No. 3 (19). Pp. 188–197. (In English)

22. *Bartoš J.* A first survey of the rye (*Secale cereale*) genome composition through BAC end sequencing of the short arm of chromosome 1R // *J. Bartoš E. Paux R. Kofler*

- M. Havránková D. Kopecký P. Suchánková J. Šafář H. Šimková C.D. Town T. Lelley C. Feuillet J. Doležel // BMC Plant Biology. 2008. 8. 95. 12 p. (In English)
23. DeLisle D.G. Taxonomy and distribution of the genus *Cenchrus*. // Iowa State Journal of Science. 1963. Vol. 37. Pp. 259–351. (In English)
24. Eivazi A.R. Assessing wheat (*Triticum aestivum* L.) genetic diversity using quality traits, amplified fragment length polymorphisms, simple sequence repeats and proteome analysis. / A.R. Eivazi, M.R. Naghavi, M. Hajheidari, S.M. Pirseyedi, M.R. Ghaffari, S.A. Mohammadi, I. Majidi, G.H. Salekdeh1 & M. Mardi // Annals of Applied Biology. – 2008. 152:81–91. (In English)
25. Hitchcock A.S., Chase A. Manual of the grasses of the United States. Second Edition. Washington. 1950. 1051 p. (In English)
26. Korzun V. Application of microsatellite markers to distinguish inter-varietal chromosome substitution lines of wheat (*Triticum aestivum* L.) / V. Korzun A. Borner A.J. Worland C.N. Law & M.S. Roder // Euphytica. 1997. 95. Pp. 149–155. (In English)
27. Kulakova Yu.Yu. Searching for molecular markers for identification of weeds / Yu.Yu. Kulakova V.G. Kulakov E.S. Mazurin // Karantin rasteniy. Nauka i praktika. 2015. No. 1 (11). Pp. 36–39. (In English)
28. Mabberley D.J. Mabberley's plant-book (3th ed.). Cambridge University Press, Cambridge: XVIII – 2008. + 1021 p. (In English)
29. PCR Protocol for Taq DNA Polymerase with Standard Taq Buffer [Electronic source] / New England Biolabs. – Access mode: <https://www.neb.com/protocols/1/01/01/taq-dna-polymerase-with-standard-taq-buffer-m0273.html> – (Access date: 18.02.2017). (In English)
30. Stieber M.T. *Cenchrus* / M.T. Stieber J.K. Wipff // Flora of North America north of Mexico, 2003. Vol. 25. Oxford University Press, New York-Oxford. Pp. 529–535. (In English)

Сыксин Станислав Владимирович – аспирант кафедры генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства факультета агрономии и биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550 г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49.); научный сотрудник лаборатории маркерной и геномной селекции растений ФГБНУ ВНИИСБ (127550 г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42); инженер компании ООО «Синтол»; e-mail: stason_16@inbox.ru

Блинова София Алексеевна – аспирант ФГБНУ ВНИИСБ (127550 г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42); научный сотрудник компании ООО «Синтол» (127550 г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42.)

Яшкин Алексей Сергеевич – младший научный сотрудник компании ООО «Синтол» (127550 г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42.)

Кулаков Виталий Геннадьевич – начальник отдела организации межлабораторных сличительных испытаний ФГБУ «Всероссийского центра карантина растений»; Московская область, Раменский р-н, пос. Быково, ул. Пограничная, д. 32. Тел.: +7 (499) 707-22-27 (доб. 1480); e-mail: vitaliyk2575@mail.ru.

Кулакова Юлиана Юрьевна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник научно-экспериментального отдела ФГБУ «Всероссийского центра карантина растений»; Московская область, Раменский р-н, пос. Быково, ул. Пограничная, д. 32. Тел.: +7 (499) 707-22-27 (доб. 1584); e-mail: thymus73@mail.ru.

Аладина Ольга Николаевна – доктор биологических наук, профессор, научный консультант отдела диссертационных советов ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева; e-mail: alberry7@yandex.ru

Соловьев Александр Александрович – доктор биологических наук, профессор, профессор РАН, заместитель директора по научной и образовательной деятельности, заведующий лабораторией маркерной и геномной селекции растений ФГБНУ ВНИИСБ (127550 г. Москва, ул. Тимирязевская, д.42. Тел.: 84999779289); научный консультант отдела диссертационных советов ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550 г. Москва, ул. Тимирязевская, д.49), e-mail: a.soloviev70@gmail.com

Stanislav V. Syksin – postgraduate student, Assistant Professor, the Department of Genetics, Biotechnology, Plant Breeding and Seed Sciences, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (127550, Moscow, Timiryazevskaya Str., 49); Researcher of the All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, engineer of “Syntol” Company; e-mail: Stason_16@inbox.ru

Sofiya A. Blinova – postgraduate student of the All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology (127550, Moscow, Timiryazevskaya Str., 42); Researcher of “Syntol” Company

Aleksei S. Yashkin – MSc student of the Department of Genetics, Biotechnology, Plant Breeding and Seed Sciences, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (127550, Moscow, Timiryazevskaya Str., 49); phone: +7 (499) 976-39-81); e-mail: roshanololo@gmail.ru

Vitaly G. Kulakov – Head of Department of the Inter-Laboratory Comparative Tests, the All-Russian Center for Plant Quarantine, Moscow Region, Ramenskoye District, Bykovo, Pogradichnaya Str., 32; phone: +7 (499) 707-22-27 (1480); e-mail: vitaliyk2575@mail.ru.

Yuliana Y. Kulakova – PhD (Bio), senior researcher of the Department of Science, the All-Russian Center for Plant Quarantine, Moscow Region, Ramenskoye District, Bykovo, Pogradichnaya Str., 32; phone: +7 (499) 707-22-27 (1584); e-mail: thymus73@mail.ru

Olga N. Aladina – DSc (Bio), Professor, Scientific Consultant of the Department of Dissertation Councils, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (127550, Moscow, Timiryazevskaya Str., 49); e-mail: alberry7@yandex.ru

Aleksandr A. Soloviev – DSc (Bio), Professor, Head of the Laboratory of Marker-Assisted and Genomic Selection of Plants, the All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, (127550, Moscow, Timiryazevskaya Str., 42); Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (127550, Moscow, Timiryazevskaya Str., 49); phone: +7 (499) 977-92-89; e-mail: a.soloviev70@gmail.com).