

## Разработка CAPS-маркёров для изучения полиморфизма пластидных локусов представителей подрода *Idaeobathus* Focke рода *Rubus* L.

### Development of CAPS-markers for studying plastid loci polymorphism in *Rubus* L. subgenus *Idaeobathus* Focke

Камнев А. М., Антонова О. Ю., Чухина И. Г.

Kamnev A. M., Antonova O. Yu., Chukhina I. G.

Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова (ВИР), г. Санкт-Петербург, Россия  
E-mail: antonkamen@mail.ru

N. I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia

**Реферат.** Род *Rubus* L., включая подрод *Idaeobathus* Focke (малина), является в систематическом отношении довольно сложным. Особый интерес при изучении данного подрода представляет Западная Сибирь и особенно Алтайский регион, поскольку здесь происходит встреча двух видов: *R. idaeus* L. и *R. sachalinensis* H. Lev. Традиционно в филогенетических исследованиях изучают локусы пластидной ДНК. В данной работе предпринята попытка разработать пластидные CAPS-маркёры, пригодные для изучения генетического разнообразия подрода малины. Всего было разработано 9 таких маркёров, выявивших полиморфизм среди селекционных сортов малины различного происхождения, однако на выборке ДНК-препаратов, полученных из гербарных сборов *R. idaeus* и *R. sachalinensis* на территории Алтайского края и Республики Алтай, почти все они оказались мономорфны, за исключением двух комбинаций «праймеры/рестриктаза», детектировавших внутривидовой полиморфизм у малины сахалинской (*R. sachalinensis*). Кроме того, было выявлено два потенциальных маркёра, способных дифференцировать виды *R. idaeus* и *R. sachalinensis* без применения рестриктаз. В дальнейшем работа по созданию маркёров для изучения полиморфизма пластидных локусов у представителей подрода *Idaeobathus* будет продолжена.

**Ключевые слова.** Алтай, гербарий, малина, филогения, хлоропластная ДНК.

**Summary.** Genus *Rubus* L. including subgenus *Idaeobathus* Focke (raspberry) has difficult structure. Studying this subgenus researchers have special interest to West Siberia and especially Altai region because two species *R. idaeus* L. and *R. sachalinensis* H. Lev. grow together on this territory. Usually in phylogenetic research chloroplast DNA loci are studied. This article describes the attempt to develop relevant plastid CAPS-markers for studying raspberry genetic diversity. Nine markers that revealed polymorphism among raspberry cultivars have been developed. However, the sample of *R. idaeus* and *R. sachalinensis* herbarium specimens from Altai Krai and Republic of Altai showed that all of them are monomorphic aside from two combinations “primers/restrictase” indicated intraspecies polymorphism within *R. sachalinensis*. In addition, two potential markers able to differentiate *R. idaeus* and *R. sachalinensis* without using restrictases are detected. Further research devoted to creating markers for revealing plastid loci polymorphism will continue.

**Key words.** Altai, chloroplast DNA, herbarium, phylogeny, raspberry.

**Введение.** Род *Rubus* L. является довольно сложным по своей структуре и включает в себя по разным данным от 750 (Thompson, 1997) до 1000 (Focke, 1910, 1911, 1914) видов, разделённых на 12 подродов. В культуре наибольшее распространение получили представители подродов *Rubus* (ежевика) и *Idaeobathus* Focke (малина). Изучение меж- и внутривидового разнообразия подрода малины может представлять интерес как для исследования и уточнения филогенетических взаимоотношений и процессов флорогенеза, так и для расширения культивируемого сортимента малины, для которого в целом характерна достаточно узкая генетическая база (Dale et al., 1993). В плане изучения эволюционных процессов и поиска уникальных генотипов особый интерес представляют регионы Западной Сибири (включая и Алтай), поскольку здесь происходит встреча двух широкоареальных видов – европейского *R. idaeus* L. и азиатского *R. sachalinensis* H. Lev. Последний вид является единственным тетраплоидным видом в подрode *Idaeobathus* и, к тому же, существуют различные взгляды на его номенклатуру и таксономический статус (Эбель, 2012). По мнению Г. М. Синьковой, он состоит из двух подвидов: тетраплоидного *R. sachalinensis* subsp. *sachalinensis* и диплоидного *R. sachalinensis* subsp. *sibiricus* (Kom.) Sinjk., в более поздней системе последний подвид был выделен в отдельный вид (Синькова, 1973).

В решении спорных вопросов филогении, систематики, а также для оценки генетического разнообразия большим подспорьем оказывается подход, основанный на анализе полиморфизма органелльных и, прежде всего, пластидных ДНК. По сравнению с ядерной ДНК, пластидная лучше сохраняется в гербарных образцах благодаря своим небольшим размерам и значительному числу копий в каждой клетке растения (Фомина и др., 2019). Поэтому именно последовательности хлДНК часто используются в филогенетических исследованиях, в том числе малин и ежевик, и в работах по разграничению видов путем баркодинга (Камнев и др., 2020). Следует отметить, что в анализе пластидных геномов у представителей рода *Rubus* чаще всего используется достаточно ограниченный набор локусов: *atpF-atpH*, *psbK-psbI*, *trnL-trnF*, *rpl20-rps12*, *rbcL* и *matK* (Alice, Campbell, 1999; Pang et al., 2011; Wang et al., 2016), при этом почти все исследования такого рода основаны на дорогостоящих методиках секвенирования. Известна только одна работа прикладного характера, в которой описываются молекулярные маркеры SCAR-типа, способные в агарозных гелях различать лекарственный вид *R. coreanus* Miq. от часто использующихся в качестве его фальсификатов *R. crataegifolius* Bunge и *R. chingii* Hu (Yang et al., 2012). В то же время на других таксонах разработаны системы типирования цитоплазм на основе бюджетных ПЦР- и рестрикционных маркеров, примерами могут служить картофель (Hosaka, Sanetomo, 2012) и капустные культуры (Zhao et al., 2010).

**Цель работы** – разработать систему пластидных CAPS-маркеров, пригодных для изучения генетического разнообразия представителей подрода *Idaeobathus* рода *Rubus*.

**Материалы и методы.** Материалом послужили 8 образцов *in vitro* коллекции ВИР – 7 сортов малины различного происхождения – ‘Бабье Лето’, ‘Бабье Лето 2’, ‘Белая Спирина’, ‘Малая Устюжная’, ‘Таганка’, ‘Phoenix’, ‘Bristol’ – и 1 образец ежевики грузинской (*R. georgicus* Focke), а также 28 ДНК-препаратов, полученных из гербарного материала *R. idaeus* (17 образцов) и *R. sachalinensis* (11 образцов), собранного на территории Алтайского края и Республики Алтай и хранящегося в Гербарии Алтайского университета (ALTU).

Из отобранных образцов проводилось выделение ДНК модифицированным СТАВ-методом (Антонова и др., 2021). Гербарные ткани предварительно перед выделением обрабатывали в течение 12 часов сорбитол-содержащим буфером (Inglis et al., 2018).

Часть праймеров была подобрана на основе литературных данных (Yang, Pak, 2006; Fazekas et al., 2008; Dunning, Savolainen, 2010; Wang et al., 2016). Остальные праймеры были разработаны нами самостоятельно на основе анализа пластидных локусов у малины. К сожалению, для *R. idaeus* до сих пор отсутствует полный сиквенс пластидного генома. Поэтому для разработки маркеров была выбрана последовательность хлДНК *R. crataegifolius* (код в базе NCBI: NC\_039704.1). Локусы для изучения подбирали из числа межгенных спейсеров в уникальных участках LSC (large single copy – большой однокопийный район) и SSC (small single copy – малый однокопийный район). Список использованных праймеров приведён в таблице 1.

Таблица 1

Перечень маркеров, использованных в исследовании

№ п/п	Название маркера	Локус	Праймеры	Температура отжига	Источник
1	atpF-atpH	<i>atpF-atpH</i>	F: actgcacacactccctttcc R: gctttatggaagcttaacaat	51	Fazekas et al., 2008
2	psbK-psbI	<i>psbK-psbI</i>	F: ttagcctttgttggaag R: agagtttgagagtaagcat	51	Fazekas et al., 2008
3	rpl20-rps12	<i>rpl20-rps12</i>	F: tttgtctacgtcttcgagc R: gacgaggaacatgtactagg	55	Wang et al., 2016
4	trnL-trnF	<i>trnL-trnF</i>	F: agggttcaagtcctctatccc R: gatttgaactggtgacacgagg	50	Yang and Pak, 2006
5	RubPlast5	<i>trnK-rps16</i>	F: aatctgttgctcatacaaatg R: tgttcctgctattctagatttc	55	авторская разработка
6	RubPlast6	<i>rps16-trnQ</i>	F: gttttaccataacattccttcg R: tatatagacggggtatgatctg	55	авторская разработка

Продолжение табл. 1

№ п/п	Название маркера	Локус	Праймеры	Температура отжига	Источник
7	RubPlast7	<i>rpoB-trnC</i>	F: actatagaagtccagagaat R: atttacatctcaaatgctgtt	55	авторская разработка
8	RubPlast8	<i>trnC-petN</i>	F: aatcacaaaagaatcgacata R: gagtgaagggaatgtaaag	55	авторская разработка
9	RubPlast9	<i>petN-psbM</i>	F: ctttacatttcccttctc R: gccaaagtgattaattgaaatt	55	авторская разработка
10	RubPlast10	<i>rbcl-accD</i>	F: gcaattactactgttagttctc R: tagcctacacctgtattctaac	60	авторская разработка
11	RubPlast12	<i>trnS-trnG</i>	F: aaaaaggataatactatgttac R: cactttaccactaaactatac	55	авторская разработка
12	RubPlast15	<i>psbE-petL part 1</i>	F: gtaaagatgaatcagtaaatt R: ttggatctaatacaacaat	57	авторская разработка
13	XFA/AST_R	<i>matK</i>	F: taatttcagatcaattcattca R: caaataatatccaataccea	48	Dunning, Savolainen, 2010

ПЦР проводили в 20 мкл смеси, содержащей 40 нг ДНК-матрицы, 1× ПЦР-буфер, 2мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,4 мМ каждого из dNTPs, по 0,5 мкМ каждого из праймеров, 1 ед. полимеразы. Амплификацию проводили в приборах BIO-RAD C1000 и Eppendorf по следующей программе: 94 °С – 4 мин, затем 37 циклов, [94 °С – 45 с, температура отжига – 45 с, 72 °С – 90 с], и финальная элонгация при 72 °С в течение 10 мин.

Готовые ПЦР-продукты обрабатывали рестриктазами фирмы «СибЭнзим» ([www.sibenzyme.ru](http://www.sibenzyme.ru)) в течение 12 часов согласно инструкции производителя.

Получившиеся ДНК-фрагменты разделяли путём электрофореза в 2%-м агарозном геле при напряжении 5 В/см длины геля в течение 1,5 часов. Визуализацию результатов проводили в проходящем УФ-свете при помощи установки BIO-RAD Gel-Doc.

**Результаты.** Отбор наиболее полиморфных пластидных CAPS-маркеров проводили на небольшом блоке, состоящем из 8 образцов из *in vitro* коллекции ВИР. Для каждого локуса апробировали по 4 различные рестриктазы, в основном использовали мелкощепящие ферменты. Всего из 13 изученных локусов 9 оказались полиморфны, для них удалось разработать 13 CAPS-маркеров (комбинация «праймер/рестриктаза»). Перечень отобранных комбинаций дан в таблице 2. Примеры результатов электрофореза некоторых полиморфных комбинаций приведены на рисунке 1.

Чаще всего различия в рестрикционных профилях давали сорта 'Бабые Лето 2' (межвидовой ремонтантный гибрид) и 'Bristol' (принадлежащий к черноплодному виду *R. occidentalis* L.), несколько реже отличались сорта 'Phoenix' (имеет в родословной вид *R. strigosus* Michx.) и 'Малая Устюжная' (старый сорт народной селекции).

Таблица 2

Перечень наиболее полиморфных комбинаций пластидных маркеров и рестриктаз

№ п/п	Пластидный маркер	Рестриктазы
1	atpF-atpH	Alu I
2	psbK-psbI	Hpa II
3	rpl20-rps12	Alu I, Taq I
4	trnL-trnF	Alu I
5	RubPlast5	Alu I, Taq I
6	RubPlast8	Taq I
7	RubPlast10	Alu I, Hinf I
8	RubPlast12	Alu I
9	XFA/AST_R	Hinf I, Taq I

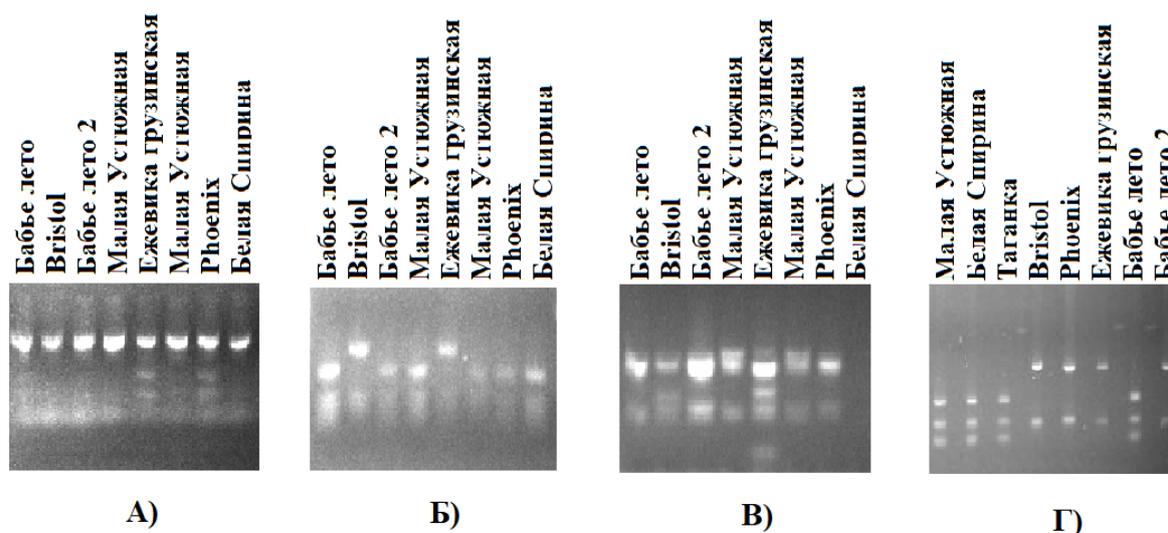


Рис. 1. Примеры электрофореза некоторых полиморфных комбинаций: А – rpl20-rps12+Alu I; Б – rpl20-rps12+Taq I; В – RubPlast5+Taq I; Г – RubPlast8+Taq I.

Разработанные CAPS-маркеры были апробированы на выборке из 28 образцов видов *R. idaeus* и *R. sachalinensis*, собранных на территории Алтая и хранящихся в Гербарии АЛТВ. Однако большинство комбинаций «праймер/рестриктаза» на этой выборке оказались, в отличие от селекционных сортов малин, мономорфны (рис. 2а). Исключение составили комбинации RubPlast8+TaqI и RubPlast10+AluI (рис. 2б, 2в).

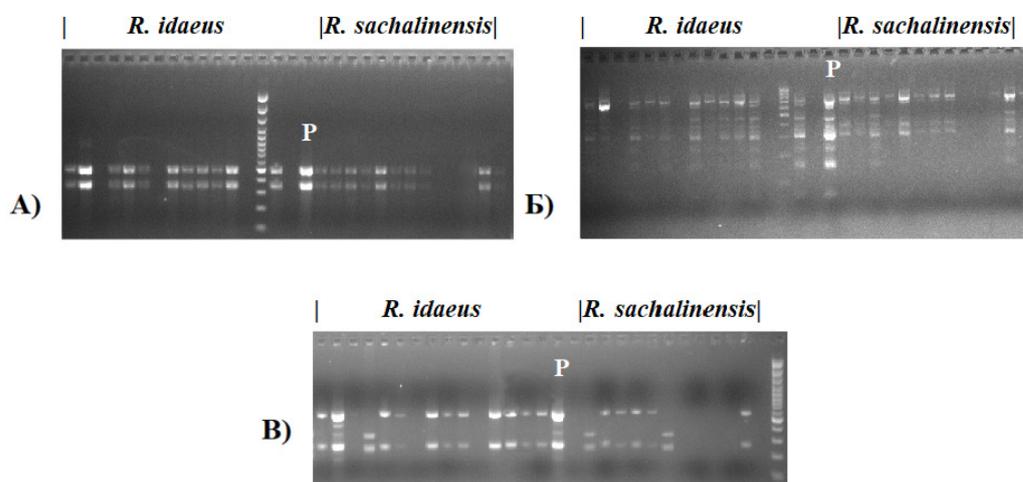


Рис. 2. Рестрикционные профили образцов *Rubus idaeus* и *R. sachalinensis* из гербария АЛТВ: А – rpl20-rps12+Alu I; Б – RubPlast10+Alu I; В – RubPlast8+Taq I. Латинской буквой Р обозначен сорт 'Phoenix', взятый в качестве реперного образца.

Необходимо отметить, что некоторые образцы не амплифицировались, что может быть связано с возможной деградацией гербарной ДНК или её недостаточной очисткой. Однако для праймеров RubPlast1 и RubPlast5 было отмечено, что ПЦР-продукты отсутствуют у всех образцов *R. sachalinensis*, в то время как ПЦР у *R. idaeus* в основном проходит нормально. Действительно, при анализе локусов *atpF-atpH* (маркер *atpF-atpH*) и *trnK-rps16* (маркер RubPlast5) у хлДНК данного вида последовательности использованных праймеров отсутствовали. Таким образом, маркеры *atpF-atpH* и RubPlast5 мы рассматриваем как потенциальные STS-маркеры, способные разграничивать виды *R. sachalinensis* и *R. idaeus*.

В комбинациях RubPlast8+Taq I и RubPlast10+Alu I на небольшой выборке образцов *R. sachalinensis* был выявлен внутривидовой полиморфизм. На рисунке 2 хорошо видно, что некоторые образцы *R. sachalinensis* имеют рестрикционные профили, отличные от профилей других образцов этого вида. В случае комбинации RubPlast10+Alu I, это образцы из Чарышского (ALTB1100017110) и Курьинского (ALTB1100017126) районов Алтайского края, расположенные в предгорной зоне. В случае комбинации RubPlast8+Taq I выделились образцы из Улаганского района Республики Алтай (ALTB1100030798) и Змеиногорского района (ALTB1100030855) Алтайского края. Образец из Солонешенского района Алтайского края (ALTB1100011615) по морфологическим признакам принадлежит к *R. sachalinensis*, что и подтвердил его профиль, но на гербарном листе изначально был идентифицирован как *R. idaeus*. Рестрикционные профили образцов *R. idaeus* были однородны.

**Заключение.** Нами было разработано 13 пластидных CAPS-маркёров, выявляющих полиморфизм у селекционных сортов малины. Однако большая часть из них на ограниченной выборке образцов алтайских популяций видов *R. idaeus* и *R. sachalinensis* оказалась мономорфной. Были отобраны две комбинации, детектирующие внутривидовой полиморфизм у малины сахалинской и два потенциальных STS-маркера для дифференциации *R. idaeus* и *R. sachalinensis*. В дальнейшем работа по созданию маркёров для изучения полиморфизма пластидных локусов у представителей подрода *Idaeobathus* будет продолжена.

**Благодарности.** Работа выполнена при поддержке Государственного задания FGEM-2022-0008 «Использование комплекса современных методов ДНК-генотипирования и молекулярного скрининга для изучения генетических ресурсов культурных растений и их диких родичей и форм собственной селекции».

#### ЛИТЕРАТУРА

- Антонова О. Ю., Клименко Н. С., Рыбаков Д. А., Фомина Н. А., Желтова В. В., Новикова Л. Ю., Гавриленко Т. А. SSR-анализ современных российских сортов картофеля с использованием ДНК номенклатурных стандартов // Биотехнология и селекция растений, 2020. – Т. 3, № 4. – С. 77–96. DOI: 10.30901/2658-6266-2020-4-02
- Камнев А. М., Антонова О. Ю., Дунаева С. Е., Гавриленко Т. А., Чухина И. Г. Молекулярные маркеры в исследованиях генетического разнообразия представителей рода *Rubus* L. и перспективы их применения в селекции // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2020. – Т. 24, № 1. – С. 20–30. DOI: 10.18699/VJ20.591
- Синькова Г. М. О сибирской малине – *Rubus sibiricus* (Ком.) Sinkova // Новости сист. высш. раст., 1973. – Т. 10. – С. 172–174.
- Фомина Н. А., Антонова О. Ю., Чухина И. Г., Гавриленко Т. А. Гербарные коллекции в молекулярно-генетических исследованиях // Turczaninowia, 2019. – Т. 22, № 4 – С. 104–118. DOI: 10.14258/turczaninowia.22.4.12
- Эбель А. А. Конспект флоры северо-западной части Алтае-Саянской провинции. – Кемерово: КРЭОО «Ирбис», 2012. – 568 с.
- Alice L. A., Campbell C. S. Phylogeny of *Rubus* (Rosaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences // American Journal of Botany, 1999. – Vol. 86. – P. 81–97.
- Dale A., Moore P. P., McNicol R. J., Sjulín T. M., Burmistrov L. A. Genetic diversity of red raspberry varieties throughout the-world // Journal of the American Society for Horticultural Science, 1993. – Vol. 118, iss. 1. – P. 119–129. DOI: 10.21273/JASHS.118.1.119
- Dunning L. T., Savolainen V. Broad-scale amplification of *matK* for DNA barcoding plants, a technical note // Botanical Journal of Linnaeus Society, 2010. – Vol. 164. – P. 1–9.
- Fazekas A. J., Burgess K. S., Kenasakurti P. R., Graham S. W., Newmaster S. G., Husband B. C., Percy D. M., Hajibabaei M., Barrett S. C. H. Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well // PLoS ONE, 2008. – Vol. 3, iss. 7. – P. 1–12. DOI: 10.1371/journal.pone.0002802
- Focke W. O. Species Ruborum. Monographiae Generis Rubi Prodromus part I. – New York, NY: Stuttgart, E. Schweizerbart, 1910. – P. 1–120.
- Focke W. O. Species Ruborum. Monographiae Generis Rubi Prodromus part II. – New York, NY: Stuttgart, E. Schweizerbart, 1911. – P. 121–223.
- Focke W. O. Species Ruborum. Monographiae Generis Rubi Prodromus part III. – New York, NY: Stuttgart, E. Schweizerbart, 1914. – P. 224–498.
- Hosaka K., Sanetomo R. Development of a rapid identification method for potato cytoplasm and its use for evaluating Japanese collections // Theoretical and Applied Genetics, 2012. – Vol. 125. – P. 1237–1251. DOI: 10.1007/s00122-012-1909-4
- Inglis P. W., Pappas M. C. R., Resende L. V., Grattapaglia D. Fast and inexpensive protocols for consistent extraction of high quality DNA and RNA from challenging plant and fungal samples for high throughput SNP genotyping and sequencing applications // PLoS ONE, 2018. – Vol. 13, iss. 10. – P. 1–14. DOI: 10.1371/journal.pone.0203333

**Pang X., Song J., Zhu Y., Xu H., Huang L., Chen S.** Applying plant DNA barcodes for Rosaceae species identification // *Cladistics*, 2011. – Vol. 27. – P. 165–170. DOI: 10.1111/j.1096-0031.2010.00328.x

**Thompson M. M.** Survey of chromosome numbers in *Rubus* (Rosaceae: *Rosoideae*) // *Annual of Missouri Botanical Garden*, 1997. – Vol. 84. – P. 128–164. DOI: 10.2307/2399958

**Wang Y., Chen Q., Chen T., Tang H., Liu L., Wang X.** Phylogenetic Insights into Chinese *Rubus* (Rosaceae) from Multiple Chloroplast and Nuclear DNAs // *Frontiers of Plant Science*, 2016. – Vol. 7, iss. 968. – P. 1–13. DOI: 10.3389/fpls.2016.00968

**Yang J. Y., Jang S. Y., Kim H.-K., Park S. J.** Development of a molecular marker to discriminate Korean *Rubus* species medicinal plants based on the nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer and chloroplast *trnL-F* intergenic region sequences // *Journal of Korean Society for Applied and Biological Chemistry*, 2012. – Vol. 55. – P. 281–289. DOI: 10.1007/s13765-012-1044-6

**Yang J. Y., Pak J. H.** Phylogeny of Korean *Rubus* (Rosaceae) based on ITS (nrDNA) and *trnL/F* intergenic region (cpDNA) // *Journal of Plant Biology*, 2006. – Vol. 49. – P. 44–54. DOI: 10.1007/BF.03030787.

**Zhao H. X., Li Z. J., Hu S. W., Sun G. L., Chang J. J., Zhang Z. H.** Identification of cytoplasm types in rapeseed (*Brassica napus* L.) accessions by multiplex PCR assay // *Theor. Appl. Genet.*, 2010. – Vol. 121. – P. 643–650. DOI: 10.1007/s00122-010-1336-3