



УДК 575.852'113:57.082.132:57.063.7

Перспективы использования внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS1 и ITS2) для идентификации редких видов растений на примере рода *Waldsteinia* (Rosaceae)

М. В. Протопопова¹, В. В. Павличенко¹, А. Д. Коновалов²,
Е. Д. Золотовская², Э. М. Байрамова², В. В. Чепинога^{2,3}

¹ Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск

² Иркутский государственный университет, Иркутск

³ Институт географии им. В. Б. Сочавы СО РАН, Иркутск

E-mail: marina.v.protopopova@gmail.com

Аннотация. Работа направлена на оценку возможности использования нуклеотидных последовательностей ITS регионов для идентификации представителей рода *Waldsteinia* (Rosaceae). Выявленная в работе степень внутри- и межвидовой варибельности ITS1 региона обеспечивает возможность его успешного применения для идентификации видов рода *Waldsteinia*. Выявляемые с помощью молекулярного клонирования низкокопийные варианты ITS1 региона могут быть использованы для идентификации отдельных популяций *W. ternata*. Для ITS2 региона была отмечена высокая внутривидовая и внутрипопуляционная варибельность одновременно с низким числом систематических замен, что не позволяет однозначно различать близкородственные виды. Таким образом, ITS2 регион не может быть в полной мере рекомендован для использования в качестве молекулярного маркера для установления видовой принадлежности представителей рода *Waldsteinia*.

Ключевые слова: ДНК-штрихкодирование, молекулярные маркеры, *Waldsteinia*, Байкальская Сибирь, неморальные реликты, редкие и исчезающие виды, ITS1, ITS2.

Введение

В настоящее время активное развитие получают методы молекулярной идентификации (DNA barcoding), которые позволяют по коротким нуклеотидным последовательностям в геноме (ДНК-маркеры или молекулярные маркеры) определять видовую принадлежность организма [7]. С помощью этих технологий стало возможным проводить быструю идентификацию видов, определение которых с помощью морфологических критериев затруднено. Данный принцип лёг в основу глобального проекта по созданию генетической базы данных (Barcode of Life Data System – BOLD) для возможности идентификации всех живых организмов – «Штрихкод жизни» (от англ. Barcode of Life). ДНК-штрихкодирование имеет огромные перспективы как экспресс-метод определения видов (в том числе и по биологическим остат-

кам), что может найти широкое применение в экспертизе ряда товаров, при проведении таможенного и карантинного контроля, в экологическом мониторинге редких и исчезающих видов. Следует, однако, отметить, что в отличие от методов молекулярной филогенетики, ДНК-штрихкодирование может рассматриваться лишь как подход для определения места данного организма в уже существующей классификации, а не для установления новых филогенетических связей.

В качестве универсального маркера для ДНК-штрихкодирования животных используется последовательность 5'-фрагмента гена первой субъединицы цитохром *c*-оксидазы (CO1 или *cox1*) [6; 7]. Попытки использовать универсальные маркеры для растений оказались менее успешными. На сегодняшний день наиболее перспективными маркерами считаются внутренние транскрибируемые спейсеры ядерных генов рРНК (ITS1 и ITS2), а также некоторые фрагменты пластидного генома (например, *rbcL*, *matK*, *trnH-psbA*, *atpF-atpH*, *rpoB*, *rpoC1*, *psbK-psbI* и др.) [8; 12; 13].

Настоящее исследование направлено на оценку возможности использования нуклеотидных последовательностей ITS1 и ITS2 для идентификации представителей рода *Waldsteinia* (Rosaceae).

Материалы и методы

В качестве основного объекта исследования была выбрана *Waldsteinia ternata* (Steph.) Fritsch. Вид является эндемиком Южной Сибири, относится к неморальным реликтам и включён в Красные книги Иркутской области и Республики Бурятия [2–4]. Сбор образцов проводили из нескольких популяций в предгорьях хр. Хамар-Дабан (поймы рек Безымянная, Дулиха, Выдриная и Снежная) и Восточного Саяна (пойма р. Белая Зима). В работе также использованы образцы из приморских популяций дальневосточного вида *W. maximowicziana* (Juz. ex Terpner) Probat. (Надеждинский район, окрестности посёлков Раздольное и Сиреневка) и европейского вида *W. geoides* Willd. (Ботанический сад ИГУ). Свежие неповреждённые листья растений фиксировали (высушивали) в силикагеле, затем образцы засыпали свежим дегидратированным силикагелем и хранили в темноте до момента проведения молекулярно-генетических анализов. В работе были также использованы несколько экземпляров *W. ternata* из гербариев СИФИБР СО РАН и ИГУ. Анализ проводили минимум для пяти особей из каждой популяции. ДНК выделяли из высушенных листьев СТАВ-методом [9] с авторскими модификациями [1]. Амплификацию ITS1-ITS2 региона проводили в конечном объёме реакционной смеси 20 мкл с использованием ДНК-полимеразы GoTaq Flexi (Promega, США), универсальных праймеров [11; 14] с финальной концентрацией каждого 250 нМ и отжиге при 52 °С в течение 20 с. Для выявления основных нуклеотидных вариантов ITS1-ITS2 региона полученные ампликоны электрофоретически отделяли от компонентов реакции в агарозном геле, очищали с помощью набора GenJet Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, США) и использовали в качестве ДНК-матрицы для реакции терминирования. Для выявления низкокопийных нуклеотидных

вариантов ITS1-ITS2 региона очищенные ампликоны лигировали в плазмидный вектор pTZ57R/T (Thermo Fisher Scientific, США) с последующей трансформацией *E. coli*. Плазмиды и исходные ампликоны секвенировали по методу Сэнгера с использованием набора реагентов для терминирования BigDye Terminator v. 3.1 (Applied Biosystems, США) на генетическом анализаторе ABI3500 (Applied Biosystems, США). Выравнивание и анализ нуклеотидных последовательностей, а также расчёт генетических дистанций осуществляли в программе MEGA 7 v. 7.0.16. Для выравнивания нуклеотидных последовательностей использовали алгоритм MUSCLE, расчёт генетических дистанций проводили исходя из оптимальной модели нуклеотидных замен (модель Кимуры).

Результаты и обсуждение

Анализ ITS1 региона у особей из всех исследованных популяций не выявил внутривидовой варибельности его основных нуклеотидных вариантов в пределах рода *Waldsteinia*. В то же время были выявлены существенные межвидовые различия. На рис. 1 представлены ДНК-штрихкоды ITS1 региона у трёх видов рода *Waldsteinia*. Так, было выявлено 7 нуклеотидных замен между *W. ternata* и *W. geoides*, 1 – между *W. ternata* и *W. maximowicziana*, 6 – между *W. geoides* и *W. maximowicziana*.

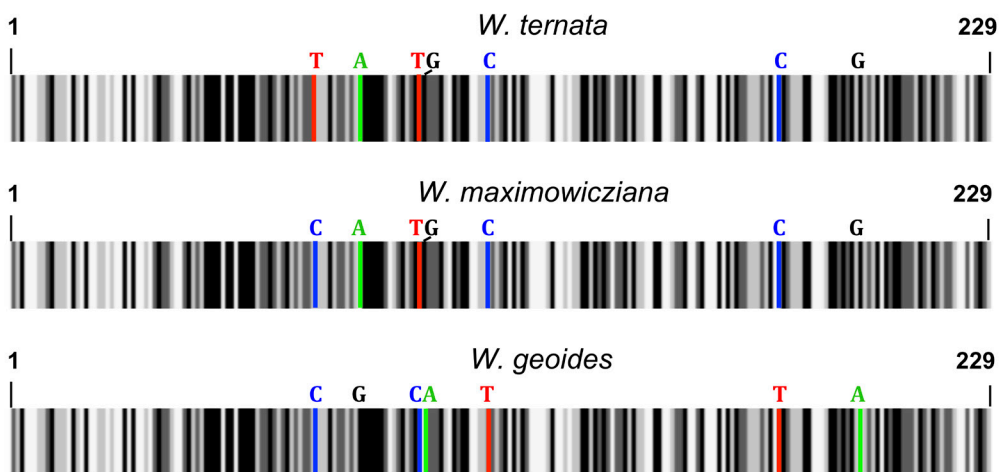


Рис. 1. ДНК-штрихкоды видов рода *Waldsteinia*, сгенерированные на основе нуклеотидных последовательностей ITS1 региона. Нуклеотиды представлены в виде полос, окрашенных в различные оттенки чёрно-белого спектра (А – белый; С – светло-серый; Т – тёмно-серый; G – чёрный). Цветная маркировка и буквенные обозначения указывают на сайты, для которых выявлены межвидовые различия. Цифрами обозначена длина фрагмента в парах оснований

Таким образом, межвидовые дистанции в пределах рода достигали 1–4 %, а различия с наиболее близкими последовательностями представителей других родов сем. Rosaceae – 2–5 % (рис. 2). Использование метода молекулярного клонирования в клетках *E. coli* позволило дополнительно выявить несколько низкокопийных вариантов ITS1, уникальных для отдельных популяций *W. ternata*. Эти уникальные варианты, по-видимому, являются производными от основного и имеют несколько дополнительных замен.

Таким образом, наличие в последовательности ITS1 сайтов с систематическими заменами позволяет идентифицировать виды рода *Waldsteinia* со 100%-ной достоверностью. Кроме того, поскольку в большинстве случаев межвидовая генетическая дистанция превышала 2 %, это дополнительно подтверждает возможность использования ITS1 региона для молекулярной идентификации [6; 7]. Только в паре *W. ternata* – *W. maximowicziana* обнаруженные различия составили около 1 %. Довольно низкий уровень различий в ITS1 регионе может объясняться тем, что на сегодняшний день видовая самостоятельность *W. maximowicziana* неоднозначна, поскольку он был выделен из *W. ternata* [5] главным образом на основании географической изолированности популяций. Тем не менее наличие даже единственной систематической замены в ITS1 регионе позволяет однозначно определять источник происхождения биологического образца.

Название вида		1	2	3	4	5
<i>W. ternata</i>	1	–				
<i>W. maximowicziana</i>	2	0,01 SE = 0,00	–			
<i>W. geoides</i>	3	0,04 SE = 0,01	0,03 SE = 0,01	–		
<i>Taihangia rupestris</i>	4	0,03 SE = 0,01	0,02 SE = 0,01	0,03 SE = 0,01	–	
<i>Geum vernum</i>	5	0,05 SE = 0,01	0,04 SE = 0,01	0,04 SE = 0,01	0,03 SE = 0,01	–

Рис. 2. Межвидовые генетические дистанции (K2P), рассчитанные исходя из количества нуклеотидных различий в ITS1 регионе. Показаны значения генетических дистанций и их стандартные ошибки (SE)

Для ITS2 региона нами была отмечена высокая внутривидовая и даже внутривидовая вариабельность (в отдельных случаях более 1 %) одновременно с низким числом систематических замен, что не позволяет однозначно различать близкородственные виды. Стоит отметить, что в настоящее время для молекулярной идентификации растений в системе BOLD рекомендован именно ITS2 регион, однако наши результаты показали, что его использование для видов рода *Waldsteinia* представляется затруднительным. Большая эффективность ITS1 по сравнению с рекомендованным ITS2 регионом показана также на примере ряда других видов [10]. В дальнейшем

нами планируется разработка подхода на основе одновременного использования нескольких молекулярных маркеров, включая *rbcL* и *matK*, использующихся в настоящее время в системе BOLD.

Заключение

Нуклеотидные последовательности ITS1 региона могут быть успешно использованы для идентификации видов рода *Waldsteinia*. Выявляемые с помощью молекулярного клонирования низкокопийные варианты ITS1 региона могут быть использованы при идентификации отдельных популяций *W. ternata*. Нуклеотидная последовательность ITS2 региона не может быть в полной мере рекомендована для установления видовой принадлежности представителей рода *Waldsteinia*.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 16-34-60135 мол_а_дк, 14-04-31350-мол_а и 16-05-00783). Авторы благодарят Байкальский аналитический центр (ЦКП) СО РАН при Президиуме ИНЦ СО РАН за предоставленный доступ к оборудованию, гербарные фонды СИФИБР СО РАН и ИГУ за предоставление образцов для анализа, Ботанический сад ИГУ за предоставленные образцы *W. geoides*, г.н.с. БПИ ДВО РАН Н. С. Пробатову и зам. директора БСИ ДВО РАН Е. А. Пименову за помощь в сборе образцов *W. taximowicziana*.*

Список литературы

1. Использование генетических маркеров для оценки состояния реликтовых видов растений Байкальской Сибири / М. В. Протопопова [и др.] // Вестн. РУДН. Сер. Экология и безопасность жизнедеятельности. – 2015. – Т. 4. – С. 28–36.
2. Красная книга Иркутской области. – Иркутск : Время странствий, 2010. – 480 с.
3. Красная книга Республики Бурятия: редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды животных, растений и грибов. – Улан-Удэ : Изд-во БНЦ СО РАН, 2013. – 688 с.
4. Положий А. В. Реликты третичных широколиственных лесов во флоре Сибири / А. В. Положий, Э. Д. Крапивкина. – Томск : Изд-во Том. гос. ун-та, 1985. – 158 с.
5. Пробатова Н. С. Семейство Розовые – *Rosaceae* / Н. С. Пробатова, В. Ю. Баркалов // Флора российского Дальнего Востока. – Владивосток : Дальнаука, 2006. – С. 160–168.
6. Шнеер В. С. ДНК-штрихкодирование видов животных и растений – способ их молекулярной идентификации и изучения биоразнообразия / В. С. Шнеер // Журн. общ. биологии. – 2009. – Т. 70, № 4. – С. 296–315.
7. Biological identifications through DNA barcodes / P. D. N. Hebert [et al.] // Proc. Biol. Sci. – 2003. – Vol. 270. – P. 313–321.
8. CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants / CBOL Plant Working Group // PNAS. – 2009. – Vol. 106, N 31. – P. 12794–12797.
9. Doyle J. J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue / J. J. Doyle, J. L. Doyle // Phytochem. Bull. – 1987. – Vol. 19. – P. 11–15.
10. ITS1: a DNA barcode better than ITS2 in eukaryotes? / X-C. Wang [et al.] // Mol. Ecol. Resour. – 2015. – Vol. 15. – P. 573–586.

11. History and evolution of alpine plants endemic to the Qinghai-Tibetan Plateau: *Aconitum gymnandrum* (Ranunculaceae) / L. Wang [et al.] // Mol. Ecol. – 2009. – Vol. 9, N 4. – P. 709–721.
12. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals / M. W. Chase [et al.] // Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci. – 2005. – Vol. 360. – P. 1889–1895.
13. Universal Plant DNA Barcode Loci May Not Work in Complex Groups: A Case Study with Indian *Berberis* Species / S. Roy [et al.] // PLoS ONE. – 2010. – Vol. 5, N 10. – e13674.
14. Utelli A. Molecular and morphological analyses of European *Aconitum* species (Ranunculaceae) / A. Utelli, B. Roy, M. Baltisberger // Plant Systematics and Evolution. – 2000. – Vol. 224. – P. 195–212.

The Perspectives for the Internal Transcribed Spacer (ITS1 and ITS2) Application for the Endangered Plant Species Identification with *Waldsteinia* (Rosaceae) as an Example

M. V. Protopopova¹, V. V. Pavlichenko¹, A. D. Konovalov²,
E. D. Zolotovskaya², E. M. Bairamova², V. V. Chepinoga^{2,3}

¹ Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk

² Irkutsk State University, Irkutsk

³ V. B. Sochava Institute of Geography SB RAS, Irkutsk

Abstract. The study was aimed to estimate the possibility to use the ITS nucleotide sequences for molecular identification of species from *Waldsteinia* genus (Rosaceae). The detected levels of intra- and interspecific ITS1 variability allow using this molecular marker for identification of *Waldsteinia* species. The low copy number variants of ITS1, revealed by molecular cloning approach, can be used for identification of distinct populations of *W. ternata*. A high intraspecific and intrapopulation variation of ITS2 region, together with a low number of systematic substitutions do not allow to distinguish these closely related species. Thus, using of ITS2 region as a molecular marker for *Waldsteinia* genus is very ambiguous.

Keywords: DNA barcoding, molecular markers, *Waldsteinia*, Baikal Siberia, nemoral relict species, endangered species, ITS1, ITS2.

Протопопова Марина Владимировна
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132
тел.: (3952) 42–46–59
факс: (3952) 51–07–54
e-mail: marina.v.protopopova@gmail.com

Protopopova Marina Vladimirovna
Candidate of Science (Biology),
Senior Research Scientist
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033
tel.: (3952) 42–46–59
fax: (3952) 51–07–54
e-mail: marina.v.protopopova@gmail.com

Павличенко Василий Валерьевич
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник

Pavlichenko Vasily Valeryevich
Candidate of Science (Biology),
Senior Research Scientist

*Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132
тел.: (3952) 42-46-59
факс: (3952) 51-07-54
e-mail: vpavlichenko@gmail.com*

*Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033
tel.: (3952) 42-46-59
fax: (3952) 51-07-54
e-mail: vpavlichenko@gmail.com*

*Коновалов Алексей Дмитриевич
студент
Иркутский государственный университет
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1
тел.: (3952) 24-18-70
e-mail: konovalov.alexey.d@gmail.com*

*Konovarov Aleksey Dmitryevich
Student
Irkutsk State University
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003
tel.: (3952) 24-18-70
e-mail: konovalov.alexey.d@gmail.com*

*Золотовская Елена Дмитриевна
студент
Иркутский государственный университет
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1
тел.: (3952) 24-18-70
e-mail: zolotovskayaelenad@gmail.com*

*Zolotovskaya Elena Dmitryevna
Student
Irkutsk State University
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003
tel.: (3952) 24-18-70
e-mail: zolotovskayaelenad@gmail.com*

*Байрамова Эльвира Махаловна
студент
Иркутский государственный университет
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1
тел.: (3952) 24-18-70
e-mail: bairamovaelvira@gmail.com*

*Bayramova Elvira Makhhalovna
Student
Irkutsk State University
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003
tel.: (3952) 24-18-70
e-mail: bairamovaelvira@gmail.com*

*Чепинога Виктор Владимирович
доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник
Институт географии им В. Б. Сочавы
СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 1
тел.: (3952) 42-70-95
профессор
Иркутский государственный университет
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1
тел.: (3952) 24-18-55
e-mail: victor.chepinoga@gmail.com*

*Chepinoga Victor Vladimirovich
Doctor of Sciences (Biology),
Leading Research Scientist
V. B. Sochava Institute of Geography
SB RAS
1, Ulan-Batorskaya st., Irkutsk, 664033
tel.: (3952) 42-70-95
Professor
Irkutsk State University
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003
tel.: (3952) 24-18-55
e-mail: victor.chepinoga@gmail.com*