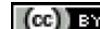


Научная статья

УДК 634.22:575.133:575.174

DOI: 10.30901/2658-6266-2025-3-03



## CAPS-маркеры для анализа полиморфизма пластидной ДНК у представителей подрода *Prunophora* (Neck. ex Spach) Focke рода *Prunus* L.

А.К. Макаов, О.Е. Радченко, К.Р. Криворучко, О.Ю. Антонова

Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

**Автор, ответственный за переписку:** Адам Капланович Макаов, a.makaov@vir.nw.ru

**Актуальность.** Слива домашняя *Prunus domestica* L., алыча *Prunus cerasifera* Ehrh. и терн *Prunus spinosa* L. относятся к секции *Prunus* подрода *Prunophora* (Neck. ex Spach) Focke рода *Prunus* L. Считается, что вид *P. domestica* произошел за счет гибридизации алычи и терна, однако из-за фенотипической разнородности сливы домашней, наличия широкого спектра вариаций и переходных форм, а также сложного гексаплоидного генома вопрос его происхождения до сих пор остается предметом споров. Для углубленного изучения филогенетических взаимоотношений в настоящее время широко применяют анализ полиморфизма пластидного генома с использованием технологий молекулярного маркирования и ДНК-штрихкодирования. В данном исследовании мы поставили себе цель разработать набор CAPS-маркёров для быстрого анализа полиморфизма последовательностей пластидной ДНК у представителей секции *Prunus*. **Материалы и методы:** На основе анализа последовательности хлДНК *Prunus cerasifera* var. *pissardii* (Cartière) L.H. Bailey была разработана 21 пара пластидоспецифичных праймеров. Также были задействованы праймеры, использовавшиеся ранее для анализа хлДНК у других видов семейства Розовые, а именно у представителей рода *Rubus* L. Для апробации праймеров и подбора рестриктаз использовали выборку, состоящую из семи образцов *P. cerasifera*, четырех сортов *P. domestica*, четырех образцов терна *P. spinosa* и одного сорта гибридного вида *Prunus × rossica* Eremin. **Результаты:** Нами разработано 10 потенциальных CAPS-маркеров (комбинаций праймер/рестриктаза), дающих наиболее наглядную картину полиморфизма сайтов пластидной ДНК у образцов сливы домашней, алычи и терна. Для подтверждения диагностической ценности отобранных CAPS-маркеров проведен анализ экспериментальной выборки образцов косточковых культур из коллекции ВИР, в которую входили 19 сортов *P. domestica*, 16 образцов *P. spinosa*, семь сортов *P. cerasifera* и один гибрид с участием сливы китайской *Prunus salicina* Lindl. У использованных в работе CAPS-маркеров выявлен разный уровень детектируемого полиморфизма, большая часть маркеров давала от трех до пяти вариантов рестрикционных профилей, наиболее полиморфным оказался район *petN/psbM* (маркер RubPlast9/TaqI) – девять спектров рестрикционных фрагментов. Сочетания различных рестрикционных профилей одного образца расценивали как гаплотип его хлДНК, всего в относительно небольшой выборке в 43 образца было выявлено 20 гаплотипов. **Заключение.** Таким образом, разработанные нами CAPS-маркёры позволяют эффективно анализировать полиморфизм пластомов косточковых культур. В дальнейшем эти маркёры будут использованы для изучения расширенных выборок образцов сливы домашней, алычи и терна и исследования взаимосвязей между данными видами.

**Ключевые слова:** *Prunus* sp., слива домашняя, терн, алыча, пластидная ДНК, CAPS-маркёры, гаплотипы

**Благодарности:** Работа выполнена в рамках Государственного задания согласно тематическому плану ВИР по теме № 1021032424343-9-4.4.4 FGEM-2022-0008

**Для цитирования:** Макаов А.К., Радченко О.Е., Криворучко К.Р., Антонова О.Ю. CAPS-маркёры для анализа полиморфизма пластидной ДНК у представителей подрода *Prunophora* (Neck. ex Spach) Focke рода *Prunus* L. *Биотехнология и селекция растений*. 2025;8(3):32-42. DOI: 10.30901/2658-6266-2025-3-03

**Прозрачность финансовой деятельности:** Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах. Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы. Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы.

© Макаов А.К., Радченко О.Е., Криворучко К.Р., Антонова О.Ю., 2025

Original article

DOI: 10.30901/2658-6266-2025-3-03

## CAPS markers for the analysis of plastid DNA polymorphism in representatives of the subgenus *Prunophora* (Neck. ex Spach) Focke of the genus *Prunus* L.

Adam K. Makaov, Olga E. Radchenko, Ksenija R. Krivoruchko, Olga Yu. Antonova

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

**Corresponding author:** Adam K. Makaov, a.makaov@vir.nw.ru

**Relevance.** Common plum *Prunus domestica* L., cherry plum *Prunus cerasifera* Ehrh. and blackthorn *Prunus spinosa* L. belong to the section *Prunus* of the subgenus *Prunophora* (Neck. ex Spach) Focke of the genus *Prunus* L. It is believed that the species *P. domestica* originated from hybridization of cherry plum and blackthorn, however, due to the phenotypic heterogeneity of the European plum, the presence of a wide range of variations and transitional forms, as well as a complex hexaploid genome, the question of its origin is still a matter of debate. For in-depth study of phylogenetic relationships, the analysis of polymorphism of plastid genome sites using molecular marking and DNA barcoding technologies is currently widely used. In this study, we aimed to develop a set of CAPS markers for rapid analysis of plastid DNA polymorphism in representatives of the *Prunus* section. **Materials and methods.** Based on the analysis of the cpDNA sequence of *Prunus cerasifera* var. *pissardii* (Carrière) L.H. Bailey, 21 pairs of plastid-specific primers have been developed. The primers previously applied to cpDNA analysis in other species of the Rosaceae family, namely in representatives of the genus *Rubus* L., were also used. To test the primers and select restriction enzymes, a subset consisting of seven accessions of *P. cerasifera*, four cultivars of *P. domestica*, four accessions of blackthorn *P. spinosa* and one cultivar of the hybrid species *Prunus* × *rossica* Eremin was used. **Results.** We have developed 10 potential CAPS markers (primer/restriction enzyme combinations) that provide the most visual picture of plastid DNA polymorphism in accessions of European plum, cherry plum and blackthorn. To confirm the diagnostic value of the selected CAPS markers, an analysis was performed on an experimental subset of stone fruit crops from the VIR collection, which included 19 cultivars of *P. domestica*, 16 accessions of *P. spinosa*, seven cultivars of *P. cerasifera* and one hybrid involving Chinese plum *Prunus salicina* Lindl. The CAPS markers used in the work showed different levels of detectable polymorphism, most of the markers identified from three to five variants of restriction profiles, the most polymorphic was the *petN/psbM* region (RubPlast9/TaqI marker) with nine different spectra of restriction fragments. Combinations of different restriction profiles for each accession were assessed as a haplotype of cpDNA; in total, 20 haplotypes were identified in a relatively small subset of 43 accessions. **Conclusion.** The developed CAPS markers allow us to effectively analyze the polymorphism of stone fruit plastomes in the future. They will be used to study broader experimental sets of accessions of European plum, cherry plum, and blackthorn and to investigate the relationships between these species.

**Keywords:** *Prunus* sp., common plum, blackthorn, cherry plum, plastid DNA, CAPS markers, haplotypes

**Acknowledgements:** The research was carried out according to the State Assignment to VIR, Topic No. 1021032424343-9-4.4.4 FGEM-2022-0008

**For citation:** Makaov A.K., Radchenko O.E., Krivoruchko K.R., Antonova O.Yu. CAPS markers for the analysis of plastid DNA polymorphism in representatives of the subgenus *Prunophora* (Neck. ex Spach) Focke of the genus *Prunus* L. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2025;8(3):32-42. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2025-3-03

**Financial transparency:** The authors have no financial interest in the presented materials or methods. The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work. The journal's opinion is neutral to the presented materials, the authors, and their employers.

© Makaov A.K., Radchenko O.E., Krivoruchko K.R., Antonova O.Yu., 2025

## Введение

Род *Prunus* L. относится к семейству Rosaceae Juss., подсемейству Amygdaloideae Arn. (= Prunoideae Focke) и трибе Amygdaleae Batsch (Potter et al., 2007; Eremin, 2008). Внутри рода по международной принятой систематике выделяют пять основных подродов: *Prunophora* (Neck. ex Spach) Focke (или *Prunus* s.s.), *Amygdalus* (L.) Focke, *Cerasus* (Mill.) A. Gray, *Padus* (Moench) Focke и *Laurocerasus* (Torrey) Schneid. (Rehder, 1940; Eremin, 2008); в традиционной для нашей страны систематике принято выделять отдельные роды (в том числе род *Prunus* Mill.) в составе подсемейства Prunoideae (Komarov, 1971; Vitkovskii, 2003; Eremin, 2008).

Слива домашняя (*Prunus domestica* L.) представляет собой гексаплоидный вид ( $2n=6x=48$ ), который, наряду с диплоидной алычой *Prunus cerasifera* Ehrh. ( $2n=2x=16$ ) и тетраплоидным терном *Prunus spinosa* L. ( $2n=4x=32$ ) относится, согласно современным представлениям, к секции *Prunus* подрода *Prunophora* рода *Prunus*. (Eremin, 2008). Слива играет важную роль в мировой плодово-овощной индустрии, среди плодовых косточковых культур по ежегодному объему производства она занимает второе место в мире, уступая только персику и нектарину (Vitkovskii, 2003; FAO, 2025). По данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации объединенных наций, валовый сбор слив в России за 2023 год составил 189,2 тысяч тонн (FAO, 2025).

Систематика вида *Prunus domestica* достаточно сложна, в нем выделяют несколько подвидов и ряд помологических групп (сортотипов). Так, П.М. Жуковский (Zhukovsky, 1971) и Г.В. Еремин (Eremin, 2008) называют четыре подвида: subsp. *domestica* Mausfeld (= слива европейская), subsp. *insititia* (Jusl.) Schneid (= тернослива), subsp. *italica* (Borkh.) Gams (= ренклод) и subsp. *syriaca* (Borkh.) Janchen (= мирабель). В составе этих подвидов выделяют ряд сортотипов, например ренклоды, венгерки, пердригоны, яичные желтые сливы, императорские сливы, сливы типа Ломбард (Vitkovskii, 2003). Однако провести четкие границы между группами сложно из-за присущей сливе большой фенотипической изменчивости и наличия переходных форм (Hedrick, 1911; Watkins, 1976).

Происхождение сливы домашней до сих пор является предметом споров. Целый ряд авторов поддерживает гипотезу происхождения сливы посредством гибридизации между тетраплоидным терном *P. spinosa* (геном SSSS) и диплоидной алычой *P. cerasifera* (геном CC) (Crane, Lawrence, 1952; Murawski, 1970; Mowrey, Werner, 1990; Bortiri et al., 2001). Эта гипотеза опирается на результаты экспериментов по прямой межвидовой гибридизации между *P. cerasifera* и *P. spinosa*, в которых было показано появление, наряду с бесплодными формами, небольшого количества фертильных гибридов, морфологически сходных с *P. domestica* (Rybin, 1936; Murawski, 1970). В соответствии с этой гипотезой геномный состав сливы обозначают как CCSSSS (Crane, Lawrence, 1934;

Murawski, 1970).

Другой распространенной гипотезой является предположение о наличии среди предков сливы домашней различных косточковых культур. По мнению Г.В. Еремина (Eryomine, 1990), формирование сливы домашней включает две стадии: на первой образовался сескви-пloid терн, а на второй происходило его скрещивание с алычой. При этом сам вид *P. spinosa*, вероятно, является межвидовым гибридом *P. cerasifera* с другим видом подрода *Prunophora*. Так, Reynders-Aloisi и Grellet (Reynders-Aloisi, Grellet, 1994) при RFLP-анализе рибосомной ДНК (рДНК) показали, что у терна существует три варианта рибосомных последовательностей, причем два из них аналогичны имеющимся у алычи, а третий оригинален и, по всей видимости, происходит от неизвестного вида. По мнению Г.В. Еремина (Eryomine, 1990), терн является результатом скрещивания алычи с вишней мелкоплодной *Prunus microcarpa* C.A. Mey., и, соответственно, геномная формула сливы домашней может быть представлена в виде CsCsCdCdMsMs, где Cs и Cd – геномы алычи, а Ms – геном вишни мелкоплодной. Существуют, однако, молекулярные данные, не согласующиеся с этой гипотезой: тот же самый RFLP-анализ рДНК у образца *P. microcarpa* P3187 показал отличие его ДНК от последовательностей терна (Reynders-Aloisi, Grellet, 1994), а при проведении SSR-анализа в работе M.N. Nas с соавторами (Nas et al., 2011) было продемонстрировано, что образцы вишни мелкоплодной образовывали кластер отдельно от образцов сливы домашней. Терн авторы не изучали.

Кроме того, были выдвинуты еще две гипотезы: вид *P. domestica* представляет собой автополиплоидный вариант *P. cerasifera* (Zohary, Hopf, 2000), или же наоборот, *P. domestica* является гексаплоидом *P. spinosa*, причем переходной формой между ними служат терносливы (Hedrick, 1911). Однако обе эти гипотезы были опровергнуты результатами SNP-анализа большой выборки сортов сливы домашней методами GBS (genotyping-by-sequencing) (Zhebentyayeva et al., 2019).

Ранние работы по филогенетике *Prunus* основывались на морфологических данных (Hedrick, 1911; Rehder, 1940) и на результатах межвидовых скрещиваний (Rybin, 1936; Crane, Lawrence, 1952; Murawski, 1970; Eryomine, 1990). На более поздних этапах стали также использовать данные изоферментного анализа (Badenes, Parfitt, 1995). В настоящее время для установления филогенетических взаимоотношений видов рода *Prunus* преимущественно применяют ДНК-маркеры и, в частности, маркеры локусов пластидной ДНК (хлДНК). Подобные исследования связаны или с прямым секвенированием последовательностей пластидного генома для проведения ДНК-штрихкодирования (Matveeva et al., 2011), или с проведением рестрикционного анализа, то есть с использованием CAPS-маркеров (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences).

Разными авторами была изучена диагностическая ценность последовательностей хлДНК для прояснен-

ния филогенетических взаимоотношений сливы домашней и ее предполагаемых предков путем секвенирования. Были апробированы последовательности спайсеров *trnL-trnF*, *trnS-trnG*, *trnH-psbA*, *peL-psbE*, *atpI-atpH* и другие (Bortiri et al., 2001; 2006; Shaw et al., 2007; Sayed et al., 2023; Halász et al., 2023), а также последовательности генов *ndhF*, *rbcL*, *matK* (CBOL, 2009). В исследованиях J. Shaw с соавторами (Shaw et al., 2007) выявлена наибольшая информативность последовательностей *trnH-psbA* и *trnS-trnG* для анализа видов рода *Prunus*. Гены *matK*, *rbcL* и спайсер *trnH-psbA* были рекомендованы консорциумом CBOL как стандартные для проведения штрихкодирования у растений (CBOL, 2009).

A. Reales с соавторами (Reales et al., 2010) на основе секвенирования последовательностей, фланкированных так называемыми универсальными праймерами (способными отжигаться на хлДНК различных видов и родов), показал монофилетичность секции *Prunus*, в которую входят слива домашняя и ее сородичи, при этом образцы *P. domestica* кластеризовались совместно с алычой, но отделялись от терна *P. spinosa*.

Углубить исследования межвидовых и внутривидовых связей внутри секции *Prunus* позволило использование высокопроизводительных методов секвенирования нового поколения (New Generation Sequencing, NGS). В частности, анализ обширной выборки из 405 образцов различных видов (*Prunus domestica*, *P. spinosa*, *P. cerasifera*, *P. brigantina* Vill., *P. simonii* Carriere) методом RAD-Seq (Restriction Site Associated DNA Sequencing) дал возможность более детально изучить генетическую изменчивость и определить родственные связи между европейскими и восточноазиатскими представителями секции *Prunus* (Zhebentyayeva et al., 2019). Анализ хлДНК в работе этих авторов показал, что *P. cerasifera* является наиболее вероятным предком сливы домашней с материнской стороны. При этом, однако, был выявлен особый тип пластидного генома ‘T’, который отсутствовал у образцов терна и алычи и оказался специфичен для слив группы д’Ажен (d’Agen prune plums). Это позволило авторам сделать предположение о возможном участии в формировании генома *P. domestica* третьего вида (Zhebentyayeva et al., 2019).

Рестрикционный анализ ПЦР-продуктов, то есть использование CAPS-маркеров, является гораздо более бюджетным вариантом использования молекулярных методов, поэтому его также часто применяют в филогенетических исследованиях (Mohanty et al., 2000; 2002; 2003; Horvath et al., 2011; Ternjak et al., 2023). При этом авторы используют так называемые универсальные праймеры, которые разработаны на основе консенсусных последовательностей локусов хлДНК и способны давать ПЦР-продукты по матрице ДНК растений разных родов, семейств и даже типов: мхов, папоротников, голосемен-

ных, покрытосеменных (Taberlet et al., 1991; Demesure et al., 1995; Dumolin-Lapegue et al., 1997). Соответственно, изучаемые с помощью этих праймеров локусы хлДНК являются умеренно полиморфными. Невысокий уровень детектируемого полиморфизма снижает точность реконструкции филогенетических связей, особенно среди недавно дивергировавших таксонов (Wolfe, Randle, 2004).

Целью нашей работы была разработка праймеров, специфичных для пластидного генома видов секции *Prunus*, и создание на их основе CAPS-маркеров, пригодных для филогенетического анализа сливы домашней и ее сородичей, а также для генотипирования образцов коллекций.

## Материалы и методы

**Растительный материал.** Апробацию праймеров и подбор рестриктаз проводили на небольшой выборке из 16 образцов, включающей в себя семь образцов алычи *P. cerasifera* (‘Гейджа Султани’, к-30711; ‘Ласточка’, к-14772; ‘Никитская Желтая’, к-3784; ‘Превосходная Шунтукская’, к-4296; Саади Резайе, к-18419; Ткемали 35, к-12085; образец *var. pissardi* 22, к-9618), четыре сорта сливы домашней *P. domestica* (‘Венгерка Калифорнийская’, к-3589; ‘Мирабель Зеленая’, к-3741; ‘Ренклод Доре’, к-9650; ‘Drop More Blue’, к-28394), один сорт ‘Гек’ (к-43209) гибридного вида *Prunus × rossica* Erem., два межвидовых гибрида с тёрном – ‘Терн алычовый’, к-4346 (*P. spinosa* × *P. cerasifera*) и ‘Терн душистый’, к-43464 (‘Тока’ × *P. spinosa*), а также две местные формы тёрна – Волжский, к-15084; и Соляновский крупноплодный, к-43467).

Разработанные CAPS-маркеры были использованы для анализа экспериментальной выборки, насчитывающей 43 образца видов секции Eurprunus рода *Prunus*, а именно 19 сортов *P. domestica*, 16 образцов *P. spinosa*, семь сортов *P. cerasifera* и один гибрид с участием сливы китайской *P. salicina* (‘Black Star’). Полный список образцов экспериментальной выборки приведен в Приложении/ Supplement<sup>1</sup>.

**Выделение ДНК** из листьев и почек отобранных образцов проводили с использованием модифицированного метода СТАВ-экстракции, принятого в отделе биотехнологии ВИР (Antonova et al., 2020). При использовании листьев на поздних этапах вегетации растений растерптый материал предварительно обрабатывали буфером на основе сорбита (Inglis et al., 2018), что обеспечивало устранение окисленных полифенольных соединений. Контроль качества выделенной ДНК проводили при помощи нанофотометра Implen N60 (Implen, Германия).

**Проведение ПЦР.** Основная часть праймеров для работы (таблица) была разработана нами на основе анализа последовательности хлДНК *Prunus cerasifera*

<sup>1</sup> Приложение доступно в онлайн версии статьи/ The supplement is available in the online version of the paper: DOI: 10.30901/2658-6266-2025-3-03

Таблица. Использованные в работе праймеры, а также комбинации праймер-рестриктаз Table. Primers used in the work, as well as primer-restriction enzyme combinations

## Таблица. Продолжение

Праймеры, отобранные по опубликованным данным (Fazekas et al., 2008; Kamnev et al., 2023) Primers selected based on published data (Fazekas et al., 2008; Kamnev et al., 2023)

var. *pissardii* (Carrière) L.H. Bailey (No. #MN418903, GenBank, 2025). Локусы отбирали из числа межгенных спайсеров в уникальном участке LSC (large single copy – большой однокопийный район). Праймеры были созданы с использованием программного обеспечения Primer3Plus (Untergasser, 2025) и дополнительно проверены на отсутствие внутренних шпилек и самоотжига при помощи инструмента OligoAnalyzer™ Tool (IDT, 2025).

Также мы апробировали несколько праймеров, успешно применяемых для анализа полиморфизма сортов и образцов видов малины (Kamnev et al., 2023). Большое сходство геномов розоцветных, возможность перекрестного использования маркеров, разработанных для одного рода, применительно к другим родам семейства Rosaceae (Decroosq et al., 2003; Shaw et al., 2007; Illa et al., 2011) давало основание полагать, что маркеры для рода *Rubus* L. будут успешны и для представителей рода *Prunus*. Действительно, нам удалось амплифицировать последовательности трех межгенных спайсеров, а именно *atpF/atpH*, *petN/psbM* и *rbcL/accD*. Однако остальные праймеры не давали четких ампликонов. Окончательный список праймеров приведен в таблице.

ПЦР осуществляли в 20 мкл реакционной смеси следующего состава: 40 нг ДНК-матрицы, 1x реакционный буфер, 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,4 мМ каждого из dNTP's, по 0,1 мКМ прямого и обратного праймеров и 1 ед. Таq-полимеразы (Dialat, Россия).

Амплификацию проводили по следующей программе: 94°C – 4 мин, затем 37 циклов: [94°C – 45 с, температура отжига T m – 45 с, 72°C – 60 с], и финальная элонгация при 72°C в течение 10 мин.

**Рестрикция и электрофорез.** Готовые ПЦР-продукты обрабатывали рестриктазами (СибЭнзим, Россия) в течение 16 часов согласно инструкции производителя. Предварительно для каждого ампликона были определены перспективные рестриктазы, сайты которых присутствовали в его последовательности. Выявление сайтов проводили при помощи программного обеспечения Sequence Manipulation Suite. Version 2 (Stothard, 2000). Для каждой последовательности апробировали от четырех до восьми рестриктаз (см. таблица).

Рестрикционные фрагменты разделяли электрофорезом в горизонтальных 2%, 2,5% и 3% агарозных гелях в буфере TBE при напряжении 5 В/см длины геля в течение 1,5-4 часов. В качестве маркеров молекулярного веса использовали ДНК Step 100 (Biolabmix, Россия) и DNA Ladder 50+ bp (Евроген, Россия). Гели окрашивали бромистым этидием и визуализировали в проходящем УФ-свете на установке Gel Doc XR+ (BioRad, США).

## Результаты

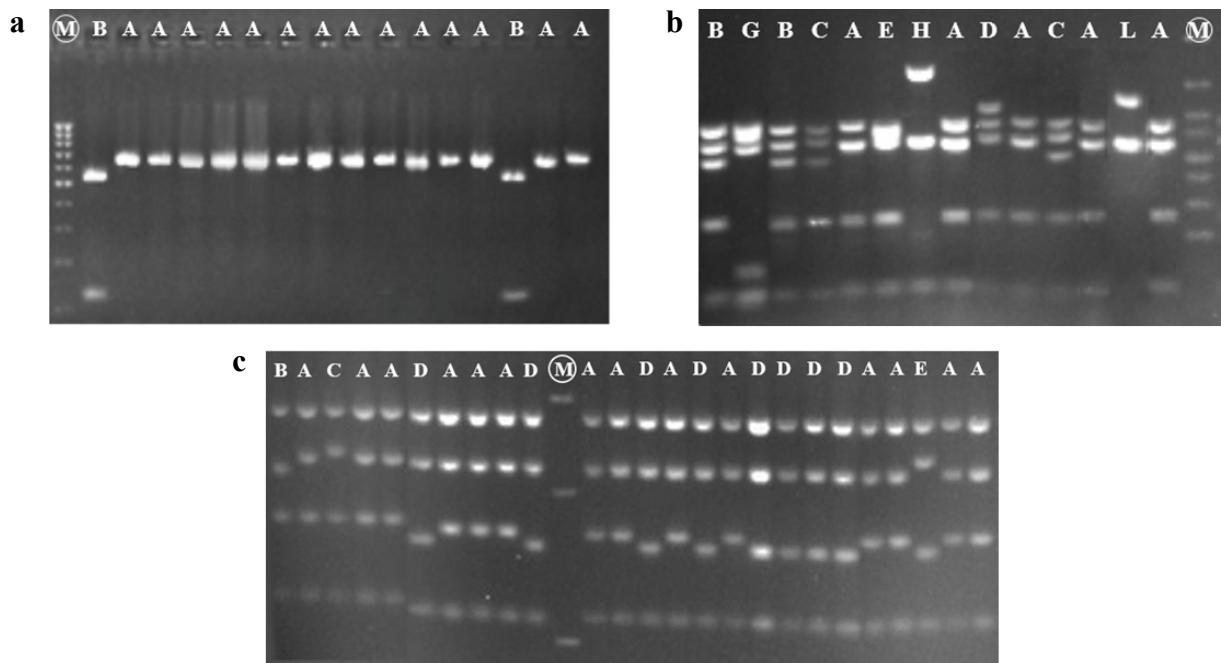
В процессе анализа полногеномной последовательности хлДНК алычи *Prunus cerasifera* var. *pissardii* (Carrière) L.H. Bailey (номер в Генбанке #MN418903) было выявлено 130 межгенных спайсеров, из которых 96 были рас-

положены в уникальных участках LSC и SSC. Из них мы отобрали для анализа 14 межгенных спайсеров и ген *matK*, который традиционно рекомендуется для проведения филогенетических исследований и ДНК-штрихкодирования (CBOL, 2009; Sayed et al., 2023). Для этих последовательностей были разработаны специфичные праймеры; в случае спайсеров большого размера было сконструировано по две пары праймеров, генерирующих частично перекрывающиеся ампликоны.

Апробацию праймеров и подбор рестриктаз проводили на небольшой выборке из 16 образцов сливы домашней, алычи и сливы русской из коллекции Майкопской ОС – филиала ВИР. Четыре из 21 пары праймеров оказались неспособны генерировать четкие ПЦР-продукты (см. таблица). ПЦР-продукты остальных 17 пар праймеров были обработаны различными рестриктазами, сайты которых присутствовали в соответствующих последовательностях. Дополнительно в этот анализ вовлекли ампликоны трех пар праймеров, подобранных по опубликованным источникам (см. таблица). В результате было отобрано 10 комбинаций праймер-рестриктаза, потенциально способных генерировать CAPS-маркеры, дающие возможность различать между собой образцы тестовой выборки, включающей в себя 16 генотипов.

Для подтверждения диагностической ценности отобранных маркеров мы провели анализ расширенной выборки образцов, состоящей из 43 генотипов (см. Приложение/ see the Supplement). При этом для разработанных CAPS-маркеров был выявлен разный уровень детектируемого полиморфизма. Большая часть маркеров давала от трех до пяти вариантов рестрикционных профилей. Наименьшим оказался полиморфизм последовательностей *atpF/atpH* (маркер FH/Taq I) и часть спайсера *groB/trnC*, прилегающая к гену *trnC* (маркер PlumCP14/Alu I) – в них было выявлено только по два варианта спектров рестрикционных фрагментов (рис. 1a). Интересно, что другая часть того же спайсера *groB/trnC* оказалась более полиморфной – маркер PlumCP13/Bst MBI генерировал пять вариантов спектров. Самый высокий уровень изменчивости обнаружен в локусе *petN/psbM* (маркер RubPlast 9/Taq I) – девять вариантов спектров рестрикционных фрагментов (см. таблица, рис. 1b).

Сочетание вариантов рестрикционных профилей всех маркеров у каждого образца мы определили как его гаплотип. Всего у 43 образцов выборки было выделено 20 гаплотипов (см. Приложение/ see the Supplement). Наибольшее число гаплотипов (восемь) было найдено у 16 образцов терна (0,5 гаплотипа на образец). У сливы домашней (изучено 19 образцов) и у алычи (семь образцов) было найдено семь и пять гаплотипов – соответственно 0,37 и 0,71 на образец (рис. 2). Таким образом, наибольшей вариабельностью пластидных локусов по предварительным данным обладала алыча *P. cerasifera*. Использованный в качестве представителя аутгруппы гибрид сливы китайской 'Black Star' обладал уникальным гаплотипом.

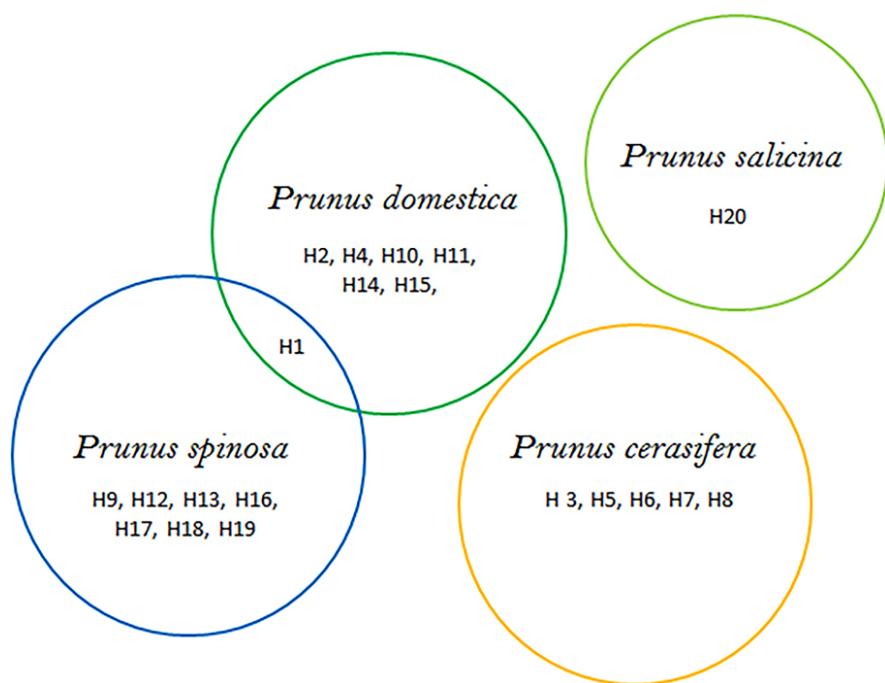


**Рис. 1 Примеры маркерных рестрикционных профилей пластидных локусов с различным уровнем полиморфизма**

а) – слабый уровень полиморфизма, маркер FH/Taq, спейсер *atpF/atpH*; б) – высокий уровень полиморфизма, маркер RubPlast9/Taq, спейсер *petN/psbM*; в) – средний уровень полиморфизма, маркер PlumCP13/BstMBI, спейсер *rpoB/trnC*. М – маркер молекулярного веса: а) и в) – ДНК Step100, б) – DNA Ladder 50+ bp

**Fig. 1. Examples of marker restriction profiles at plastid loci with different levels of polymorphism**

а) – low level of polymorphism, FH/Taq marker, *atpF/atpH* spacer; б) – high level of polymorphism, RubPlast9/Taq marker, *petN/psbM* spacer; в) – medium level of polymorphism, PlumCP13/BstMBI marker, *rpoB/trnC* spacer. М – DNA-Ladder: а) and в) – DNA Step 100, б) – DNA Ladder 50+ bp



**Рис. 2. Распределение гаплотипов между видами в изученной выборке**

**Fig. 2. Distribution of haplotypes between species in the studied subset**

При анализе распределения гаплотипов по видам было выявлено единственное пересечение – гаплотип H1 имели одновременно образцы сливы домашней и терна. Все остальные гаплотипы были ассоциированы с определенными видами (см. рис. 2). Очевидно, что при расширении состава выборки могут появиться как дополнительные гаплотипы, так и дополнительные их пересечения между видами, однако уже на этом этапе общность пластид терна и сливы домашней представляет интерес, поскольку изученные к настоящему времени сорта *P. domestica* имели цитоплазму от алыги (Reales et al., 2010; Horvath et al., 2011; Zhebentyayeva et al., 2019).

Необходимо отметить, что уровень полиморфизма, зарегистрированный при помощи разработанного нами набора праймеров, был ощущимо выше, чем при использовании маркеров на основе универсальных праймеров. Например, в работе Ternjak с соавторами (Ternjak et al., 2023) при сопоставимом количестве маркеров в существенно большей выборке, насчитывающей 124 образца, было выявлено только 10 гаплотипов, в то время как нами зарегистрировано 20 гаплотипов в выборке из 43 образцов.

## Заключение

Таким образом, на основе анализа хлДНК алычи *P. cerasifera* var. *pissardii* (GenBank No. #MN418903) и использования праймеров, разработанных для анализа представителей рода *Rubus* (Fazekas et al., 2008; Kamnev et al., 2023), нами были разработаны CAPS-маркеры пластидных локусов, успешно детектирующие полиморфизм у сливы домашней и у наиболее близких к ней видов. Маркеры будут использованы для скрининга коллекций косточковых культур, что позволит сделать выводы о филогенетических взаимоотношениях видов, относящихся к подроду *Prunophora*.

## References/Литература

- Antonova O.Yu., Klimenko N.S., Rybakov D.A., Fomina N.A., Zheltova V.V., Novikova L.Yu., Gavrilenco T.A. SSR analysis of modern Russian potato varieties using DNA samples of nomenclatural standards. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2020;3(4):77-96. [in Russian] (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;3(4):77-96). DOI: 10.30901/2658-6266-2020-4-02)
- Badenes M.L., Parfitt D.E. Phylogenetic relationships of cultivated *Prunus* species from an analysis of chloroplast DNA variation. *Theoretical and Applied Genetics*. 1995;90:1035-1041. DOI: 10.1007/BF00222918
- Bortiri E., Oh S.-H., Jiang J., Baggett S., Granger A., Weeks C., Buckingham M., Potter D., Parfitt D.E. Phylogeny and systematics of *Prunus* (Rosaceae) as determined by sequence analysis of ITS and the chloroplast *trnL-trnF* spacer DNA. *Systematic Botany*. 2001;26(4):797-807. DOI: 10.1043/0363-6445-26.4.797
- Bortiri E., Vanden Heuvel B., Potter D. Phylogenetic analysis of morphology in *Prunus* reveals extensive homoplasy. *Plant Systematics and Evolution*. 2006;259:53-71. DOI: 10.1007/s00606-006-0427-8
- CBOL – The Consortium for the Barcode of Life. Plant Working Group. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*. 2009;106(31):12794-12797. DOI: 10.1073/pnas.0905845106
- Crane M., Lawrence W. Genetics of Garden Plants. London, UK: MacMillan; 1934.
- Crane M., Lawrence W. The genetics of garden plants. 4<sup>th</sup> ed. London, UK: Macmillan; 1952.
- Decroocq V., Favé M.G., Hagen L., Bordenave L., Decroocq S. Development and transferability of apricot and grape EST microsatellite markers across taxa. *Theoretical and Applied Genetics*. 2003;106:912-922. DOI: 10.1007/s00122-002-1158-z
- Demasure B., Sodzi N., Petit R. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular ecology*. 1995;4:129-132. DOI: 10.1111/j.1365-294X.1995.tb00201.x
- Dumolin-Lapegue S., Pemonge M.H., Petit R.J. An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants. *Molecular ecology*. 1997;6:393-397. DOI: 10.1046/j.1365-294X.1997.00193.x
- Eryomine G.V. New data on origin of *Prunus domestica* L. *Acta Horticulturae*. 1990;283:2:27-30. DOI: 10.17660/ActaHortic.1990.283.2
- Eremin G.V. Systematics of stone fruit plants (Sistematiка kostochkovykh plodovykh rasteniy). In: Eremin G.V. (ed.) Pomology. Vol. 3. Stone fruit crops (Pomologiya. T. 3. Kostochkovye kultury). Orel: GNU VNIISPK; 2008. p.15-20. [in Russian] (Еремин Г.В. Систематика косточковых плодовых растений. В кн.: Еремин Г.В. (ред.), Помология. Т. 3. Косточковые культуры. Орел: ГНУ ВНИИСПК; 2008. С.15-20).
- FAO. The Food and Agriculture Organization of the United Nations. Available at: <https://www.fao.org/faostat/ru/#data/QCL> [accessed May 25, 2025]
- GenBank. National Institutes of Health (NIH, USA) genetic sequence database, an annotated collection of all publicly available DNA sequences. GenBank No. #MN418903. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>
- Halász J., Szendy G., Ivanovska B., Tóth E.G., Hegedűs A. The self-incompatibility locus and chloroplast DNA regions of *Prunus domestica* reflect the origin and genetic diversity of traditional cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 2023;148(5):230-239. DOI: 10.21273/JASHS05330-23
- Hedrick U.P. The Plums of New York. Albany: J.B. Lyon Co., State Printers; 1911.
- Horvath A., Balsemin E., Barbot J.C., Christmann H., Manzano G., Reynet P., Laigret F., Mariette S. Phenotypic variability and genetic structure in plum (*Prunus domestica* L.), cherry plum (*P. cerasifera* Ehrh.) and sloe (*P. spinosa* L.). *Scientia Horticulturae*. 2011;129:283-293.
- IDT. Integrated DNA Technologies. OligoAnalyzer™ Tool. Available at: <https://eu.idtdna.com/calc/oligoanalyzer> [accessed Jun. 12, 2025].
- Illa E., Sargent D.J., Girona E.L., Bushakra J., Cestaro A., Crowhurst R., Pindo M., Cabrera A., Van der Knapp E., Iezzoni A., Gardiner S., Velasco R., Arus P., Chagné D., Troggio M. Comparative analysis of rosaceous genomes and the reconstruction of a putative ancestral genome for the family. *BMC Evolutionary Biology*. 2011;11(9):1-13. DOI: 10.1186/1471-2148-11-9
- 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;13(10):1-14. DOI: 10.1371/journal.pone.0210504
- Kamnev A.M., Antonova O.Y., Chukhina I.G. Development of CAPS-markers for studying plastid loci polymorphism in *Rubus* L. subgenus *Idaeobathus* Focke. *Problems of botany of South Siberia and Mongolia*. 2023;22(2):116-121. [in Russian] (Камнев А.М., Антонова О.Ю., Чухина И.Г. Разработка CAPS-маркеров для изучения полиморфизма пластидных локусов представителей подрода *Idaeobathus* Focke рода *Rubus* L. *Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии*.

- 2023;22(2):116-121). DOI: 10.14258/pbssm.2023110
- Komarov V.L. Rosaceae: Rosoideae, Amygdaloideae. In: *Flora of the USSR*. Vol.10. Washington D.C., USA: Smithsonian Institution; 1971. p.1-512.
- Matveeva T.V., Pavlova O.A., Bogomaz D.I. Demkovich A.E., Lutova L.A. Molecular markers for plant species identification and phylogenetics. *Ecological Genetics*. 2011;9(1):32-43. [in Russian] (Матвеева Т.В., Павлова О.А., Богомаз Д.И., Демкович А.Е., Лутова Л.А. Молекулярные маркеры для видоидентификации и филогенетики растений. *Экологическая генетика*. 2011;9(1):32-43). DOI: 10.17816/ecogen9132-43
- Mohanty A., Martín J.P., Aguinagalde I. Chloroplast DNA diversity within and among populations of the allotetraploid *Prunus spinosa* L. *Theoretical and Applied Genetics*. 2000;100(8):1304-1310. DOI: 10.1007/s001220051439
- Mohanty A., Martín J.P., Aguinagalde I. Population genetic analysis of European *Prunus spinosa* (Rosaceae) using chloroplast DNA markers. *American journal of botany*. 2002;89(8):1223-1228. DOI: 10.3732/ajb.89.8.1223
- Mohanty A., Martín J.P., González L.M., Aguinagalde I. Association between chloroplast DNA and mitochondrial DNA haplotypes in *Prunus spinosa* L. (Rosaceae) populations across Europe. *Annals of Botany*. 2003;92(6):749-55. DOI: 10.1093/aob/mcg198
- Mowrey B.D., Werner D.J. Phylogenetic relationships among species of *Prunus* as inferred by isozymes markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 1990;80:129-133. DOI: 10.1007/BF00224026
- Murawski H.B. Die bedeutung der poliploidie für die evolution der pfirsiche. Berlin: Tagungen. Dtsch. Akad. Landwirtschafts Wiss; 1970. [in German]
- Nas M.N., Bolek Y., Bardak A. Genetic diversity and phylogenetic relationships of *Prunus microcarpa* C.A. Mey. subsp. *tortusa* analyzed by simple sequence repeats (SSRs). *Scientia Horticulturae*. 2011;127(3):220-227. DOI: 10.1016/j.scienta.2010.09.018
- Potter D., Eriksson T., Evans R.C., Oh S., Smedmark J.E.E., Morgan D.R., Kerr M., Robertson K. R., Arsenault M., Dickinson T.A., Campbell C.S. Phylogeny and classification of Rosaceae. *Plant Systematics and Evolution*. 2007;266:5-43. DOI: 10.1007/s00606-007-0539-9
- Rybin W.A. Spontane und experimentell erzeugte bastarde zwischen schwarzdorn und kirschpflaume und das abstammungsproblem der kulturfraume. *Planta*. 1936;25:22-58. [in German] DOI: 10.1007/BF01909303
- Reales A., Sargent D.J., Tobutt K.R., Rivera D. Phylogenetics of Eurasian plums, *Prunus* L. section *Prunus* (Rosaceae), according to coding and non-coding chloroplast DNA sequences. *Tree Genetics & Genomes*. 2010;6(1):37-45. DOI: 10.1007/s11295-009-0226-9
- Rehder A. A manual of cultivated trees and shrubs hardy in North America, 2<sup>nd</sup> edn. New York: Macmillan; 1940.
- Reynders-Aloisi S., Grellet E. Characterization of the ribosomal DNA units in two related *Prunus* species (*P. cerasifera* and *P. spinosa*). *Plant Cell Reports*. 1994;13:641-646. DOI: 10.1007/BF00232937
- Shaw J., Lickey E.B., Schilling E.E., Small R.L. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany*. 2007;94:275-288. DOI: 10.3732/ajb.94.3.275
- Sayed H.A., Mostafa S., Haggag I.M., Hassan N.A. DNA barcoding of *Prunus* species collection conserved in the National Gene Bank of Egypt. *Molecular Biotechnology*. 2023;65(3):410-418. DOI: 10.1007/s12033-022-00530-z
- Stothard P. The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formattting protein and DNA sequences. *Biotechniques*. 2000;28:1102-1104. Version 2. Available from: <https://www.bioinformatics.org/sms2/> [accessed Jun. 25, 2025].
- Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant molecular biology*. 1991;17(5):1105-9. DOI: 10.1007/BF00037152
- Ternjak T., Barreneche T., Šiško M., Ivančič A., Šušek A., Quero-García J. Genetic diversity and structure of Slovenian native germplasm of plum species (*P. domestica* L., *P. cerasifera* Ehrh. and *P. spinosa* L.). *Frontiers of plant science*. 2023;14:1150459. DOI: 10.3389/fpls.2023.1150459
- Untergasser A. Primer3-org/ primer3plus. GitHub, Inc. Supported by EMBL Heidelberg. Available at: <https://www.primer3plus.com> [accessed Jun. 15, 2025].
- Vitkovsky V.L. Fruit plants of the world (Plodoviye rasteniya mira). St. Petersburg; Moscow; Krasnodar: Lan; 2003. [in Russian] (Витковский В.Л. Плодовые растения мира. Санкт-Петербург; Москва; Краснодар: Лань; 2003).
- Watkins R. Cherry, plum, peach, apricot and almond. In: N.W. Simmonds (ed.), *Evolution of crop plants*. London, UK: Longman; 1976. p.242-247.
- Wolfe A.D., Randle C.P. Recombination, heteroplasmy, haplotype polymorphism, and paralogy in plastid genes: implications for plant molecular systematics. *Systematic Botany*. 2004;29(4):1011-1020. DOI: 10.1600/0363644042451008
- Zhebentyayeva T., Shankar V., Scorz R., Callahan A., Ravelonandro M., Castro S., DeJong T., Saski C.A., Dardick C. Genetic characterization of worldwide *Prunus domestica* (plum) germplasm using sequence-based genotyping. *Horticulture Research*. 2019;6:12. DOI: 10.1038/s41438-018-0090-6
- Zhukovsky P.M. Cultivated plants and their relatives: systematics, geography, cytogenetics, immunity, ecology, origin, and utilization (Kul'turnye rasteniya i ikh sorodichi). Leningrad: Kolos; 1971. [in Russian] (Жуковский П.М. Культурные растения и их сородичи: систематика, география, цитогенетика, иммунитет, экология, происхождение, использование. Ленинград: Колос; 1971).
- Zohary D., Hopf M. Domestication of plants in the old world. Oxford, UK: Oxford University Press; 2000.

## Информация об авторах

- Адам Капланович Макаов**, младший научный сотрудник, лаборатория молекулярной селекции и ДНК-паспортизации, отдел биотехнологии, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, a.makaov@vir.nw.ru <https://orcid.org/0009-0006-0142-9433>
- Ольга Емельяновна Радченко**, научный сотрудник, отдел генетических ресурсов плодовых культур, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, o.radchenko@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1712-2018>
- Ксения Романовна Криворучко**, магистрант, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, ksenia.criw@yandex.ru, <https://orcid.org/0009-0003-0221-4088>
- Ольга Юрьевна Антонова**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий, лаборатория молекулярной селекции и ДНК-паспортизации, отдел биотехнологии, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, olgaant326@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8334-8069>

---

### ***Information about the authors***

**Adam K. Makaov**, Junior Researcher, Department of Biotechnology, Laboratory of Molecular Breeding and DNA Passportization, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia, a.makaov@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0009-0006-0142-9433>

**Olga E. Radchenko**, Researcher, Department of Genetic Resources of Fruit Crops, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000 Russia, o.radchenko@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1712-2018>

**Ksenia R. Krivoruchko**, Master's Student, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia, ksenia.criw@yandex.ru, <https://orcid.org/0009-0003-0221-4088>

**Olga Yu. Antonova**, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher, Head, Laboratory of Molecular Breeding and DNA Passportization, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia, olgaant326@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8334-8069>

**Вклад авторов:** А.К.М. – отбор растительного материала, создание экспериментальной выборки, разработка праймеров, молекулярный скрининг, анализ результатов, подготовка рукописи; О.Е.Р. – отбор и передача растительного материала, заполнение базы данных об образцах терна с Павловской ОС; К.Р.К. – молекулярный скрининг, заполнение базы данных; О.Ю.А. – концептуализация, руководство исследованиями, разработка праймеров, анализ результатов, подготовка рукописи.

**Contribution of the authors:** A.K.M. – selection of plant material, creation of the experimental sample set, primer design, molecular screening, analysis of the results, manuscript preparation; K.R.K. – molecular screening, database filling; O.E.R. – selection and transfer of plant material, addition of blackthorn samples from Pavlovsk Experiment Station into the database; O.Yu.A. – conceptualization, research supervision, primer design, analysis of the results, manuscript preparation.

**Конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interests:** the authors declare no conflicts of interests.

Статья поступила в редакцию 17.06.2025; одобрена после рецензирования 18.07.2025; принятая к публикации 08.09.2025.  
The article was submitted on 17.06.2025; approved after reviewing on 18.07.2025; accepted for publication on 08.09.2025.