

Генетическая инвентаризация редких и эндемичных видов сосудистых растений Байкальского региона

Genetic inventory of rare and endemic plant species of the Baikal Region

Кулакова Н. В.¹, Верхозина А. В.¹, Кондратов И. Г.²

Kulakova N. V.¹, Verkhozina A. V.¹, Kondratov I. G.²

¹ Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск, Россия
E-mails: kulakova@sifibr.irk.ru; allaverh@list.ru

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

² ФГБНУ Научный Центр «Проблем здоровья семьи и репродукции человека», г. Иркутск, Россия
E-mail: kondratov@mail.ru

² Federal state public scientific institution "Scientific centre for family health and human reproduction problems", Irkutsk, Russia

Реферат. Пополнение баз данных генетической информацией о видах необходимо для решения актуальных вопросов их таксономии и систематики. Один из способов получения генетических данных для гербарных материалов – определение нуклеотидных последовательностей отдельных ядерных и хлоропластных регионов, широко используемых для молекулярной идентификации и филогении растений. Наименее представленными в генетических базах данных часто оказываются редкие и эндемичные виды растений. В работе нами исследованы эндемичные виды сосудистых растений: *Astragalus angarensis*, *Hedysarum turczaninovii*, *Hedysarum zundukii*, *Oxytropis popoviana*, *Papaver popovii*, *Gueldenstaedtia verna*, *Tulipa uniflora*, *Eutrema cordifolium*, *Megadenia pygmaea*, *Mannagettaea hummelii*, имеющие различный охранный статус в Иркутской области и в Республике Бурятия. Для *Papaver popovii* и *Astragalus angarensis* генетические данные получены нами впервые, для остальных видов дополнена информация об универсальных ДНК-штрихкодах. Кроме того, установлены генетические отличия *Mannagettaea* из Республики Бурятия от типового вида *Mannagettaea hummelii* Harry Sm. (Китай). Показана необходимость более детального исследования рода *Mannagettaea* для уточнения ее видового состава. Таким образом, полученные результаты дополнили генетическую информацию о видах, представленных в гербарии СИФИБР СО РАН, что расширяет возможности использования гербария в интегративных исследованиях с применением генетических данных и способствует дальнейшему изучению редких эндемичных видов Байкальского региона.

Ключевые слова. Гербарий, ДНК-штрихкодирование, ITS1-ITS2, *matK*, *rbcL*, *trnL-trnF*, *trnH-psbA*.

Summary. Replenishment of databases with genetic information of various species is necessary to solve topical issues of their taxonomy and systematics. One way to obtain genetic data from herbarium vouchers is to determine the nucleotide sequences of individual nuclear and chloroplast regions, which are widely used for molecular identification and plant phylogeny. Rare and endemic plant species are often the least represented in the genetic databases. In this work, we studied endemic plant species: *Astragalus angarensis*, *Hedysarum turczaninovii*, *Hedysarum zundukii*, *Oxytropis popoviana*, *Papaver popovii*, *Gueldenstaedtia verna*, *Tulipa uniflora*, *Eutrema cordifolium*, *Megadenia pygmaea*, *Mannagettaea hummelii* which have different conservation status in the Irkutsk Region and in the Republic of Buryatia. For *Papaver popovii* and *Astragalus angarensis*, genetic data have been obtained for the first time; for other species, information on universal DNA barcodes has been supplemented. In addition, genetic differences between *Mannagettaea* from the Republic of Buryatia and the type species *Mannagettaea hummelii* Harry Sm. (China) were shown. More detailed study on *Mannagettaea* is necessary to clarify its species diversity. Thus, results obtained supplemented the genetic information of the vouchers of the species presented in the herbarium of the Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (SIPPB SB RAS). This DNA-barcoding expands application of the herbarium in integrative studies using genetic data and contributes to the further study of rare endemic species of the Baikal Region.

Key words. DNA barcoding, herbarium, ITS1-ITS2, *matK*, *rbcL*, *trnL-trnF*, *trnH-psbA*.

Получение и интеграция генетической информации в базы данных является актуальной задачей для гербариев. Генетические данные все чаще становятся незаменимыми в случаях уточнения и пересмотра вопросов таксономии и систематики, а также подтверждения морфологической идентификации. Небольшое количество и относительная простота получения нуклеотидных последовательностей

универсальных ядерных и хлоропластных регионов (рекомендованных международной группой по ДНК-штрихкодированию, International Barcode of Life Consortium) (CBOL Plant Working Group, 2009), а также других молекулярных маркеров (*trnL-trnF* и др.), способствуют их применению для решения широкого спектра задач при изучении сосудистых растений. Наличие генетических данных является основой для сохранения, оценки, использования и охраны редких видов растений, исследования экологии и эволюции. Несмотря на все большую доступность новых методов полногеномного секвенирования и модификаций на основе частичного секвенирования (например, Nevill et al., 2020), применение ДНК-штрихкодирования является простым и удобным методом. Во многих случаях анализ «универсальных» регионов ДНК обладает рядом преимуществ, дополняет и улучшает идентификацию на основе морфологии, что особенно актуально для редких и эндемичных видов, для которых в генетических базах данных такой информации мало или нет совсем.

Цель данной работы – ДНК-штрихкодирование редких и эндемичных видов сосудистых растений из Иркутской области и Бурятии: *Astragalus angarensis* Turcz. ex Bunge, *Hedysarum turczaninovi* Peschkova, *Hedysarum zundukii* Peschkova, *Oxytropis popoviana* Peschkova, *Papaver popovii* Sipliv., *Gueldenstaedtia verna* (Georgi) Boriss., *Tulipa uniflora* (L.) Besser ex Baker, *Eutrema cordifolium* Turcz. ex Ledeb., *Megadenia pygmaea* Maxim., *Mannagettaea hummelii* Harry Sm.

Для молекулярного анализа использовали гербарный материал СИФИБР СО РАН и свежесобранные растения, листовые пластинки или части листьев (для *Mannagettaea* – надземная часть), которые отбирали в силикагель, параллельно те же особи были собраны в гербарий и идентифицированы на основе морфологических признаков. Экстракцию ДНК проводили с помощью лизирующего буфера СТАВ (Doyle J. J., Doyle J. L., 1990). Ядерный регион ITS1-ITS2, хлоропластные гены *rbcL*, *matK* и межгенные районы *trnH-psbA*, *trnL-trnF* анализировали с помощью ПЦР и секвенирования. ПЦР проводили на амплификаторе BIOER (Gene Explorer, China) в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 1x ПЦР буфер, по 10 пкмоль прямого и обратного праймеров (табл. 1), ДНК (10–80 нг), 2 ед. HS-Taq-полимеразы (Биолабмикс, Новосибирск, Россия).

Таблица 1

Праймеры, используемые в ПЦР

Ген, регион	Структура (5' -3' forward/reverse)	Ссылка
ITS1-ITS2	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG / TCCTCCGCTTATGTGATATGC	White et al., 1990
<i>rbcL</i>	ATGTCACCACAAACAGAAAC / TCAGGACTCCACTTYCTAGCTTCACG	Wattoo et al., 2016 Schuettpelz et al., 2007
<i>matK</i>	GAAATCTTRGTTCAAATYCTTC / CGTACAGTACTTTTTRTGTTTAC	Verkhovina et al., 2020
<i>trnL-trnF</i>	CATTACAAATGCGATGCTCT / ATTTGAACTGGTGACACGAG	Taberlet et al., 1999
<i>trnH-psbA</i>	GTTATGCATGAACGTAATGCTC / CGCGCATGGTGGATTCACAAATC	Newmaster, Ragupathy, 2009

Режим амплификации включал первичную денатурацию при 94 °С, 30 циклов ПЦР: 94 °С – 30 с, 50 °С – 30 с, 72 °С – 1 мин, и заключительную элонгацию при 72 °С – 5 мин. ПЦР продукты очищали из геля 1 % агарозы для последующего секвенирования («Синтол», Москва, Россия). Полученные последовательности анализировали и редактировали в программе BioEdit 7.0.5.3 (Hall, 1999), для поиска ближайших гомологов использовали сервис Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Аннотирование ITS2 и моделирование вторичной структуры проводили с помощью ITS2 Database (Wolf, 2005; Keller, 2009).

Полученные данные частично депонированы в базу данных GenBank, номера доступа последовательностей OQ877241–OQ877246.

Для всех образцов были получены ПЦР ампликоны маркеров ITS1-ITS2 и *matK*. Для 9 из 10 образцов амплифицирован регион *trnH-psbA*. Наименее эффективная ПЦР амплификация отмечена для *rbcL* (7 из 10 образцов) (табл. 2).

Таблица 2

Результаты ПЦР-амплификация молекулярных маркеров

	ITS1-ITS2	<i>rbcl</i>	<i>matK</i>	<i>trnL-trnF</i>	<i>trnH-psbA</i>
<i>Astragalus angarensis</i>	+	+	+	+	+
<i>Hedysarum turczaninovii</i>	+	+	+	–	+
<i>Hedysarum zundukii</i>	+	–	+	+	+
<i>Oxytropis popoviana</i>	+	+	–	+	+
<i>Gueldenstaedtia verna</i>	+	–	+	+	+
<i>Papaver popovii</i>	+	+	+	+	+
<i>Tulipa uniflora</i>	+	+	+	+	+
<i>Eutrema cordifolium</i>	+	+	+	+	+
<i>Megadenia pygmaea</i>	+	+	+	+	+
<i>Mannagettaea hummelii</i>	+	–	+	–	–

Примеч.: «+»/ «–» – получен/ не получен ПЦР-продукт.

Нуклеотидные последовательности исследованных молекулярных маркеров для *Astragalus angarensis* и *Papaver popovii* получены впервые. Генетические отличия от последовательностей близкородственных видов, доступных в базе данных GenBank, для обоих видов составили 0,3 % для ядерного ITS1-ITS2 и 0–1 % для пластидных маркеров, без учета вставок и делеций в некодирующих регионах хлоропласта. Первичный анализ данных показал, что для *Gueldenstaedtia verna*, *Eutrema cordifolium*, *Megadenia pygmaea* отличия ваучерных последовательностей видов, представленных в GenBank, от полученных нами, отсутствовали или были минимальными. Относительно высокая степень нуклеотидной гетерогенности (около 2 %) обнаружена при сравнении ITS1-ITS2 с ваучерной последовательностью *Tulipa uniflora* K:Chase 751, что требует дополнительного исследования для установления степени (внутри- или межвидовые различия) эволюционного сродства.

Результаты анализа последовательностей ядерного и хлоропластного регионов *Mannagettaea* из Тункинской долины (Республика Бурятия) были противоречивыми. Сравнение с последовательностями ваучерного образца GH 34020 *Mannagettaea hummelii* (номер доступа в GenBank KC480355) показало высокую степень нуклеотидного сродства, в частности по пластидному гену *matK* (99,4 %). В то же время ядерный регион ITS1-ITS2 исследованного нами образца существенно отличался. Ваучерная последовательность GH 34020 из GenBank была на 48 н.о. короче за счет 7 делеций, распределенных по ITS1 и ITS2 регионам. Кроме различий в длине, отмечены только две транзиции в ITS2, таким образом, нуклеотидное сродство без учета делеций было высоким и составило 99,6 %. Сравнение с ближайшими гомологами из базы данных GenBank показало, что длина ITS1-ITS2 исследуемой в данной работе *Mannagettaea* соответствует последовательностям из близкородственных родов *Epifagus* и *Boschniakia*. Кроме того, при моделировании вторичной структуры обнаружена низкая степень совпадения вторичных структур ITS2 исследуемого образца и ваучерной последовательности GH 34020, что указывает на необходимость дополнительного анализа других участков ядерной ДНК для установления их эволюционных взаимоотношений и видовой идентификации исследуемого образца *Mannagettaea*. Для остальных видов были дополнены данные о ДНК-штрихкодах и получены нуклеотидные последовательности ваучеров видов, представленных в гербарии СИФИБР СО РАН. Случаи расхождения «ядерной» и «пластидной» филогении и неоднозначные результаты анализа ITS1-ITS2 (для *T. uniflora*, *M. hummelii*) указывают на необходимость выбора и применения дополнительных ядерных маркеров

для филогенетического анализа. Результаты исследования ДНК-штрихкодов подтвердили видовую идентификацию *Hedysarum turczaninovii*, *Hedysarum zundukii*, *Oxytropis popoviana*, *Gueldenstaedtia verna*, *Eutrema cordifolium*, *Megadenia pygmaea*, выявили необходимость дополнительного анализа ваучерных образцов видов *Mannagettaea hummelii* и *Tulipa uniflora*, а также пополнили генетические базы данных нуклеотидными последовательностями, полученными для *Astragalus angarensis* и *Papaver popovii*.

Таким образом, в работе проанализированы ядерный и хлоропластные регионы, рекомендованные для ДНК-штрихкодирования, и дополнена информация о генетических маркерах ряда редких и эндемичных видов сосудистых растений Иркутской области и Республики Бурятия. Полученные в работе последовательности частично депонированы в базу данных GenBank. В большинстве случаев исследованные ДНК-штрихкоды подтвердили видовую идентификацию и дали дополнительные данные о генетическом разнообразии образцов видов, представленных в гербарии СИФИБР СО РАН.

Благодарности. Работа выполнена по теме гос. задания «Изучение динамики биологического разнообразия наземных экосистем Байкальской Сибири в оригинальной информационно-аналитической среде» (0277-2022-0001), номер гос. регистрации 122041100047-6.

ЛИТЕРАТУРА

- CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2009. – Vol. 106, No. 31. – P. 12794–12797. DOI: 10.1073/pnas.0905845106.
- Doyle J. J., Doyle J. L. Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue // Focus, 1990. – Vol. 12, № 1. – P. 13–15.
- Keller A., Schleicher T., Schultz J., Müller T., Dandekar T., Wolf M. 5.8S–28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation // Gene, 2009. – Vol. 430. – P. 50–57. DOI: 10.1016/j.gene.2008.10.012
- Nevill P.G., Zhong X., Tonti-Filippini J., Byrne M., Hislop M., Thiele K., van Leeuwen S., Boykin L. M. Large scale genome skimming from herbarium material for accurate plant identification and phylogenomics // Plant Methods, 2020. – 16, 1. DOI: 10.1186/s13007-019-0534-5
- Newmaster S. G., Ragupathy S. Testing plant barcoding in a sister species complex of pantropical *Acacia* (*Mimosoideae*, Fabaceae) // Mol. Ecol. Res., 2009. – Vol. 9. – P. 172–180. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2009.02642.x
- Schuettpelz E., Schneider H., Huiet L., Windham M. D., Pryer K. M. A molecular phylogeny of the fern family Pteridaceae: assessing overall relationships and the affinities of previously unsampled genera // Mol. Phylogenet. Evol., 2007. – Vol. 44, № 3. – P. 1172–1185. DOI: 10.1016/j.ympev.2007.04.011
- Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA // Plant Mol. Biol., 1991. – Vol. 17. – № 5. – P. 1105–1109.
- Verkhozina A. V., Kulakova N. V., Krivenko D. A., Murashko V. *Convallaria majalis* L. s. l. (Asparagaceae Juss.) in Baikal // Siberia BIO Web Conf., 2020. – Vol. 24. – 00092. DOI: 10.1051/bioconf/20202400092
- Wattoo J. I., Saleem M. Z., Shahzad M. S., Arif A., Hameed A., Saleem M. A. DNA Barcoding: Amplification and sequence analysis of *rbcL* and *matK* genome regions in three divergent plant species // Adv. Life Sci., 2016. – Vol. 4. – № 1. – P. 03–07.
- White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR Protocols: a guide to methods and amplifications. – New York: Academic, 1990. – P. 315–322.
- Wolf M., Achtziger M., Schultz J., Dandekar T., Müller T. Homology modeling revealed more than 20,000 rRNA internal transcribed spacer 2 (ITS2) secondary structures // RNA, 2005. – Vol. 11. – P. 1616–1623. DOI: 10.1261/rna.2144205