

Идентификация видов Lamiaceae флоры Узбекистана с использованием ДНК-маркеров

Identification of Lamiaceae species in the flora of Uzbekistan using DNA markers

Никитина Е. В.¹, Савина Н. В.², Кубрак С. В.²

Nikitina E. V.¹, Savina N. V.², Kubrak S. V.²

¹ Институт ботаники Академии наук Республики Узбекистан, г. Ташкент, Узбекистан
E-mail: elenanikita2013@rambler.ru

¹ Institute of Botany of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Tashkent, Uzbekistan

² Институт генетики и цитологии НАН Республики Беларусь, г. Минск, Беларусь. E-mail: n.savina@igc.by

² Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Реферат. Флора Узбекистана характеризуется высоким разнообразием яснотковых и насчитывает около 240 видов, принадлежащих 40 родам. 30 видов семейства Lamiaceae занесены в Красную книгу Узбекистана. Редкие виды требуют регулярного мониторинга и всестороннего изучения как классическими методами, так и методами молекулярно-генетического анализа. Данные исследования направлены на изучение видового разнообразия флоры Узбекистана с использованием ДНК-маркеров. Материалом для исследований служили виды семейства Lamiaceae, произрастающие на территории Узбекистана. Видовая идентификация выполнена по двух-четырёхлокусным комбинациям ДНК маркеров (ITS, *rbcL*, *trnL-trnF*, *matK*, *psbA-trnH*). Полученные 76 консенсусных нуклеотидных последовательностей ITS региона использовано для молекулярно-филогенетического анализа семейства. Представлены филогенетические взаимоотношения 26 родов, сгруппированных в четыре подсемейства: *Nepetoideae*, *Lamioideae*, *Scutellarioideae*, *Ajugoideae*, на основании нуклеотидной варибельности.

Ключевые слова. ДНК-штрихкодирование, Lamiaceae, ITS, *matK*, *psbA-trnH*, *rbcL*, *trnL-trnF*.

Summary. The flora of Uzbekistan is characterized by a high diversity of Lamiaceae and has about 240 species belonging to 40 genera. 30 species of the family Lamiaceae are listed in the Red Book. Rare species require regular monitoring and comprehensive study, both by classical methods and by methods of molecular genetic analysis. This study is aimed at assessment the species diversity of the flora of Uzbekistan using DNA markers. The material for the research was the species of the family Lamiaceae growing on the territory of Uzbekistan. Species identification was performed using two-four-locus combinations of DNA markers (ITS, *rbcL*, *trnL-trnF*, *matK*, *psbA-trnH*). 76 consensus nucleotide sequences of the ITS region are used for molecular phylogenetic analysis of the family. The phylogenetic relationships of 26 genera grouped into four subfamilies: *Nepetoideae*, *Lamioideae*, *Scutellarioideae*, *Ajugoideae* are presented based on nucleotide variability.

Key words. DNA-barcoding, ITS, Lamiaceae, *matK*, *psbA-trnH*, *rbcL*, *trnL-trnF*.

Введение. Своеобразные климатические условия, различная зональность, высотные пояса обусловили фенотипическое многообразие представителей растительного мира Узбекистана (Тожибаев и др., 2016). Среди растений местной флоры именно группы редких, эндемичных и реликтовых видов наиболее адекватно отражают направления миграционных потоков при формировании флор и процессы видообразования на ограниченных территориях (Тожибаев, 2010). Чрезвычайное разнообразие морфо-экологических характеристик в свою очередь усложняет систематику семейств. Идентификация таксонов, а также оценка филогенетических и эволюционных отношений между видами являются одними из важнейших задач биологии. Современная систематика дикорастущих растений в Узбекистане использует преимущественно классические методы ботаники; базируясь на сравнении морфо-анатомических признаках и кариологических данных, проводится естественная классификация таксонов, отражающая их филогенетическую историю (Sennikov et al., 2016). В настоящее время отечественные исследования с использованием генетических методов для идентификации видов, прояснения эволюционных взаимоотношений, а также оценка генетического разнообразия дикой флоры Узбекистана немногочисленны (Juramurodov et al., 2021; Shchegoleva et al., 2022). Семейство Lamiaceae

Martinov является космополитом, включая в себя более 7800 видов, образующих 245 родов (The Plant List URL: <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Lamiaceae/>). Важность инвентаризации дикорастущих видов Lamiaceae обусловлена необходимостью оценки видового разнообразия некоторых родов семейства на основе классических и молекулярных методов. На территории Узбекистана произрастают представители четырех подсемейств: *Nepetoideae* (Dumortier) Luerssen, *Lamioideae* Harley, *Scutellarioideae* (Dumortier) Caruel, *Ajugoidae* Kostel.

Цель нашего исследования – молекулярно-генетическая инвентаризация дикорастущих видов семейства Lamiaceae флоры Узбекистана с помощью комбинации ДНК-маркеров. В работе использованы хлоропластные маркеры *rbcL*, *matK*, *trnL-trnF*, *psbA-trnH* и один маркер ядерной последовательности ITS. С целью максимальной эффективности идентификации и высокой достоверности результатов, для всех видов выполнено 2–4-локусное генотипирование. Данное исследование является началом изучения флоры Узбекистана методом ДНК-штрихкодирования, включающим в себя секвенирование филогенетически значимых последовательностей.

Материалы и методы. Для анализа использовали свежий, высушенный в силикагеле листовой материал. А также материал гербарных образцов, хранящийся в коллекции Национального гербария Узбекистана (TASH). Суммарную ДНК выделяли в трех биологических повторностях коммерческим набором GeneJET Plant Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, США) в соответствии с протоколом производителя, с использованием поливинилпирролидона (PVPP) в качестве сорбента. Концентрацию и чистоту тотальных нуклеиновых кислот определяли спектрофотометрически в Thermo Scientific NanoDrop 8000 (США). Чистоту ДНК оценивали по коэффициенту поглощения растворов со значениями оптической плотности (ОП) в области длин волн 260/280 нм.

Согласно Kress (Kress et al., 2005), потенциальные маркеры ДНК-штрихкодирования должны удовлетворять критерию достаточно короткой длины последовательности (300–800 п. н.). Для приготовления реакционной смеси ПЦР использовали 2X PCR Taq Plus MasterMix с красителем (Applied Biological Materials Inc., Канада), вносили 1 мкл матрицы ДНК в концентрации 20 нг/мкл; реакцию проводили в финальном объеме 25 мкл. Амплификация проводилась в термоциклере Thermal Cycler 2720 (Applied biosystems). Результаты амплификации проверяли в 1,2%-м агарозном геле. Наиболее эффективны для амплификации внутренние транскрибируемые спейсерные области (ITS) ядерной рибосомной ДНК и комбинация штрихкодов областей хлоропластной ДНК – *rbcL*, *matK*, широко используемые в качестве основных ДНК-штрихкодов для наземных растений благодаря доступности и эффективности секвенирования и высокого уровня таксономического разрешения (Kress et al., 2005). Реакцию амплификации проводили на термоциклере C1000 Touch Thermal Cycler (BioRad, США). Условия ПЦР были оптимизированы.

Для успешной амплификации маркерных последовательностей в образцах ДНК изучаемых растений использовали универсальные праймеры: ITS1-18S (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'), ITS4-26S (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'); *matK*-390F (5'-CGATCTATTCATTC AATATTC-3'), *matK*-1326R (5'-TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT-3'); *trnL*-F_F (5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3'), *trnL*-F_R (5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3'); *rbcLa*F (5'-ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC-3'), *rbcLa*R (5'-GTAAAATCAAGTCCACCRCG-3'); *psbA*3_F (5'-GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3'), *trnH*f_05 (5'-CGCGCATGGTGGATTCSACAATCC-3').

За время работы определены 102 нуклеотидные последовательности для 36 видов семейства Lamiaceae. Некоторые депонированы впервые в международную базу данных GenBank (табл.).

Выравнивание пар последовательностей проведено в редакторе BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.01. Полученные консенсусные последовательности ДНК сохраняются в формате FASTA. Для филогенетического анализа выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили по алгоритму ClustalW в программе MegaX. Подбор модели проводили с помощью программы jModelTest2.1.10 (Darriba et al., 2012). По результатам анализа ITS последовательностей было реконструировано филогенетическое дерево в программе Mr. Bayes v3.1.2 методом Байеса (Huelsenbeck, Ronquist, 2001). Расчет апостериорной вероятности реализовался с использованием алгоритма Монте-Карло с марковской цепью (MCMC) при числе репликаций равном 1 000 000 до получения среднего стандартного отклонения (average standard deviation) в пределах 0.01. Визуализация результирующего графического изображения производилась в программе FigTree v1.4.0 (Rambaut, 2012).

Результаты и обсуждение. Результаты генотипирования по четырем консенсусным последовательностям демонстрируют высокий уровень воспроизводимости результатов амплификации по всем маркерам. Показаны результаты сравнения нуклеотидных последовательностей для *Dracocephalum adylovii* I. I. Malzev и *Salvia submutica* Botsch. et Vved., узких эндемиков Узбекистана (табл.). Было продемонстрировано сходство с аналогичными последовательностями в базе данных BLAST, с достоверностью 97–99 %. Полученные консенсусные последовательности по филогенетически значимым маркерам (ДНК-штрихкодам) депонированы в международную базу данных Генбанк (GenBank. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) с присвоением ID номеров.

Таблица

Результаты идентификации *Dracocephalum adylovii* и *Salvia submutica* с использованием 4-локусной панели

ДНК-штрих-код	Консенсусная нуклеотидная последовательность	ID номер в GenBank	Результат идентификации в BLAST
	(п. н.)		
ITS	1 caaggtttcc gtaggtgaac ctgagggaagg atcattgtcg aaacctgcaa agcagaccgc 61 gaaccctgctg ataacgaacc acgtgtggcg cggcgtgggg gcgaccccc gtcgagccac 121 cgtatccccg ccggcgtcgt cctccggggc gctgctgctg ggtaacgaa ccccgggcgg 181 gaatgcccga aggaaaaca aaacgaagcg tccgcccc gctccccgt cggcggagct 241 cggggggacc ggccgtctat caaaatgtca taacgactct cggcaacgga tatctcgct 301 ctgcgcatcga tgaagaactg agcgaatgc gatacttggg gtgaattgca gaatccccgtg 361 aaccatcgag tctttgaacg caagtggcgc ccgaagccat taggcccagg gcacgtctgc (693 bp)	GenBank Sequence ID: MW858379.1	AJ420999.1 <i>Dracocephalum grandiflorum</i> 5.8S rRNA gene, internal transcribed spacer 1 (ITS1) and internal transcribed spacer 2 (ITS2) Identities: 97.86 %
matK	1 attagatata ctaatacctc gctctgttca tgtggaatc ttgattcaaa ctattcgcgc 61 ttgggtaaaa gatgtttctt ttttacattt attacgagtc ttctcaacg aatacgaata 121 ttggaatagt ctcttactc caaagaaagt aagtctctct ttgtcaaaaa gaatacaaaa 181 gttgtttttt tcttatata attctcatg atgtgaatat gaactctatt tegtctttct 241 acgtaaccaa tctttcatt tacgatcaac atctctgga gttctcttg aaagaattta 301 ttctctata aaaatagaac gctctgtgaa cgtctttgtt aaagatttta gggagaacct 361 gtggttggtc gaggaacctt gcatgcatta tattaggtat caaagaaaaa cctattatggc (849 bp)	GenBank Sequence ID: MW924790.1	MG224977.1 <i>Dracocephalum parviflorum</i> maturase K (matK) gene Identities: 99 %
rbcL	1 agcaagtgtt ggattcaaa cgggtgttaa agagtacaaa ttgacttatt atactcctga 61 atatgaaacc aaagatactg atactctggc agcattccga gtaactctc aacctggagt 121 tccgcccgaag gaagcagggg ccgcccgtagc tgcgcaatc tctactgga catggacaac 181 tgtgtggacc gatggactta ccagccttga tctgtacaaa gggcgatgt accacattga 241 gcccgcttct ggagaaaaag atcaatata ctgttatgta gcttaccctt tagacctttt 301 tgaagaaggt tctgttacta acatgtttac ttccattgta ggaaatgat ttgattcaa 361 agccttactg gctctactgc tgaagatct gcgaattctc cctgcttaca taaaacttt (916 bp)	GenBank Sequence ID: MW924793.1	Z37390.1 <i>Dracocephalum ruyschiana</i> chloroplast rbcL gene Identities: 99.13 %
trnL-trnF	1 taattggatt gacccctggt atggaaactt actaagtgat aacttcaaa ttcagagaaa 61 ccccggaatt aataaaaatg ggcaatcctg agccaatcc tgtttctca aaacaagggt 121 tcaaaaaacg acaaaaaagg ataggtgcag agactcaatg gaagctgtc taacgaatgg 181 agttggctgc gccggtagag gaatcttcc atggaaatt tagaaggat gaagataaa 241 cgcactatt gaatactata tcaaatttt aatgttggcc cgaactgtt ttttaatat 301 ttaatatgaa aataaaaaaa aataagtgtg aattatttc acgttgaaga aaaaatagaa 361 tattcatcaa ctactcact ccatagtcg gtagacttt taaagaactt attaactgga (875 bp)	GenBank Sequence ID: MW924794.1	JQ669038.1 <i>Dracocephalum parviflorum</i> trnL-trnF intergenic spacer Identities: 98.27 %
ITS	1 tcgaacctgc aaagcagacc gcgaacactg ctcaacacc aaccgacggt gcatggcgtg 61 gggggcagcc ccgtctgtt cccgtcacc cggcccgtg gttccatcg ggtcacgtcg 121 tgtgggctaa cgaacccgg cgcggaatgc gcaaggaaa accaaacgaa gcatctccc 181 ccccgccccc cgttcgcca gtgcgcccgg gtgctggatg tctatcaat gtaaaacga 241 ctctcggcaa cggatctct ggctctcgca tcatgaaga acgtagcga atcgatact 301 tgggtggaat tgcagaatcc cgtgaacct cagatcttg aacgaagt gcgcccgaag 361 ccattaggcc gagggcactg ctgctgggc gtcacgcatc gctgcccc cccactcgt (676)	GenBank Sequence ID: MW588814.1	MK213202.1 <i>Salvia dracocephaloides</i> , internal transcribed spacer 1 (ITS1) and internal transcribed spacer 2 (ITS2) Identities: 99.52 %
matK	1 catttaaat ttgtattga tagctata cctcgtctg tccactgga aatctgatt 61 caaaccttgc gccattgat aaaagatgtt tctcttgc atttattac agtcttctc 121 aaccaatatt ggaattgcag tagtctctt actccaaga aagccagctt ctcttgtca 181 aaaagaatc aaaggtatt ttttctta tataattct atgtatgta atacgaatc 241 atttctgtc ttctacgaa ccaatcttt catttaccat caactctc tggagtctt 301 cttgaacgaa tctatttca taaaaata gaactctta tgaacacctt ttttaaggt 361 ttaaggcga acctagggtt ggtcaggaa cctccatcg attatattag gtatcaaga (845)	GenBank Sequence ID: MW633173.1	MK228117.1 <i>Salvia aegyptiaca</i> maturase K gene, Identities: 97.37 %

Продолжение табл.

ДНК-штрих-код	Консенсусная нуклеотидная последовательность	ID номер в GenBank	Результат идентификации в BLAST
	(п. н.)		
rbcl	1 aaattgactt attatactcc tgaatagca accaaagata cggatatctt ggcagcattc 61 cgagtaactc ctaacactgg agttccgctt gaagaagcag gggccgctt agctgccgaa 121 tcttctactg gtacatggac aactgtgtgg accgatggac ttaccagcct tgatcgttac 181 aaagggcgat gctaccacat tgagccggtt gctggagaaa aagatcaata tatctgttat 241 gttagctacc ctttagacct tttgaagaa ggttctgta ctaacatgtt tacttccatt 301 gttagaaatg tatttggatt caaagccta cgtgctctac gtctggaaga tctcgaatt 361 cctcctgctt atattaaaaa ttccaagc cgcctcatg ggatccaagt tgagagagat (540)	GenBank Sequence ID: MW633181.1	MW633185.1 <i>Salvia margaritae</i> chloroplast rbcL gene Identities: 99.23 %
psbA-trnH	1 tcgaagctcc acaaatggc taagactttt ttttagtgg taggcgtttt tgaanaataga 61 atagataagg agctataaac cctcttttga tagaacaaga aagggtttat tgctccttta 121 ttttctttc aattggagtc cttttctata ttttcagta gattggact tacctagaat 181 tattcttcc attagagaat aaagaagaa gataaaaaat gattgaaatt ctatcttttg 241 tttacaatt tctacaaaaa ttaaaattca aaaagtaaat aaatataaaa attcaata 301 gaattttaga gtacaggggc ggatgtagcc aagtggatca aggcagtgga ttgtgaatcc 361 accatgcg (368)	GenBank Sequence ID: MW633189.1	MW633191.1 <i>Salvia tianshanica</i> psbA-trnH intergenic spacer Identities: 99.28 %

Уровень видового разнообразия семейства Lamiaceae флоры Узбекистана оценивали с помощью последовательностей ITS региона, маркерами являлись внутренние транскрибируемые спейсеры (ITS1 и ITS2) участка 18S–26S ядерной рДНК. Проведено сравнение результатов секвенирования представителей семейства Lamiaceae. Регион ITS обычно используется для идентификации растений различного географического происхождения из-за его способности к высокой изменчивости. 36 последовательностей участка ITS, используемые для построения филогенетической дендрограммы, получены как результат нашего анализа, 40 последовательностей были загружены из базы данных GenBank, всего в филогенетический анализ вовлечены 76 таксонов. Область целевого маркера размером 661 п. н. В качестве внешней группы нами использован вид *Pedicularis korolkowii* Regel семейства Orobanchaceae Vent. Таксономическое название родов приведено согласно Plants of the World Online (URL: <https://powo.science.kew.org>). На полученной дендрограмме выделены две достоверно различающиеся суперклады, состав родов которых соответствует четырем из семи выделенных Harley (Harley et al., 2004) подсемействам флоры Узбекистана: *Lamioideae*, *Nepetoideae*, *Scutellarioideae* и *Ajugoideae*.

Генетическое разделение подсемейства Lamioideae образовало субклады триб с высоким значением апостериорной вероятности (posterior probability, PP = 99 %), сгруппировав представителей родов: *Hypogomphia* Bunge, *Stachys* L., в трибу *Stachydeae*; виды *Lamium* L. в *Lamieae*, виды *Lagochilus* Bunge ex Benth. и *Leonurus* L. в трибу *Leonureae*; *Phlomis* L., *Eremostachys* Bunge, *Phlomoideae* Moench в трибу *Phlomoideae*; *Moluccella* L., *Marrubium* L. образовали трибу *Marrubieae*.

Подсемейство *Nepetoideae*, наиболее богатое по численности видов в таксоне и представленное в нашей работе четырьмя родами, образует отдельную кладу со значением 100. Молекулярные данные подтвердили разделение подсемейства на подтрибы: *Salviinae*, *Menthinae*, *Nepetinae*, *Lycorinae*, объединенные в трибу *Mentheae*.

По результатам филогенетического анализа подтриба *Salviinae* сгруппировала виды *Salvia* L., *Rosmarinus* L., *Perovskia* L., *Melissa* L. в отдельную группу. Виды родов *Thymus* L., *Origanum* L., *Mentha* L., *Ziziphora* L. объединены в одну субкладу, относящуюся к подтрибе *Menthinae*. Представители родов *Dracocephalum* L., *Hyssopus* L., *Lallemantia* Fisch. et C. A. Mey, *Hymenocrater* Fisch. et C. A. Mey., *Drepanocaryum* Rojark., *Nepeta* L. образовали субкладу в пределах подтрибы *Nepetinae*. Род *Scutellaria* L. представляет подсемейство *Scutellarioideae*. *Ajuga* L. и *Teucrium* L. являются представителями подсемейства *Ajugoideae*.

Установлены эволюционные взаимосвязи между видами и уровни межродовой дивергенции внутри семейства Lamiaceae. При этом подтвержден монофилетичный статус семейства и представленных в исследовании подсемейств (*Ajugoideae*, *Lamioideae*, *Nepetoideae*, *Scutellarioideae*) (рис.). Таким образом, данное разделение определило хорошо различимые виды Lamiaceae на межродовом уровне и согласуется с принятой классической таксономией семейства. Результаты наших исследований демонстрируют эффективность использования ITS региона в качестве молекулярно-филогенетического маркера для оценки видового разнообразия флоры Узбекистана. Топология представленной дендрограммы, построенная на основе сравнения последовательностей ITS региона, совпадает с разделением

видов и их группированием в клады, полученных по результатам анализа последовательностей хлоропластного участка *matK* (Nikitina et al., 2022).

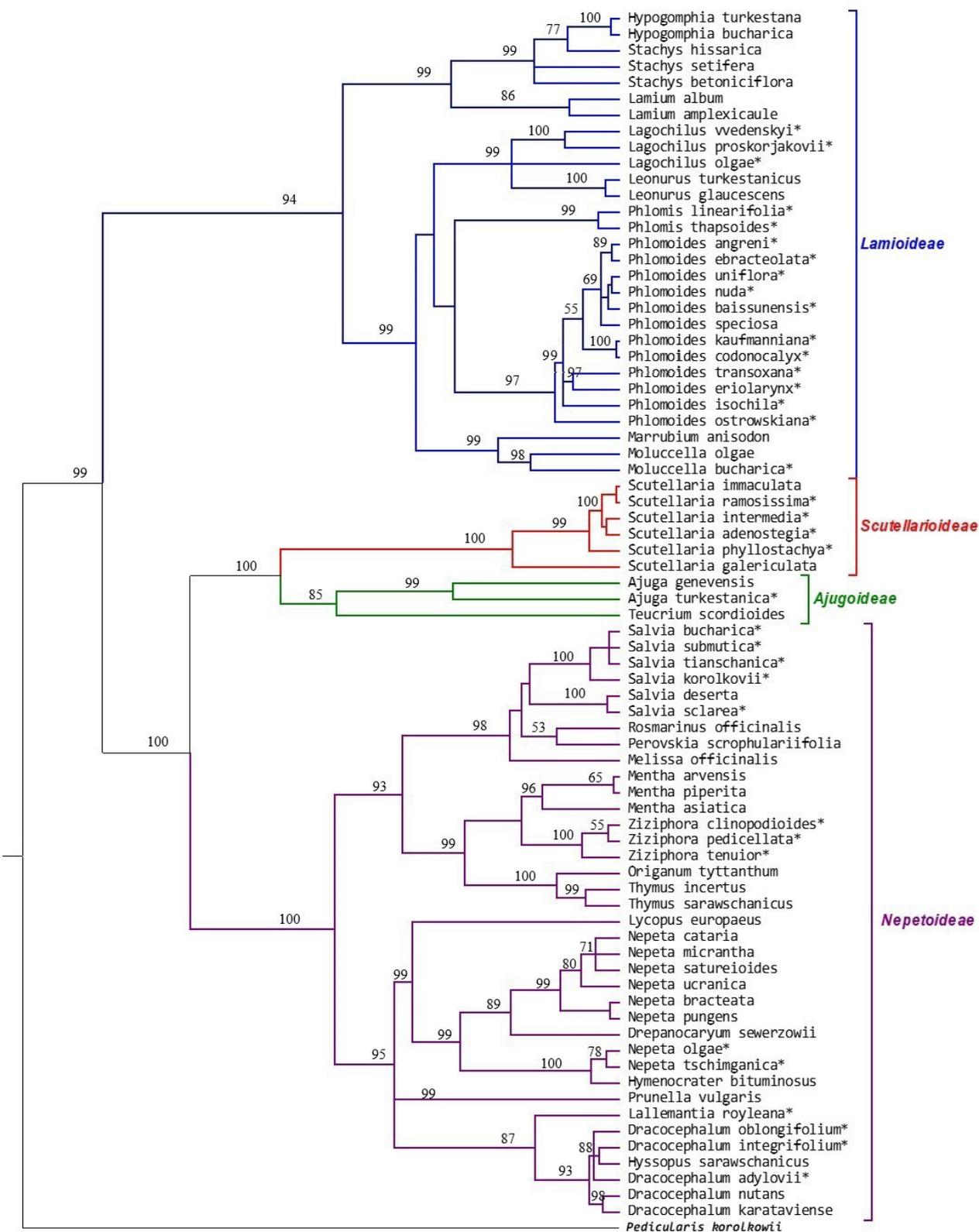


Рис. Дендрограмма семейства Lamiaceae, построенная по локусу ITS, методом MrBayes. Показана апостериорная вероятность байесовского вывода (BIPP). * – виды, проанализированные в данной работе.

ЛИТЕРАТУРА

- Тожибаев К. Ш., Бешико Н. Ю., Попов В. А.** Ботанико-географическое районирование Узбекистана // Бот. журн., 2016. – Т. 101, № 10. – С. 1105–1132.
- Darriba D., Taboada G., Doallo R., Posada D.** jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing // Nat. Methods, 2012. – Vol. 9. – P. 772.
- GenBank*. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (accessed 14.09.2023).
- Harley R. M., Atkins S., Budantsev A. L. et al.** Flowering plants dicotyledons: Lamiales (except Acanthaceae including Avicenniaceae) // The Families and Genera of Vascular Plants / J. W. Kadereit (ed.). – Berlin, Heidelberg: Springer, 2004. – Vol. 6. – P. 167–275. DOI: 10.1007/978-3-642-18617-2_11
- Huelsenbeck J.P., Ronquist F.** MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees // Bioinformatics, 2001. – Vol. 17, No. 8. – P. 754–755. DOI: 10.1093/bioinformatics/17.8.754
- The Plant List*. URL: <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Lamiaceae/> (accessed 13.09.2023).
- Juramurodov I., Tojibaev K. Sh., Nikitina E. V. et al.** *Hedysarum sunhangii* (Fabaceae, Hedysareae), a new species from Pamir-Alay (Babatag Ridge – Uzbekistan) // Phytotaxa, 2021. – Vol. 524, No. 1. – P. 1–13.
- Kress J., Wurdack K., Zimmer E., Lee W., Janzen D.** Use of DNA barcodes to identify flowering plants // PNAS, 2005. – Vol. 102, No. 23. – P. 8369–8374. DOI: 10.1073/pnas.0503123102
- Nikitina E. V., Beshko N. Yu., Omarov S. A.** Assessment of plant species diversity (Lamiaceae Lindl.) in Uzbekistan based on DNA barcoding // IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science, 2022. – Vol. 1068, No. 012042. DOI: 10.1088/1755-1315/1068/1/012042
- Rambaut A.** FigTree v1. 4.0. – University of Oxford, Oxford, UK. 2012. URL: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.
- Sennikov A. N., Tojibaev K. Sh., Khassanov F. O., Beshko N. Yu.** The Flora of Uzbekistan Project // Phytotaxa, 2016. – Vol. 282, No. 2. – P. 107–118.
- Shchegoleva N. V., Nikitina E. V., Juramurodov I. J. et al.** A new species of *Ranunculus* (Ranunculaceae) from Western Pamir-Alay, Uzbekistan // PhytoKeys, 2022. – Vol. 193. – P. 125–139. DOI: 10.3897/phytokeys.193.70757
- Tojibaev K. Sh.** Monitoring of the Relic Endemics of Uzbekistan's Flora // Czech J. Genet Plant Breed, 2010. – Vol. 46. – P. 45–46.