

УДК 575.852'113:575.858:57.082.13

ДНК-ШТРИХКОДИРОВАНИЕ РАСТЕНИЙ СЛЕДУЮЩЕГО ПОКОЛЕНИЯ***А. В. Родионов, Е. О. Пунина, В. С. Шнеер, А. С. Сухов, В. В. Домашкина****Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН,**ул. проф. Попова, д. 2, г. Санкт-Петербург, 197376, Россия**E-mail: avrodionov@mail.ru; ORCID iD: <https://orcid.org/00-0003-1146-1622>*

По оценкам кариологов, от 30 до 80% видов растений имеют полиплоидные геномы. Полиплоидизация (полногеномная дупликация – WGD) генома – широко распространенный и быстрый способ видо- и родообразования у растений. Таким путем возникли десятки тысяч видов современных растений. Отталкиваясь от этого факта, А. Лёве (Löve, 1982, 1984) предложил положить в основу систематики и таксономии Пшеницевых геномную формулу – уникальную композицию генома, характерную для данного рода. К одному роду следует относить группу близкородственных видов, имеющую или специфический диплоидный геном, или особую, только для рода характерную, комбинацию субгеномов. До недавнего времени почти единственным способом определения геномного состава вида и рода был предложенный Кихарой метод «Genomanalys» в основе которого лежит изучение закономерностей конъюгации хромосом у потомства от скрещивания тестируемого полиплоида с предполагаемыми диплоидными предками ("анализаторами"). Предложенный Кихарой экспериментальный подход требовал длительных и трудоемких исследований и наличия коллекций живых растений. По этой причине проведение геномного анализа было возможно только в работе с немногочисленными сельскохозяйственными культурами. Должны были появиться новые методы анализа геномов. «То, что невозможно теперь, со временем может стать возможным» - писал Н.Н. Цвелев (1991). Такие методы сейчас появились. Исследуя внутригеномный полиморфизм рДНК методом NGS на платформе Illumina можно эффективно идентифицировать виды и рода растений и верифицировать гипотезы о их происхождении.

Ключевые слова: ITS1, DNA barcoding, rDNA

После того, как была реализована программа секвенирования всех протеин-кодирующих генов генома человека, возникла идея секвенировать один и тот же ген в геномах всех видов животных. В идеале хотелось подобрать такой ген, который бы у животных и у растений выполняет одну и ту же функцию, который был бы идентичен по последовательности ДНК у всех особей вида, но различается у разных видов. Тем самым появилась бы возможность идентифицировать вид по ДНК вне зависимости от сохранности морфологии биологического материала. Автором и пропагандистом этой идеи был канадский ученый Пол Эбер (Hebert et al., 2003). Предлагаемое направление исследований получило название **DNA-barcoding**. В качестве такого стандартного ДНК-штрихкода был предложен 5'-фрагмент субъединицы 1 митохондриального гена цитохром С оксидазы (CO1) (Hebert et al., 2003). Идея была поддержана многими исследователями в разных странах и легла в основу нескольких крупных национальных и межнациональных проектов, таких как International Barcode of Life (I-BOL), Fish Barcode of Life Campaign (FISH-BOL), HealthBOL, Bee Barcode of Life Initiative (Bee-BOL), Lepidoptera Barcode of Life, Mammalian Barcode of Life Campaign. В нашей стране добровольное объединение исследователей этого направления получило название RUS-BOL - председатель Координационного совета проф. Ю.Ф. Картавцев (НИЦМБ ДВО РАН, Владивосток).

Причина, почему идея ДНК-штрихкодирования стала популярной в потенциальной привлекательности этой технологии для решения научных и практических задач. Выделим несколько основных направлений научно-практической деятельности, где находит применение ДНК-штрихкодирование:

А. Определение таксономической принадлежности (вида) образца в экологических, зоологических и ботанических исследованиях: актуальность и значение этого направления исследований объясняется тем, что 1) число квалифицированных

«традиционных» систематиков-зоологов, энтомологов, ботаников, микологов, способных по морфологии безошибочно определить вид, катастрофически уменьшается с каждым годом; 2) Некоторые виды можно определить только на определенной стадии развития; 3) В последние годы обнаружено, что в природе есть «криптические виды» – морфологически неразличимые, но репродуктивно изолированные (Шнеер и др., 2023).

В. Контроль происхождения и качества пищевых продуктов: конкретные, проведенные уже с использованием ДНК-технологий исследования показали, что анонсированный рыбными торговцами и указанный ресторанным меню видовой состав рыбных блюд катастрофически часто не соответствует реальности. Так Argani et al. (2015) показали, что на итальянских рыбных рынках 48.5% продуктов относились к другим видам рыб, чем объявлено продавцами. Kappel and Schröder (2016) показали, что в немецких ресторанах 50% блюд приготовлены из более дешевых видов рыб, чем указано в меню. В испанских и китайских ресторанах показатели ненамного лучше – в Испании 43% рыбных блюд приготовлены из рыбы, не соответствующей меню (Muñoz-Colmenero et al. (2016); в Китае на рыбных базарах Сяньзяня 36% рыб, а в Хэнане 28,5% рыб относились не к тому виду рыб, который значился на этикетке (Wang et al (2015). Контрольное исследование видового состава мясных блюд также часто показывает несоответствие вида продукта объявленному видовому составу: в Арабских Эмиратах это наблюдалось в 5% случаев (Premanandh et al., 2013), в Великобритании в 10% (Shears, 2010), в Индии, Греции, США и Канаде в 25-35% случаев (Wong, Hanner, 2008; Stamatis et al. 2015).

С. Определения видового состава видов растений, по тем или иным причинам запрещенных к выращиванию. Приведем конкретный пример: постановлением Правительства Российской Федерации №135 от 7 февраля 2024 года предусмотрена административная и уголовная ответственность за выращивание ранее популярного садового растения вида *Ipomoea tricolor* Cav. Садовые сорта этого вида прошли через руки селекционеров и удивительно разнообразны. Отличить вид от садовых сортов других видов рода, например от *I. purpurea* (L.) Roth нелегко даже специалисту. Вероятно, со временем, как судебным исполнителям, так и адвокатам в делах, связанных с этим объектом не обойтись без ДНК-технологий.

Д. Качество растительного сырья в фармакогнозии. Между тем, случаи фальсификации дорогостоящих компонентов и замены их на морфологически сходные, но более дешевые виды растительного сырья не редкость в фармацевтической практике. Так, из 78 растительных продуктов, обозначенных поставщиками как *Hypericum perforatum* L., только 68% содержали растительный материал именно этого вида. Только 15% исследованных растительных продуктов *Veronica* содержали целевой вид *Veronica officinalis* L., тогда как основной известный фальсификат, *Veronica chamaedrys* L., был обнаружен в 62% продуктов (Raclariu et al., 2018). В Великобритании популярны как антидепрессанты элеутерококк колючий (*Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim) Maxim), продающийся под именем «сибирский женьшень», и розовый корень *Rhodiola rosea* L. Проверка 25 коммерческих образцов «сибирского женьшеня» и 10 образцов розового корня, поставленных из Китая показала, что все образцы, продаваемые как «сибирский женьшень», содержали растительный материал этого вида, но 9 образцов кроме того имели в своем составе материал других видов *Eleutherococcus* - *E. sessiliflorus* (Rupr. et Maxim) S.Y.Hu, *E. divaricatus* (Siebold et Zucc.) S.Y.Hu или *E. seoulensis* (Nakai) S.Y.Hu. Что касается родиолы розовой, то в 5 образцах действительно содержалась только родиола розовая, в 1 образце смесь *Rhodiola rosea* и других видов этого рода, в 4 образцах *R. rosea* не определялась, но выявлялась смесь других видов рода *Rhodiola* (Жохова и др., 2019).

Следует подчеркнуть, что с самого начала реализации программы CBOL на пути ДНК-штрихкодирования растений встретилось много трудностей. Стандартный ДНК-штрихкод животных – фрагмент митохондриального гена CO1 оказался неприменим для растений ввиду низкой и неравномерной скорости мутирования (Kress, 2017; Шнеер, Родионов, 2018; Жохова и др., 2019). Была организована специальная группа по поиску ДНК-штрихкода растений (Plant Working Group CBOL). Поиск велся среди нескольких хлоропластных последовательностей, генов: *matK*, *groB*, *groC1*, *accD*, *rbcL* и др., некоторых межгенных спейсеров *trnH-psbA*, *atpF*–

atpH, psbK–psbI. В качестве наиболее эффективных ДНК-маркеров видов рассматривались межгенные спейсеры ITS1 и ITS2 генов 35S рРНК (Kress, 2017; Шнеер, Родионов, 2018; Жохова и др., 2019). В общем, вывод из многочисленных исследований был сделан такой – однозначная идентификация вида часто требует сравнения нескольких последовательностей сразу (например, rbcL и ITS2) (Kress, 2017; Жохова и др., 2019). Появление новых технологий секвенирования, таких как NGS и геномного скимминга (low-coverage shotgun sequencing) породило новые направления, получившие названия “extended DNA barcode” и “mega-barcoding” (Hollingsworth et al., 2016; Kress, 2017). В основе этих подходов лежит предположение, что ДНК-штрихкодирование растений нужно проводить путем одновременного анализа многих разных генов в геноме.

Предлагаемый нами подход принципиально иной. Он строится на особенностях происхождения и организации геномов растений. Исследованиями последнего времени показано, что предки всех современных цветковых растений прошли через акт или акты межвидовой гибридизации, полиплоидизации и вторичной диплоидизации и дисплоидии (Родионов, 2022, 2023). Кроме того, от 15 до 50% видов – это относительно недавно возникшие виды с полиплоидным геномом, кариотип которого не позволяет усомниться в его полиплоидном происхождении (Wood et al., 2009). Вторичные диплоиды и полиплоидные виды часто сохраняют способность к следующим актам межвидовой гибридизации, давая все новые и новые комбинации субгеномов. Часто, хотя и не всегда, каждая новая комбинация субгеномов характеризуется особым набором морфологических признаков, достаточным, чтобы определить обладающую им группу морфологически своеобразных растений как особый вид или особый род. Лёве и Дьюи (Löve, 1984; Dewey, 1984) предложили считать родом группу близкородственных видов, имеющую или специфический диплоидный геном, или особую, только для этого рода характерную комбинацию субгеномов. При этом автополиплоидное умножение генома или субгенома не считалось достаточным для того, чтобы относить носителей таких комбинаций генома к разным родам. Попытки последовательного применения геномной концепции рода нередко приводили к неоднозначным новациям в таксономии, потому в свое время, геномная концепция рода принята далеко не всеми систематиками. Однако, такой авторитет, как Н. Н. Цвелев (1991) считал, что геномный критерий родов заслуживает внимания хотя бы потому, что в области морфологии однозначных синапоморфий для построения системы родов, по крайней мере у Пшеницевых, не существует, убедительных морфологических гиатусов на границах родов или репродуктивной изоляции не найдено.

Из широко распространенного недавнего гибридного происхождения многих видов цветковых растений следует, что индикатором вида является не конкретная маркерная последовательность ДНК (ДНК-штрихкод), а сочетание ДНК-штрихкодов, полученных растением от его относительно недавних предков. Метод локус-специфичной амплификации на платформе Illumina многократно повторенных в геноме последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1 и/или ITS2 позволяет выявить мажорные и минорные варианты рДНК, из которых часть - результат постепенно накапливающихся в геномах мутаций, а другие определяются как последовательности, полученные растением от предков видов. Новое или необычное сочетание вариантов рДНК показывает на то, что геном образца относится к иному виду или новому гибриду. Предлагаемый подход позволяет эффективно дифференцировать близкие по морфологии виды и верифицировать гипотезы о происхождении природных и искусственных гибридов.

Благодарности. Работа выполнена в рамках гранта РНФ № 24-24-00326.

Библиографический список

1. Жохова Е. В., Родионов А. В., Повыдыш М. Н. и др. 2019. Современное состояние и перспективы использования ДНК-штрихкодирования и ДНК-фингерпринтинга для анализа качества лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов // Успехи современной биологии. Т. 139. №1. С. 25-40.
2. Родионов А.В. 2023. Эуполиплоидия как способ видообразования у растений // Генетика. Т. 59. №5. С. 493-506. DOI: 10.31857/S0016675823050119

3. Родионов А. В. 2022. Тандемные дубликации генов, эуполиплоидия и вторичная диплоидизация—генетические механизмы видообразования и прогрессивной эволюции в мире растений // *Turczaninowia*, 25(4), 87-121
4. Цвелев Н. Н. 1991. О геномном критерии родов у высших растений // *Бот. журн.* Т. 76, № 5. С. 669–676).
5. Шнеер В. С., Пунина Е. О., Домашкина В. В., Родионов А. В. 2023. Криптогибриды у растений- подводная часть айсберга // *Ботанический журнал.* Т. 108. №12. С. 1037-1052.
6. Шнеер В. С., Родионов А. В. 2018. ДНК-штрихкоды растений // *Успехи современной биологии.* Т. 138. № 6. с. 531–538.
7. Armani, A., Guardone, L., La Castellana, R., Gianfaldoni, D., Guidi, A., & Castigliego, L. (2015). DNA barcoding reveals commercial and health issues in ethnic seafood sold on the Italian market // *Food Control*, 55, 206–214. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.030>.
8. Dewey, D. R. 1984. The genomic system of classification as a guide to intergeneric hybridization with the perennial Triticeae // In: J. P. Gustafson (ed.) *Gene manipulation in plant improvement*. Boston, MA: Springer. Pp. 209-279.
9. Hebert P.D. N., Ratnasingham S., deWaard J. R. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species // *Proc. R. Soc. Lond. B.* V. 27. P. 96–99.
10. Hollingsworth PM, Li D-Z, van der Bank M, Twyford AL. 2016. Telling plant species apart with DNA: From barcodes to genomes // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 371: 20150338.
11. Kappel, K., & Schröder, U. 2016. Substitution of high-priced fish with low-priced species: Adulteration of common sole in German restaurants // *Food Control*, 59, 478–486. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.06.024>.
12. Kress, W. J. 2017. Plant DNA barcodes: Applications today and in the future // *Journal of systematics and evolution*, 55(4), 291-307.
13. Löve Á. 1984. Conspectus of the Triticeae // *Feddes Repert.* 1984. T. 95. S. 425–521.
14. Muñoz-Colmenero, M., Blanco, O., Arias, V., Martinez, J. L., & Garcia-Vazquez, E. 2016. DNA authentication of fish products reveals mislabeling associated with seafood processing // *Fisheries*, 41(3), 128–138. <https://doi.org/10.1080/03632415.2015.1132706>.
15. Premanandh, J., Sabbagh, A. and Maruthamuthu, M. 2013. Misdescription of packaged foods: a case study from the United Arab Emirates // *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30(12), pp.2022-2026.
16. Raclariu, A. C., Heinrich, M., Ichim, M. C. and de Boer, H. 2018. Benefits and limitations of DNA barcoding and metabarcoding in herbal product authentication// *Phytochemical Analysis*, 29(2), pp.123-128.
17. Shears, P. 2010. Food fraud—a current issue but an old problem // *British Food Journal*, 112(2), pp.198-213.
18. Stamatis, C., Sarri, C.A., Moutou, K.A., Argyrakoulis, N., Galara, I., Godosopoulos, V., Kolovos, M., Liakou, C., Stasinou, V., Mamuris, Z. 2015. What do we think we eat? Single tracing method across foodstuff of animal origin found in Greek market // *Food Research International*, 69, pp.151-155.
19. Wang, M., Liu, Z., Huang, H., Zhao, X. M., Shi, Q., He, S. P., et al. 2015. Application of DNA barcode technology in identification of fish and meat products in Shenzhen // *Food Science*, 36(20), 247–251. Available from: http://www.wanfangdata.com.cn/details/detail.do?_type=perio&id=spkx201520048.
20. Wong, E. H. K. and Hanner, R. H. 2008. DNA barcoding detects market substitution in North American seafood // *Food Research International*, 41(8), pp.828-837.
21. Wood T. E., Takebayashi N., Barker M. S. et al. 2009. The frequency of polyploid speciation in vascular plants // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. V. 106. P. 13875–13879.