

11. Kreis, W. *In-Vitro* Culturing Techniques of Medicinal Plants. In: Kayser, O. & Quax, W. J. (eds) *Medicinal Plant Biotechnology. From Basic Research to Industrial Applications*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 2007. -604 с.
12. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*. 1962. 15. –P. 473–497.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНВЕНТАРИЗАЦИЯ РЕДКИХ И ИСЧЕЗАЮЩИХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ УЗБЕКИСТАНА С ПРИМЕНЕНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ ДНК – ШТРИХКОДИРОВАНИЯ

Мустафина Ф.У., Дехконов Д.Б., Жамалова Д.Н., Ортиков Э.А.,
Турдиев Д.Э., Газиев А.Дж., Журамуродов И.Ж., Махмуджанов Д.И.,
Тожибаев К.Ш.

Институт ботаники Академии наук Республики Узбекистан
mustafinaferuza@yahoo.com, botany@academy.uz

Штрих-кодирование ДНК - это метод идентификации видов с использованием короткого участка ДНК определенного гена или генов. В большинстве случаев для ДНК-штрихкодирования используется короткий переменный участок ДНК, последовательность которого может быть легко определена у широкого круга объектов и обладает достаточной изменчивостью на межвидовом уровне, но стабилен в пределах одного вида.

Данный принцип лёг в основу глобального проекта по созданию генетической базы данных (Barcode of Life Data System – BOLD) для возможности идентификации всех живых организмов – «Штрихкод жизни» (от англ. Barcode of Life). ДНК-штрихкодирование имеет огромные перспективы как экспресс-метод определения видов, что находит широкое применение при проведении таможенного и карантинного контроля, в экологическом мониторинге редких и исчезающих видов.

Результаты исследований, изложенные в данной статье, получены в ходе выполнения работ по проектам MRB-AN-2019-30 «Генетическая инвентаризация редких и исчезающих видов растений Беларуси и Узбекистана с применением технологии ДНК-штрихкодирования», а также в рамках договора 23/2020 между Институтом ботаники и Государственным комитетом РУз по экологии и охране окружающей среды.

Объектами исследований послужили редкие, исчезающие и эндемичные виды флоры Республики Узбекистан. ДНК баркод разработан для 65 видов (129 образцов) флоры Узбекистан по праймерам *ITS2*, *matK*, *rbcL*: 15 видов рода *Astragalus* L. (Fabaceae Lindl.), два вида рода *Dracocephalum* L. (Lamiaceae Martinov), три вида рода *Ferula* L. (Apiaceae Lindl.), 16 видов рода *Hedysarum* L. (Fabaceae Lindl.), 19 видов рода *Tulipa* L. (Liliaceae Juss.), четыре вида рода *Iris* L. (Iridaceae Juss.) и шесть видов рода *Salvia* L. (Lamiaceae Martinov).

С целью сбора материала для выполнения задач проекта организованы экспедиционные исследования в различные районы Узбекистана. Данные о собранном гербарном материале были внесены в базу данных в формате Excel, включая информацию о научном названии растений, месте и дате сбора, GPS координаты места сбора, имя коллектора, идентификационный номер гербарного материала. База данных вместе с гербарным материалом были переданы в Национальный гербарный фонд TASH. Гербарные образцы отцифровывались путём сканирования. Каждому гербарному образцу присваивался уникальный регистрационный номер.

Сушка материала осуществлялась с использованием силикогеля, выделение ДНК из растительного материала проводилось методом Cetyl Trimethylammonium Bromide (СТАВ, Sigma-Aldrich, U.S.A.) в соответствии с описанием метода в руководстве Т. Маниатис и др. (1984) с некоторыми модификациями, амплификация ДНК проводилась методом полимеразно-цепной реакции в соответствии с опубликованными ранее протоколами с использованием праймеров *ITS2* (1: e8613), *matK* (4: 1-11, 2: 1-9) и *rbcL* (3: 111–120, 8: e508). Очистка ПЦР продуктов проводилась с использованием реагента ExoSAP-IT™ PCR Product Clean-up (Thermo Fisher, U.S.A.), перед секвенированием неинкорпорированные терминаторы удалялись с использованием BigDye XTerminator Purification Kit (Thermo Fisher, U.S.A.). Секвенирование проводилось на генетическом анализаторе ABI Prism 3500 (Applied Biosystems, U.S.A.) в Научно-исследовательском институте гематологии и переливания крови РУз. На всех этапах выделения ДНК, ПЦР амплификации и очистки контроль качества и количества ДНК продуктов проводилось на 1,2% агарозном геле, а также при спектрофотометрическом измерении, исходя из соотношения показателей поглощения оптических плотностей при длинах волн 230, 260 и 280 нм. Обработка данных осуществлялась в программе Geneious 10.0.9 (7: 1647–1649).

Консенсусные нуклеотидные последовательности генерированы из контигов при высокой чувствительности к ошибкам. Для проверки качества генерированных сиквенсов были построены филогенетические деревья. Сиквенсы выравнивались с использованием программы CLUSTAL W (11: 4673-4680), интегрированного в программу Geneious v10.0 (7: 1647–1649). Для построения деревьев использовались алгоритмы Bayesian inference программы MrBayes 3.2.6 (6: 754-755), максимальной экономии в программе RAUP* 4.0b08 (10) и алгоритма максимального правдоподобия (Maximum Likelihood) в программах PhyML v3.3 (5: 307-321) и RAxML v8 (5: 1312-1313)

После тщательной проверки, нуклеотидные последовательности были загружены в глобальную систему данных BOLD v4 (Barcode of Life Data Systems; <https://v4.boldsystems.org/index.php>). Система BOLD создана в 2005 году и является веб-платформой, предназначенной для сбора баркод информации, обработки и анализа данных.

Впервые для видов флоры Узбекистана в систему BOLD v4 загружена информация для 65 видов (129 образцов, по два образца каждого вида), занесенных в Красную книгу РУз (2019), а также являющиеся эндемиками для

Республики Узбекистан или Центральной Азии. В ходе выполнения проекта был использован только точно документированный материал (рис. 1, 2).

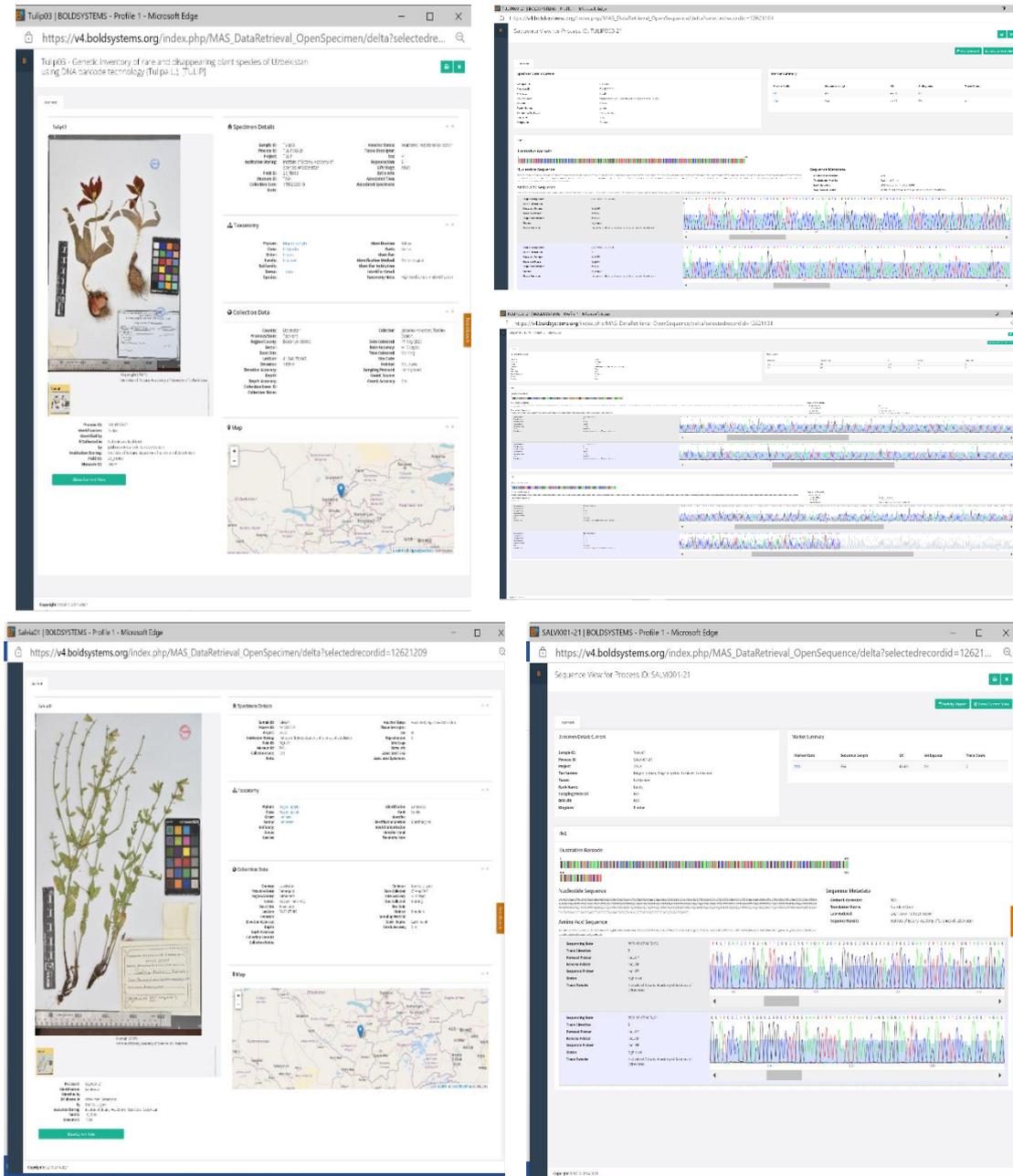


Рисунок - 1. Информация, загруженная в глобальную систему данных BOLD v4 (Barcode of Life Data Systems): данные о ваучере образца, нуклеотидные последовательности.

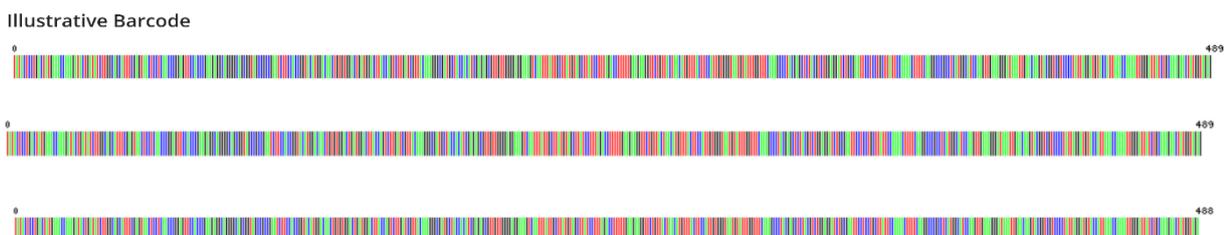


Рисунок - 2. Сравнение участков ДНК-баркода

Таким образом, в результате выполнения проектов в Национальный гербарный фонд TASH переданы гербарные ваучеры, а также база данных с информацией о современном распространении для более 110ти видов редких видов, оптимизирован процесс выделения ДНК методом СТАБ, протестирован и отобран набор праймеров, наиболее информативных для объектов исследований, секвенированы нуклеотидные последовательности 129 образцов, относящихся к 65 видам по 2 образца каждого вида родов *Astragalus* L. (Fabaceae Lindl.), *Dracocephalum* L. (Lamiaceae Martinov), *Ferula* L. (Apiaceae Lindl.), *Hedysarum* L. (Fabaceae Lindl.), *Tulipa* L. (Liliaceae Juss.), *Iris* L. (Iridaceae Juss.) и *Salvia* L. (Lamiaceae Martinov), создана референсная база данных ДНК по трем праймерам (*ITS2*, *matK* и *rbcL*) на базе платформы Barcode of Life Data Systems (BOLD v4), что внесло вклад в выполнение задач Стратегии по сохранению биоразнообразия 2030: «документирование разнообразия растений в мире», а также «проведение научных исследований по вопросам генетического разнообразия, систематики и таксономии, экологии и биологических методов сохранения растений». Выявлены единичные полиморфные участки (SNP, Single Nucleotide Polymorphism), характерные только для исследованных видов, что позволяет идентифицировать виды, используемые в производстве лекарственных средств растительного происхождения, контролировать нелегальный сбор редких и исчезающих видов, а также производить мониторинг биоразнообразия и влияния на него антропогенного фактора

Список использованных источников:

1. Chen S, Yao H, Han J, Liu C, Song J, Shi L, et al. (2010) Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species. PLoS ONE 5(1): e8613. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008613>
2. Dunning L. T., Savolainen V., 2010, Broad-scale amplification of matK for DNA barcoding plants, a technical note, Botanical Journal of the Linnean Society, 164: 1-9 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8339.2010.01071>
3. Fay, M. F., S. M. Swensen, and M. W. Chase. 1997. Taxonomic affinities of *Medusagyne oppositifolia* (Medusagynaceae). Kew Bulletin 52: 111–120.
4. Ford C.S., Ayres K.L., Haider N., Toomey N., van-Alpen-Stohl J., 2009, Selection of candidate DNA barcoding regions for use on land plants. Botanical Journal of the Linnean Society 159: 1–11
5. Guindon, S., Dufayard, J-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O., 2010. New algorithms and methods to estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. Syst. Biol. 59(3), 307-321. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>
6. Huelsenbeck J, Ronquist F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics 17(8), 754-755. <https://doi:10.1093/bioinformatics/17.8.754>
7. Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P, Drummond A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software