

Никитина Елена Васильевна
elenanikita2013@rambler.ru

Тоштемиров Журабек Гани угли

Каримов Бобур Абдусобирович

Юсупов Зиёвиддин Олимжон угли

Институт ботаники Академии наук Республики Узбекистан

ДНК- МАРКЕРЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ В УЗБЕИСТАНЕ

Аннотация: Среди большого видового разнообразия растений флоры Узбекистана, насчитывающей около 4400 видов сосудистых растений, около 1200 обладают лекарственными свойствами, являясь богатой сырьевой базой и огромным потенциалом для производства фармацевтических препаратов из лекарственных растений. Однако, для всего мира первоочередной глобальной проблемой является фальсификация лекарственных средств растительного происхождения. Молекулярно-генетический метод, инструмент для быстрой и надежной идентификации видов, позволяющий определять принадлежность организма к определённому таксону с помощью специфических участков генома изучаемого вида, ДНК-штрихкодов.

Ключевые слова: видовая идентификация, лекарственные растения, ДНК-штрихкоды.

Nikitina Elena V
Toshtemirov Jo'rabek G
Karimov Bobur A.,
Yusupov Ziyoviddin O.

Institute of Botany of the Academy of Sciences of the Republic of
Uzbekistan

DNA MARKERS FOR THE IDENTIFICATION OF MEDICINAL PLANT SPECIES IN UZBEKISTAN

Abstract: Among the rich plant diversity of the flora of Uzbekistan, which comprises approximately 4,400 species of vascular plants, about 1,200 possess

medicinal properties, representing a substantial raw material base and a significant potential for the production of pharmaceutical preparations from medicinal plants. However, the falsification and adulteration of herbal medicinal products constitute a major global problem. Molecular genetic methods provide a rapid and reliable tool for species identification, allowing the assignment of biological material to a particular taxon using genomic regions of the target species, known as DNA barcodes.

Keywords: *species identification, medicinal plants, DNA barcodes.*

Nikitina Elena V
Toshtemirov Jo'rabek G
Karimov Bobur A.,
Yusupov Ziyoviddin O.

O'zbekiston Respublikasi Fanlar akademiyasi Botanika instituti

O'ZBEKISTONDA DORIVOR O'SIMLIK TURLARINI ANIQLASHDA DNK-MARKERLARDAN FOYDALANISH

Annotatsiya: O'zbekiston florasida taxminan 4400 xil qon tomirli o'simliklar kiradi, shundan 1200 ga yaqin turi dorivor xususiyatlarga ega bo'lib, farmatsevtik preparatlar ishlab chiqarishda katta xomashyo bazasini va salmoqli salohiyatni tashkil etadi. Biroq, butun dunyoda dorivor o'simliklardan tayyorlangan dori vositalarining soxtalashtirilishi va aralashtirilishi jiddiy muammo bo'lib qolmoqda. Molekulyar-genetik usullar o'simlik materialini aniq taksonlarga mansubligini aniqlash imkonini beruvchi, genetik jihatdan DNK fragmentlariga asoslangan — ya'ni DNK-shtrixkodlardan foydalanilgan — tez va ishonchli identifikatsiya vositasidir.

Kalit so'zlar: *tur darajasida identifikatsiya, dorivor o'simliklar, DNK-shtrixkodlar.*

Введение

Около 750 видов лекарственных растений из более 4,3 тысячи растений местной флоры считаются лекарственными, из них 112 видов зарегистрированы в Узбекистане для применения в научной медицине, из

которых 70 видов активно используются в фармацевтической промышленности (<https://president.uz/ru/lists/view/3499>).

Так как, идентификация растительного материала на уровне видов не всегда осуществима, то сегодня исследователями широко применяется молекулярный метод. Кроме того, идентификация растений классическими методами иногда затруднена, особенно в тех случаях, когда материал является производным переработанной части растения или присутствует в порошкообразном виде. Поэтому, перспективностью данного подхода является проведение точной видовой аутоидентификации по фрагментированному биологическому материалу, что ценно с точки зрения лекарственной безопасности (Жохова и др., 2019). В настоящее время активно разрабатываются методы молекулярной идентификации биологических видов с использованием нуклеотидных последовательностей коротких участков генома (ДНК-маркеры). Специфическая проблема ДНК-маркирования в фармакогнозии и при контроле качества компонентов для производства БАДов, связана с фрагментированным биологическим материалом, и с веществами-наполнителями растительных смесей (Parveen et. al., 2016). Одним из ключевых этапов при выборе молекулярных маркеров для исследований является выявление наиболее изменчивых участков генома. Для оценки уровня варибельности последовательностей широко применяется показатель нуклеотидного разнообразия (P_i , *nucleotide diversity*).

Целью работы является–выявление наиболее варибельных участков хлоропластных геномов родов рода *Leonurus*, путем анализа нуклеотидного разнообразия (P_i) с использованием программы DnaSP.

Материалы исследования

Род *Leonurus* L. (пустырник) насчитывает около 25 видов, распространённых преимущественно в Евразии, с центрами разнообразия в Центральной Азии, Восточной Азии, Западной Азии и Кавказ, три из которых распространены в Узбекистане (Флора СССР, 1954). Растения признаны перспективным лекарственным растением (Koshovyi et. al., 2021;

Liu et. al., 2024). Фармакологические свойства препаратов на основе пустырника включают седативное, гипотензивное и снотворное действие. Препараты на его основе оказывают расслабляющее влияние на центральную нервную систему, способствуют снижению частоты сердечных сокращений и увеличению силы сердечных импульсов. В народной медицине настой данного растения традиционно применяется для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, таких как пороки сердца, начальная стадия артериальной гипертензии, кардиосклероз, миокардит и миокардиодистрофия, а также при невралгиях и атеросклерозе (Акопов, 1990).

Результаты и обсуждение

Разработка видоспецифичных праймеров на основе переменных участков хлоропластного генома позволяет: надёжно идентифицировать виды *Leonurus* на молекулярном уровне; различать морфологически сходные или близкородственные виды; исключить подмену и фальсификацию сырья при заготовке и фармацевтическом производстве; создать основу для молекулярной сертификации и стандартизации лекарственных растений в фармакопейной практике.

Согласно данным множественного выравнивания хлоропластных геномов *Leonurus turkestanicus* V.I.Krecz. & Kuprian. и четырех видов *Leonurus* взятых из базы NCBI, общее число сайтов составило 152 537 п.н. Для оценки нуклеотидного разнообразия (P_i) выполнен анализ с использованием программы DnaSP показавший следующие параметры: Среднее нуклеотидное разнообразие составило $P_i=0,00412$, число полиморфных (сегрегирующих) сайтов $S=1198$, что соответствует 1202 мутациям (Θ), 342 парсимоний-информативных сайта, что указывает на наличие филогенетически значимых сигналов в хлоропластных последовательностях рода.

В целом, полученные результаты демонстрируют умеренный уровень нуклеотидного разнообразия ($P_i<0,014$). Данный показатель, вероятно, связан

с относительно недавней радиацией рода. Род *Leonurus* является относительно «молодым» в эволюционном плане по сравнению с другими линиями *Lamiaceae*. Согласно данным (Wang et. al., 2023), дивергенция рода от общего предка произошла в раннем Миоцене— около 16 млн лет назад. Недавнее происхождение и последующая быстрая дивергенция в миоцене—плиоцене могли способствовать умеренному уровню нуклеотидного разнообразия, так как времени для накопления значительного числа мутаций было меньше, чем у более древних таксонов.

Несмотря на относительно низкий общий уровень дивергенции, график распределения P_i показывает наличие выраженных hotspot-регионов, обладающих высоким филогенетическим потенциалом. На графике представлен результат скользящего анализа нуклеотидного разнообразия (P_i) по всему хлоропластному геному представителей рода *Leonurus* (Рисунок 1). Диапазон значений P_i оказался относительно узким (0–0,022), что указывает на умеренный уровень вариабельности хлоропластных последовательностей.

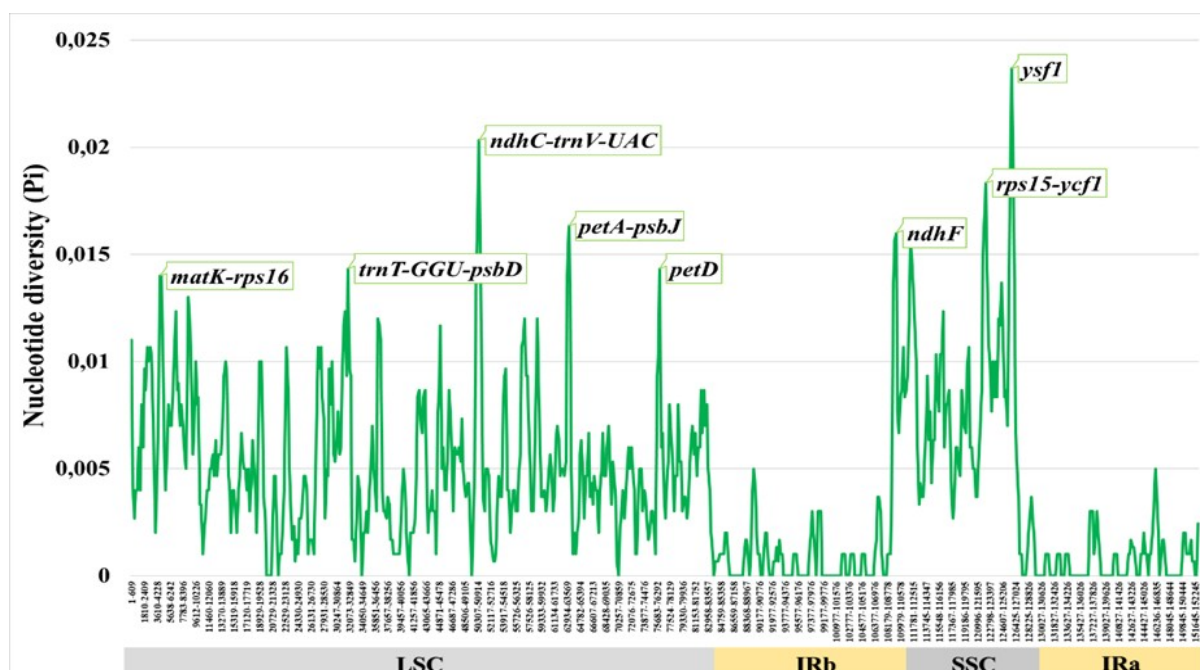
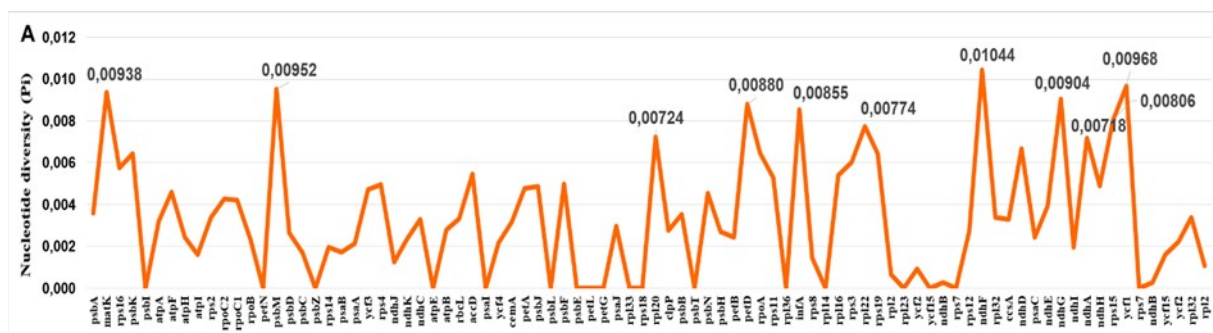


Рисунок 1. Анализ нуклеотидного разнообразия (P_i) хлоропластных геномов 5 видов рода *Leonurus*, выполненный методом скользящего окна (длина окна – 600 п.н., шаг – 200 п.н.). По оси X показано положение средней точки окна, по оси Y – значение нуклеотидного разнообразия (P_i).

Наиболее вариабельные участки включают: *matK-rps16* ($P_i \approx 0,0135$) — межгенный спейсер, часто используемый в качестве маркера в систематике растений; *trnT-GGU-psbD* ($P_i \approx 0,014$) — участок LSC, связанный с фотосинтетическими генами, демонстрирующий высокий уровень полиморфизма; *ndhC-trnV-UAC* ($P_i \approx 0,020$) — пик в LSC-области, отражающий значительное накопление мутаций, один из наиболее изменчивых регионов, участвующий в регуляции NADH-дегидрогеназного комплекса; *petA-psbJ* ($P_i \approx 0,016$) и *petD* ($P_i \approx 0,015$) — локусы, кодирующие белки фотосинтетического комплекса; *ndhF* ($P_i \approx 0,016$) — ген SSC-региона, вовлечённый в электронный транспорт, часто используемый в филогеографических исследованиях; *rps15-ycf1* ($P_i \approx 0,018$) — вариабельный участок SSC, перспективный для внутривидовой дифференциации; *ycf1* (до $P_i \approx 0,02367$) — наиболее полиморфный регион, признанный универсальным маркером высокой изменчивости, участвующий в транспорте белков и межгеномных взаимодействиях.

Средние значения P_i для кодирующих генов сравнительно низкие (в пределах 0,002–0,01). Наибольшие пики отмечены у *psbA* (0,00938), *psbM* (0,00952), *petD* (0,00880), *rps16* (0,00855), *ndhF* (0,01044), *ndhH* (0,00904), *ycf1* (0,00968) (Рисунок 2А). Ген *ycf1* — наиболее вариабельный среди CDS, что согласуется с литературными данными: он считается универсальным маркером для видовой диагностики. В целом вариабельность CDS умеренная, что отражает консервативность белок-кодирующих регионов хлоропластного генома.



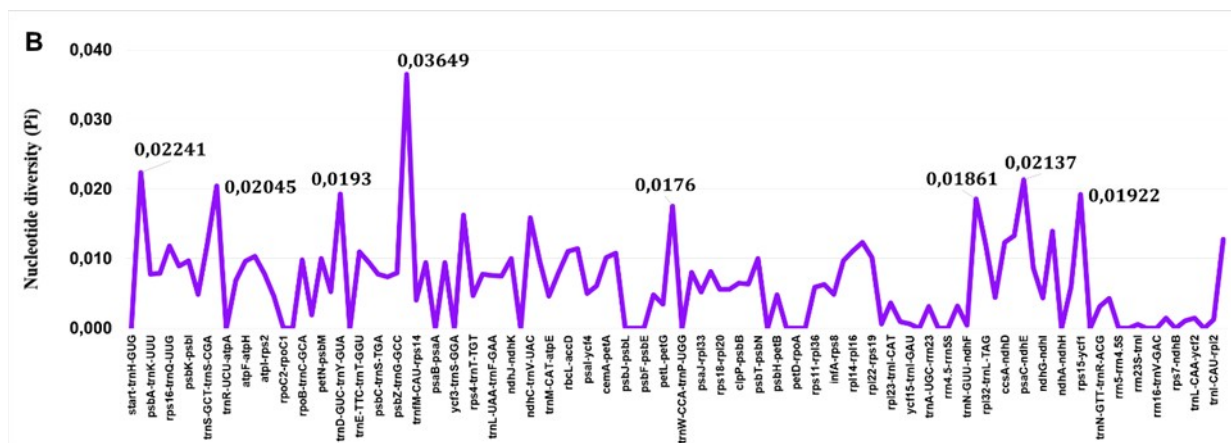


Рисунок 2. Сравнительный анализ нуклеотидного разнообразия (Pi) хлоропластных геномов 5 видов рода *Leonurus*. А — кодирующие области (CDS) ($P_i > 0,0076$); В — некодирующие области (IGS) ($P_i > 0,01145$).

Наибольшая вариабельность наблюдается в некодирующих межгенных спейсерах (IGS), в среднем до 0,02–0,036, чем у CDS. Наиболее вариабельные спейсеры: *trnH-psbA* (0,02158)— классический штрихкод растений; *matK-rps16* (0,02034); *psbZ-trnG* (0,01897); *trnL-trnF* (0,03649) — наиболее высокий пик, традиционно используется в филогенетике; *ccsA-ndhD* (0,02111); *ycf1-rps15* (0,01917) (Рисунок 2В). Эти регионы показывают значительный потенциал как молекулярные маркеры для дискриминации близких видов *Leonurus*.

Таким образом, среди CDS наибольший интерес представляют гены *ycf1*, *ndhF* и *psbA*, а среди IGS — *trnH-psbA*, *matK-rps16* и *trnL-trnF*. Эти регионы могут быть рекомендованы как информативные маркеры для дальнейших таксономических, филогенетических и популяционно-генетических исследований *Leonurus*, а так же могут быть использованы для разработки специфических молекулярных маркеров. Это имеет особое значение, учитывая фармакологическую ценность видов рода и необходимость предотвращения фальсификации лекарственного растительного сырья.

Литература:

- 1) Жохова Е. В. Родионов А. В. Повыдыш М. Н., Гончаров М. Ю., Протасова Я. А., Яковлев Г. П. Современное состояние и перспективы

использования ДНК-штрихкодирования и ДНК-фингерпринтинга для анализа качества лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов. Успехи современной биологии, 2019, Т.139, № 1, с. 25–40.

2) Флора СССР. / ред. В. Л. Комаров, С. В. Юзепчук, Б. К. Шишкин. — Т. 20. — М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1954. — С. 541.

3) Parveen I., Gafner S., Tehen N., Murch S. J., Khan I. A. DNA Barcoding for the Identification of Botanicals in Herbal Medicine and Dietary Supplements: Strengths and Limitations // *Planta Medica*. 2016. Vol. 82, № 14. P. 1225–1235. DOI: 10.1055/s-0042-111208.

4) Акопов Ф.М. Сердечно-сосудистые средства растительного происхождения. — М.: Медицина, 1990. — 192 с.

5) Koshovyi, O., Raal, A., Kireyev, I., Tryshchuk, N., Ilina, T., Romanenko, Y., Kovalenko, S. M., & Bunyatyan, N. (2021). Phytochemical and Psychotropic Research of Motherwort (*Leonurus cardiaca* L.) Modified Dry Extracts. *Plants*, 10(2), 230. <https://doi.org/10.3390/plants10020230>

6) Liu S., Sun C., Tang H., Peng C., Peng F. *Leonurine*: a comprehensive review of pharmacokinetics, pharmacodynamics, and toxicology // *Frontiers in Pharmacology*. – 2024. – Vol. 15. – Article 1428406. – DOI: 10.3389/fphar.2024.1428406.

7) Wang Y., Wang J., Garran T.A. et al. Genetic diversity and population divergence of *Leonurus japonicus* and its distribution dynamic changes from the last interglacial to the present in China. *BMC Plant Biol* 23, 276 (2023). <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04284-x>