

Никитина Елена Васильевна,
Старший научный сотрудник Институт ботаники Академии наук
Республики Узбекистан,
E-mail: elenanikita2013@rambler.ru
Гуламов Рустам Комилжон угли,
Доцент Наманганского государственного университета,
E-mail: gulomovr92@mail.ru
Ахроров Бобуржон Навруз угли,
Магистр Наманганского государственного университета
E-mail: bobur@mail.ru

УДК: 577.2.08+582.949.2

ВАРИАБЕЛЬНЫЕ УЧАСТКИ ХЛОРОПЛАСТНЫХ ГЕНОМОВ *PHLOMOIDES* MOENCH (LAMIACEAE) - КАК МИШЕНИ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ СПЕЦИФИЧНЫХ ПРАЙМЕРОВ

Аннотация: Одним из ключевых этапов при выборе молекулярных маркеров для филогенетических и популяционных исследований является выявление наиболее изменчивых участков генома. Для оценки уровня вариабельности последовательностей широко применяется показатель нуклеотидного разнообразия (P_i , nucleotide diversity). Настоящее исследование направлено на выявление наиболее изменчивых участков хлоропластного генома представителей рода *Phlomoides* с целью определения эффективных молекулярных маркеров для дальнейших филогенетических и таксономических исследований. Анализ нуклеотидного разнообразия (P_i), проведённый методом скользящего окна, показал высокий уровень вариабельности среди кодирующих последовательностей (CDS) *matK*, *rpoC2*, *ndhF*, *ycf1*, а среди межгенных регионов (IGS) — *psbI-trnS-GCU*, *petB-petD*, и *trnL-UAG-ccsA*, *ndhE-ndhG*, *ndhH-rps15*. Полученные данные отражают степень внутригрупповой вариабельности и являются объективным критерием для сравнения различных генов и межгенных регионов, могут быть использованы для разработки ДНК-маркеров и идентификации таксонов *Phlomoides*.

Ключевые слова: *Phlomoides*, нуклеотидное разнообразие, P_i -анализ, хлоропластный ДНК

Elena Vasilievna Nikitina,
Senior Researcher, Institute of Botany, Academy of Sciences of the Republic of
Uzbekistan,
Rustam Gulamov Komiljon ugli,
Associate Professor, Namangan State University;
Boburjon Akhrorov Navruz ugli,
Master's Student, Namangan State University

VARIABLE REGIONS OF *PHLOMOIDES* MOENCH (LAMIACEAE)

CHLOROPLAST GENOMES AS TARGETS FOR THE DEVELOPMENT OF SPECIES-SPECIFIC PRIMERS

Abstract: One of the key steps in selecting molecular markers for phylogenetic and population studies is identifying the most variable regions of the genome. Nucleotide diversity (P_i) is widely used as an indicator to assess the level of sequence variability. This study aims to identify the most variable regions of the chloroplast genome in representatives of the genus *Phlomoidea* in order to determine effective molecular markers for further phylogenetic and taxonomic research. Sliding-window analysis of nucleotide diversity (P_i) revealed a high level of variability among coding sequences (CDS), particularly *matK*, *rpoC2*, *ndhF*, and *ycf1*, and among intergenic regions (IGS), notably *psbI-trnS-GCU*, *petB-petD*, *trnL-UAG-ccsA*, *ndhE-ndhG*, and *ndhH-rps15*. The obtained data reflect the degree of intragroup variability and provide an objective criterion for comparing different genes and intergenic regions. They can be used for developing DNA markers and for taxon identification within *Phlomoidea*.

Keywords: *Phlomoidea*, nucleotide diversity, P_i analysis, chloroplast DNA.

Nikitina Elena Vasilevna

O'zbekiston Respublikasi Fanlar akademiyasi Botanika instituti katta ilmiy
xodimi

G'ulomov Rustamjon Komiljon o'g'li

Namangan davlat universiteti dotsenti

Ahrorov Bobur Navruz o'g'li

Namangan davlat universiteti magistranti

PHLOMOIDES MOENCH (LAMIACEAE) XLOROPLAST GENOMLARINING O'ZGARUVCHAN HUDUDLARI — TURGA XOS PRIMERLAR ISHLAB CHIQISH UCHUN NISHON UCHASTKALAR

Annotatsiya: Molekulyar markerlarni filogenetik va populyatsion tadqiqotlar uchun tanlashdagi muhim bosqichlardan biri genomning eng o'zgaruvchan uchastkalarini aniqlashdir. Ketma-ketliklarning variabelligi darajasini baholashda nukleotid xilma-xilligi (P_i , nucleotide diversity) ko'rsatkichi keng qo'llaniladi. Ushbu tadqiqot *Phlomoidea* turkum turlarining xloroplast genomi tarkibida eng o'zgaruvchan uchastkalarni aniqlashga qaratilgan bo'lib, keyingi filogenetik va taksonomik izlanishlar uchun samarali molekulyar markerlarni belgilashni maqsad qiladi. Sirg'aluvchi oyna (sliding-window) usulida o'tkazilgan nukleotid xilma-xilligi (P_i) tahlili kodlovchi ketma-ketliklar (CDS) orasida, xususan *matK*, *rpoC2*, *ndhF* va *ycf1* genlarida, yuqori variabellik mavjudligini ko'rsatdi; genlararo hududlar (IGS) orasida esa *psbI-trnS-GCU*, *petB-petD*, *trnL-UAG-ccsA*, *ndhE-ndhG* va *ndhH-rps15* uchastkalari eng o'zgaruvchan bo'ldi. Olingan natijalar guruh ichidagi variabellik darajasini aks ettiradi hamda turli genlar va genlararo hududlarni taqqoslash uchun obyektiv mezon bo'lib xizmat qiladi. Ular *Phlomoidea* taksonlarini identifikatsiya qilish va DNK-markerlarni ishlab chiqishda qo'llanishi mumkin.

Kalit so'zlar: *Phlomoidea*, nukleotid xilma-xilligi, P_i -tahlil, xloroplast DNK

Введение

Phlomoides Moench (Lamiaceae, подсемейство Lamioideae, триба Phlomideae) представляет одну из наиболее таксономически сложных и морфологически разнообразных линий в составе Lamiaceae. Исторически *Phlomoides* часто рассматривали в широком объёме рода *Phlomis* на уровне секции, и лишь позднее он получил широкое признание как самостоятельный род. Такое «секционное» трактование *Phlomis* (sect. *Phlomoides*) было принято рядом классических таксономических систем и неоднократно отмечается в современных сводках по группе [9, 13, 14, 15].

В настоящее время *Phlomoides* трактуется в широком объёме и включает примерно 150–170 видов [9]. Эта оценка согласуется с таксономической базой Plants of the World Online [4], где для *Phlomoides* Moench приводится 181 принятый вид. Род широко распространён по Евразии; однако основные «горячие точки» разнообразия приурочены к горностепным и (полу)пустынным ландшафтам трёх регионов – Китая, Иранского нагорья и Средней Азии, которые на основании современных филогенетических и флористических данных интерпретируются как вероятная первичная область происхождения с последующим расширением ареала на восток [2, 5, 12, 16]. Вторичные центры диверсификации предполагаются в юго-западном Китае [8]. Для Средней Азии характерен особенно высокий эндемизм *Phlomoides*: в *Conspectus Florae Asiae Mediae* было указано 67 видов [10]. Наиболее современный региональный обзор приводит 79 видов, большинство из которых ограничено горными системами Тянь-Шаня и Памиро-Алая [11]. В Узбекистане в настоящее время признаются 43 вида *Phlomoides* [7].

Хлоропластные геномы (пластомы) обеспечивают надёжную основу для систематики растений, поскольку пластомы наземных растений обычно консервативны по общей архитектуре и организации генов – чаще всего представляют собой одну кольцевую молекулу с квадрипартитной структурой

(LSC и SSC, разделённые двумя инвертированными повторами, IR) и в целом стабильным составом/порядком генов, – но при этом сохраняют достаточный уровень последовательной и структурной вариабельности для филогенетических и сравнительно-геномных исследований.

Благодаря сравнительно низким темпам нуклеотидных замен, высокой консервативности геномной архитектуры и преимущественно однородительскому - главным образом материнскому - наследованию у семенных растений, хлоропластные геномы широко применяются в филогенетических и популяционно-генетических исследованиях.

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

Материалы исследования

Для анализа использовались полные хлоропластные геномы 17 видов рода *Phlomoïdes*, полученные из базы NCBI, а также секвенированные виды из Узбекистана (*Phlomoïdes isochila* (Pazij & Vved.) Salmaki, *Ph. anisochila* (Pazij & Vved.) Salmaki, *Ph. kaufmanniana* (Regel) Adylov, Kamelin & Makhm). Выравнивание последовательностей проводилось в MAFFT. Анализ нуклеотидного разнообразия (P_i) был выполнен в программе DnaSP v6.12.03 методом скользящего окна с параметрами: размер окна – 600 п.н., шаг – 200 п.н. Были отдельно проанализированы CDS и IGS регионы. Горячими участками считались те, где $P_i > 0.025$. Работа выполнена в рамках проекта «Endemizm fenomeni va uning molekulyar-genetik asoslari» (№ ПФИ-5).

Результаты и обсуждение

Для оценки нуклеотидного разнообразия (P_i) у представителей рода *Phlomoïdes* был проведено выравнивание полных хлоропластных геномов секвенированных редких видов флоры Узбекистана *Ph. isochila*, *Ph. anisochila*, *Ph. kaufmanniana* с взятыми из GenBank последовательностями 17 видов *Phlomoïdes*. По результатам выравнивания было выявлено 3515 полиморфных (сегрегирующих) сайтов (S), 3594 мутаций (Eta) и 1510 парсимоний-

информативных сайтов из 152 883 нуклеотидных последовательностей. Среднее значение нуклеотидного разнообразия составило $P_i = 0,00414$, что указывает на умеренный уровень дивергенции.

В ходе сканирующего анализа нуклеотидного разнообразия (P_i) по полным хлоропластным геномам представителей рода *Phlomoidea* выявил, что средний уровень вариабельности составляет около $P_i \approx 0,007–0,008$, что соответствует умеренно консервативному состоянию хпДНК, типичному для представителей *Lamioideae*.

При этом по геному выявлены выраженные пики гипервариабельности, значения которых превышают 0,010–0,018. Наиболее вариабельные участки приходятся на межгенные спейсеры *psbA-trnK-UUU* (0,01054), *rps16-trnQ-UUG* (0,0984), *trnT-UGU-trnL-UAA* (0,01282), *ndhC-trnV-UAC* (0,01056), *petA-psbJ* (0, 01151), а также на кодирующие регионы *ndhF* (0,01395) и *ycf1* (0,01634) (Рисунок 1).

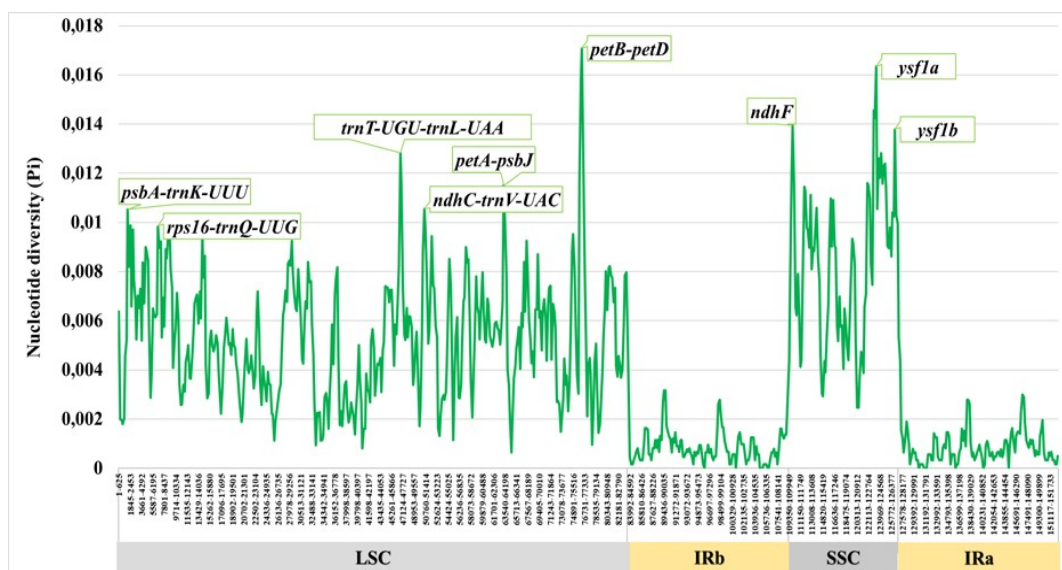


Рисунок 1. Анализ нуклеотидного разнообразия (P_i) хлоропластных геномов 20 видов рода *Phlomoidea*, выполненный методом скользящего окна (длина окна – 600 п.н., шаг – 200 п.н.). По оси X показано положение средней точки окна, по оси Y – значение нуклеотидного разнообразия (P_i).

Наиболее вариабельный участок для рода *Phlomoidea* обнаружен в регионе *petB-petD* ($P_i=0,01708$), представляя собой специфический межгенный спейсер, отличающийся повышенной чувствительностью к эволюционным изменениям. Подобная высокая вариабельность указывает на

ускоренные процессы нуклеотидных замен в данном регионе, что делает его ценным молекулярным маркером для выявления филогенетических связей близкородственных видов и для использования в популяционно-генетических исследованиях.

В сочетании с другими гипервариабельными зонами (например, *ndhF* и *usc1*) данный участок способен существенно повысить разрешающую способность при построении филогенетических реконструкций внутри рода *Phlomoidea* и уточнении границ между близкими таксонами. Таким образом, именно указанные зоны представляют наибольший интерес для использования в качестве молекулярных маркеров при проведении филогенетических реконструкций, популяционно-генетических исследований и видового баркодинга рода *Phlomoidea*. Исследование нуклеотидного разнообразия (P_i) хлоропластного генома рода *Phlomoidea* показало различия в уровне изменчивости между кодирующими участками (CDS) и межгенными спейсерами (IGS).

Кодирующие последовательности (CDS) в целом характеризуются низким уровнем вариабельности, что отражает их высокую функциональную консервативность. Средние значения P_i для большинства генов составляют 0,003–0,005, однако отдельные гены продемонстрировали заметно более высокие показатели. Так, *matK* ($P_i = 0,00676$), *rpoC2* ($P_i = 0,00915$), *ndhF* ($P_i = 0,01008$), *psaC* ($P_i = 0,00892$) и *usc1* ($P_i = 0,00937$) показали наибольший уровень изменчивости (Рисунок 2А). Эти гены хорошо известны как маркеры для филогенетических исследований растений, и полученные данные подтверждают их ключевую роль и для рода *Phlomoidea*.

В отличие от CDS, межгенные спейсеры и интроны (IGS) продемонстрировали значительно более высокий уровень полиморфизма. Средние значения P_i в этих регионах достигали 0,010–0,015, а для отдельных участков превышали 0,020–0,028. Наиболее вариабельными оказались регионы *psbI-trnS-GCU* ($P_i = 0,02287$), *petB-petD* ($P_i = 0,02852$) и *trnL-UAG*–

ccsA ($P_i = 0,02823$), *ndhE-ndhG* ($P_i = 0,01579$), а также *ndhH-rps15* ($P_i = 0,01568$) (Рисунок 2В).

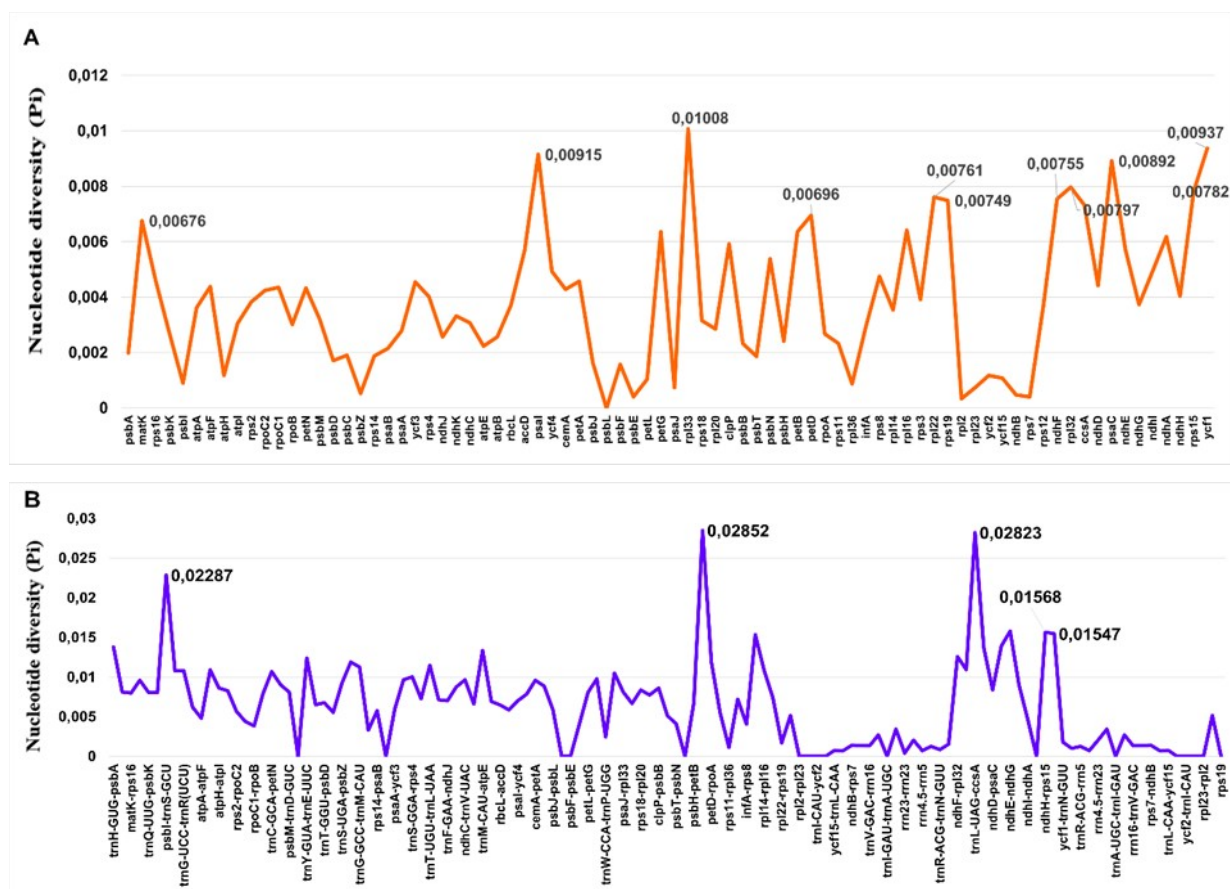


Рисунок 2. Сравнительный анализ нуклеотидного разнообразия (P_i) хлоропластных геномов 20 видов рода *Phlomis*. А – кодирующие области (CDS); В – некодирующие области (IGS).

Таким образом, при анализе нуклеотидного разнообразия для рода *Phlomis* выявлено, что значения P_i для большинства кодирующих и межгенных участков хлоропластного генома у представителей рода сравнительно невысоки. Центры видового богатства рода *Phlomis* сосредоточены главным образом в горностепных и (полу)пустынных районах трёх регионов: в Китае, на Иранском нагорье и в Средней Азии. Данные регионы, являясь основными центрами разнообразия рода, характеризуются сравнительно молодыми радиациями и адаптацией видов к сходным экологическим условиям горностепных и аридных ландшафтов. Долгое время *Phlomis* рассматривался лишь как секция рода *Phlomis* L. и лишь на основе морфологических и молекулярных данных был выделен в самостоятельный

род [1, 3, 6]. Это означает, что дивергенция между *Phlomis* и *Phlomoïdes* является относительно недавним событием в эволюционном масштабе, а большинство видов *Phlomoïdes* сохранили близкое филогенетическое родство и консервативные признаки срДНК. Вследствие этого генетические различия на уровне хлоропластного генома пока выражены слабо, что и проявляется в виде сравнительно низких значений нуклеотидного разнообразия. В результате большинство изученных таксонов демонстрирует близкое филогенетическое родство и, как следствие, ограниченные различия в последовательностях хпДНК. Таким образом, невысокая вариабельность последовательностей у *Phlomoïdes* отражает как относительную молодость дивергенции внутри рода, так и географическую и экологическую приуроченность изученного материала к Ирано-Туранской флористической области.

Заключение

Таким образом, для рода *Phlomoïdes* выявлены «гипервариабельные зоны» хпДНК, которые являются наиболее перспективными для применения баркодинговых исследований. Среди CDS наибольший интерес представляют гены *matK*, *rpoC2*, *ndhF*, и *ycf1*, а среди IGS – *psbI-trnS-GCU*, *petB–petD*, и *trnL-UAG–ccsA*, *ndhE-ndhG*, а также *ndhH–rps15*.

Эти регионы могут быть рекомендованы как информативные маркеры для дальнейших таксономических, филогенетических и популяционно-генетических исследований *Phlomoïdes*, а также 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. Bendiksby M., Thorbek L., Scheen A.-C., et al. An updated phylogeny and classification of *Lamiaceae* subfamily *Lamioideae* // *Taxon*. – 2011. – Vol. 60. – P. 471–484.

2. Khosroshahi E. E., Salmaki Y. Evolution of trichome types and its systematic significance in the genus *Phlomoides* (*Lamioideae*–*Lamiaceae*) // Nordic Journal of Botany. – 2019. – Vol. 37, No. 5. – Article e02132. <https://doi.org/10.1111/njb.02132>.

3. Mathiesen C., Scheen A.-C., Lindqvist C. Phylogeny and biogeography of the lamiod genus *Phlomis* (*Lamiaceae*) // Kew Bulletin. – 2011. – Vol. 66, No. 1. – P. 83–99. <https://doi.org/10.1007/s12225-011-9257-0>.

4. Plants of the World Online (POWO). Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Published on the Internet: <https://powo.science.kew.org/>

5. Salmaki Y., Zarre S., Ryding O., Lindqvist C., Scheunert A., Bräuchler C., Heubl G. Phylogeny of the tribe *Phlomideae* (*Lamioideae*: *Lamiaceae*) with special focus on *Eremostachys* and *Phlomoides*: new insights from nuclear and chloroplast sequences // Taxon. – 2012. – Vol. 61, No. 1. – P. 161–179. <https://doi.org/10.1002/tax.611012>.

6. Scheen A.-C., Bendiksby M., Ryding O., Mathiesen C., Albert V. A., Lindqvist C. Molecular phylogenetics, character evolution, and suprageneric classification of *Lamioideae* (*Lamiaceae*) // Annals of the Missouri Botanical Garden. — 2010. — Vol. 97(2). — P. 191–217. <https://doi.org/10.3417/2007174>.

7. Gulamov R. K., Tagayev I., Sheraliev A. Synopsis of some species of the genus *Phlomoides* Moench (*Lamiaceae*) // Research Focus International Scientific Journal. –2025. –Vol. 4, No. 1.–P. 36–42. <https://doi.org/10.5281/zenodo.14789363>.

8. Zhao W., Guo L., Yang Y., Wang Y., Yang L., Wei C., Guo J., Yan K., Chen H., Yang Z., Li Y. Complete chloroplast genome sequences of *Phlomis fruticosa* and *Phlomoides strigosa* and comparative analysis of the genus *Phlomis* sensu lato (*Lamiaceae*) // Frontiers in Plant Science. – 2022. – Vol. 13. – 1022273. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1022273>.

9. Zhao Y., Chen Y. P., Drew B. T., Zhao F., Almasi M., Turginov O. T., Xiao J. F., Karimi A. G., Salmaki Y., Yu X. Q., Xiang C. L. Molecular phylogeny and taxonomy of *Phlomoides* (*Lamiaceae*, subfamily *Lamioideae*) in China: insights

from molecular and morphological data // Plant Diversity. – 2024a. – Vol. 46(4). – P. 462–475. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2024.04.011>

10. Адылов Т. А., Махмедов А. М. *Labiatae* — *Phlomoides* Moench // Определитель растений Средней Азии: Критический конспект флоры. — Ташкент: Фан, 1987. — Т. 9. — С. 82–107.

11. Определитель растений Средней Азии: Критический конспект флоры Средней Азии. Т. 11 / Гл. ред. Ф. О. Хасанов. — Ташкент: Фан, 2015. — 487 с.

12. Черепанов С. К. Сосудистые растения России и сопредельных государств (в пределах бывшего СССР). — Санкт-Петербург: Мир и семья–95, 1995. — 992 с.

13. Min-Su Park, Nu-Ree Na, Chang-Gee Jang, Rustam Gulomov and Komiljon Tojibaev. The complete chloroplast genome sequence of *Phlomoides kirghisorum* Adylov, Kamelin & Makhmedov 1987 (Lamiaceae), an endemic species of Fergana Valley. MITOCHONDRIAL DNA PART B: RESOURCES 2024, VOL. 9, NO. 1, 104–108. <https://doi.org/10.1080/23802359.2023.2292159>

14. Gulomov R.K. Distribution of the genus *Phlomoides* Moench in the Fergana Valley (taxonomy, geography, ecology and conservation): avtoref. Diss. PhD. –Tashkent: 2022. – p. 43.

15. Gulomov R.K., Batoshov A.R. Morphological Phylogeny of the Species *Phlomoides* Moench (Lamiaceae) Distributed in the Fergana Valley // International Journal of Virology and Molecular Biology. – USA, 2022. – № 11 (1). – P. 9-15. <https://doi.org/10.5923/j.ijymb.20221101.03>

16. Tojibaev KS, Karimov FI, Hoshimov HR, Gulomov R, Lazkov GA, Jang C-G, Gil H-Y, Jang J-E, Batoshov AR, Iskandarov A, Choi HJ (2023) Important plant areas (IPAs) in the Fergana Valley (Central Asia): The Bozbu-Too-Ungortepa massif. Nature Conservation 51: 13–70. <https://doi.org/10.3897/natureconservation.51.94477>