

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

УДК 577.2

doi: 10.26907/2542-064X.2022.3.408-437

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БАРКОДИРОВАНИЯ ДЛЯ СОХРАНЕНИЯ РЕДКИХ ВИДОВ ФЛОРЫ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН

Ф.У. Мустафина¹, Д.Н. Жамалова¹, Д.Э. Турдиев¹,
Г.Т. Курбаниязова¹, А.Дж. Газиев¹, Н.Ю. Бешико¹, К.Ш. Тожибаев¹,
З.З. Ибрагимов², К.Т. Бобоев³

¹Институт ботаники Академии наук Республики Узбекистан,
г. Ташкент, 100125, Республика Узбекистан

²Институт биоорганической химии имени А.С. Садькова Академии наук Республики
Узбекистан, г. Ташкент, 100143, Республика Узбекистан

³НИИ гематологии и переливания крови Министерства здравоохранения Республики
Узбекистан, г. Ташкент, 100097, Республика Узбекистан

Аннотация

В статье впервые представлена референсная база данных нуклеотидных последовательностей по трем ДНК-баркодам: ITS2, *matK* и *rbcL* – для 65 редких, исчезающих видов флоры Республики Узбекистан (133 образца, по два образца для каждого вида), в том числе 23 однодольных и 42 двудольных видов. Наиболее вариабельным, легко амплифицируемым и секвенируемым участком оказался ITS2 как для однодольных, так и для двудольных видов. Данный участок рекомендован в качестве основного ДНК-баркода. Референсная база данных, загруженная на платформу BOLD v4, может быть использована фармацевтическими компаниями, природоохранными и таможенными службами, а также в филогенетических исследованиях.

Ключевые слова: баркодирование, редкие виды, эндемики, сохранение биоразнообразия, BOLD

Введение

Точная и быстрая идентификация видов является первостепенной задачей для исследований в области систематики, флористики, морфологии и эволюции сосудистых растений. Развивающееся интенсивными темпами направление – баркодирование растений, или паспортизация, на основе коротких, от 400 до 800 п.о., нуклеотидных последовательностей (ДНК-баркодинг) – позволяет детектировать генетический материал без наличия таксономически важных признаков, а также позволяет быстро и точно определить известные виды растений при наличии референсной библиотеки нуклеотидных последовательностей.

Первоначально ДНК-баркодинг использовался для выявления видовой принадлежности растений в рамках проекта «Дерево жизни» [1]. Данный метод стал универсальным после того, как его начали применять для идентификации видов на всех этапах их жизненного развития, включая плоды, семена, проростки, зрелые

индивиды, для анализа поврежденных растений и образцов фекалий животных, данный метод стал универсальным.

ДНК-баркод может быть эффективным инструментом оценки биоразнообразия при идентификации новых для науки видов, в том числе криптических [2]. Кроме того, ДНК-баркод позволяет выявить функциональное сходство исследуемых видов, в дополнение к филогенетическому. К. Баралото с соавторами [3] обнаружили 17 общих функциональных признаков у 668 видов, произрастающих в лесах северной Амазонки, с использованием ДНК-баркодов.

Баркодирование дает возможность установить точные границы распространения видов и помогает выявлять новые таксоны. Генетические маркеры ДНК-баркода используются для идентификации и определения качества коммерческих продуктов, в защите видов, которым угрожает исчезновение, от незаконной торговли, а также при документировании использования лесных генетических ресурсов местным населением. Более широкое использование ДНК-баркода позволяет сохранять генетические ресурсы растений, а также виды животных, которые являются объектами купли-продажи на мировых рынках.

Необходимость в точной и надежной оценке древесной продукции с применением недорогих и быстрых методов стимулировало развитие ДНК-баркодинга многих древесных лесных пород и его использование во многих регионах, отличающихся высоким разнообразием лесной продукции. А.Н. Мюллнер с соавторами [4] протестировали ряд маркеров с целью определения ДНК-баркода для некоторых видов махогонного дерева семейства Meliaceae Juss. Несмотря на то что большинство маркеров были недостаточно точными для идентификации видов, ITS оказался наиболее приемлемым маркером, предложенным для идентификации деревьев, перечисленных Конвенцией о международной торговле видами и находящимися под угрозой исчезновения (CITES). ДНК-баркодинг применяется для идентификации растительного сырья при производстве фармацевтической продукции. Данный метод позволяет избежать возможных расходов от неправильного идентифицирования растительного сырья, особенно при проведении дорогостоящих биотехнологических процессов.

Целый ряд исследований основан на применении различных молекулярных маркеров, однако многие из них не позволяли точно идентифицировать исследуемые виды. Наиболее часто используемыми и предлагаемыми рабочей группой по растениям СВОЛ ДНК-участками являются *rbcL*, *matK*, *trnH-A* и ITS [5]. Среди проблем, связанных с ДНК-баркодированием, можно отметить следующие: 1) отсутствие библиотеки ДНК-баркодов; 2) отсутствие списка тривиальных и научных названий растений.

В настоящей статье представлены результаты исследований, целью которых являлось создание библиотеки ДНК-баркодов редких и исчезающих видов флоры Республики Узбекистан, пополнение системы данных BOLD v4 нуклеотидными последовательностями, которые могут быть использованы фармацевтическими компаниями для производства сырья растительного происхождения, природоохранными и таможенными службами в борьбе с незаконным сбором редких видов растений в природе.

Материал и методы

Объектом исследований стали 65 редких, исчезающих и/или эндемичных видов флоры Республики Узбекистан, относящихся к 7 родам и 5 семействам: 15 видов рода *Astragalus* L. (Fabaceae Lindl.), 2 вида рода *Dracocephalum* L. (Lamiaceae Martinov), 3 вида рода *Ferula* L. (Apiaceae Lindl.), 16 видов рода *Hedysarum* L. (Fabaceae Lindl.), 4 вида рода *Iris* L. (Iridaceae Juss.), 6 видов рода *Salvia* L. (Lamiaceae Martinov) и 19 видов рода *Tulipa* L. (Liliaceae Juss.) (рис. 1). Для каждого вида исследованы по 2 образца, собранных с разных индивидов; всего 133 образца. Список видов представлен в табл. 1, 2.

Сбор материала проводился в ходе экспедиционных обследований различных районов Республики Узбекистан. Полученная по результатам исследования база данных вместе с гербарным материалом передана в Национальный гербарный фонд TASH. Гербарные образцы оцифрованы путем сканирования, каждому гербарному образцу присвоен уникальный регистрационный номер.

Сушку растительного материала осуществляли в пакетиках с использованием индикаторного силикогеля в течение 7–10 дней. Сухие образцы сохраняли в морозильнике при температуре -20°C .

Выделение ДНК. Общая геномная ДНК была выделена с помощью СТАБ (гексадецилтриметиламмоний бромид) [6] из высушенных в силикогеле листьев. Тотальная геномная ДНК была растворена в ТЕ-буфере (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) до концентрации 50 нг/мкл. Экстракцию ДНК каждого образца проводили в трех повторностях.

ПЦР-амплификация ДНК и подготовка образцов к секвенированию. ПЦР-амплификация ДНК осуществлялась с использованием трех пар праймеров ITS2, *rbcL* и *matK* мастер миксами Invitrogen Platinum Hot Start PCR (2X) и Thermo Scientific Dream Taq Hot Start (2X). Три пары праймеров следующей последовательности были синтезированы в Институте химии растительных веществ Академии наук Республики Узбекистан:

ITS2: 5'-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3',
5'-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3';
matK-*xf/matK*-MALP-R1: 5'-ТААТТТАСГАТСААТТКАТТС-3',
5'-ACAAGAAAGTCGAAGTAT-3';
rbcL: 5'-ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC-3',
5'-GTAAATCAAGTCCACCGCG-3'.

ПЦР-продукты визуализировались в 1.2%-агарозном геле. Используются следующие режимы проведения ПЦР с праймерами ITS2: 94°C , 5 мин (один цикл); 94°C , 30 с, 60°C , 1 мин и 72°C , 1 мин (35 циклов); 72°C , 45 мин, с дальнейшим хранением при 4°C . Основываясь на экспериментальных данных, температура отжига праймеров при использовании *matK*-*xf/matK* была установлена 50°C , *rbcL* – 56°C . При неудовлетворительном результате образцы амплифицировались повторно 2–3 раза до получения четких фрагментов ДНК при разделении в 1.2%-агарозном геле. При неудовлетворительном результате материал не использовался в дальнейших исследованиях.









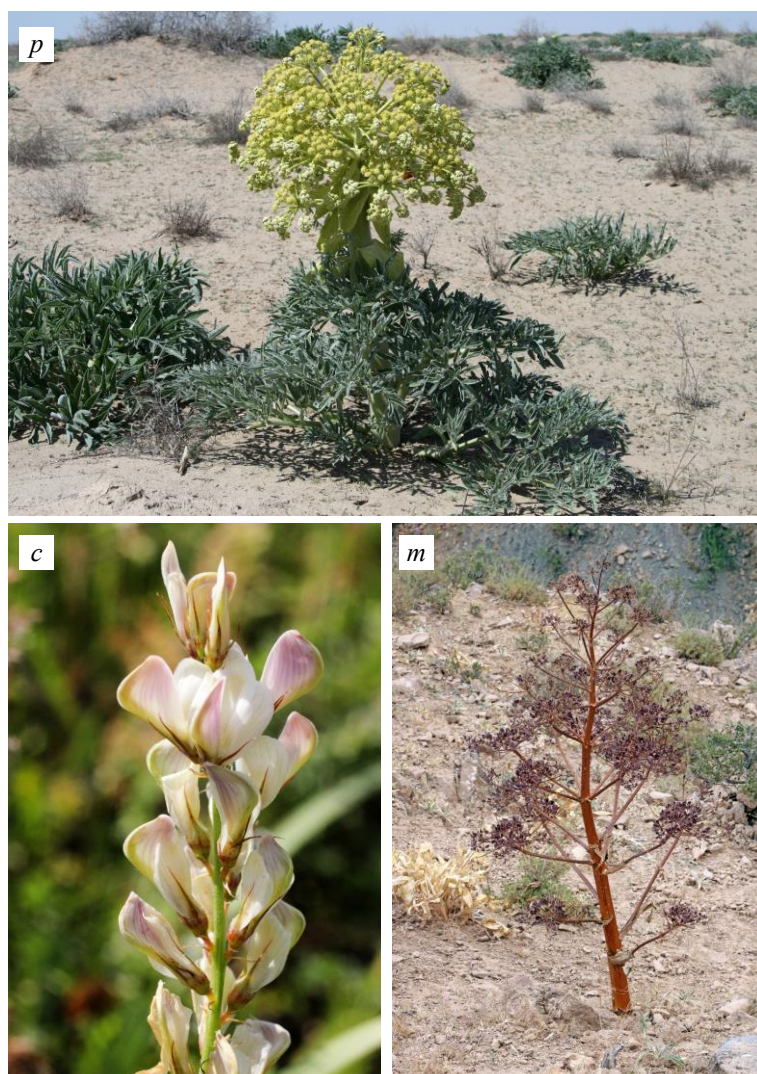


Рис. 1. Объекты исследований: а) *Iris orchioides* Carrière; б) *Iris magnifica* Vved.; в) *Tulipa butkovii* Botschantz.; г) *Tulipa dubia* Vved.; д) *Tulipa greigii* Regel.; е) *Tulipa ingens* Hoog; ж) *Tulipa kaufmanniana* Regel; з) *Tulipa lehmanniana* Merckl.; и) *Tulipa vvedenskyi* Botschantz.; к) *Tulipa carinata* Vved.; л) *Tulipa kaufmanniana* Regel; м) *Astragalus ptercephalus* Bunge; н) *Astragalus xanthomeloides* Korovin & Popov; о) *Astragalus ptercephalus* Bunge; п) *Ferula tadshikorum* Pimenov; р) *Ferula foetida* (Bunge) Regel; с) *Hedysarum taschkenticum* Popov; м) *Ferula tadshikorum* Pimenov

ПЦР-продукты очищались с использованием набора ExoSap PCR Clean-Up Mini kit (Applied Biosystems, Inc., США) и визуализировались в 1.2%-агарозном геле (рис. 2, 3).

Циклическое секвенирование производилось со специфичными для ДНК-матрицы праймерами ITS2, *rbcL* и *matK* с использованием BigDye R Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Inc., США) в соответствии с протоколом GeneAmp PCR System 9700.

Табл. 1

Объекты исследований

Класс	Название рода и семейства	Экстрагировано ДНК	Секвенировано
Однодольные	<i>Iris</i> L.	12 образцов	8 образцов
	Iridaceae Juss.	4 вида	4 вида
	<i>Tulipa</i> L.	62 образцов	38 образцов
	Liliaceae Juss.	19 видов	19 видов
Двудольные	<i>Astragalus</i> L.	48 образцов	31 образец
	Fabaceae Lindl.	15 видов	15 видов
	<i>Dracocephalum</i> L.	11 образцов	8 образцов
	Lamiaceae Martinov	4 вида	2 вида
	<i>Ferula</i> L.	10 образцов	6 образцов
	Ariaceae Lindl.	3 вида	3 вида
	<i>Hedysarum</i> L.	47 образцов	32 образца
	Fabaceae Lindl.	16 видов	16 видов
	<i>Salvia</i> L.	28 образцов	10 образцов
Lamiaceae Martinov	6 видов	6 видов	
Всего		218 образцов 67 видов	133 образца 65 видов

Табл. 2

Информация по объектам исследований

№	Название вида	Полевой регистрационный № образца	Код образца (ДНК)	Код образца (BOLD)	Код процесса (BOLD)	Статус вида
1.	<i>Iris orchioides</i> <i>Carrière</i>	20_FB043	I3	Iris05	IRIS003-21	Статус 3. Редкое, эндемичное растение Западного Тянь-Шаня
2.	<i>Iris orchioides</i> <i>Carrière</i>	20_FB045 (unknown1)	I6	Iris06	IRIS004-21	Статус 3. Редкое, эндемичное растение Западного Тянь-Шаня
3.	<i>Iris hippolyti</i> (Vved.) Kamelin	19_TK21	I11	Iris 01	IRIS007-21	Статус 1. Редчайший узколокальный эндемик низкогорий Кызылкума
4.	<i>Iris hippolyti</i> (Vved.) Kamelin	20_ShX16	I12	Iris02	IRIS001-21	Статус 1. Редчайший узколокальный эндемик низкогорий Кызылкума
5.	<i>Iris magnifica</i> Vved	19_JD31	I12	Iris 03	IRIS008-21	Статус 2. Редкий эндемик Зеравшанского хребта
6.	<i>Iris magnifica</i> Vved	19_KU04		Iris04	IRIS002-21	Статус 2. Редкий эндемик Зеравшанского хребта
7.	<i>Iris svetlanæ</i> (Vved.) T.Hall & Seisums	19_KU03	I17	Iris07	IRIS005-21	Статус 2. Редкий эндемик Западного Памиро-Алая
8.	<i>Iris svetlanæ</i> (Vved.) T.Hall & Seisums	20_TK001	I19	Iris08	IRIS006-21	Статус 2. Редкий эндемик Западного Памиро-Алая

9.	<i>Tulipa affinis</i> Botschantz.	19_BN64	T66	Tulip01	TULIP001-21	Статус 3. Редкий эндемик Западного Памиро-Алая
10.	<i>Tulipa affinis</i> Botschantz.	19_BN62	T64	Tulip02	TULIP002-21	Статус 3. Редкий эндемик Западного Памиро-Алая
11.	<i>Tulipa butkovii</i> Botschantz.	20_FB063	T4	Tulip03	TULIP003-21	Статус 2. Редкий эндемик Западного Тянь-Шаня
12.	<i>Tulipa butkovii</i> Botschantz.	18_JCh02	T19	Tulip04	TULIP004-21	Статус 2. Редкий эндемик Западного Тянь-Шаня
13.	<i>Tulipa carinata</i> Vved	14_TO001	T47	Tulip05	TULIP005-21	Статус 3. Редкий эндемик Юго- Западного Памиро- Алая
14.	<i>Tulipa carinata</i> Vved	13_TK001	T46	Tulip06	TULIP006-21	Статус 3. Редкий эндемик Юго-За- падного Памиро- Алая
15.	<i>Tulipa</i> <i>dasytemon</i> (Regel) Regel	19_BN60	T24	Tulip07	TULIP007-21	Статус 3. Редкий вид Западного Тянь- Шаня и Памиро- Алая
16.	<i>Tulipa dubia</i> Vved.	20_FB057	T5	Tulip09	TULIP009-21	Статус 3. Редкий эндемик Западного Тянь-Шаня
17.	<i>Tulipa dubia</i> Vved.	19_BN65	T44	Tulip10	TULIP010-21	Статус 3. Редкий эндемик Западного Тянь-Шаня
18.	<i>Tulipa ferganica</i> Vved	17_JCh07	T18	Tulip11	TULIP011-21	Статус 2. Редкий эндемик Ферганской долины
19.	<i>Tulipa ferganica</i> Vved	20_TK002	T57	Tulip12	TULIP012-21	Статус 2. Редкий эндемик Ферганской долины
20.	<i>Tulipa</i> <i>fosteriana</i> W.Irving	17_BN07	T67	Tulip13	TULIP013-21	Статус 2. Очень уз- кий редкий эндемик Западного Памиро- Алая
21.	<i>Tulipa</i> <i>fosteriana</i> W.Irving	19_Unknown07	T69	Tulip14	TULIP014-21	Статус 2. Очень уз- кий редкий эндемик Западного Памиро- Алая
22.	<i>Tulipa greigi</i> Regel	Unknown03	T61	Tulip15	TULIP015-21	Статус 3. Редкий эндемик Западного Тянь-Шаня
23.	<i>Tulipa greigi</i> Regel	19_BN57	T25	Tulip16	TULIP016-21	Статус 3. Редкий эндемик Западного Тянь-Шаня
24.	<i>Tulipa ingens</i> Hoog	19_BN61	T26	Tulip17	TULIP017-21	Статус 3. Редкий эндемик Западного Памиро-Алая
25.	<i>Tulipa ingens</i> Hoog	19_Unknown11	T71	Tulip18	TULIP018-21	Статус 3. Редкий эндемик Западного Памиро-Алая

26.	<i>Tulipa intermedia</i> Tojibaev & J. de Groot	18_Unknown01	T52	Tulip19	TULIP019-21	Статус 2. Редкий вид адыров северной части Ферганской долины
27.	<i>Tulipa intermedia</i> Tojibaev & J. de Groot	17_JCh03	T30	Tulip20	TULIP020-21	Статус 2. Редкий вид адыров северной части Ферганской долины
28.	<i>Tulipa kaufmanniana</i> Regel	19_BN62v1	T31	Tulip21	TULIP021-21	Статус 3. Эндемик Западного Тянь-Шаня с сокращающимся ареалом и численностью
29.	<i>Tulipa kaufmanniana</i> Regel	19_uknown01	T32	Tulip22	TULIP022-21	Статус 3. Эндемик Западного Тянь-Шаня с сокращающимся ареалом и численностью
30.	<i>Tulipa korolkowii</i> Regel	20_TO113	T72	Tulip23	TULIP023-21	Статус 3. Редкий вид Юго-Западного Тянь-Шаня и Памиро-Алая с разрозненным ареалом
31.	<i>Tulipa korolkowii</i> Regel	20_BN11	T7	Tulip24	TULIP024-21	Статус 3. Редкий вид Юго-Западного Тянь-Шаня и Памиро-Алая с разрозненным ареалом
32.	<i>Tulipa lanata</i> Regel	19_Unknown04	T39	Tulip25	TULIP025-21	Статус 3. Редкий эндемик Памиро-Алая
33.	<i>Tulipa lanata</i> Regel	20_FB086	T15	Tulip26	TULIP026-21	Статус 3. Редкий эндемик Памиро-Алая
34.	<i>Tulipa lehmanniana</i> Merckl.	20_ShX07	T10	Tulip27	TULIP027-21	Статус 3. Редкий вид в Узбекистане
35.	<i>Tulipa lehmanniana</i> Merckl.	19_BN56	T34	Tulip28	TULIP028-21	Статус 3. Редкий вид в Узбекистане
36.	<i>Tulipa micheliana</i> Hoog	19_BN63	T35	Tulip29	TULIP029-21	Статус 3. Редкий вид Западного Памиро-Алая
37.	<i>Tulipa micheliana</i> Hoog	20_BN10	T12	Tulip30	TULIP030-21	Статус 3. Редкий вид Западного Памиро-Алая
38.	<i>Tulipa scharipovii</i> Tojibaev	09_TK002	T50	Tulip31	TULIP031-21	Статус 2. Эндемичное растение северных предгорий Ферганской долины
39.	<i>Tulipa scharipovii</i> Tojibaev	20_TO126	T13	Tulip32	TULIP032-21	Статус 2. Эндемичное растение северных предгорий Ферганской долины
40.	<i>Tulipa tubergeniana</i> Hoog	18_BN02	T36	Tulip33	TULIP033-21	Статус 3. Редкий эндемик Юго-Западного Памиро-Алая

41.	<i>Tulipa tubergeniana</i> Hoog	06_I001	T48	Tulip34	TULIP034-21	Статус 3. Редкий эндемик Юго-Западного Памиро-Алая
42.	<i>Tulipa uzbekistanica</i> Botschantz. & Sharipov	Unknown02	T45	Tulip35	TULIP035-21	Статус 1. Редкий эндемик Юго-Западного Памиро-Алая, находящийся на грани исчезновения
43.	<i>Tulipa uzbekistanica</i> Botschantz. & Sharipov	17_BN05	T38	Tulip36	TULIP036-21	Статус 1. Редкий эндемик Юго-Западного Памиро-Алая, находящийся на грани исчезновения
44.	<i>Tulipa vvedenskyi</i> Botschantz.	18_JCh03v	T63	Tulip37	TULIP037-21	Статус 3. Редкий эндемик Западного Тянь-Шаня
45.	<i>Tulipa vvedenskyi</i> Botschantz.	18_JCh01v	T41	Tulip38	TULIP038-21	Статус 3. Редкий эндемик Западного Тянь-Шаня
46.	<i>Tulipa dasystemon</i> (Regel) Regel	20_FB117	T54	Tulip08	TULIP008-21	Статус 3. Редкий вид Западного Тянь-Шаня и Памиро-Алая
47.	<i>Astragalus bucharicus</i> Regel	19NB53	A1	Astr 02	JDAST001-21	Статус 2. Редкий эндемик Юго-Западного Памиро-Алая
48.	<i>Astragalus farctissimus</i> Lipsky	12BN01	A3	Astr03	JDAST002-21	Эндемик Западного Памиро-Алая
49.	<i>Astragalus farctissimus</i> Lipsky	18_KU02	A44	Astr04	JDAST003-21	Эндемик Западного Памиро-Алая
50.	<i>Astragalus farctissimus</i> Lipsky	19_TO07	A4	Astr31	JDAST029-21	Эндемик Западного Памиро-Алая
51.	<i>Astragalus leptophysus</i> Vved.	16_UM01	A5	Astr05	JDAST004-21	Статус 2. Редкий реликтовый эндемик Западного Памиро-Алая
52.	<i>Astragalus leptophysus</i> Vved.	20_FB005	A6	Astr06	JDAST005-21	Статус 2. Редкий реликтовый эндемик Западного Памиро-Алая
53.	<i>Astragalus leptophysus</i> Vved.	20_AF012	A7	Astr32	JDAST030-21	Статус 2. Редкий реликтовый эндемик Западного Памиро-Алая
54.	<i>Astragalus lipskyi</i> Popov	12_TO01	A9	Astr07	JDAST006-21	Эндемик Памиро-Алая
55.	<i>Astragalus lipskyi</i> Popov	20_FB108	F8	Astr08	JDAST007-21	Эндемик Памиро-Алая
56.	<i>Astragalus nobilis</i> Bunge ex B.Fedtsch.	12_BN03	A52	Astr10	JDAST008-21	Эндемик Памиро-Алая

57.	<i>Astragalus nobilis</i> Bunge ex B.Fedtsch.	20_FB163	A42	Astr33	JDAST031-21	Эндемик Памиро-Алая
58.	<i>Astragalus pseudanthylloides</i> Gontsch.	13_TO01	A11	Astr11	JDAST009-21	Статус 2. Редкий эндемик Западного Гиссара
59.	<i>Astragalus pseudanthylloides</i> Gontsch.	19_PS02	A12	Astr12	JDAST010-21	Статус 2. Редкий эндемик Западного Гиссара
60.	<i>Astragalus pseudoeremophyssa</i> Popov	20_FB099	A15	Astr13	JDAST011-21	Статус 2. Редкий вид Южного Памиро-Алая
61.	<i>Astragalus pseudoeremophyssa</i> Popov	19_JD34	A13	Astr14	JDAST012-21	Статус 2. Редкий вид Южного Памиро-Алая
62.	<i>Astragalus ptercephalus</i> Bunge	20_FB129	A28	Astr15	JDAST013-21	Эндемик горной Средней Азии
63.	<i>Astragalus ptercephalus</i> Bunge	20_FB143	A30	Astr16	JDAST014-21	Эндемик горной Средней Азии
64.	<i>Astragalus rumpens</i> Meffert	12_TO06	A49	Astr17	JDAST015-21	Эндемик Памиро-Алая
65.	<i>Astragalus rumpens</i> Meffert	19_BN65	A19	Astr18	JDAST016-21	Эндемик Памиро-Алая
66.	<i>Astragalus stenocystis</i> Bunge	20_FB125	A33	Astr19	JDAST017-21	Эндемик горной Средней Азии
67.	<i>Astragalus stenocystis</i> Bunge	20_FB128	A34	Astr20	JDAST018-21	Эндемик горной Средней Азии
68.	<i>Astragalus subbijugus</i> Ledeb.	15_BN01	A17	Astr 21	JDAST019-21	Эндемик останцовых низкогорий Кызылкума и Нуратинских гор, эндемик Узбекистана
69.	<i>Astragalus subbijugus</i> Ledeb.	19_TK20	A16	Astr22	JDAST020-21	Эндемик останцовых низкогорий Кызылкума и Нуратинских гор, эндемик Узбекистана
70.	<i>Astragalus terrae-rubrae</i> Butkov	19_BN47	A21	Astr23	JDAST021-21	Статус 3. Редкий эндемик Юго-Западного Памиро-Алая
71.	<i>Astragalus terrae-rubrae</i> Butkov	20_FB030	A23	Astr24	JDAST022-21	Статус 3. Редкий эндемик Юго-Западного Памиро-Алая
72.	<i>Astragalus tibetanus</i> Bunge	20_FB126	A38	Astr25	JDAST023-21	Эндемик горной Средней Азии
73.	<i>Astragalus tibetanus</i> Bunge	20_FB124	A37	Astr 26	JDAST024-21	Эндемик горной Средней Азии
74.	<i>Astragalus urgutinus</i> Lipsky	19_UF01	A24	Astr 27	JDAST025-21	Эндемик Западного Памиро-Алая
75.	<i>Astragalus urgutinus</i> Lipsky	20_FB132	A32	Astr28	JDAST026-21	Эндемик Западного Памиро-Алая
76.	<i>Astragalus xanthomeloides</i> Korovin & Popov	20_FB109	A26	Astr29	JDAST027-21	Эндемик горной Средней Азии

77.	<i>Astragalus xanthomeloides</i> Korovin & Popov	12_TO07	A47	Astr30	JDAST028-21	Эндемик горной Средней Азии
78.	<i>Dracocephalum nuratavicum</i> Adyl.	18_AN02	D3	Dracocephalum02	DRCPH002-21	–
79.	<i>Dracocephalum nuratavicum</i> Adyl.	18_AN02	D3	Dracocephalum02	DRCPH002-21	–
80.	<i>Dracocephalum nuratavicum</i> Adylov.	20_FB139	D2	Dracocephalum01	DRCPH001-21	–
81.	<i>Dracocephalum nuratavicum</i> Adylov.	20_FB139	D2	Dracocephalum01	DRCPH001-21	–
82.	<i>Dracocephalum spinulosum</i> Popov	12_MI07	D12	Dracocephalum03	DRCPH003-21	Статус 3. Редкий узколокальный эндемик Западного Тянь-Шаня
83.	<i>Dracocephalum spinulosum</i> Popov	12_MI08	D13	Dracocephalum04	DRCPH004-21	Статус 3. Редкий узколокальный эндемик Западного Тянь-Шаня
84.	<i>Dracocephalum spinulosum</i> Popov	12_MI07	D12	Dracocephalum03	DRCPH003-21	Статус 3. Редкий узколокальный эндемик Западного Тянь-Шаня
85.	<i>Dracocephalum spinulosum</i> Popov	12_MI08	D13	Dracocephalum04	DRCPH004-21	Статус 3. Редкий узколокальный эндемик Западного Тянь-Шаня
86.	<i>Ferula foetida</i> (Bunge) Regel	20_SHX02	F1	Fer01	APIAC001-21	–
87.	<i>Ferula foetida</i> (Bunge) Regel	20_KHO04	F4	Fer02	APIAC002-21	–
88.	<i>Ferula sumbul</i> (Kauffm.) Hook. f.	20_FB041	F5	Fer03	APIAC003-21	Статус 3. Редкий эндемик Памиро-Алая
89.	<i>Ferula sumbul</i> (Kauffm.) Hook. f.	13_TO03	F11	Fer04	APIAC004-21	Статус 3. Редкий эндемик Памиро-Алая
90.	<i>Ferula tadshikorum</i> Pimenov	20_XA01	F7	Fer05	APIAC005-21	Статус 3. Эндемик Юго-Западного Памиро-Алая с сокращающейся численностью
91.	<i>Ferula tadshikorum</i> Pimenov	78_N01	F10	Fer06	APIAC006-21	Статус 3. Эндемик Юго-Западного Памиро-Алая с сокращающейся численностью
92.	<i>Hedysarum baldshuanicum</i> B. Fedtsch	19_JI01	H55	Hedy03	HEDY003-21	Эндемик Центральной Азии
93.	<i>Hedysarum baldshuanicum</i> B. Fedtsch	19_JI02	H56	Hedy04	HEDY004-21	Эндемик Центральной Азии

94.	<i>Hedysarum bucharicum</i> B. Fedtsch.	20_FB008	H2	Hedy01	HEDY001-21	Статус 2. Очень редкий вид Юго-Западного Памиро-Алая
95.	<i>Hedysarum bucharicum</i> B. Fedtsch.	19_AA03	H4	Hedy02	HEDY002-21	Статус 2. Очень редкий вид Юго-Западного Памиро-Алая
96.	<i>Hedysarum denticulatum</i> Regel & Schmalh.	87_D01	H47	Hedy05	HEDY005-21	Эндемик Центральной Азии
97.	<i>Hedysarum denticulatum</i> Regel & Schmalh.	12_TO04	H46	Hedy06	HEDY006-21	Эндемик Центральной Азии
98.	<i>Hedysarum drobovii</i> Korotkova	20_FB023	H7	Hedy07	HEDY007-21	Статус 1. Редкий узколокальный эндемик Западного Тянь-Шаня
99.	<i>Hedysarum drobovii</i> Korotkova	20_FB024	H8	Hedy08	HEDY008-21	Статус 1. Редкий узколокальный эндемик Западного Тянь-Шаня
100.	<i>Hedysarum gypsaceum</i> Korotk.	20_JI01	H41	Hedy09	HEDY009-21	Эндемик Центральной Азии
101.	<i>Hedysarum gypsaceum</i> Korotk.	20_JI02	H40	Hedy10	HEDY010-21	Эндемик Центральной Азии
102.	<i>Hedysarum iomuticum</i> B. Fedtsch.	20_FB146	H10	Hedy11	HEDY011-21	Эндемик Центральной Азии
103.	<i>Hedysarum iomuticum</i> B. Fedtsch.	20_FB150	H14	Hedy12	HEDY012-21	Эндемик Центральной Азии
104.	<i>Hedysarum jaxarticum</i> Popov	60_PM01	H60	Hedy13	HEDY013-21	Эндемик Центральной Азии
105.	<i>Hedysarum jaxarticum</i> Popov	75_Li01	H59	Hedy14	HEDY014-21	Эндемик Центральной Азии
106.	<i>Hedysarum magnificum</i> Kudr.	19_TO06	H36	Hedy15	HEDY015-21	Статус 3. Редкий вид Юго-Западного Памиро-Алая, находящийся на грани исчезновения
107.	<i>Hedysarum magnificum</i> Kudr.	19_AA10	H34	Hedy16	HEDY016-21	Статус 3. Редкий вид Юго-Западного Памиро-Алая, находящийся на грани исчезновения
108.	<i>Hedysarum mogianicum</i> (B. Fedtsch.) B. Fedtsch.	20_FB152	H16	Hedy17	HEDY017-21	Эндемик Центральной Азии
109.	<i>Hedysarum mogianicum</i> (B. Fedtsch.) B. Fedtsch.	20_FB156	H20	Hedy18	HEDY018-21	Эндемик Центральной Азии

110.	<i>Hedysarum nuratense</i> Popov	20_AF002	H21	Hedy19	HEDY019-21	Эндемик Узбекистана
111.	<i>Hedysarum nuratense</i> Popov	20_AF003	H22	Hedy20	HEDY020-21	Эндемик Узбекистана
112.	<i>Hedysarum olgae</i> B. Fedtsch.	20_XA02	H43	Hedy21	HEDY021-21	Эндемик Узбекистана
113.	<i>Hedysarum olgae</i> B. Fedtsch.	19_JI04	H58	Hedy22	HEDY022-21	Эндемик Узбекистана
114.	<i>Hedysarum pskemense</i> Popov ex B. Fedtsch.	19_TK25	H51	Hedy23	HEDY023-21	Эндемик Центральной Азии
115.	<i>Hedysarum pskemense</i> Popov ex B. Fedtsch.	19_TK26	H52	Hedy243	HEDY024-21	Эндемик Центральной Азии
116.	<i>Hedysarum talassicum</i> Nikitina & Sultanova	19_TK24	H50	Hedy25	HEDY025-21	Эндемик Центральной Азии
117.	<i>Hedysarum talassicum</i> Nikitina & Sultanova	19_TK22	H48	Hedy26	HEDY026-21	Эндемик Центральной Азии
118.	<i>Hedysarum taschkenticum</i> Popov	20_FB157	H25	Hedy27	HEDY027-21	Эндемик Центральной Азии
119.	<i>Hedysarum taschkenticum</i> Popov	20_FB160	H28	Hedy28	HEDY028-21	Эндемик Центральной Азии
120.	<i>Hedysarum turkestanicum</i> Regel & Schmalh.	20_TO130	H38	Hedy29	HEDY029-21	Эндемик Центральной Азии
121.	<i>Hedysarum turkestanicum</i> Regel & Schmalh.	20_OE02	H44	Hedy30	HEDY030-21	Эндемик Центральной Азии
122.	<i>Hedysarum uzbekistanicum</i> sp. nova	20_FB072	H30	Hedy31	HEDY031-21	Новый вид
123.	<i>Hedysarum uzbekistanicum</i> sp. nova	20_FB073	H31	Hedy32	HEDY032-21	Новый вид
124.	<i>Salvia drobovii</i> Botsch.	18_KU01	S1	Salvia01	SALVI001-21	–
125.	<i>Salvia drobovii</i> Botsch.	18_TK01	S2	Salvia02	SALVI002-21	–
126.	<i>Salvia korolkowii</i> Regel et Schmalh.	20_TOB01	S4	Salvia03	SALVI003-21	Статус 2. Редкий эндемик Западного Тянь-Шаня
127.	<i>Salvia lilacinocoerulea</i> Nevski	16_ShX01	S7	Salvia04	SALVI004-21	Статус 1. Редкий эндемик Южного Памиро-Алая

128.	<i>Salvia margaritae</i> Botsch.	19_AM01	S9	Salvia05	SALVI005-21	Статус 2. Редкий узкий эндемик Алайского хребта
129.	<i>Salvia margaritae</i> Botsch.	64_X01	S11	Salvia06	SALVI006-21	Статус 2. Редкий узкий эндемик Алайского хребта
130.	<i>Salvia submutica</i> Botsch. & Vved.	20_FB052	S12	Salvia07	SALVI007-21	Статус 2. Редкий узкий реликтовый эндемик Нуратау
131.	<i>Salvia submutica</i> Botsch. & Vved.	12_BN02	S13	Salvia08	SALVI008-21	Статус 2. Редкий узкий реликтовый эндемик Нуратау
132.	<i>Salvia tianschanica</i> Makhm.	20_FB097	S15	Salvia09	SALVI009-21	Статус 2. Редкий эндемик Западного Тянь-Шаня
133.	<i>Salvia tianschanica</i> Makhm.	20_FB102	S22	Salvia10	SALVI010-21	Статус 2. Редкий эндемик Западного Тянь-Шаня

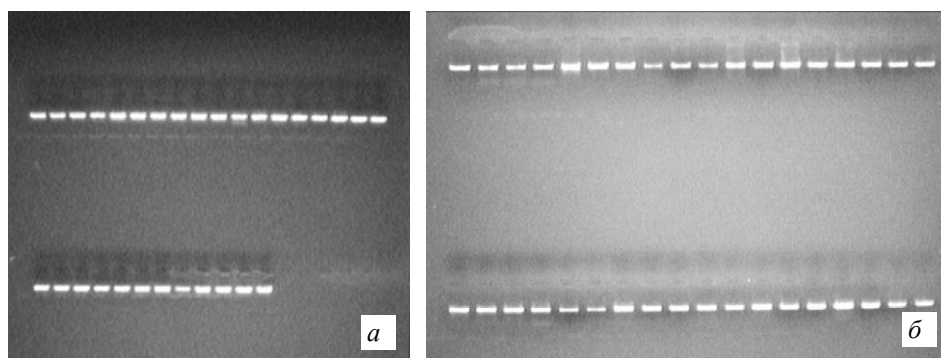


Рис. 2. Визуальная оценка качества ДНК в 1.2%-агарозном геле после инкубирования ПЦР-продукта с ExoSAP-IT™ PCR Product Clean-up для видов *Tulipa* (а) и *Dracosephalum* и *Hedysarum* (б) (праймер *rbcl*)

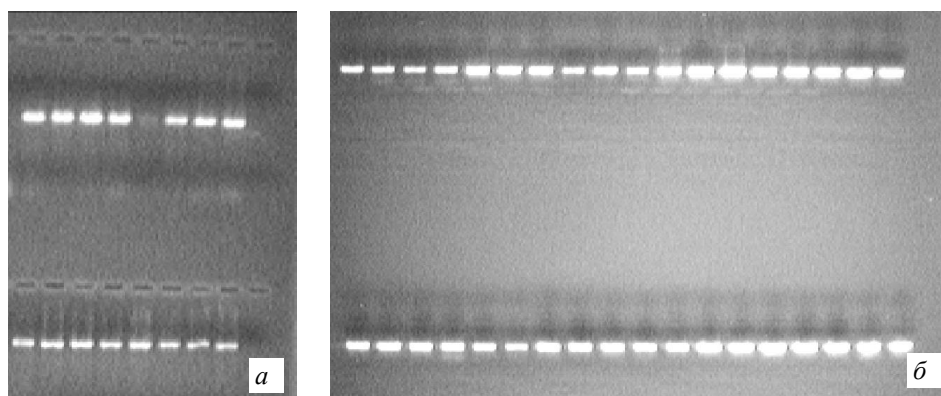


Рис. 3. Визуальная оценка качества ДНК в 1.2%-агарозном геле после инкубирования ПЦР-продукта с ExoSAP-IT™ PCR Product Clean-up для видов *Asrtragalus* (а) и *Dracosephalum* и *Hedysarum* D2-H41 (б) (праймер *rbcl-FP/rbcl-RP*)

Продукты циклического секвенирования, которые включали целевые последовательности, соли, невстроенные терминаторы красителей, dNTPs, очищали

с использованием набора реактивов BigDye XTerminator™ (Applied Biosystems, Inc., США). Очистка выполнялась менее чем за 40 мин и требовала менее 10 мин работы вручную.

Рабочий раствор для очистки продуктов циклического секвенирования включал 10 мкл раствора BigDye XTerminator, 45 мкл раствора SAM и 10 мкл раствора, содержащего целевую ДНК. Рабочий раствор перемешивали в течение 25 мин на вортексе и затем центрифугировали в течение 5 мин.

Супернатант объемом 1.2 мкл смешивали с 9 мкл Hi-Di формамида (Applied Biosystems, Inc., США), общий объем составлял 10.2 мкл раствора секвенируемой ДНК. Секвенирование ДНК проводили на автоматическом капиллярном ДНК-секвенаторе ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems, США), при этом использовали капилляры длиной 50 см и полимерную матрицу POP-7™.

Редактирование и выравнивание сиквенсов. Платформа Geneious R10.0.9 [7] была использована для визуализации, редактирования и *de novo* сборки нуклеотидных последовательностей. Сгенерированные последовательности выравнивали с помощью программного обеспечения MUSCLE [8] на платформе Geneious R10.0.9. Выравненные нуклеотидные последовательности просматривали с целью исключения пробелов, анализа вставок и делеций. Нуклеотидные последовательности участков ITS2, *matK* и *rbcL* далее экспортировали из Geneious R10.0.9 с целью загрузки на портал информационной системы данных BOLD v4 (Barcode of Life Data System) [9].

Оценка эффективности использования нуклеотидных последовательностей для идентификации растений проводилась при помощи трех подходов: средства поиска основного локального выравнивания BLAST [10], генетических дистанций и филогенетических методов ближайшего связывания (Neighbor Joining) и максимального правдоподобия (Maximum Likelihood) [11, 12].

Анализ нуклеотидных последовательностей с использованием BLAST. Для поиска гомологий исследуемых последовательностей с последовательностями, размещенными в международных базах данных, использовали программу анализа нуклеотидных последовательностей BLAST (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Анализ нуклеотидных последовательностей на основе оценки генетических дистанций. Кластеризацию выборок методом невзвешенной попарной группировки UPGMA [13] проводили в программе MEGA6 [14]. Внутри- и межвидовая генетические дистанции рассчитывались для каждого вида внутри рода у двух групп – однодольных и двудольных видов.

Загрузка нуклеотидных последовательностей в системы базы данных BOLDv4. Barcode of Life Data Systems (BOLD), созданная в 2005 г., является веб-платформой, предназначенной для сбора баркод-информации, обработки и анализа данных (URL: <https://v4.boldsystems.org/index.php>).

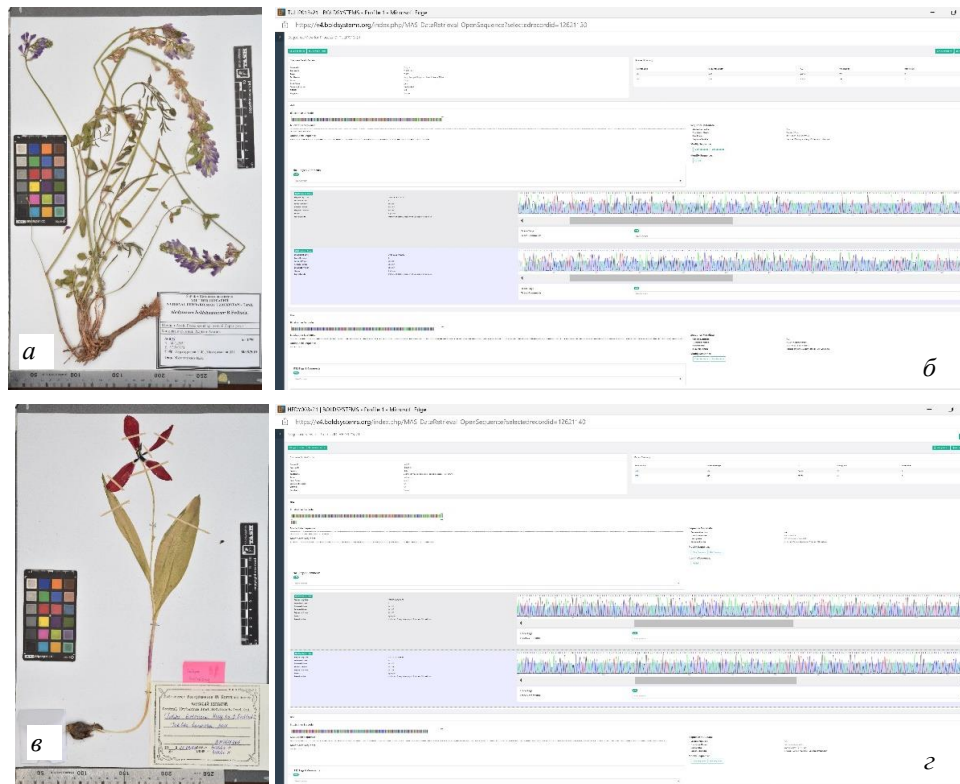


Рис. 4. Вид страницы в системе данных BOLD с гербарным образцом *Hedysarum baldshuanicum* B. Fedtsch (а) и его сиквенсами ITS2, *matK* и *rbcL* (б) и с гербарным образцом *Tulipa fosteriana* W. Irving (в) и его сиквенсами ITS2, *matK* и *rbcL* (г)

В глобальную систему данных BOLD нами загружена информация для 133 образцов 65 видов (рис. 4), занесенных в Красную книгу Республики Узбекистан (2019) [16] и/или являющихся эндемиками. Для каждого образца информация представлена в следующем виде.

А. Информация о ваучере образца (Таксономия вида. Код образца (BOLD), например Tulip05. Код процесса (BOLD), например TULIP005-21. Полевой регистрационный номер образца, например 20_FB160. Название организации, где депонирован ваучер образца. Ф.И.О. коллектора и идентификатора. Дата сбора. Место сбора. Информация об ассоциированных видах, произрастающих в той же ценопопуляции, где собран образец. Информация о фазе развития растения. Полная информация по таксономии вида, включая царство, класс, порядок, семейство, подсемейство, род и вид. GPS координаты места сбора с уточнением времени сбора (утро, день, вечер). Высотность. Метод определения координат. Метод сбора).

Б. Информация о загруженных нуклеотидных последовательностях (Таксономия вида. Код образца (BOLD), например Tulip05. Код процесса (BOLD), например TULIP005-21. Полевой регистрационный номер образца, например 20_IJ001. Дата секвенирования. Направление (Форвард или Реверс). Качество нуклеотидных последовательностей. Принадлежность организации).

После анализа качества нуклеотидных последовательностей присваивается уникальный код VIN для данного образца. Кроме того, загруженные в систему

данных BOLD v4 нуклеотидные последовательности регистрируются в базе данных GenBank.

Результаты исследования

Нуклеотидные последовательности трех ДНК-баркодов 65 видов растений, занесенных в Красную книгу Республики Узбекистан и/или являющихся эндемиками местной флоры или флоры Центральной Азии, были секвенированы и загружены в глобальную систему данных BOLD v4, в том числе 23 однодольных (19 видов рода *Tulipa* L. и 4 вида рода *Iris* L.) и 42 двудольных (15 видов рода *Astragalus* L., 2 вида рода *Dracocephalum* L., 16 видов рода *Hedysarum* L., 6 видов рода *Salvia* L., 3 вида *Ferula* L.) видов.

Аmplификация и секвенирование ДНК образцов. Результаты амплификации трех ДНК-баркодов и их секвенирования различались между собой (см. табл. 3). Выделение ДНК из образцов осуществлялось в трех и более повторностях. Отобранные образцы характеризовались высоким качеством ДНК с концентрацией ≥ 50 нг/мкл и отношением показателей преломления A_{260}/A_{280} , равным 1.8 ± 0.1 , и A_{260}/A_{230} – в пределах 1.8–2.2 (см. Приложение). Амплифицируемость баркод-участка определялась соотношением количества образцов, нуклеотидные последовательности которых успешно амплифицированы, к общему числу образцов. Наилучшие показатели амплификации ITS2 участка матрицы ДНК отмечены для видов *Iris* (100%) и *Hedysarum* (100%), самые низкие показатели – у *Dracocephalum* (45%); для ДНК-баркодов *rbcL* самые высокие показатели зафиксированы для видов *Iris* (93%), *Tulipa* (93%) и *Hedysarum* (93%), самые низкие показатели – у *Dracocephalum* (36%). Из трех ДНК-баркодов амплификация матрицы ДНК с участием *matK* дала самый наименьший результат по сравнению с другими двумя участками: амплификация нуклеотидных последовательностей видов *Astragalus* имела значение 87%, самый низкий показатель выявлен у *Dracocephalum* (28%). Это связано с высоким содержанием вторичных метаболитов, что отмечалось также в процессе выделения ДНК.

Секвенирование было наиболее успешным для ДНК-баркода *rbcL*: определены нуклеотидные последовательности 100% исследованных видов *Iris*, *Tulipa*, *Dracocephalum* и *Ferula*. Для ITS2-участка также отмечаются хорошие результаты: определены нуклеотидные последовательности 80–100% исследованных видов. Сравнительно низкие результаты секвенирования отмечены для всех видов по ДНК-баркоду *matK*: успешно просеквенированы нуклеотидные последовательности лишь 41–56% исследованных видов (табл. 4).

Вследствие того что матричная ДНК не всех образцов успешно амплифицирована и секвенирована из-за высокой загрязненности образцов или высокого содержания вторичных метаболитов, в систему данных BOLD v4 загружены нуклеотидные последовательности, а также информация по ваучерам 8 образцов 4 видов *Iris* L. (Iridaceae Juss.), 38 образцов 19 видов *Tulipa* L. (Liliaceae Juss.), 31 образца 15 видов *Astragalus* L. (Fabaceae Lindl.), 8 образцов 2 видов *Dracocephalum* L. (Lamiaceae Martinov), 6 образцов 3 видов *Ferula* L. (Apiaceae Lindl.), 32 образцов 16 видов *Hedysarum* L. (Fabaceae Lindl.) и 10 образцов 6 видов *Salvia* L. (Lamiaceae Martinov). Всего 133 образца 65 видов.

Табл. 3

Показатели степени амплификации и секвенирования трех баркод-зон (%)

Класс	Вид	ПЦР-амплификация			Секвенирование		
		ITS2	<i>rbcL</i>	<i>matK</i>	ITS2	<i>rbcL</i>	<i>matK</i>
Однодольные	<i>Iris L.</i>	100	93	41	87	100	41
	<i>Tulipa L.</i>	88	93	82	89	100	54
Двудольные	<i>Astragalus L.</i>	83	89	87	82	93	43
	<i>Dracocephalum L.</i>	45	36	28	80	100	41
	<i>Ferula L.</i>	80	90	50	100	100	45
	<i>Hedysarum L.</i>	100	93	82	83	83	56
	<i>Salvia L.</i>	68	82	60	83	83	43

Табл. 4

Успешность идентификации кандидатных ДНК-баркодов на видовом и родовом уровнях с помощью BLASTN-анализа

Вид	Видовой уровень			Родовой уровень		
	ITS2	<i>rbcL</i>	<i>matK</i>	ITS2	<i>rbcL</i>	<i>matK</i>
<i>Iris L.</i>	20%	15%	16%	74%	90%	87%
<i>Tulipa L.</i>	18%	12%	14%	76%	94%	86%
<i>Astragalus L.</i>	11%	14%	10%	80%	94%	84%
<i>Dracocephalum L.</i>	9%	16%	9%	79%	95%	86%
<i>Ferula L.</i>	12%	15%	8%	89%	90%	88%
<i>Hedysarum L.</i>	14%	17%	15%	86%	89%	85%
<i>Salvia L.</i>	15%	17%	15%	88%	89%	85%

Табл. 5

Нуклеотидная дивергентность и вариабельность ДНК-баркодов, рассчитанные с помощью DNAsp

Вид	Нуклеотидная дивергентность, Pi			Доля консервативных сайтов С, % доля полиморфных (сегрегирующих) сайтов S, %					
	ITS2	<i>rbcL</i>	<i>matK</i>	ITS2		<i>rbcL</i>		<i>matK</i>	
				С	S	С	S	С	S
<i>Iris L.</i>	0.07795	0.00178	0.04634	76	24	98.3	1.7	85	15
<i>Tulipa L.</i>	0.07938	0.00191	0.05179	79	21	99.5	0.5	86	14
<i>Astragalus L.</i>	0.08420	0.00132	0.04517	80	20	98	2	84	16
<i>Dracocephalum L.</i>	0.07150	0.00757	0.04271	81	19	98	2	83.2	16.8
<i>Ferula L.</i>	0.06710	0	0.03800	81	19	100	0	81.9	18.1
<i>Hedysarum L.</i>	0.06995	0.00578	0.04238	78	22	97.5	2.5	83	17
<i>Salvia L.</i>	0.06414	0.00142	0.04304	76	24	98.8	1.2	80	20

Полиморфизм и дивергентность ДНК-баркодов. В качестве основных индикаторов генетического разнообразия исследованы значения нуклеотидной дивергентности (Pi) и доли консервативных (С) и полиморфных, или сегрегирующих (S), участков (табл. 5). Наиболее дивергентными оказались участки ITS2 с долей консервативных участков в пределах 76–81%, доля полиморфных участков варьировала в пределах 19–24%. Более консервативными оказались участки *rbcL* с долей консервативных участков в пределах 97.5–100%, вариабельных участков – 0–2.5%. Средние значения были характерны для участков *matK* с долей консервативных участков в пределах 81.9–86% и вариабельных участков – 14–20%.

Идентификация видов с использованием BLAST. Поиск идентичных последовательностей в глобальной базе нуклеотидов NCBI осуществлялся с использованием встроенного в Geneious 10.0.9. плагина BLAST. Вследствие того что исследуемые виды занесены в Красную книгу РУз [16], причем многие из них, и работа по изучению нуклеотидных последовательностей данных видов проводилась впервые, поиск на видовом уровне показал низкие результаты. BLAST поиск позволил идентифицировать близкие виды на видовом уровне, принадлежность которых на родовом уровне составила 82–100% для ITS2, 83–100% для *rbcL* и 41–56% для *matK*.

Обсуждение

Создание электронной базы данных генетического разнообразия редких, исчезающих видов, а также эндемиков флоры, изучение генетического полиморфизма в контексте глобальной международной программы ДНК-штрихкодирования (BoL, Barcode of Life) – идентификации биологических образцов по последовательностям их ДНК – является важным вкладом Республики Узбекистан в документирование генетических ресурсов растений. При выделении ДНК-баркодов использовали только документированный материал, гербарные образцы которого были определены специалистами и зарегистрированы в Национальном гербарном фонде TASH (г. Ташкент, Республика Узбекистан).

Применение баркодирования в фармацевтической промышленности позволит избежать потерь, связанных с некорректной идентификацией видов, в дорогостоящих биотехнологических процессах, а природоохранным и таможенным службам – предотвратить бесконтрольный браконьерский сбор сырья из природы, а также идентифицировать присутствие компонентов редких видов, вывозимых из страны.

Нуклеотидные последовательности 133 образцов 65 видов высокого качества были секвенированы с использованием трех пар праймеров ITS2, *matK* и *rbcL*. Анализ полиморфизма и нуклеотидной дивергентности по трем ДНК-участкам показал наличие наибольшего количества полиморфных участков для ITS2-региона. BLAST-анализ выявил отсутствие нуклеотидных последовательностей по участкам ITS2, *matK* и *rbcL* исследуемых видов. Это объясняется тем, что нуклеотидные последовательности 65 видов, относящихся к 7 родам и 5 семействам флоры Республики Узбекистан, являющиеся в основном видами, занесенными в Красную книгу и/или эндемиками, исследованы и загружены в глобальную систему данных BOLD v4 впервые.

Баркодирование редких видов и/или эндемиков Республики Узбекистан с использованием трех пар праймеров ITS2, *matK* и *rbcL* позволяет идентифицировать виды и является универсальным для представителей как однодольных, так и двудольных растений. Необходимо отметить, что участок ITS2 характеризовался более высокими значениями нуклеотидной дивергенции, а также количеством полиморфных участков, способностью легко амплифицироваться и секвенироваться.

Благодарности. Авторы благодарят сотрудников Научно-исследовательского института гематологии и переливания крови Министерства здравоохранения Республики Узбекистан за содействие в проведении исследований. Особую благодарность выражаем К.Т. Бабаеву и З.З. Ибрагимову.

Исследования проведены в рамках проекта MRB-AN-2019-30 «Генетическая инвентаризация редких и исчезающих видов растений Беларуси и Узбекистана с применением технологии ДНК-штрихкодирования», договора 23/2020 между Институтом ботаники и Государственным комитетом РУз по экологии и охране окружающей среды и государственной программы ПФИ-5 «Дерево жизни: однодольные Узбекистана» Института ботаники Академии наук Республики Узбекистан.

Ресурсы

BOLD Barcode of Life Data System (URL: <https://v4.boldsystems.org>)

IRIS003-21, IRIS004-21, IRIS007-21, IRIS001-21, IRIS008-21, IRIS002-21, IRIS005-21, IRIS006-21, TULIP001-21, TULIP002-21, TULIP003-21, TULIP004-21, TULIP005-21, TULIP006-21, TULIP007-21, TULIP009-21, TULIP010-21, TULIP011-21, TULIP012-21, TULIP013-21, TULIP014-21, TULIP015-21, TULIP016-21, TULIP017-21, TULIP018-21, TULIP019-21, TULIP020-21, TULIP021-21, TULIP022-21, TULIP023-21, TULIP024-21, TULIP025-21, TULIP026-21, TULIP027-21, TULIP028-21, TULIP029-21, TULIP030-21, TULIP031-21, TULIP032-21, TULIP033-21, TULIP034-21, TULIP035-21, TULIP036-21, TULIP037-21, TULIP038-21, JDAST008-21, JDAST001-21, JDAST002-21, JDAST003-21, JDAST029-21, JDAST004-21, JDAST005-21, JDAST030-21, JDAST006-21, JDAST007-21, JDAST008-21, JDAST031-21, JDAST009-21, JDAST010-21, JDAST011-21, JDAST012-21, JDAST013-21, JDAST014-21, JDAST015-21, JDAST016-21, JDAST017-21, JDAST018-21, JDAST019-21, JDAST020-21, JDAST021-21, JDAST022-21, JDAST023-21, JDAST024-21, JDAST025-21, JDAST026-21, JDAST027-21, JDAST028-21, DRCPH002-21, DRCPH003-21, DRCPH004-21, DRCPH001-21, DRCPH002-21, DRCPH003-21, DRCPH004-21, APIAC001-21, APIAC002-21, APIAC003-21, APIAC004-21, APIAC005-21, APIAC006-21, HEDY003-21, HEDY004-21, HEDY001-21, HEDY002-21, HEDY005-21, HEDY006-21, HEDY007-21, HEDY008-21, HEDY009-21, HEDY010-21, HEDY011-21, HEDY012-21, HEDY013-21, HEDY014-21, HEDY015-21, HEDY016-21, HEDY017-21, HEDY018-21, HEDY019-21, HEDY020-21, HEDY021-21, HEDY022-21, HEDY023-21, HEDY024-21, HEDY025-21, HEDY026-21, HEDY027-21, HEDY028-21, HEDY029-21, HEDY030-21, HEDY031-21, HEDY032-21, SALVI001-21, SALVI002-21, SALVI003-21, SALVI004-21, SALVI005-21, SALVI006-21, SALVI007-21, SALVI008-21, SALVI009-21, SALVI010-21

Приложение

Показатели качества ДНК, выделенных методом СТАБ из листьев объектов исследований

№	Код образца (ДНК)	Название вида	Полевой регистрационный № образца	Концентрация, нг/мкл	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
I. <i>Tulipa</i> L. Liliaceae Juss.						
1	T2	<i>T. affinis</i>	20_BN13	231.50	1.797	1.335
2	T66	<i>T. affinis</i>	19_BN64	84.250	1.856	1.836
3	T64	<i>T. affinis</i>	19_BN62	56.400	2.029	1.649
4	T4	<i>T. butkovii</i>	20_FB063	134.55	1.801	1.871
5	T19	<i>T. butkovii</i>	18_JCh01	125.70	1.900	1.944
6	T20	<i>T. butkovii</i>	18_JCh02	101.15	1.831	2.708

7	T47	<i>T. carinata</i>	14_TO001	117.95	1.958	1.895
8	T46	<i>T. carinata</i>	13_TK001	14.550	1.890	2.064
9	T74	<i>T. carinata</i>		90.000	2.011	1.361
10	T55	<i>T. dasystemon</i>	20_FB137	509.00	2.053	1.612
11	T24	<i>T. dasystemon</i>	19_BN60	124.05	1.919	1.624
12	T54	<i>T. dasystemon</i>	20_FB117	128.00	2.019	1.248
13	T5	<i>T. dubia</i>	20_FB057	341.45	1.878	2.931
14	T22	<i>T. dubia</i>	19_BN58	296.20	1.826	2.136
15	T44	<i>T. dubia</i>	19_BN65	210.45	1.799	2.563
16	T57	<i>T. ferganica</i>	20_TK001	122.70	1.768	1.818
17	T21	<i>T. ferganica</i>	17_JCh08	22.500	1.899	1.619
18	T18	<i>T. ferganica</i>	17_JCh07	118.55	1.937	1.165
19	T57	<i>T. ferganica</i>	20_TK001	122.70	1.768	1.818
20	T16	<i>T. fosteriana</i>	17_BN09	59.600	1.935	1.481
21	T67	<i>T. fosteriana</i>	17_BN07	27.850	2.237	2.048
22	T68	<i>T. fosteriana</i>	17_BN08	144.50	2.179	1.695
23	T69	<i>T. fosteriana</i>	19_Unknown07	36.150	1.965	2.037
24	T49	<i>T. greigii</i>	09_TK001	139.15	1.623	0.757
25	T60	<i>T. greigii</i>	19_LG01	97.950	1.749	1.802
26	T25	<i>T. greigii</i>	19_BN57	127.50	1.916	1.974
27	T42	<i>T. greigii</i>	19_Unknown09	38.050	1.766	1.333
28	T61	<i>T. greigii</i>	Unknown03	52.700	1.875	1.327
29	T26	<i>T. ingens</i>	19_BN61	328.25	1.945	1.738
30	T70	<i>T. ingens</i>	19_Unknown10	141.70	1.877	1.849
31	T71	<i>T. ingens</i>	19_Unknown11	216.95	1.929	1.645
32	T30	<i>T. intermedia</i>	17_JCh03	171.55	1.794	1.122
33	T51	<i>T. intermedia</i>	12_TK001	115.25	1.818	1.825
34	T52	<i>T. intermedia</i>	18_Unknown01	426.65	1.759	1.538
35	T31	<i>T. kaufmanniana</i>	19_BN62	169.45	1.801	1.667
36	T33	<i>T. kaufmanniana</i>	19_Unknown02	199.40	1.805	2.329
37	T32	<i>T. kaufmanniana</i>	19_uknown01	65.900	1.755	1.899
38	T72	<i>T. korolkovii</i>	20_TO113	429.95	2.032	2.330
39	T73	<i>T. korolkovii</i>	20_BN07	181.40	1.906	1.695
40	T7	<i>T. korolkowii</i>	20_BN11	405.40	1.878	2.204
41	T8	<i>T. korolkowii</i>	20_BN05	268.00	1.811	2.966
42	T39	<i>T. lanata</i>	19_Unknown04	190.15	2.131	2.316
43	T15	<i>T. lanata</i>	20_FB086	157.40	2.027	1.607
44	T59	<i>T. lanata</i>	20_FB087	97.700	2.108	2.012
45	T10	<i>T. lehmanniana</i>	20_ShX07	260.50	1.861	1.697
46	T34	<i>T. lehmanniana</i>	19_BN56	33.700	2.113	1.867
47	T53	<i>T. lehmanniana</i>	07_TK001	36.650	2.047	1.204
48	T12	<i>T. micheliana</i>	20_BN10	68.400	1.817	2.276
49	T35	<i>T. micheliana</i>	19_BN63	30.400	2.219	1.630
50	T13	<i>T. sharipovii</i>	20_TO126	72.750	1.842	2.263
51	T43	<i>T. sharipovii</i>	Unknown01	176.10	1.867	2.652
52	T50	<i>T. sharipovii</i>	09_TK002	186.05	1.774	1.427
53	T36	<i>T. tubergeniana</i>	18_BN02	20.750	1.948	2.331
54	T48	<i>T. tubergeniana</i>	06_I001	57.750	1.769	1.851
55	T48	<i>T. tubergeniana</i>	06_I001	57.750	1.769	1.851
56	T45	<i>T. uzbekistanica</i>	Unknown02	235.30	1.479	2.000
57	T45	<i>T. uzbekistanica</i>	Unknown02	197.45	1.810	2.729
58	T38	<i>T. uzbekistanica</i>	17_BN05	105.30	2.083	1.839
59	T75	<i>T. uzbekistanica</i>	19_AA06	119.70	2.413	0.840
60	T63	<i>T. vvedenskyi</i>	18_JCh03v	348.15	1.791	1.806
61	T62	<i>T. vvedenskyi</i>	18_JCh02v	200.95	1.866	1.447
62	T41	<i>T. vvedenskyi</i>	18_JCh01v	113.10	1.766	1.981
II. <i>Iris</i> L. Iridaceae Juss.						
1	J1	<i>I. hippolyti</i>	19_TK21	359.70	1.835	1.963
2	J2	<i>I. hippolyti</i>	20_ShX16	189.40	1.667	1.948

3	J12	<i>I. magnificum</i>	19_JD31	484.45	1.892	2.402
4	J10	<i>I. magnificum</i>	19_KU09	369.10	1.857	1.301
5	J11	<i>I. magnificum</i>	19_KU04	242.40	1.834	1.037
6	J3	<i>I. orchiooides</i>	20_FB043	361.65	1.832	2.074
7	J6	<i>I. orchiooides</i>	Unknown01	233.25	1.861	1.716
8	J6	<i>I. orchiooides</i>	unknown1	440.10	1.883	1.853
9	J4	<i>I. orchiooides</i>	20_FB044	24.500	1.756	0.203
10	J7	<i>I. svetlanae</i>	19_KU03	124.15	1.854	2.466
11	J8	<i>I. svetlanae</i>	20_TO129	167.55	1.805	1.535
12	J9	<i>I. svetlanae</i>	20_TK001	58.900	1.846	2.866
III. <i>Dracocephalum</i> L. Lamiaceae Martino						
1	D1	<i>D. nuratavicum</i>	20_FB138	50.75	1.859	0.657
2	D2	<i>D. nuratavicum</i>	20_FB139	17.4	1.794	0.16
3	D3	<i>D. nuratavicum</i>	18_AN02	27.750	1.751	1.869
4	D8	<i>D. adylovii</i>	18_HI01	357.85	0.795	0.571
5	D9	<i>D. adylovii</i>	11_MI05	255.10	0.878	0.647
6	D10	<i>D. adylovii</i>	11_MI06	469.45	0.807	0.622
7	D5	<i>D. komarovii</i>	20_FB119	54.550	1.658	1.812
8	D6	<i>D. komarovii</i>	20_FB120	33.500	1.900	0.400
9	D11	<i>D. spinulosum</i>	18_AN03	116.00	1.711	1.662
10	D12	<i>D. spinulosum</i>	12_MI07	120.85	1.865	2.769
11	D13	<i>D. spinulosum</i>	12_MI08	129.05	1.852	1.605
IV. <i>Salvia</i> L. Lamiaceae Martinov						
1	S1	<i>S. drobovii</i>	18_KU01	59.500	1.712	1.766
2	S2	<i>S. drobovii</i>	18_TK01	52.450	1.597	1.129
3	S1	<i>S. drobovii</i>	18_KU01	76.600	1.800	1.739
4	S2	<i>S. drobovii</i>	18_TK01	43.10	1.980	2.080
5	S25	<i>S. drobovii</i>		9.0500	0.345	0.157
6	S4	<i>S. korolkovii</i>	20_TOB01	93.250	1.557	1.827
7	S27	<i>S. korolkovii</i>		62.800	1.310	1.889
8	S28	<i>S. korolkovii</i>		116.90	1.468	1.527
9	S7	<i>S. lilacinocaerulea</i>	16_ShX01	80.000	1.695	1.841
10	S8	<i>S. lilacinocaerulea</i>	16_ShX02	52.100	1.586	1.923
11	S7	<i>S. lilacinocoerulea</i>	16_ShX01	97.650	1.784	0.793
12	S8	<i>S. lilacinocoerulea</i>	16_ShX02	92.950	1.619	0.600
13	S26	<i>S. lilacinocoerulea</i>		58.150	1.643	1.998
14	S9	<i>S. margaritae</i>	19_AM01	8.3000	1.747	0.206
15	S10	<i>S. margaritae</i>	79_MA01	62.750	1.837	0.583
16	S11	<i>S. margaritae</i>	64_X01	14.450	1.818	0.382
17	S9	<i>S. margaritae</i>	19_AM01	33.800	2.200	1.270
18	S10	<i>S. margaritae</i>	79_MA01	50.70	2.030	0.820
19	S11	<i>S. margaritae</i>	64_X01	75.400	1.870	1.040
20	S12	<i>S. submutica</i>	20_FB052	92.250	2.199	0.679
21	S13	<i>S. submutica</i>	12_BN02	62.350	1.722	0.438
22	S14	<i>S. submutica</i>	98_BN01	55.500	1.606	0.420
23	S18	<i>S. submutica</i>	20_FB046	38.300	1.860	0.980
24	S15	<i>S. tianschanica</i>	20_FB097	41.450	1.768	0.587
25	S16	<i>S. tianschanica</i>	20_FB100	64.650	1.604	0.415
26	S17	<i>S. tianschanica</i>	76_FO01	187.50	1.808	0.952
27	S22	<i>S. tianschanica</i>	20_FB102	34.90	1.900	1.380
28	S17	<i>S. tianschanica</i>	76_PO01	232.90	1.842	1.567

Литература

1. Kress W.J., Erickson D.L. (Eds.) DNA Barcodes: Methods and Protocols. – N. Y.: Humana Totowa, 2012. – 485 p. – doi: 10.1007/978-1-61779-591-6.

2. *Hebert P.D.N., Penton E.H., Burns J.M., Janzen D.H., Hallwachs W.* Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2004. – V. 101, No 41. – P. 14812–14817. doi: 10.1073/pnas.0406166101.
3. *Baraloto C., Hardy O.J., Paine C.E.T., Dexter K.G., Cruaud C., Dunning L.T., Gonzalez M.-A., Molino J.-F., Sabatier D., Savolainen V., Chave J.* Using functional traits and phylogenetic trees to examine the assembly of tropical tree communities // *J. Ecol.* – 2012. – V. 100, No 3. – P. 690–701. – doi: 10.1111/j.1365-2745.2012.01966.x.
4. *Muellner A.N., Schaefer H., Lahaye R.* Evaluation of candidate DNA Barcoding loci for economically important timber species of mahogany family (Meliaceae) // *Mol. Ecol. Resour.* – 2011. – V. 11, No 3. – P. 450–460. – doi: 10.1111/j.1755-0998.2011.02984.x.
5. *CBOL Plant Working Group.* A DNA barcode for land plants // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2009. – V. 106, No 31. – P. 12794–12797. – doi: 10.1073/pnas.0905845106.
6. *Doyle J.J., Doyle J.L.* A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // *Phytochem. Bull.* – 1987. – V. 19, No 1. – P. 11–15.
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.* Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data // *Bioinformatics.* – 2012. – V. 28, No 12. – P. 1647–1649. – doi: 10.1093/bioinformatics/bts199.
8. *Edgar R.C.* MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity // *BMC Bioinf.* – 2004. – V. 5. – Art. 113, P. 1–19. – doi: 10.1186/1471-2105-5-113.
9. *Ratnasingham S., Hebert P.D.N.* BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>) // *Mol. Ecol. Notes.* – 2007. – V. 7, No 3. – P. 355–364. – doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x.
10. *Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J.* Basic local alignment search tool // *J. Mol. Biol.* – 1990. – V. 215, No 3. – P. 403–410. – doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
11. *Saitou N., Nei M.* The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees // *Mol. Biol. Evol.* – 1987. – V. 4, No 4. – P. 406–425. – doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.
12. *Haynes W.* Maximum likelihood estimation // *Dubitzky W., Wolkenhauer O., Cho K.H., Yokota H. (Eds.) Encyclopedia of Systems Biology.* – N. Y. Springer, 2013. – P. 1190–1191. – doi: 10.1007/978-1-4419-9863-7_1235.
13. *Nei M.* Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // *Genetics.* – 1978. – V. 89, No 3. – P. 583–590. – doi: 10.1093/genetics/89.3.583.
14. *Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipowski A., Kumar S.* MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 // *Mol. Biol. Evol.* – 2013. – V. 30, No 12. – P. 2725–2729. – doi: 10.1093/molbev/mst197.
15. *Nylander J.A.A.* MrModeltest Version 2. Program Distributed by the Author. – Uppsala: Uppsala Univ., Evol. Biol. Cent., 2004.
16. Красная книга Республики Узбекистан. Т. 1: Растения. – Ташкент: Chinor ENK, 2019. – 356 с.
17. *Clement W.L., Donoghue M.J.* Barcoding success as a function of phylogenetic relatedness in *Viburnum*, a clade of woody angiosperms // *BMC Evol. Biol.* – 2012. – V. 12. – Art. 73. P. 1–13. – doi: 10.1186/1471-2148-12-73.

18. Kim W.J., Ji Y., Choi G., Kang Y.M., Yang S., Moon B.C. Molecular identification and phylogenetic analysis of important medicinal plant species in genus *Paeonia* based on rDNA-ITS, *matK*, and *rbcL* DNA barcode sequences // Genet. Mol. Res.: GMR. – 2016. – V. 55, No 3. – P. 1–12. – doi: 10.4238/gmr.15038472.

Поступила в редакцию
09.02.2022

Мустафина Феруза Усмановна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник

Институт ботаники Академии наук Республики Узбекистан
ул. Дурмон йули, д. 32, г. Ташкент, 100125, Республика Узбекистан
E-mail: mustafinaferuza@yahoo.com

Жамалова Дилафруз Ньёматилла кизи, младший научный сотрудник

Институт ботаники Академии наук Республики Узбекистан
ул. Дурмон йули, д. 32, г. Ташкент, 100125, Республика Узбекистан
E-mail: dilafruz_jamalova.91@mail.ru

Турдиев Достон Эргаш угли, младший научный сотрудник

Институт ботаники Академии наук Республики Узбекистан
ул. Дурмон йули, д. 32, г. Ташкент, 100125, Республика Узбекистан
E-mail: doston.turdiyev.91@mail.ru

Курбаниязова Гулсаур Танирберген кизи, младший научный сотрудник

Институт ботаники Академии наук Республики Узбекистан
ул. Дурмон йули, д. 32, г. Ташкент, 100125, Республика Узбекистан
E-mail: kurbaniyazova94@list.ru

Газиев Алим Джавдетович, специалист

Институт ботаники Академии наук Республики Узбекистан
ул. Дурмон йули, д. 32, г. Ташкент, 100125, Республика Узбекистан
E-mail: gazievalim644@gmail.com

Бешко Наталья Юрьевна, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией

Институт ботаники Академии наук Республики Узбекистан
ул. Дурмон йули, д. 32, г. Ташкент, 100125, Республика Узбекистан
E-mail: natalia_beshko@mail.ru

Тожибаев Комилжон Шаробиддинович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией

Институт ботаники Академии наук Республики Узбекистан
ул. Дурмон йули, д. 32, г. Ташкент, 100125, Республика Узбекистан
E-mail: ktojibaev@mail.ru

Ибрагимов Зафар Зокиржонович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник

Институт биоорганической химии имени А.С. Садыкова Академии наук Республики Узбекистан
ул. Мирзо Улугбека, д. 83, г. Ташкент, 100125, Республика Узбекистан
E-mail: z.ibragim@gmail.com

Бобоев Кодиржон Тухтабоевич, доктор биологических наук, заведующий отделением

НИИ гематологии и переливания крови Министерства здравоохранения Республики Узбекистан
массив Чиланзар, квартал 5, г. Ташкент, 100097, Республика Узбекистан
E-mail: saboboev@mail.ru

ORIGINAL ARTICLE

doi: 10.26907/2542-064X.2022.3.408-437

**Assessing the Effectiveness of Barcoding
for Conservation of Rare Plant Species in the Republic of Uzbekistan**F.U. Mustafina^{a*}, D.N. Jamalova^{a**}, D.E. Turdiev^{a***}, G.T. Kurbaniyazova^{a****},
A.Dj. Gaziev^{a*****}, N.Yu. Beshko^{a*****}, K.Sh. Tojibaev^{a*****},
Z.Z. Ibragimov^{b*****}, K.T. Boboev^{c*****}^aInstitute of Botany, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan,
Tashkent, 100125 Republic of Uzbekistan^bA.S. Sadykov Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan,
Tashkent, 100143 Republic of Uzbekistan^cResearch Institute of Hematology and Blood Transfusion of the Ministry of Health
of the Republic of Uzbekistan, Tashkent, 100097 UzbekistanE-mail: *mustafinaferuza@yahoo.com, **dilafruz_jamalova.91@mail.ru,
doston.turdiyev.91@mail.ru, *kurbaniyazova94@list.ru, *****gazievalim644@gmail.com,
*****natalia_beshko@mail.ru, *****tojibaev@mail.ru, *****z.ibragim@gmail.com,
*****saboboev@mail.ru

Received February 9, 2022

Abstract

This article presents, for the first time, a reference database of the nucleotide sequences for three DNA barcodes (ITS2, *matK*, and *rbcl*) of 65 rare and critically endangered plant species of the Republic of Uzbekistan (133 samples, two samples per species), including 23 monocots and 42 dicots. ITS2 region was proposed as the most variable, easily amplified and sequenced for both monocot and dicot species. Therefore, it was recommended as the main DNA barcode. The obtained reference database uploaded to the BOLD v4 platform should be useful for pharmaceutical companies, environmental and customs offices, as well as for phylogenetic research.

Keywords: barcoding, rare species, endemics, biodiversity conservation, BOLD

Acknowledgments. We thank our colleagues from the Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of the Ministry of Health of the Republic of Uzbekistan for their kind cooperation and help. K.T. Babaeva and Z.Z. Ibragimov are specially acknowledged for their valuable contributions.

The study was performed as part of: project MRB-AN-2019-30 “Genetic inventory of rare and endangered plant species in Belarus and Uzbekistan using DNA barcoding technology”; 23/2020 agreement between the Institute of Botany and the State Committee of the Republic of Uzbekistan for Ecology and Nature Conservation; and state project “Tree of life: Monocots of Uzbekistan” (PFI-5) funded by the Institute of Botany, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan.

Figure Captions

Fig. 1. Studied species: a) *Iris orchioides* Carrière; b) *Iris magnifica* Vved.; c) *Tulipa butkovii* Botschantz.; d) *Tulipa dubia* Vved.; e) *Tulipa greigii* Regel.; f) *Tulipa ingens* Hoog; g) *Tulipa kaufmanniana* Regel; h) *Tulipa lehmanniana* Merckl.; i) *Tulipa vvedenskyi* Botschantz.; j) *Tulipa carinata* Vved.; k) *Tulipa kaufmanniana* Regel; l) *Astragalus pterocephalus* Bunge; m) *Astragalus xanthomeloides* Korovin & Popov; n) *Astragalus pterocephalus* Bunge; o) *Ferula tadshikorum* Pimenov; p) *Ferula foetida* (Bunge) Regel; q) *Hedysarum taschkenticum* Popov; r) *Ferula tadshikorum* Pimenov.

Fig. 2. Visual assessment of the DNA quality in 1.2% agarose gel after the PCR product treatment with the ExoSAP-IT™ PCR Product Clean-up reagent for species of the following genera: *Tulipa* (a), *Dracocephalum* and *Hedysarum* (b) (primer *rbcL*).

Fig. 3. Visual assessment of the DNA quality in 1.2% agarose gel after the PCR product treatment with the ExoSAP-IT™ PCR Product Clean-up reagent for species of the following genera: *Asrtragalus* (a), *Dracocephalum* and *Hedysarum* D2-H41 (b) (primer *rbcL-FP/rbcL-RP*).

Fig. 4. Page on the BOLD platform with the herbarium specimen image of *Hedysarum baldshuanicum* B. Fedtsch (a) and its ITS2, *matK*, and *rbcL* sequences (b), as well as with the herbarium specimen image of *Tulipa fosteriana* W. Irving (c) and its ITS2, *matK*, and *rbcL* sequences (d).

References

1. Kress W.J., Erickson D.L. (Eds.) *DNA Barcodes: Methods and Protocols*. New York, Humana Totowa, 2012. 485 p. doi: 10.1007/978-1-61779-591-6.
2. Hebert P.D.N., Penton E.H., Burns J.M., Janzen D.H., Hallwachs W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2004, vol. 101, no. 41, pp. 14812–14817. doi: 10.1073/pnas.0406166101.
3. Baraloto C., Hardy O.J., Paine C.E.T., Dexter K.G., Cruaud C., Dunning L.T., Gonzalez M.-A., Molino J.-F., Sabatier D., Savolainen V., Chave J. Using functional traits and phylogenetic trees to examine the assembly of tropical tree communities. *J. Ecol.*, 2012, vol. 100, no. 3, pp. 690–701. doi: 10.1111/j.1365-2745.2012.01966.x.
4. Muellner A.N., Schaefer H., Lahaye R. Evaluation of candidate DNA Barcoding loci for economically important timber species of mahogany family (Meliaceae). *Mol. Ecol. Resour.*, 2011, vol. 11, no. 3, pp. 450–460. doi: 10.1111/j.1755-0998.2011.02984.x.
5. CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2009, vol. 106, no. 31, pp. 12794–12797. doi: 10.1073/pnas.0905845106.
6. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.*, 1987, vol. 19, no. 1, pp. 11–15.
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. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 2012, vol. 28, no. 12, pp. 1647–1649. doi: 10.1093/bioinformatics/bts199.
8. Edgar R.C. MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinf.*, 2004, vol. 5, art. 113, pp. 1–19. doi: 10.1186/1471-2105-5-113.
9. Ratnasingham S., Hebert P.D.N. BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Mol. Ecol. Notes*, 2007, vol. 7, no. 3, pp. 355–364. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x.
10. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 215, no. 3, pp. 403–410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
11. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 1987, vol. 4, no. 4, pp. 406–425. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.
12. Haynes W. Maximum likelihood estimation. In: Dubitzky W., Wolkenhauer O., Cho K.H., Yokota H. (Eds.) *Encyclopedia of Systems Biology*. New York, Springer, 2013, pp. 1190–1191. doi: 10.1007/978-1-4419-9863-7_1235.
13. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 1978, vol. 89, no. 3, pp. 583–590. doi: 10.1093/genetics/89.3.583.
14. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipinski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, 2013, vol. 30, no. 12, pp. 2725–2729. doi: 10.1093/molbev/mst197.
15. Nylander J.A.A. *MrModeltest Version 2. Program Distributed by the Author*. Uppsala, Uppsala Univ., Evol. Biol. Cent., 2004.
16. *Krasnaya kniga Respubliki Uzbekistan* [Red Book of the Republic of Uzbekistan]. Vol. 1: Plants. Tashkent, Chinor ENK, 2019. 356 p. (In Russian)

17. Clement W.L., Donoghue M.J. Barcoding success as a function of phylogenetic relatedness in *Viburnum*, a clade of woody angiosperms. *BMC Evol. Biol.*, 2012, vol. 12, art. 73, pp. 1–13. doi: 10.1186/1471-2148-12-73.
18. Kim W.J., Ji Y., Choi G., Kang Y.M., Yang S., Moon B.C. Molecular identification and phylogenetic analysis of important medicinal plant species in genus *Paeonia* based on rDNA-ITS, *matK*, and *rbcL* DNA barcode sequences. *Genet. Mol. Res.: GMR*, 2016, vol. 55, no. 3, pp. 1–12. doi: 10.4238/gmr.15038472.

Для цитирования: Мустафина Ф.У., Жамалова Д.Н., Турдиев Д.Э., Курбаниязова Г.Т., Газиев А.Дж., Бешко Н.Ю., Тожибаев К.Ш., Ибрагимов З.З., Бобоев К.Т. Оценка эффективности использования баркодирования для сохранения редких видов флоры Республики Узбекистан // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2022. – Т. 164, кн. 3. – С. 408–437. – doi: 10.26907/2542-064X.2022.3.408-437.

For citation: Mustafina F.U., Jamalova D.N., Turdiev D.E., Kurbaniyazova G.T., Gaziev A.Dj., Beshko N.Yu., Tojibaev K.Sh., Ibragimov Z.Z., Boboev K.T. Assessing the effectiveness of barcoding for conservation of rare plant species in the Republic of Uzbekistan. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennyye Nauki*, 2022, vol. 164, no. 3, pp. 408–437. doi: 10.26907/2542-064X.2022.3.408-437. (In Russian)