

## ПОИСК ДНК-МАРКЕРОВ, ПОДХОДЯЩИХ ДЛЯ ДНК-БАРКОДИНГА ПЕРЕДНЕАЗИАТСКИХ ВИДОВ РОДА *GLADIOLUS* L.

Антипин М. И.

НОЦ "Ботанический сад Петра I" биологического факультета МГУ  
[sagefool@yandex.ru](mailto:sagefool@yandex.ru)

Современная систематика растений немыслима без учёта молекулярных данных, позволяющих непредвзято оценить объёмы таксонов и степень их родства. Тем не менее получение молекулярных данных по-прежнему связано со значительными затратами времени и средств. Перед исследователем определённой группы растений таким образом естественно возникает задача получить максимум информации, дифференцирующей таксоны, с минимальными затратами. Метод ДНК-баркодинга использует для идентификации таксона последовательности, получаемые при помощи универсальных праймеров: для растений в качестве баркодов предлагались в свое время последовательности ядерных (ITS) и пластомных генов, однако их разрешающая способность иногда оказывается недостаточной, и тогда исследователю приходится самостоятельно осуществлять поиск более подходящих последовательностей.

У видов рода *Gladiolus* L. (Iridaceae) два очага разнообразия: хорошо изученная Капская область Южной Африки, где сосредоточено более 100 эндемичных видов из 300 в роде в целом, и Восточное Средиземноморье с прилегающими аридными регионами Передней Азии и Кавказа, где общепризнанных видов на порядок меньше, но в последние полвека продолжают описывать новые виды. Нет единой точки зрения и на объём и родственные связи многих описанных в XX веке азиатских таксонов. В настоящее время не существует ни одной полноценной работы, использующей молекулярные данные для уточнения филогении внутри этой группы видов.

В данной работе предпринята попытка оценить информативность и удобство использования в качестве ДНК-баркодов нескольких традиционно применявшихся в этой роли маркеров для переднеазиатской группы видов рода *Gladiolus*. Для этого были взяты образцы трёх достаточно близких, но хорошо различающихся морфологически и экологически видов рода с переднеазиатскими ареалами (*G. atrovioleaceus*, *G. kotschyanus*, *G. szovitsii*, по два и более образца из разных локаций для одного вида) из гербариев MW, ERE и полевых сборов автора: в качестве внешней группы были взяты последовательности для европейского вида *G. communis* из ГенБанка.

Пластомные последовательности хорошо амплифицируются стандартными праймерами: их недостаток – низкая разрешающая способность. Наиболее мономорфной, не позволяющей различить виды, оказалась частичная последовательность гена *rbcL*, т.н. *rbcL*-a (ок. 500 н.п.). Пять переменных локусов на примерно 800 н.п. последовательности *matK* (праймеры Kim) группируют образцы отдельных видов вместе, при этом различая виды между собой. Наконец, маркер *trnL-F* (объединенные последовательности *trnL*-интрона и *trnL-trnF* межгенного спейсера) для данных четырех видов дают десять переменных участков на 750 н.п., что позволяет не только различить виды, но и обнаружить некоторый внутривидовой полиморфизм широкоареального *G. atrovioleaceus* из различных локаций.

Обладая на порядок большей информативностью, популярные баркоды ITS оказались мало пригодны для баркодирования гладиолусов из-за низкой специфичности стандартных праймеров. Электрофорез ПЦР-продуктов в этом случае почти всегда показывает минимум две полосы, так как исходные образцы, как гербарные, так и свежие полевые сборы, оказываются контаминированы ДНК грибов. Разделение ПЦР-продуктов препаративным форе́зом дополнительно удорожает данные, не устраняя полностью из смеси грибные последовательности ДНК с близкой молекулярной массой, и сиквенсы часто оказываются двоящимися до полной нечитаемости.

Использование более специфичных праймеров ITS-р несколько снижает уровень шума на итоговом сиквенсе, но не решает проблемы полностью.

# IN SEARCH OF DNA MARKERS SUITABLE FOR DNA BARCODING OF WESTERN ASIAN SPECIES OF *GLADIOLUS* L.

Antipin M. I.

Scientific and Educational centre "Peter the Great botanical garden", Lomonosov Moscow State University  
[sagefool@yandex.ru](mailto:sagefool@yandex.ru)

Molecular data are crucial for modern plant systematics, providing the most unbiased estimates of taxon limits and relations. Yet obtaining molecular data can be quite expensive considering lab resources, time and money. Thus a researcher has to pursue a natural goal of getting more information at minimal expense. DNA barcoding methods use short DNA sequences obtained with universal primers for taxon identification. Several nuclear (ITS) and plastome markers were proposed as universal barcodes for plants and were successfully used as those for many plant groups. Still in certain groups these popular barcodes fail to discriminate between taxons of interest, and then investigators have to go on a personal quest for better suiting barcodes.

Genus *Gladiolus* L. (Iridaceae) has two very distinct biodiversity hotspots: the thoroughly studied Cape floristic region with its more than 100 endemic species out of 300 in the genus, and Eastern Mediterranean with adjoining arid regions of Western Asia, where the number of well recognized species is tenfold less, but new species continue to be described during the last 50 years. Opinions vary also regarding the limits and relations of many Western Asian species described earlier in XX century. At present there are no publications that would successfully use molecular data to undermine the phylogeny within this group of species. This work is an attempt to estimate the applicability of a group of several DNA markers, traditionally used as DNA barcodes, as an informative and easy key to phylogeny of Western Asian *Gladiolus* species.

We selected three Western Asian species, thought to be close enough, but quite distinct in regards to morphology and habitat preferences (*G.atroviolaceus*, *G.kotschyanus*, *G.szovitsii*). At least two samples from spatially different populations were taken for each species from MW and ERE herbariums and the author's field collections. Sequences for a European species *G.communis* from GenBank were used as an outgroup.

Plastome sequences are known to amplify quite well with universal standard primers. Their main disadvantage is their relatively low variability, which is sometimes not enough to separate the species of a genus well. A partial *rbcL* gene sequence of about 500 np, so called *rbcL-a*, proved to be the least variable for our group, totally failing to separate the species. Five variable loci of about 800np long *matK* gene partial sequence have grouped the samples within the species together, at the same time separating all four species from each other. Finally *trnL-F* sequence (joined sequence of *trnL* intron and *trnL-trnF* intergenic spacer) has about 10 variable loci in a sequence about 750 np long, which proves enough to separate the 4 species and even shows some interspecific polymorphism for samples of widely distributed *G.atroviolaceus* from different locations.

The ITS sequences, being quite popular as plant barcodes due their highly informative variability, proved to be problematic for barcoding Gladioli because of low specificity of standard universal primers. Most *Gladiolus* samples, both herbarium specimens and fresh field collections, appear to be contaminated with fungal DNA that gets amplified together with plant DNA, and electrophoresis of PCR products usually yields at least two bands. Preparative EP separation of plant and fungal PCR products doubles the expense of data, at the same time it fails to eliminate fungal amplicones with similar molecular mass fully, which often results in unreadable doubling sequence reads. Plant specific ITS-p primers help to get rid of fungal amplicones with lower molecular mass and to reduce the noise level in sequence reads, but do not solve the problem fully.