



ПРОБЛЕМЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ЭКОНОМИЧЕСКИ ЦЕННЫХ РАСТЕНИЙ РОДА *WITHANIA*

*Михайлова Е.В.¹, Палкина И.М.²

¹Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, Россия.

²Уфимский государственный нефтяной технический университет, Уфа, Россия.

*E-mail: mikhele@list.ru

Резюме

Представители рода *Withania* семейства Пасленовых, растения *Withania somnifera* и *Withania coagulans* Dunal. ценны для фармацевтической и пищевой промышленности благодаря содержанию биологически активных соединений, в основном относящихся к классу витанолидов. Измельченные сушеные корни *W. somnifera* используются для производства БАДов. Помимо климатических условий и состава почвы, на состав метаболитов растений оказывает влияние генотип. Внешнее сходство *W. somnifera* и *W. coagulans* вероятно, может также приводить к случайной или намеренной подмене одного вида другим. Нами были проанализированы хлоропластные геномы 12 растений семейства Пасленовые и выявлены вариабельные участки некодирующего спейсера *atpF-atpH* и генов *rbcL* и *rpoB*, которые могут быть использованы для идентификации вида растения методом секвенирования по Сэнгеру. Также было выявлено три участка хлоропластного генома (*trnF-trnL - ndhJ-trnL*, *rbcL-accD* и *rpl36-rps8*) с инделами размером от 100 до 600 п.н., которые можно использовать для разработки ПЦР-тест-системы по определению вида экономически ценных растений рода *Withania*.

Ключевые слова: *Withania somnifera*, *Withania coagulans*, хлоропластный геном, филогенетическое древо

Цитирование: Михайлова Е.В., Палкина И.М. Проблемы генетической идентификации экономически ценных растений рода *Withania* // Biomics. 2024. V.16(3). P.328-334. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2024-21

© Авторы

PROBLEMS OF GENETIC IDENTIFICATION OF ECONOMICALLY VALUABLE PLANTS OF THE GENUS *WITHANIA*

*Mikhaylova E.V.¹, Palkina I.M.²

¹Institute of Biochemistry and Genetics UFRC RAS, Ufa, Russia

²Ufa State petroleum Technological University, Ufa, Russia

*E-mail: mikhele@list.ru

Resume

Representatives of the genus *Withania* of the *Solanaceae* family, the plants *Withania somnifera* and *Withania coagulans* Dunal. are valuable for the pharmaceutical and food industries due to the content of biologically active compounds, mainly belonging to the class of withanolides. Powdered dried roots of *W. somnifera* are used as dietary supplements. In addition to climatic conditions and soil composition, plant metabolism is affected by the genotype. The external similarity of *W. somnifera* and *W. coagulans* may also lead to accidental or intentional substitution of one species for the other. We analyzed the chloroplast genomes of 12 plants of the *Solanaceae* family and identified variable regions of the non-coding spacer *atpF-atpH* and the *rbcL* and *rpoB* genes, which can be used to identify the plant species by the Sanger sequencing method. We also identified three regions of the chloroplast genome (*trnF-trnL - ndhJ-trnL*, *rbcL-accD* and *rpl36-rps8*) with indels ranging from 100 to 600 bp, which can be used to develop a PCR test system for identifying the species of economically valuable plants of the genus *Withania*.

Key words: *Withania somnifera*, *Withania coagulans*, chloroplast genome, phylogenetic tree

Citation: Mikhaylova E.V., Palkina I.M. Problems of genetic identification of economically valuable plants of the genus *Withania*. *Biomics*. 2024. V.16(3). P.328-334. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2024-21 (In Russian)

© The Authors

Из 23 видов рода *Withania*, семейства Пасленовых, субтропические кустарники *Withania somnifera* и *Withania coagulans* являются экономически значимыми благодаря содержанию разнообразных биологически активных соединений с широким спектром полезных свойств, в том числе противоопухолевой, антибактериальной и противовирусной активностью, нейропротекторной активностью и др. [Khan et al., 2021]. Особенно ценны стероидные лактоны: витанолиды, витаферины, витанозиды, витакоагулины, витаноны, коагуланзины, коагулолиды [Xia et al., 2022; Михайлова и др. (Mikhailova et al.), 2022]. Измельченные сушеные корни *W. somnifera*, которую в Индии называют Ашвагандой, продают во всем мире в качестве БАДов.

Одним из факторов, препятствующих использованию индивидуальных стероидных лактонов в медицинских исследованиях, является сложность добычи, выделения и очистки, а также высокая стоимость. Поскольку литературные данные о концентрации и составе тех или иных метаболитов в различных органах *W. somnifera* и *W. coagulans* неоднозначны, можно предположить, что генетические факторы играют в этом важную роль. Более того, внешнее сходство *W. somnifera* (LE 01194966) и *W. coagulans* (MW0747341), вероятно, может приводить к случайной или намеренной подмене одного вида другим.

В одном из первых исследований, посвященных оценке уровней генетического разнообразия среди генотипов *W. somnifera*, один из селективно амплифицированных микросателлитных полиморфных локусов (SAMPL) был использован для разработки ПЦР-тест-системы [Negi et al., 2006]. Позднее на основе обнаруженных различий нуклеотидной последовательности ядерного маркера ITS было предложено выделить культивируемую форму *W. somnifera* в новый вид *Withania ashwagandha* [Malik et al., 2017]. Для 14 и 29 генотипов *W. somnifera* также были разработаны маркеры RAPD [Khanna et al., 2014; Venugopal et al., 2024]. Однако несмотря на то, что уже достаточно давно был прочитан транскриптом [Gupta et al., 2015] и хлоропластный геном [Mehmood et al., 2020], общепринятая панель молекулярных маркеров для идентификации *W. somnifera* и *W. coagulans* до сих пор не разработана.

Для хлоропластных геномов характерны многочисленные мутационные события, которые

широко используются в таксономических и филогенетических исследованиях и при разработке методов ДНК-штрихкодирования для идентификации и поддержания чистоты экономически значимых растений. Так, сравнительный анализ хлоропластных геномов *W. coagulans*, *W. adpressa* и *W. riebeckii* выявил 10 областей, подходящих для разработки молекулярных маркеров, филогенетического анализа и идентификации видов [Mehmood et al., 2020].

Целью настоящего исследования был поиск вариабельных участков в хлоропластных геномах *W. somnifera* и *W. coagulans*, а также определение видовой принадлежности семян *W. somnifera*, продаваемых на отечественном рынке.

Материалы и методы

Референсные последовательности хлоропластных геномов *W. somnifera* (NC_047245) и *W. coagulans* (NC_047176), а также близкородственных растений *Physalis minima* (NC_048515), *Physalis pubescens* (NC_048514), *Physalis angulata* (MH045574), *Solanum pseudocapsicum* (OQ632460), *Solanum wrightii* (MN218084), *Solanum confine* (NC_062495), *Solanum clivorum* (NC_062513), *Solanum barbulatum* (NC_062869), *Solanum lycopersicum* (NC_007898), а также вьюнка *Convolvulus arvensis* (NC_054224) в качестве внешней группы, загружали из базы данных NCBI и выравнивали в программе SnapGene с целью поиска наиболее вариабельных участков, подходящих для подтверждения видовой принадлежности методом секвенирования и ПЦР-анализа. Филогенетическое древо строили с использованием онлайн-ресурса NGPhylogeny.fr по алгоритму Maximum likelihood.

Для выделения ДНК использовали ранее полученные нами волосовидные корни [Михайлова и др. (Mikhaylova et al.), 2024], а также семена *W. somnifera* (ашваганды) производства ИП Григорьев и MagicForestSeeds, которые проращивали в почве. ДНК выделяли методом СТАБ, затем проводили ПЦР с использованием праймеров к хлоропластному маркеру *atpF-atpH*, *rbcL* и *groB* (Таблица 1).

ПЦР-продукты очищали при помощи Exo-Sap (Thermo, США), ставили секвенирующую реакцию с использованием BrilliantDye 3.1 (NimaGen, Нидерланды), очищали изопропанолом и растворяли в Hi-Di формамиде (Thermo, США). Секвенирование по Сэнгеру проводили на секвенаторе Нанофор (Синтол, Россия). Сиквенсы выравнивали в программе SnapGene.

Таблица 1.

Последовательности праймеров, использованные в работе

Хлоропластный маркер	F-праймер, 5'-3'	R-праймер, 5'-3'	Температура отжига, °C
atpF-atpH	GCTTTTATGGAAGCTTTAACAAT	ACTCGCACACACTCCCTTTCC	54
rbcL	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	GTAAAATCAAGTCCACCRCG	56
rpoB	ATGCAACGTCAAGCAGTTCC	CCGTATGTGAAAAGAAGTATA	54

Table 1. Sequences of the primers used in this research.

Chloroplast marker	F-primer, 5'-3'	R-primer, 5'-3'	Annealing temperature, °C
atpF-atpH	GCTTTTATGGAAGCTTTAACAAT	ACTCGCACACACTCCCTTTCC	54
rbcL	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	GTAAAATCAAGTCCACCRCG	56
rpoB	ATGCAACGTCAAGCAGTTCC	CCGTATGTGAAAAGAAGTATA	54

Результаты и их обсуждение

По результатам выравнивания хлоропластных геномов растений семейства Пасленовые и построения филогенетического дерева было показано, что хлоропластные геномы *W. somnifera* и *W. coagulans* отличаются друг от друга в большей степени, чем от

геномов растений родов *Physalis* и *Solanum*. Несмотря на высокий уровень внешнего сходства, *W. somnifera* продемонстрировала большее генетическое сходство с растениями рода Паслен (*Solanum*), а *W. coagulans* - с растениями рода Физалис (Рис. 1).

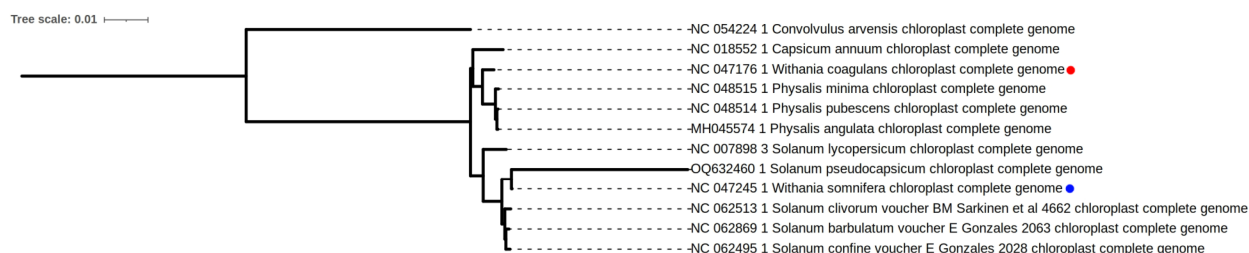


Рисунок 1. Филогенетическое дерево, построенное на основе хлоропластных геномов 11 видов пасленовых, а также вьюнка в качестве внешней группы. *W. somnifera* и *W. coagulans* отмечены цветными точками.
Figure 1. Phylogenetic tree constructed from chloroplast genomes of 11 *Solanaceae* species, bindweed selected as an outgroup. *W. somnifera* and *W. coagulans* are marked with colored dots.

Таким образом, очевидно, хлоропластные геномы этих растений хорошо подходят для идентификации видов. Анализ последовательностей хлоропластных геномов показал, что секвенирование переменных участков некодирующего спейсера *atpF-atpH* и генов *rbcL* и *rpoB* может быть использовано для идентификации вида растения. Данные участки были секвенированы у исследуемых образцов растений, и все из них на 100% соответствовали последовательности хлоропластного генома *W. coagulans* (NC_047176) (Рис. 2). Таким образом, семена растений, продающиеся как *W.*

somnifera, по всей видимости, не относятся к этому виду, а значит, имеют состав метаболитов, отличающийся от ожидаемого. Данный факт также может быть связан с тем, что в России *W. somnifera* входит в Перечень растений и продуктов их переработки, запрещенных для использования в составе биологически активных добавок к пище из-за содержания психотропных, наркотических, сильнодействующих или ядовитых веществ согласно техническому регламенту Таможенного союза "О безопасности пищевой продукции", тогда как *W. coagulans* в этом списке отсутствует.

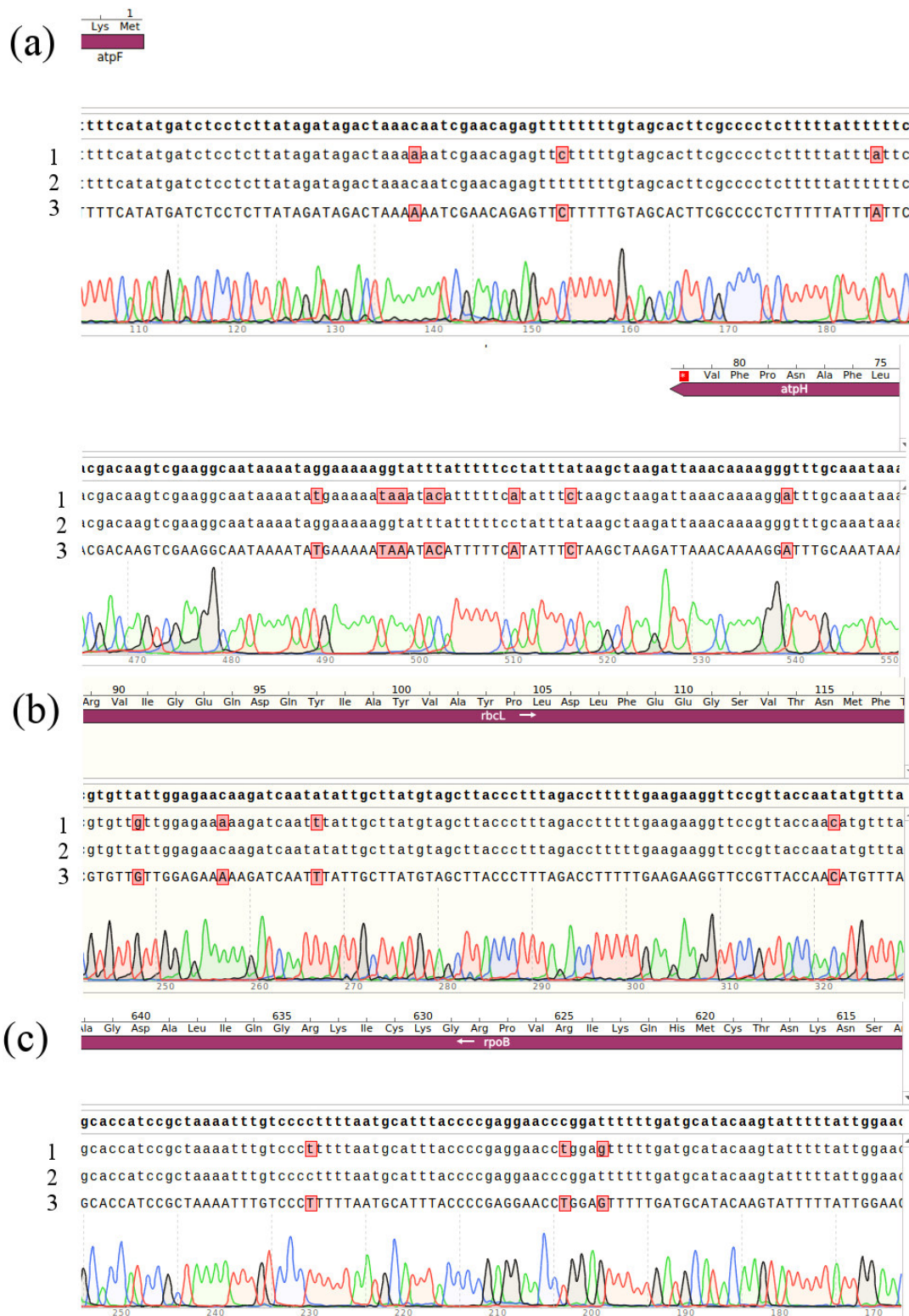


Рисунок 2. Полиморфные участки хлоропластного генома растений рода *Withania*: (a) *atpF-atpH*, (b) *rbcL*, (c) *rpoB*. 1 — *W. coagulans*, 2 — *W. somnifera*, 3 — просеквенированный образец
 Figure 2. Polymorphic regions of chloroplast genome in genus *Withania*: (a) *atpF-atpH*, (b) *rbcL*, (c) *rpoB*. 1 — *W. coagulans*, 2 — *W. somnifera*, 3 — sequenced sample

Помимо этого, при сравнении хлоропластных геномов двух растений были выявлены три участка, амплификация которых должна приводить к образованию продуктов разной длины (с разницей от 100 до 600 п.н.), хорошо различаемых на гель-

электрофорезе (Рис. 3). Участки *trnF-trnL - ndhJ-trnL*, *rbcL-accD* и *rpl36-rps8* хлоропластных геномов *Withania sp.* могут использоваться при разработке ПЦР-тест-системы для идентификации вида растения.

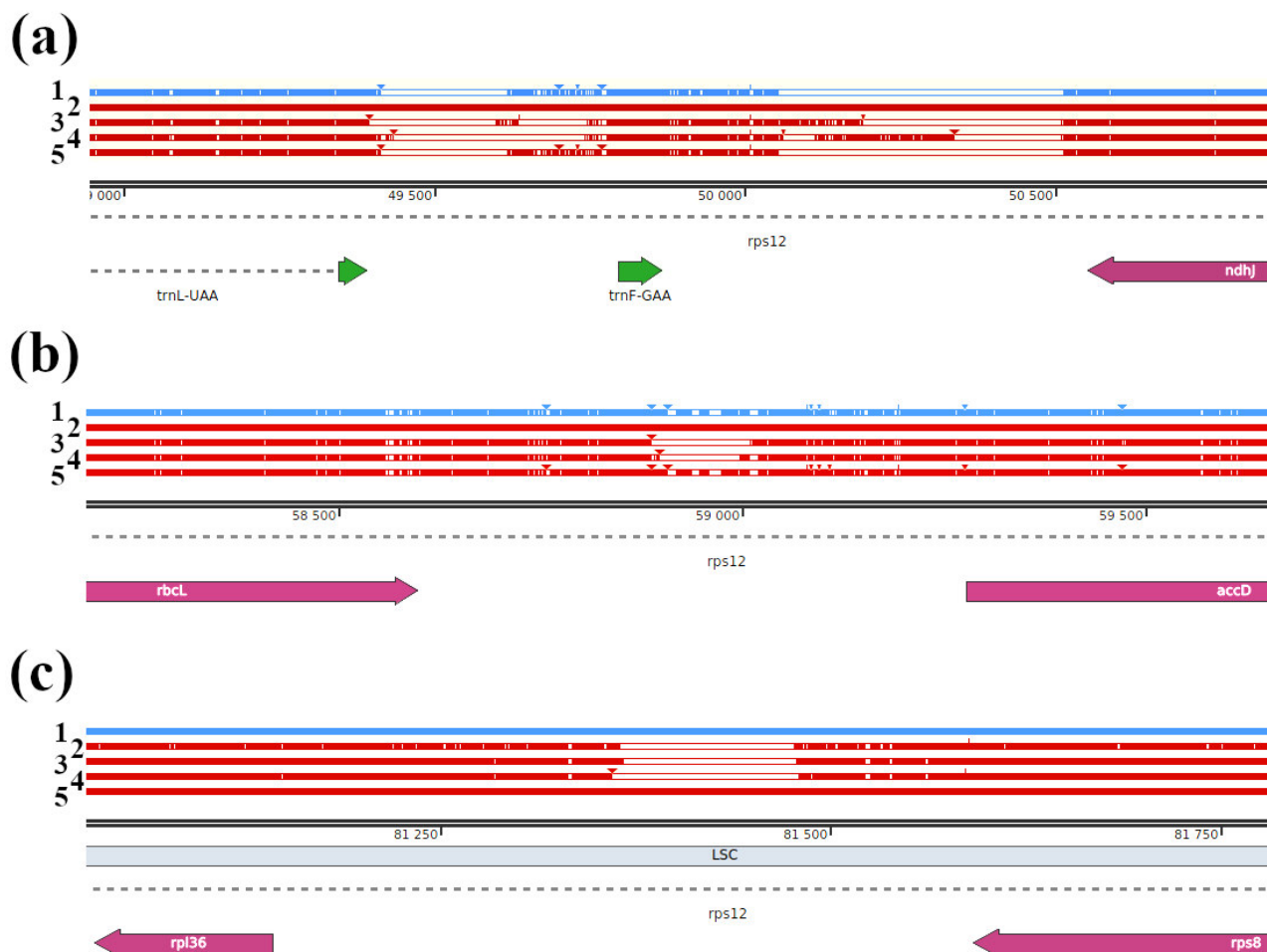


Рисунок 3. Варибельные участки хлоропластного генома: (a) *trnF-trnL - ndhJ-trnL*, (b) *rbcL-accD*, (c) *rpl36-rps8*. 1 - *W. coagulans* (NC_047176), 2 - *W. somnifera* (NC_047245), 3 - *W. somnifera* OR16675, 4 - *W. somnifera* OR16674, 5 - *W. somnifera* MK142783

Figure 3. Variable regions of chloroplast genomes: (a) *trnF-trnL - ndhJ-trnL*, (b) *rbcL-accD*, (c) *rpl36-rps8*. 1 - *W. coagulans* (NC_047176), 2 - *W. somnifera* (NC_047245), 3 - *W. somnifera* OR16675, 4 - *W. somnifera* OR16674, 5 - *W. somnifera* MK142783

Необходимо отметить, что помимо референсного хлоропластного генома *W. somnifera* (NC_047245) в базе данных NCBI имеются еще три - OR16675, OR16674 и MK142783 [Mehmood et al., 2020], у которых последовательности *atpF-atpH*, *rbcL* и *rpoB* соответствуют таковым у референсного генома *W. coagulans*. Однако участки с крупными инделами (*trnF-trnL - ndhJ-trnL*, *rbcL-accD* и *rpl36-rps8*) отличаются у всех пяти хлоропластных геномов (Рис. 3). Это может говорить как об ошибках в определении

вида изучаемого растения, так и о наличии большего количества видов и/или подвидов витании, нежели предполагалось ранее.

Таким образом, у экономически ценных растений рода *Withania* наблюдается высокий уровень генетического разнообразия, безусловно, отражающийся на составе ценных метаболитов, которые потенциально могут использоваться в медицине. Секвенирование геномов и отдельных генов необходимо сопровождать анализом

метаболома, чтобы выявить взаимосвязь между генотипом растения и его биохимическим составом.

Литература

1. Михайлова Е.В. Перспективы использования лекарственного растения *Withania somnifera* для производства фармацевтических препаратов биотехнологическим способом // *Biomics*. 2022. Т.14(3). С. 192-208. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2022-14
2. Михайлова Е.В., Панфилова М.А., Федяев В.В., Кулуев Б.Р. Влияние содержания макро- и микроэлементов в питательной среде на продуктивность культур волосовидных корней *Withania coagulans* // *Биотехнология*. 2024. 40(1). Р. 15–23. DOI: 10.56304/S0234275824010083
3. Образец LE 01194966 // Виртуальный гербарий Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН — <http://rr.herbariumle.ru/01194966>
4. Серегин А. П. (ред.) Образец MW0747341 из коллекции "Гербарий МГУ" // Депозитарий живых систем "Ноев Ковчег" (направление "Растения"): Электронный ресурс. – М.: МГУ, 2024. – Режим доступа: <https://plant.depo.msu.ru/open/module/itempublic?d=P&openparams=%5Bopen-id%3D78116014%5D> (дата обращения 06.11.2024). - Лицензия CC-BY 4.0.
5. Gupta P., Goel R., Agarwal A.V., Asif M.H., Sangwan N. S., Sangwan R.S., Trivedi P.K. Comparative transcriptome analysis of different chemotypes elucidates withanolide biosynthesis pathway from medicinal plant *Withania somnifera* // *Scientific Reports*. 2015. V. 5(1). 18611. DOI: 10.1038/srep18611
6. Khan M.I., Maqsood M., Saeed R.A., Alam A., Sahar A., Kieliszek M., Miecznikowski A., Muzammil H.S., Aadil R. M. Phytochemistry, Food Application, and Therapeutic Potential of the Medicinal Plant (*Withania coagulans*): A Review // *Molecules*. 2021. V. 26(22), 6881. DOI: 10.3390/molecules26226881
7. Khanna P. K., Chandra R., Kumar A., Dogra N., Gupta H., Gupta G., Verma V. Correlation between morphological, chemical and RAPD markers for assessing genetic diversity in *Withania somnifera* (L.) Dunal. // *Journal of Crop Science and Biotechnology*. 2014. V. 17(1). P. 27–34. DOI:10.1007/s12892-013-0104-8
8. Malik S., Mir B.A., Singh H.K., Chaudhary M., Raina S.N., Babbar S.B. DNA Barcodes Distinguish *Withania somnifera* and *Withania ashwagandha* // *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*. 2018. V. 88(4). P. 1413–1424. DOI: 10.1007/s40011-017-0879-3
9. Mehmood F., Abdullah Ubaid Z., Bao Y., Poczai P., Mirza B. Comparative Plastomics of *Ashwagandha* (*Withania, Solanaceae*) and Identification of Mutational Hotspots for Barcoding Medicinal Plants // *Plants*. 2020. V. 9(6). 752. DOI: 10.3390/plants9060752
10. Negi M., Sabharwal V., Wilson N., Lakshmikumaran M. Comparative analysis of the efficiency of SAMPL and AFLP in assessing genetic relationships among *Withania somnifera* genotypes // *Curr. Sci*. 2006. V. 9. P. 464–471.
11. Venugopal S., Padma M., Rajkumar M., Seenivasan N., Saidaiah P., Sathish G., Jnanesha A.C., Kumar R.S., Lal R.K. The qualitative and molecular categorization for genetic diversity in *Withania somnifera* (L.) Dunal. // *Ecological Genetics and Genomics*. 2024. P. 33. 100294. DOI: 10.1016/j.egg.2024.100294
12. Xia G., Cao S., Chen L., Qiu F. (2022). Natural withanolides, an update // *Natural Product Reports*. 2022. V. 39(4). P. 784–813. DOI: 10.1039/D1NP00055A

References

1. Gupta P., Goel R., Agarwal A.V., Asif M.H., Sangwan N.S., Sangwan R.S., Trivedi P.K. Comparative transcriptome analysis of different chemotypes elucidates withanolide biosynthesis pathway from medicinal plant *Withania somnifera*. *Scientific Reports*. 2015. V. 5(1). 18611. DOI: 10.1038/srep18611
2. Khan M. I., Maqsood M., Saeed R. A., Alam A., Sahar A., Kieliszek M., Miecznikowski A., Muzammil H. S., Aadil R. M. Phytochemistry, Food Application, and Therapeutic Potential of the Medicinal Plant (*Withania coagulans*): A Review. *Molecules*. 2021. V. 26(22). 6881. DOI: 10.3390/molecules26226881
3. Khanna P.K., Chandra R., Kumar A., Dogra N., Gupta H., Gupta G., Verma V. Correlation between morphological, chemical and RAPD markers for assessing genetic diversity in *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Journal of Crop Science and Biotechnology*. 2014. V. 17(1). P. 27–34. DOI: 10.1007/s12892-013-0104-8
4. Malik S., Mir B.A., Singh H.K., Chaudhary M., Raina S.N., Babbar S.B. DNA Barcodes Distinguish *Withania somnifera* and *Withania ashwagandha*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*. 2018. V. 88(4). P. 1413–1424. DOI: 10.1007/s40011-017-0879-3
5. Mehmood F., Abdullah Ubaid Z., Bao Y., Poczai P., Mirza B. Comparative Plastomics of *Ashwagandha* (*Withania, Solanaceae*) and Identification of Mutational Hotspots for Barcoding Medicinal Plants. *Plants*. 2020. V. 9(6). 752. DOI: 10.3390/plants9060752
6. Mikhaylova E.V. Prospects for the Application of the Medicinal Plant *Withania Somnifera* for Biotechnological Production of Pharmaceuticals. *Biomics*. 2022, 14(3). P. 192–208. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2022-14(In Russian)
7. Mikhaylova E.V., Panfilova M.A., Fedyaev V.V., Kuluev B.R. The impact of the content of macro- and microelements in the culture medium on the productivity of

- Withania coagulans* hairy root cultures. *Biotekhnologiya = Biotechnology*. 2024. V.40(1). P. 15–23. DOI: 10.56304/S0234275824010083. (In Russian)
8. Negi M., Sabharwal V., Wilson N., Lakshmikumaran M. Comparative analysis of the efficiency of SAMPL and AFLP in assessing genetic relationships among *Withania somnifera* genotypes. *Curr. Sci.* 2006. V. 9. P. 464–471.
9. Specimen LE 01194966. Virtual herbarium of Komarov Botanical Institute RAS — <http://re.herbariumle.ru/01194966>
10. Seregin A. P. (ed.) Sample MW0747341 from the collection "Herbarium of Moscow State University". Depository of living systems "Noah's Ark" (direction "Plants"): Electronic resource. - M.: Moscow State University, 2024. - Access: <https://plant.depo.msu.ru/open/module/itempublic?d=P&openparams=%5Bopen-id%3D78116014%5D> (дата обращения 06.11.2024). – License CC-BY 4.0.
11. Venugopal S., Padma M., Rajkumar M., Seenivasan N., Saidaiah P., Sathish G., Jnanesha A.C., Kumar R.S., Lal R.K. The qualitative and molecular categorization for genetic diversity in *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Ecological Genetics and Genomics*. 2024. V. 33. 100294. DOI: 10.1016/j.egg.2024.100294
12. Xia G., Cao S., Chen L., Qiu F. (2022). Natural withanolides, an update. *Natural Product Reports*. 2022. V. 39(4). P. 784–813. DOI: 10.1039/D1NP00055A