

Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Києво-Могилянська академія»
Факультет природничих наук

Кафедра біології
Магістерська робота
освітній ступінь - магістр

на тему «**ДИСКРИМІНАЦІЯ ВИДІВ У РОДІ *SALVIA* З
ВИКОРИСТАННЯМ ГЕНЕТИЧНО-МАРКЕРНИХ СИСТЕМ**»

Виконала: студентка 2-го року навчання
спеціальності 091 — біологія
Коба Поліна Олександрівна

Керівник
Антонюк М.З.,
доктор біологічних наук, професор
кафедри біології НаУКМА

Рецензент Шалак В. Ф.,
кандидат біологічних наук, с.н.с., ІМБІГ

Магістерську роботу захищено
з оцінкою _____

Секретар ЕК _____
Пасічник Т.В.
«____» червня 2020 року

Київ – 2020

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ_____	4
ВСТУП_____	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ_____	8
1.1. Значення шавлії_____	8
1.2. Морфологічні особливості, спосіб репродукції_____	10
1.2.1. Морфологічні особливості та ознаки, на які звертають увагу при систематиці_____	10
1.2.2.Розмноження_____	12
1.3. Систематика роду <i>Salvia</i> _____	13
1.4. Геном роду <i>Salvia</i> _____	15
1.4.1 Загальна характеристика геному роду <i>Salvia</i> _____	15
1.4.2. Повтори – елементи геному, які впливають на формування геному шавлії_____	18
1.4.3. Гібридне видоутворення_____	19
1.4.4. Способи доведення гібридного походження_____	20
1.5. Характеристика генетичних маркерних систем для вивчення представників роду_____	22
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	
РОЗДІЛ 2. ОБ’ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ_____	25
2.1. Характеристика рослинного матеріалу_____	25
2.2. Отримання зразків ДНК для роботи_____	27
2.2.1. Виділення ДНК із рослинного матеріалу_____	27
2.2.2. Спектрофотометричне вимірювання концентрацій виділеної ДНК_____	28
2.3. Проведення полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР)_____	29
2.4. Візуалізація зразків у агарозному гелі_____	32

2.5. Візуалізація зразків в акриламідному гелі	33
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	35
3.1. Візуальне порівняння насіння трьох зразків	35
3.2. Характеристика отриманих зразків ДНК	36
3.3. Результати аналізу	38
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	42
ВИСНОВКИ	44
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	45

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

IRAP	–	Inter Retrotransposone Amplified Polymorphism
RAPD	–	Random Amplified Polymorphic DNA
SSR	–	Simple Sequence Repeats
ПЛР	–	полімеразна ланцюгова реакція

ВСТУП

Для широкого кола ботанічних досліджень важливою ланкою або кінцевою ціллю є аналіз видового складу, ботанічних і морфологічних особливостей видів однієї таксономічної групи (родини або роду) певної території. Вивчення видового складу та проявів внутрішньовидової мінливості необхідні для розвитку теоретичної екології, генетики рослин, популяційної біології. Також визначення видового складу господарчо цінних родів та родин, їх географічного поширення є важливим етапом розвитку промисловості. Початкові дані та уявлення про таксономічну приналежність періодично повинні бути переглянуті, так як можливі зміни видового складу (гібридизація, поява нових або зникнення старих видів), а також з'являються нові методи досліджень, доповнюються традиційні. Широкий спектр використання результатів досліджень з визначення видів і зумовлює їх актуальність.

Використання видів шавлії у різних галузях господарства обумовлює зацікавленість щодо родини не лише в практичному, але й в теоретичному аспекті. Велика кількість досліджень з ботаніки та генетики стосуються проблем та питань, пов'язаних з родом *Salvia* — видоутворення, міжвидова гібридизація, міжвидова мінливість, популяційно-фенотиповий поліморфізм, регіональна оцінка видового складу — та проводяться у різних країнах світу [1].

Систематику роду Шавлії розробив G. Bentham у 1833 р., а вдосконалив J. Briquet у 1897. Але проведені дослідження останніх років показали, що багато ознак, які є визначальними для підродів, потребують уточнення, а також морфологічні ознаки не завжди є надійним критерієм для визначення за умов гібридизації близькоспоріднених видів.

Під *Salvia* L. за морфолого-анатомічними ознаками поділяють на 7 підродів. Така класифікація заснована на су'єктивному підході до опису рослини і не завжди відповідає дійсному стану речей. Дискусії щодо

належності видів шавлії до секцій, підсекцій і рядів завжди мали місце. Морфологічні характеристики залежать від умов навколишнього середовища, що робить ідентифікацію видів більш складною [2].

Sepehry Javan та ін. (2012) визначили три основних фактори, які впливають на генетичне різноманіття шавлій: вид, ареал географічного поширення та добір. Саме ці фактори разом з перехресним запиленням спричиняють неясність в таксономії та генетичних зв'язках видів *Salvia* [3].

Генетична характеристика має важливе значення для виявлення рівня генетичного різноманіття рослин певного ареалу, для виявлення вигідніших генотипів для вирощування в промислових цілях, особливо це стосується такого географічно диференційованого роду як *Salvia* [4, 5].

Зараз розроблено кілька систем молекулярних маркерів на основі ДНК або для ідентифікації сорту(виду), або для оцінки генетичних зв'язків між видами рослин. Ці методи є економічно вигідними, високо поліморфними і не залежать від умов навколишнього середовища[6].

Рід шавлії схильний до високого рівня гібридизації, що може призвести до зникнення певного виду, або прийняття гібриду за окремий вид. Припускають, що шавлія кременецька може бути гібридом двох інших видів, які зростають в ботанічних колекціях. Так як цей вид є рідкісним та потребує охороги, його необхідно точно ідентифікувати не лише за морфологічними критеріями, які не завжди є точними. Через можливі загрози для цього роду і зокрема певних видів існує потреба оцінити різноманітність його диких популяцій. Показано, що IRAP і RAPD молекулярні методи є надійними для виявлення поліморфізму між близькоспорідненими видами. А зберігання та одомашнення роду *Salvia* повинні відповідати рівням генетичної варіації [7].

Шавлія кременецька (*Salvia cremenecensis*) — подільський ендемічний вид, що потребує охорони та збереження. Вона занесена до Червоної книги України та дуже рідко трапляється на схилах Кременецьких гір в Тернопільській області, Середньому Придністров'ї Хмельницької області та на Товтровому кряжі Вінницької. Потребує уточнення ареалу, детального

вивчення умов зростання і охорони. Вид знаходиться під охороною в природному заповіднику «Медобори» та його філії «Кременецькі гори» та в ботанічному заказнику загальнодержавного значення Ваканци [8].

Генетичне різноманіття рослин є важливим фактором їх одомашнення, збереження та розмноження. Тому багато робіт присвячено оцінці генетичної мінливості методами IRAP і RAPD у різних видів *Salvia* [3, 4, 5, 9, 10, 11, 12].

Також Hedge ставить під сумнів видовий статус шавлії кременецької та відносить її до таксону гібридного походження, з вихідним батьківським видом *S. nutans* [13, 14].

У роботі було використано методику ПЛР, що базується на використанні IRAP (Inter Retrotransposone Amplified Polymorphism) та REMAP (Retrotransposone Microsatellite Amplified Polymorphism) маркерів. Їхня висока роздільна здатність була підтверджена в низці робіт.

Роботу виконували в лабораторії генетики та клітинної біології кафедри біології НаУКМА.

Мета роботи: підтвердити чи спростувати твердження про те, що *Salvia cremenecensis* (Бессар), яка зростає в колекціях «Кременецьких гір» є гібридом між *Salvia nutans* та *Salvia dumetorum*.

Для досягнення мети було поставлено наступні завдання:

1. Визначити видиму різницю між видами шавлії на фенотиповому рівні
2. Спираючись на літературні джерела, підібрати праймери до мікросателітних послідовностей
3. Проаналізувати наявний рослинний матеріал, за праймерами до мікросателітних локусів на наявність поліморфізму.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Значення шавлії

Рід шавлія (*Salvia* L.) включає немало господарсько цінних рослин: лікарських, ефіро- і масляноолійних, пряно-ароматичних, медоносних і декоративних. В Європі в квітникарстві та озелененні використовується не менше 17 видів шавлій. Використання роду *Salvia* широко представлене в таких галузях, як фармацевтика, виготовлення продуктів харчування та прянощів [3].

Як найчисельніший рід шавлія активно культивується в різних частинах світу, особливо в тропічних районах, таких як Китай (84 види), Іран (58 види), Середземномор'я, південний схід Африки, Центральна та Південна Америка [12, 15].

Окрім того, види *Salvia* мають яскраві фармакологічні характеристики, включаючи протизапальні, антитромбоцитарні, антитромботичні властивості, через те що мають велику кількість метаболітів як основних хімічних компонентів [11].

Шавлію також використовували для лікування різноманітних захворювань, таких як синдром набутого імунodefіциту людини (СНІД), діабету, порушень функцій печінки та хвороби Альцгеймера [9].

У 80-90х роках минулого століття почали інтенсивні дослідження антиоксидантних властивостей шавлій (та лікування завдяки ним різноманітних хвороб), результати яких є актуальними і донині [16, 17, 18].

Показано, що рослина має широкий спектр біологічної активності, включаючи антибактеріальну та протигрибкову дію, також є в'язучий ефект на основі естрогену та тіаніну [17, 19].

Важливим є те, що ефірні олії шавлії були визначені як гіпотензивні та спазмолітичні, а також мали дію пригнічування активності нервової системи [20, 21].

Лікувальні властивості гідроетанолового екстракту шавлії досліджували на моделях ран. *S. officinalis* містить велику кількість фітохімічних речовин – фенольні, флавоноїдні сполуки, які пришвидшують загоєння ран через очищення їх від вільних радикалів. Введення екстракту інгібувало пошкодження РНК. Автори дослідження зробили висновок, що *S. officinalis* значно знижує викликаний запаленням окисний стрес і рівень пошкодження РНК в клітинах епідермісу шкіри [22].

Шавлія – важливий компонент природних та штучних екосистем, є складником рослинних угруповань багатьох кліматичних зон світу [13]. Основними еволюційними центрами цього космополіту є: Центральна та Південна Америка (близько 500 видів), Центральна Азія та Середземномор'я (близько 250 видів), Східна Азія (близько 90 видів) [23].

1.2. Морфологічні особливості, спосіб репродукції

1.2.1. Морфологічні особливості та ознаки, на які звертають увагу при систематиці. При систематиці шавлій у визначниках описуються висота, форма стебла, суцвіття, форми віночку квітів, форма та розмір насіння, наявність та ступінь опушення. Шавлії – багаторічні трави, задерев'янілі біля основи. Корінь довжиною 25-72 см. Епідерміс коренів блідо-коричневий, закруглений. Стебло довжиною 16,5-38,5 см, прямокутне, пряме, висхідне. Стебло покрите залозистими волосками та ворсинками. Листя також має залози, продовгувато-яйцевидне, в основному базальне. Залозисті волоски та ворсинки присутні як на верхній, так і на нижній частині епідермісу листків. Краї листка зубчасті. Квіти зигоморфні, розташовані по вертикалі на осі може бути від 2 до 16. Форма чашечки з розширенням. Чашечка 18-24 мм, а віночок 28-36 мм. Верхня губа віночка має дві дольки – віночок двогубий. Трубка віночка пряма (не сплюснена). Тичинкова нитка довжиною 7-10 мм, а пиляк – 2-3 мм. Приймочка роздвоєна [24].

Характерною особливістю роду *Salvia* є наявність двох тичинок у вигляді важільного механізму, які адаптовані до ентомофілії. Під верхньою губою розташовані дві тичинки, вони закріплені, як важіль, коротке плече закінчується лопаттю, яка перекриває отвір у трубку квітки, довге ж плече має на кінці пиляк. Коли комаха намагається дістати нектар з дна трубки, то автоматично на неї струшується пилок з верхньої частини після натискання на лопать тичинки. В межах роду морфологія тичинок дуже мінлива, і важільний механізм у більшості видів не спеціалізований для певного запилювача. Цей унікальний механізм запилення відіграє важливу роль у видоутворенні роду *Salvia* і вважається причиною його високої монофільності. Але пізніше було показано [23, 25], що важільний механізм в роді *Salvia* розвивався незалежно, принаймні, три рази, і це було переконливим доказом поліфілетичного походження роду.

З біоморфологічної точки зору у шавлії розглядаються в такі етапи: 1) вивчається габітус (структура осьової частини); 2) структура осьової системи співвідносяться з певними життєвими формами і виявляються основні напрямки морфологічної еволюції системи стебла та пагона, що виникли при адаптації до різних умов середовища [24, 26].

Осьова система всіх видів шавлії складається зі скелетної вегетативної частини і короткоживучої генеративної, представлені суцвіттями. Для опису прийнятий понятійний апарат концепції архітектурних моделей. Вона являє собою повністю модулярну архітектурну модель, тобто безперервну послідовність морфологічно рівноцінних модулів, нарастаючих один за іншим симподіально. Модулем тут виступає структурна одиниця осьової системи, що представляє результат діяльності однієї меристеми з моменту її виникнення і до переходу в генеративний стан [27].

Перший модуль у всіх видів шавлії представлений моноподіальним нарастаючим головним пагоном у вегетативному стані. Після генеративної диференціації його апекса наростання осьової системи здійснюється за рахунок аксілярних меристем, що утворюють осі заміщення. Модуль і суцвіття, яке його закриває, утворюють в сукупності моноаксіальну архітектурну одиницю [26, 27].

Генеративні осьові системи різних видів шавлії також організовані за модульним принципом і відрізняються за ступенем складності. Модуль суцвіття, або флоральна одиниця представлена тирсом з вкороченими бічними осями, що складають його суцвіття – варіанти дихазію, у якого одна з бічних осей третього і наступних порядків зазвичай не розвивається. Процеси редукції суцвіття виражаються не тільки в укороченні осей, але і в зменшенні числа квіток. Фіксоване число квіток в дихазії, рівне трьом, очевидно, є еволюційно вигідним станом даної ознаки [26].

Під час опису виду звертають увагу на форму та розмір листя, ступінь опушеності, форму та розмір горішків, кут відгину верхньої та нижньої губ, розмір віночку.

1.2.2. Розмноження. В результаті природнього добору, опосередкованого запилювачами, у квіткових рослин виникло велике різноманіття адаптацій квітки і репродуктивних стратегій. Форма та функціонування статевих одиниць визначають закономірності розсіювання і потрапляння пилку і разом з системою несумісності визначають репродуктивні можливості рослини. Розмноження певних родів зазвичай вивчає репродуктивна біологія, яка є дуже важливою галуззю для дослідження, збереження та штучного культивування рідкісних та ендемічних видів через обмежений розмір популяції або ареал розповсюдження [28].

Розмноження є одним з найважливіших етапів, який визначає чисельність організмів та їх розподіл. Репродуктивні стратегії визначають кількість і якість нащадків, а значить, і потік генів у часі та просторі [29, 30].

Репродуктивні стратегії особливо актуальні для рідкісних, ендемічних видів, бо вони можуть повністю зникнути, якщо поступово зменшуватиметься кількість особин чи популяцій, і нею визначається генетичний склад і фертильність, чиниться вплив на динаміку популяцій і довгострокову сталість [31]. Велике різноманіття адаптацій до ротового апарату комах та репродуктивних стратегій розвинулося у рослин в результаті природнього добору під час взаємодії з запилювачами [29, 32, 33]. Не зважаючи на те, що більшість рослин еволюціонували за розвитком перехресного запилення, репродуктивні системи можуть мати обов'язкову певну схему схрещування, буди змішано- або самозапильними. Репродуктивна стратегія залежить від форми та функцій статевих одиниць (тичинок, маточок, квіток, суцвіть), які і визначають модель розсіювання і прийняття пилку, разом з системою несумісності, яка контролюється генетично [29, 30, 32].

Кожна репродуктивна система має свої переваги та недоліки [34, 35, 36]. Загалом, ауткросинг дає можливість для потоку генів всередині або серед популяцій, тому збільшується генетичне різноманіття і, можливо, підвищує продуктивність потомства, його адаптивні можливості [37, 38]. Але така

стратегія також несе енергетичні витрати, неопосередковано впливає на кількість запилювачів та приваблення травоїдних то ареалу розповсюдження [39, 40]. В умовах інбридингу і самозапилення можуть виникати та зберігатися певні адаптаційно вигідні гени і їх комбінації [30, 41]; але пізніше це може призвести до депресії інбридингу через зменшення генетичного різноманіття [30, 42]. Змішані системи схрещування поширені в природі і притаманні гермафродитним рослинам, які як самозапилюються, так і перехресно навіть з іншими видами (міжвидова гібридизація) [37].

З морфологічної точки зору рід *Salvia* представляє велике різноманіття видів запилення [43, 44], хоча репродуктивна біологія вивчала не так багато видів. Дослідження, які проводилися на представниках роду, показали, що види в основному, самозапильні і протоандричні гермафродити [45, 46]. Цвіте шавлія з травня до липня, плід — чотиригорішок.

1.3. Систематика роду *Salvia*

Рід *Salvia* включає близько 900 видів, систематичне положення роду в родині *Lamiaceae* точно не визначено. Спершу його відносили до підродини *Stachyoideae*. Але в більш пізніх систематиках, які базувалися на порівняльній морфології та молекулярній філогенії, рід *Salvia* віднесли до підродини *Nepetoideae* [47, 48].

Рід *Salvia* описаний К. Ліннеєм (Linnaeus, 1753). Сучасна систематика в рід включає види, які раніше були описані в складі самотійних родів *Schraderia* Medik., *Covola* Medik., *Horminum* Moench, *Sclarea* Moench, *Jungia* Moench, *Stenarrhena* D.Don, *Leonia* La Llav. et Lex., *Audibertia* Benth., *Rhodochlamys* Schau., *Salviastrum* Scheele, *Polakia* Stapf, *Ramona* Greene. В світовому масштабі опрацював вид G. Benthams (1833), створив систематику роду, яку вдосконалив J. Briquet (1897). Benthams виділив 14 секцій, які об'єднав в 4 підродини [49].

Комаров у своїх роботах по флорі СРСР рід *Salvia* L. за морфолого-анатомічними ознаками поділяє на 7 підродів. Підрід *Eusalvia* Pobed. складається із трьох секцій: *Eusphace* Benth.in Hook., *Physosphace* Bge та *Drymosphace*. Секція *Eusphace* Benth.in Hook. містить 5 рядів: *Officinales* Pobed. (*S. officinalis* L. та *S. grandiflora*), *Trigonocalyx* Pobed. (*S. trigonocalyx* Woron.), *Pachystachya* Pobed. (*S. pachystachya*, *S. Alexandri*, *S. Garedji* Troitzki, *S. rosifolia*), *Ringentes* Pobed. (*S. ringens* Sibth.) та *Scabiosifoliae* Pobed. (*S. Scabiosifolia*, *S. adenostachya* Juz., *S. Demetrii*). Секція *Physosphace* Bge містить *S. Trautvetteri* Rgl., *S. Lipskyi* Pobed., *S. Komarovii* Pobed., *S. submutica* Botsch.et Vved., *S. glabricaulis* Pobed. та *S. lilacinocoerulea* Nevski. Секція *Drymosphace* містить *S. glutinosa* L. та *S. Forskaehlei* (*S. Forskolei*) L. Mant. До підроду *Macrosphace* Pobed. входять п'ять видів: *S. Schmalhauseni* Rgl., *S. Margaritae* Botsch., *S. Drobovii* Botsch., *S. aequisens* Botsch. і *S. campylodonta* Botsch. З підроду *Leona* на території СНД зустрічається тільки один вид *S. Plebeja* R. Br. Prodr., який належить до секції *Notiosphace* Benth. Lab. Gen. Підрід *Sclarea* (Moench) Benth. in Benth. a. Hook. f. Gen. складається із чотирьох секцій: *Horminum* (Moench) Benth. Lab. Gen. et sp., *Stenarrhena* (Don) Briq. in Pflanzenfam., *Macrocalyx* Pobed. sect. n. en Addenda, *Plethiosphace* Benth. in Hook. До секції *Horminum* (Moench) Benth. Lab. Gen. et sp. входять *S. horminum*, L. *S. viridis* L. та *S. intercedens* Pobed. Секція *Stenarrhena* (Don) Briq. in Pflanzenfam. містить дві підсекції *Homalosphaceae*, до якої входить 5 рядів: *Syriacae* Pobed. (*S. syriaca* L.), *Spinosa* Pobed. (*S. spinosa* L., *S. nachiczewanica* Pobed., *S. macrosiphon* Boiss.), *Comparia* Pobed. (*S. compar* Trautv.ex D. Sosn.), *Seravschanicae* Pobed. (*S. zeravschanica*, *S. Gontscharovii* Kudr.) та *Canescentes* Pobed. (*S. canescens* C.A.M. *S. daghestanica* Sosn.); та *Gongrosphaceae* Briq. in Pflanzenfam., до якої входять 8 рядів: *Sclareae* Pobed. (*S. sclarea* L.), *Kopetdagenses* Pobed. (*S. kopetdaghensis* Kudr., *S. Linczewskii* Kudr., *S. Grossheimii* Sosn., *S. hajastana* Pobed., *S. karabachensis* Pobed.), *Lanatae*. Pobed. (*S. aethiopis* L.), *Verbascifoliae* Pobed. (*S. verbascifolia* , *S. Andreji* Pobed., *S. xanthocheila* Boiss.), *Limbatae* Pobed. (*S.*

limbata C. A. M. Verzeichn., *S. Chloroleuca*, *S. Prilipkoana* Grossh. et Sosn., *S. Fominii* Grossh.), *Ceratophyllae* Pobed. (*S. ceratophylla* L., *S. semilanata* Czerniak. in Fedde, Repert.), *Brachyanthae* Pobed. (*S. brachyantha* (Bordz) Pobed.), *Beckerianae* Pobed. (*S. Beckeri* Trautv.). Із секції *Macrocalyx* Pobed. sect. n. en Addenda на території СНД зустрічається тільки один вид – *S. insignis* Kudr. *Plethiosphace* Benth. in Hook. До секції *Plethiosphace* Benth. in Hook. входять 6 рядів: *Pratenses* Pobed. (*S. pratensis* L., *S. dumetorum* Andrzej., *S. stepposa* Schost., *S. Kuznetzovii* Sosn., *S. virgata* Jacq. Hort. Vind., *S. turcomanica* Pobed., *S. Sibthorpii*), *Nemorosae* Pobed. (*S. nemorosa* L. (*S. illuminata*), *S. tesquicola* Klok. et Pobed., *S. deserta* Schang.), *Fugaces* Pobed. (*S. fugax* Pobed.), *Nutantes* Pobed. (*S. nutans* L.), *Austriacae* Pobed. (*S. austriaca* Jacq., *S. armeniaca* (Bordz.) Grossh.) та *Verbenacae* Pobed. (*S. verbenaca*). Із підроду *Jungia* (Moench) Briq. in Pflanzenfam. на території СНД зустрічається тільки один вид – *S. splendens* Ker-Gawl. Підрид *Covola* Medik. Phil. представлений двома видами *S. verticillata* L. і *S. verticillata* ssp. *amasiaca* (Freyn & Sint.) Bornm. Із підроду *Sanglakia* Pobed. на території СНД зустрічається тільки один вид – *S. baldshuanica* Lipsky [50].

1.4. Генوم роду *Salvia*

1.4.1 Загальна характеристика геному роду *Salvia*. Кількість хромосом у видів *Salvia* надзвичайно різниться. З великої кількості видів підрахунок хромосом відомий для небагатьох. У 90-х роках минулого століття зазначалося, що число хромосом в роді *Salvia* варіює в межах $2n = 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 32, 44, 54$ і 64 [51]. На сьогодні опубліковані дані показують мінімальну кількість $2n = 12$ у *S. hispanica* до максимальної $2n = 88$ у октаплоїда *S. Guaranitica* [52]. Окрім того, що у шавлій варіює рівень плоїдності, основне число хромосом також широко відрізняється у видів у межах роду ($x = 6, 7, 8, 9, 10, 11$ і 15) [53].

Повногеномний сіквенс для *S. Miltiorrhiza* як господарсько цінного виду був проведений китайськими вченими. Замість очікуваного розміру в

615 Мб було отримано 538 Мб, такий відносно невеликий розмір зібраного геному пояснюють високою кількістю повторів, які, ймовірно, звернуті разов в кількості декількох копій. Також була показана кількість SNP на кілобайт – 2, 76 та кількість генів, кодуєчих білки, - 30 [54].

Так як *S. miltiorrhiza* є важливою лікарською рослиною з високою медичною та господарською цінністю, проводили також сіквенс хлоропластного геному – перший для родини *Lamiaceae*. Геном має розмір 151,328 п.н. і демонструє типову структуру довгих (LSC, 82,695 п.н.) та коротких (SSC, 17,555 п.н.) ділянок, розділених парою інвертованих повторів (IR, 25,539 п.н.). Містить 114 унікальних генів, з яких 80 - кодуєть білок, 30 - тРНК і 4 - рРНК. Показано три інвертованих, сім тандемних повторів. Більшість SSRs АТ-збагачені, кількість SSR в білок-кодуєчих послідовностях нижча порівняно з некодуєчими – тобто розподіл SSR в геномі нерівномірний. Гомологи генів Арабідопсису *psbA* (photosystem II protein D1) ата *ndhI* локалізовані в регіонах LSC та SSC [55].

Поліплоїдизація та зміна форми хромосом – основний фактор, який впливає на визначення виду роду. Хоча багато видів важкодосліджувані через малий розмір хромосом, їх морфологія разом з відомостями каріотипу показана для деяких видів (табл. 1.1) [56].

Таблиця 1.1.

Морфологія хромосом та аналіз каріотипу рослин роду *Salvia*.

Адаптовано за [56].

Вид	К-ть хромосом (2n)	Тип хромосом	Морфологія та аналіз каріотипу
<i>S. farinaceae</i>	18	A ₂ B ₂ C ₂ D ₁₀ E ₂	Тип А: 8,5 мкм, 2 метацентричні хромосоми з довгими плечами, вторинна перетяжка; тип В: 6,00 мкм, метацентричні; тип С: 7.00

			мкм, мета- або акроцентричні; тип D: 4,00-3,00 мкм, середні
<i>S.reflexa</i>	20	A_2B_{18}	A: 3,75 мкм, довгі, з вторинною перетяжкою; B: 2,50-1,50 мкм, маленькі, мета- і акроцентричні
<i>S. cjcinea</i>	22	$A_2B_6C_{14}$	A: 5,00 мкм, довгі, первинна і вторинні перетяжки близько центра; B: 3,50-3,00, короткі, акроцентричні; C: 3,25-1,75 мкм, маленькі, акро- і метацентричні
<i>S. grahamii</i>	22	$A_2B_{14}C_6$	A: 5 мкм, довгі, метацентричні, є вторинна перетяжка; B: 3,50-2,50 мкм, середні, мета – та акроцентричні; C: 3,00-2,50 мкм, короткі метацентричні
<i>S. nemorosa</i>	14	$A_2B_8C_4$	A: 4,00 мкм, довгі, вторинна перетяжка на середині короткого плеча; B: 3,94-2.50 мкм, середні, акроцентричні; C: 3,25-2,25 мкм, метацентричні
<i>S. horminum</i>	16+18	$A_2B_8C_6$	A: 4,25 мкм, метацентричеї; B: 3,50-3,00 мкм, короткі, метацентричні; C: 2,50-1,75, короткі, метацентричні
<i>S. officinalis</i>	14	$A_2B_6C_6$	Тип A: 3,00 мкм, короткі, метацентричні з вторинною перетяжкою; B: 4,95-2,25 мкм, метацентричні; C: 4,00-2,56 мкм
<i>S. tiliifolia</i>	22	A_2B_{20}	Тип A: 4,00 мкм, метацентричні з

			вторинною перетяжкою; В: 2,25-1,95 мкм, акро- і метацентричні
<i>S. leucantha</i>	22	A ₂ B ₂₀	Тип А: 4,00 мкм, метацентричні, вторинні перетяжки; тип В: 2,75-1,95 мкм акро- і метацентричні
<i>S. verbenacea</i>	54		5,00-2,25 мкм, структура неясна
<i>S. splendence</i>	44		Довгі, 8 мають вторинну перетяжку, 5,67-1,25 мкм
<i>S. aegyptica</i>	26		2,66-1,33 мкм, центромера плаваюча
<i>S. pratensis</i>	16		Нефіксована центромера, 2,10-1,00 мкм
<i>S. hispanica</i>	12		Різної форми, перетяжка неясна, 5,00-3,00 мкм
<i>S. aethiopis</i>	22		4 довші, інші короткі, перетяжка неясна, 5,00-2,00 мкм

1.4.2. Повтори – елементи геному, які впливають на формування структури геному шавлії. На елементи, які повторюються, у досліджених шавлій припадає приблизно 54,44% геному, це в 2 рази більше ніж у кунжута, який належить до іншого роду родини *Lamiales*. Довгі термінальні повтори (LTR) були найчисельнішими для *S. miltiorrhiza* і становили 18,03% геному, і той час як 55,58% повторів (30,26% геному) були некласифікованими, що вказує на їх специфічність [54].

У *S. miltiorrhiza* були виявлені нетипові для інших представників SSR довжиною більше ніж 8 п.н. SSR в 8 п.н. і довші схильні до просковзування (slip-strand mispairing) і неправильного об'єднання нуклеотидів, що, як вважають, є одним з основних мутаційних процесів і призводить до високого

рівня поліморфізму у роді. 166 SSR було виявлено в геномі *S.miltiorrhiza*. Більшість SSR у всіх видів є мононуклеотидами, далі по кількості йдуть ди-, тетра-, три-, рідко пента- або гексануклеотиди. 72% всіх SSR шавлії - А / Т-мононуклеотиди. Ці результати не заперечували того, що SSR зазвичай складаються з повторів поліаденіну (polyA) або політиміну (polyT) і рідко містять тандемні гуанінові (G) або цитозинові (C) повтори. Таким чином, ці SSR впливають на АТ-збагачення геному. SSR було знайдено в кожному білок-кодуючому гені, але їх кількість там менша, ніж в некодуючих ділянках, тобто розподіл нерівномірний. Загалом 53 SSR були ідентифіковані в 23 генах *S. miltiorrhiza*. Серед них 10 генів включають в собі щонайменше два SSR, в тому числі *ndhD*, *matK*, *proC2*, *ycf1* і *ycf2* [55].

1.4.3. Гібридне видоутворення. Ще й досі існує багато суперечок щодо того, який саме механізм відповідає за більшість випадків видоутворення. Процес видоутворення у рослин як мінімум має включати: 1) дивергенцію по деяким ознакам (характеристикам), зазвичай морфологічними, щоб рослини можна було за ними відрізнити; 2) появу репродуктивної ізоляції, якої було б достатньо для збереження цих відмінних ознак [57].

Різноманітні шляхи розвитку дивергенції та репродуктивної ізоляції являють собою способи видоутворення. Тобто будь-яке дослідження видоутворення повинно виявити ознаки, які виділяють певні види і кількість генетичних розходжень між ними [58].

Грант (1981) розділяв способи видоутворення рослин на дві основні категорії – еволюційне розходження (первинне видоутворення) і гібридне видоутворення. Первинне видоутворення може бути квантовим – відбувається швидко, або географічне – поступово. Гібридне видоутворення може відбуватися на рівні ди- або поліплоїдів [59].

Велике різноманіття в роді *Salvia* – це генетичний ресурс для покращення рослин, які вирощуються в якості сировини або декору. Відомо, що міжвидові гібриди утворилися в результаті природної або випадкової гібридизації культурних або диких рослин, але ступінь перехресної

сумісності видів в значній мірі не відома. В дослідженні зі схрещування дев'яти видів *Salvia*, які відбиралися так, щоб охопити широкий спектр американських та європейських видів, та оцінювання їх за схемою повного диалельного схрещування, лише 5 з 72 міжвидових крос-комбінацій дали життєздатне насіння. Успішне схрещування було в основному в близьких філогенетичних групах, але між видами з різною кількістю хромосом. Це дало змогу припустити, що різниця в кількості хромосом не є основною перешкодою для гібридизації в цьому роді [60].

1.4.4. Способи доведення гібридного походження. Гібридне походження рослин доводять за генетичними, епігенетичними або морфологічними маркерами, а також за біохімічними характеристиками [61, 62, 64].

За допомогою молекулярних мікросателітних маркерів (SSR) було проаналізовано *S. officinalis* і *S. fruticosa* – два близькоспоріднені види. *S. Fruticosa* в Хорватії росте лише на єдиному острові через штучну натуралізацію і тепер ділить географічне середовище існування з іншими видами роду. Досліджувані види мають однакову кількість хромосом ($2n = 14$), час їх цвітіння перекривається. Штучні гібриди між цими двома видами існують і використовуються в комерційних цілях, тому метою було вивчити спонтанну (природню)гібридизацію. Зокрема, проаналізовано було 79 зразків рослин, серед яких були як батьківські види, так і ті, для яких допускалась можливість гібридного походження. Результати підтвердили існування явища природньої гібридизації [61].

Серед біохімічних характеристик проводилось порівняння концентрації певних хімічних речовин в ефірних оліях. Гібрид шавлії, який отримали спонтанним схрещуванням двох близькоспоріднених видів (*S. officinalis* і *S. lavandulifolia*), ідентифікували шляхом вивчення хімічного складу ефірної олії, який контролювали протягом всього фенологічного циклу і порівнювали з батьківськими видами. У гібрида були представлені проміжні характеристики щодо якісного та кількісного складу олії. α -туйон (25,4–

57,2%) і 1,8-цинніол (15,5–55,1) – найбільш репрезентативні сполуки *S. officinalis* і *S. Lavandulifolia* відповідно. І вони також були основними сполуками гібридної олії, але в набагато нижчих концентраціях (α -туйон 13,6–23,6; 1,8-цинніол 12,0–34,7) [62].

Морфологічні ознаки зазвичай не найнадійніші, але використовуються при аналізі для підтвердження результатів, а також, якщо точно відомі дві батьківські форми, між якими відбулась гібридизація. Зазвичай це 23-25 якісних (бінарних) морфологічних ознак таких органів як суцвіття, вісь суцвіття, галуження гілок, залозисті волоски, квітконіжка, квітка) та 18-20 кількісних ознак цих же органів та чашечки [61]. Молекулярно-генетичні дослідження шавлії зазвичай фокусуються на генетичному розходженні в диких популяціях. Аналіз 25 природних популяцій *S. officinalis*. за допомогою Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) маркерів показав високий рівень генетичного розходження. Маркери лише розробляються, наприклад, успішно було це зроблено для аналізу близькоспоріднених видів *S. fruticosa*, *S. pratensis*, *S. sclarea*, *S. Verticillata*, *Rosmarinus officinalis* [63].

Ще один спосіб доведення гібридного походження – метод MSAP (Methylation sensitive amplification polymorphism) – найчастіше використовуваний інструмент в епігенетичних дослідженнях. Це модифікація методу AFLP (Amplified fragment length polymorphis). В більшості досліджень, заснованих на MSAP, рестриктазу EcoRI використовують, як і в AFLP, але MseI замінюють рестриктазами, які є чутливими до метилування – HpaII и MspI. Молекулярні механізми, які вважаються відповідальними за модифікації в експресії генів, включають метилування гістонів і хроматину, яке відбувається з допомогою мРНК. Завдяки успадкуванню епігенетичних варіантів фенотипові прояви на змінене середовище запам'ятовуються і проявляються у наступних поколіннях. Міжвидова гібридизація запускає не лише генетичні, але й епігенетичні зміни шляхом модифікації ділянок ДНК метилуванням. Як наслідок, нові фенотипові варіанти, які з'являються у гібридного потомства, частіше є епігенетичної природи, а не наслідком

генетичної рекомбінації. Завдяки своїй трансгенераційній спадковості можуть відігравати важливу роль в процесі видоутворення та ідентифікуватися для доказу гібридизації [64].

1.5. Характеристика генетичних маркерних систем для вивчення представників роду

Маркер ДНК – поліморфна послідовність ДНК, яка може бути використана для ідентифікації генів, хромосом, особин або видів. ДНК-маркери можуть бути розміром в одну основу, або досягати кількох сотень основ (фрагмент ДНК). Маркер повинен існувати в різних формах (поліморфних), щоб сорт або генотип, який несе конкретну форму, можна було відрізнити від іншого сорту або генотипу, які несуть інші форми. Наприклад, поліморфізм за однією основою може виділити 4 групи організмів (A, G, C або T), тоді як дві основи можуть диференціювати в 16 груп. Поліморфізми ДНК-маркерів можуть бути результатом любых замін, вставок вставок або делецій (INDEL) або варіацій в повторах (SSR) або кількості копій (CNV) [64].

Різноманітні молекулярні маркери на основі ДНК і методи фінгерпринтингу використовуються для виявлення генетичних зв'язків між рослинами, поліморфізму. Для шавлій в близькоспоріднених видах найчастіше використовують RAPD, SSR і AFLP) [66].

Маркери RAPD є зручним інструментом для вивчення генетичних відмінностей навіть на більш низьких міжвидових рівнях. Метод ISSR-PCR – ефективна система для ідентифікації генетичного різноманіття рослин. Підходить для вивчення еволюційних процесів на між- та внутрішньоспецефічному рівнях. [5, 6]. Цей метод включає праймери, які являють собою мікросателітні послідовності, які закріплюються на 3' або 5' кінцях за допомогою нуклеотидів та високих температур відпалу. Крім того, ISSR часто використовуються завдяки їх відтворюваності [4].

Велика різноманітність, відтворюваність, інформативність і відсутність необхідності в певних послідовностях для конструювання праймерів роблять систему маркерів AFLP такою популярною. Маркери, які генеруються системою AFLP, можна аналізувати в автоматичних сіквенсорах. AFLP поліморфізми можуть виникнути в результаті: 1) мутації в послідовностях для розпізнавання ферментів, які використовують для розщеплення геномної ДНК; 2) мутації в послідовностях, які комплементарні працмерам AFLP; 3) вставки або делеції в рестрикційних фрагментах. Система маркерів AFLP може використовуватися для любого організму без необхідності розробки послідовності праймера. Маркерна система AFLP зазвичай дає 50–100 фрагментів, розміром 80–500 п.н. на реакцію [65].

SSR – мікросателіти – це тандемні повтори ДНК, які зазвичай мають довжину 1–6 п.н. і розподілені по всьому геному. SSR популярні через їх високий рівень поліморфізму у одного й того ж виду і широко використовуються в популяційній генетиці та філогенії [54].

Через їх високу варіабельність, кодомінантне успадкування, високу відтворюваність і надійність протягом останніх десятиліть мікросателіти були одним з самих популярних молекулярних маркерів, які використовували від картування геному до популяційної та природоохоронної генетики. Але на відміну від універсальних маркерів (наприклад, AFLP), які не потребують попередніх знань про геном цільових видів, мікросателіти видоспецифічні. Потрібне велике число досліджуваних локусів, що може бути технічно незручним, тоді альтернативою є маркерна система AFLP. Однак AFLP має деякі недоліки порівняно з мікросателітами. Найбільший – гомоплазія (негомологічні фрагменти мають однаковий або дуже схожий розмір, або відбувається втрата незалежних фрагментів), яка знижує надійність аналізу [64].

Маркери стартового кодону (SCoT) – це маркерна система, націлена на стартовий кодон (SCoT), вона також є маркером на основі ПЛР, але її мішенню є коротка консервативна послідовність, розташована біля кодону

ініціації трансляції або стартового кодону, ATG, генів рослин. Праймер SCoT – одиночний праймер довжиною 18 нуклеотидів і містить наступні фіксовані нуклеотиди: А, Т, G стартового кодону і змінну кількість нуклеотидів зі сторони 5 'послідовності ATG. Так як використовується одиночний праймер і не потрібна інформація про послідовність, продуктів ампліфікації 2-6 в кожній ПЛР, то це схоже з RAPD, але маркери SCoT специфічні до певних областей геному, а не випадкових, і це вже схоже на системи маркерів RAPD и ISSR [65].

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Характеристика рослинного матеріалу

Три види, з яких отримано рослинний матеріал, – *S. cremenecensis*, *S. nutans* та *S. dumetorum* – з роду *Salvia* зростали в колекції на території філіалу «Кременецькі гори» ПЗ «Медобори». Під керівництвом спеціаліста було зібрано листя, стебла та суцвіття з насінням рослин (табл.2.1) у червні 2019 року.

Таблиця 2.1.

Характеристика рослинного матеріалу

Вид	К-ть хромосом, 2n	Морфологічна характеристика
<i>S. nutans</i>	22	Має схилені темно-сині, іноді білі суцвіття. Поодинокі, іноді нечисленні, стебла шавлії пониклої зазвичай безлисті. Листки розвинені лише прикореневі, досить великі, зморшкуваті, зісподу сірувато-опушені, по краю подвійно зарубчасті, з довгим черешком. Віночок двогубий, з видовженою і відігнутою назад верхньою губою. Під верхньою губою ховаються дві тичинки. Квітки шавлії зібрані в кільця по 4-6. Цвіте з травня до липня. Плід — горішок.

<i>S. dumetorum</i>	14	висотою 30-60 см. Прикореневе листя численне, довгасте або ледь яйцеподібне, при основі слабо серцеподібне, тупе, довжиною 6-11 см, шириною 2,5-5 см, по краю двояко дрібнозубчасті або городчасте, зверху голе, знизу злегка опушене, з черешками рівними листовій пластинці або коротше її; середні - частіше крупніше прикореневих, короткочерешкове або майже сидяче; верхні - довгі, вузькі, ланцетні, гострі, зморшкуваті, зверху голі, знизу волосисті. Приквіткові листки - округлі, довгозагострені, цілокраї, зверху голі, знизу густо опушені. Суцвіття просте або з одногома парами нижніх гілок, з 5-10 несправжніми 4-6-квітковими мутовками; чашечка довжиною 7 мм, верхня губа коротше нижньої, округла, нижня - двузубчата; віночок завдовжки 1-2 см. Горішки шаровидно-тригранні, діаметром 2 мм, темно-бурі.
<i>S. cremenecensis</i>	-	Багаторічна трав'яна рослина з розвиненим кореневищем і вкороченим каудексом. Стебла 70-85 см заввишки, розгалужені тільки у суцвітті, у нижній частині коротковолосисті, угорі з довшим і густим опушенням; стеблові листки нечисленні, з черешком 3,5-18,5 завдовжки й широколанцетною пластинкою 13-15 см завдовжки, 5,5-6,5 см завширшки; пластинка з неглибокосерцеподібною основою й тупуватою верхівкою, з країв подвійно

		зубчастозарубчаста, на поверхні зморшкувата, зісподу негусто коротковолосиста, зверху майже гола; приквіткові листки сидячі, округлі, на верхівці раптово загострені. Несправжні кільця 6-квіткові, під час цвітіння помітно розсунуті; квітконосні гілки угорі трохи пониклі; приквітки ланцетні, довговійчасті, коротші за квітконіжку; віночок 14–15 мм завдовжки, синьо-фіолетовий, з трохи відігнутою верхньою губою. Горішки широкоеліпсоїдальні, бурі.
--	--	---

2.2. Отримання зразків ДНК для роботи

2.2.1. Виділення ДНК із рослинного матеріалу. Рослинні клітини мають щільну клітинну стінку, яка складається з целюлози, геміцелюлози та пектатів кальцію. В клітинах рослин також накопичуються вторинні метаболіти і запасні речовини, які можуть бути біоактивними або впливати на чистоту отриманого зразку. Шавлії в клітинах листя та стебла мають олії та поліфенольні сполуки.

При виділенні ДНК із зразків користувалися стандартним протоколом з додаванням для очищення від поліфенольних сполук. Спершу провели гомогенізацію зразків у фарфорофій ступці з додаванням рідкого азоту. Отриманий гомогенат перенесли до еппендорфу та додали 400 мкл ЦТАБ-буферу (cetyl trimethylammonium bromide buffer) (pH 8) з РНКазою (7 мкл РНКаз на вказаний об'єм буферу). РНКаз необхідна для того, щоб очистити зразок від РНК. При нагріванні ЦТАБ забезпечує різну седиментативну здатність ДНК та білків, тому зразки поставили на водяну баню 65°C на 1 годину.

Щоб зруйнувати комплекс ДНК з гістоновими білками та позбавитися від вільних білків в зразках провели депротейнізацію шляхом додавання однократного об'єму (400 мкл) суміші хлороформу та ізоамілового спирту (24:1). Хлороформ розчиняє білки, а ізоаміловий спирт зменшує поверхневий натяг хлороформу, для полегшення змішування із водною фазою.

Для кращого перемішування фаз зразки гойдали на механічній гойдалці 10 хв. Потім зразки відцентрифугували у настільній центрифугі протягом 10 хв за 10 000 об. Водна фаза з ДНК утворює надосад, який відібрали в новий еппендорф.

До зразків додали один об'єм ізопропанолу для осадження ДНК й залишили на 30 хв при -20°C . Відцентрифугували за 10 000 об 10 хв. На дні еппендорфу утворився білий осад ДНК у вигляді прикріпленої бляшки. Вміст еппендорфу злили, а осад залишили просохнути на 5-8 хв. Потім, для очищення ДНК, осад промили 200 мкл 70% етанолу. Злили етанол та додали до осаду 100 мкл 1x TE-буферу (pH 8), розчинивши осад ДНК шляхом ресуспензування сеплером, для подальшого зберігання зразків.

2.2.2. Спектрофотометричне вимірювання концентрацій виділеної ДНК. Вимірювання проводили на приладі СФ-2000. В кювети внесли 150 мкл дистильованої води та 2 мкл розчину ДНК. Для контролю першу кювету наповнюємо дистильованою водою.

Вимірювання приладом здійснювали при трьох спектрах: 230нм (спектр поглинання органічних сполук), 260 нм (спектр поглинання нуклеїнових кислот) та 280 нм (спектр поглинання білків). Нам необхідні були значення при 260 нм.

Концентрацію досліджуваних розчинів визначили за формулою: $C = D_{260} \cdot K \cdot x$, де D_{260} – показник поглинання нуклеїнових кислот, K – коефіцієнт (50/40 для ДНК), x - розведення.

Для визначення чистоти досліджуваного зразку розраховували співвідношення D_{260}/D_{280} , який мав бути не менше 1,8 для ДНК.

2.3. Проведення полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР)

Для постановки ПЛР у роботі було використано такі реактиви: dH₂O, 10-кратний ПЛР Буфер, 2мМ dNTPs, 25 мМ розчину MgCl₂, 1,25 рМ/мкл праймер правий, 1,25 рМ/мкл праймер лівий, 5u/mkl Taq-полімераза.

Зразки для проведення реакції готували за вказаними в таблиці даними (табл. 2.2) та загальним об'ємом 25 мкл кожен. Роботу виконували на льодяній бані, щоб попередити неспецифічну ампліфікацію та зберегти реактиви в робочому стані.

Таблиця 2.2

Розрахунок кількості компонентів суміші (в мкл), залежно від кількості проб
(по 20 мкл + 5 мкл ДНК)

Компонент \	1	25	40
Буфер*	2,5	62,5	100
dNTPs*	2,5	62,5	100
MgCl ₂ (25 мМ)*	1,5	37,5	60
Taq Pol (5u/mkl)	0,2	5	8
Праймер R	2	50	80
Праймер L	2	50	80
dH ₂ O	9,3	232,5	372

Стандартно цикли ПЛР містять три основні стадії: денатурацію матричної ДНК при температурі 90° С до 1-2 хвилини, приєднання праймерів до послідовності-мішені при температурі 60°С 30 секунд і стадію елонгації при температурі 70°С, на якій ДНК-полімераза подовжує другий ланцюг ДНК, комплементарний кожному ланцюгу мішені. Після подовження ампліфікатор підвищує температуру до 90°С, що знову запускає цикл денатурації. Зазвичай ПЛР циклічно повторюється 30–35 разів, але потрібно підбирати певні умови до певних маркерів. Два праймери, що використовуються в ПЛР, в підсумку

визначають специфічність реакції. Праймери специфічні для певних ділянок, що потім призводить до ампліфікації бажаної послідовності-мішені в ПЛР. В нашій роботі ампліфікація мала такі умови:

94 °C – 5 хв

94 °C - 45 с (денатурація)	}	5циклів
60-55°C - 30с (аннелінг)		
(-0,5°C/цикл)		
72 °C – 1.30 хв (елонгація)	}	

95 °C - 45 с (денатурація)	}	25 циклів
55 °C - 30 с (аннелінг)		
72 °C – 1.30 хв с (елонгація)		

72 °C – 8 хв

У дослідженні використовували праймери до мікросателітних послідовностей (табл. 2.3).

Таблиця 2.3

Характеристика використаних праймерів до мікросателітних послідовностей

Назва праймеру	Послідовності	Tm
SoUZ012	F: ACCATTGGAAAGATGCCTCA R: GAATGGAGCGAGGAAGAAGA	55
SoUZ013	F: ACCATGCCCAAAGACCATAA R: GGCTTCTCCCCTCGAATAAC	55
SoUZ014	F: GGCAATGATAAGGATGCTG R: GAAGCTTCTCCCTTCTCTAACA	55

SoUZ015	F: CCATGTGTGAGTGTGTTGACC R: ATCCAATTTCGATTTGTTTACACC	55
SoUZ016	F: GGC GTTGCAGAGAGAGTGA R: GGGCCTAGCCCTTTCTCTAT	55
SoUZ017	F: ACACCGACTCCATGCTGTAA R: CCGGCACTCCCTCTATTTTC	55
SoUZ018	F: CCATGTCAAGCTTCAAGAGGA R: TTCATGCAACACATCCTTGA	55
SoUZ019	F: CAAAGCTCCTCGAAGACGAA R: CACGAGCAAGCGTAATAGCA	55

Для аналізу за маркетами до LTR та мікросателітного маркеру (CA)⁹G (CAC ACA CAC ACA CAC ACA G) ПЛР проводили за такими умовами:

94 °C

94 °C - 30 с (денатурація)

56 °C - 60 с (аннелінг)

72 °C - 120 с (елонгація)

72 °C – 600 с (10хв)

30 циклів

Таблиця 2.4

Характеристика використаних праймерів до довгих термінальних повторів

Назва праймеру	Послідовності	Tm
Nikita	CGC ATT TGT TCA AGC CTA AAC C	58,4
LTR6149	CTCGCTCGCCCACTACATCAACCGCGTTTATT	70,8
LTR6150	CTGGTTCGGCCCATGTCTATGTATCCACACATGTA	70,6
COPIAR	TTG AAC CCC TTT TGA TGT AT	51,1
COPIAF	GAT GCT CCT TGC CTA TGC TA	57,3

Sabrina	GCA AGC TTC CGT TTC CGC	58,2
5'LTR1	TTGCCTCTAGGGCATATTTCCAACA	61,3
5'LTR2	ATCATTCCTCTAGGGCATAATTC	59,3
3'LTR	TGTTTCCCATGCGACGTTCCCCAACA	66,4
Sukkula	GAT AGG GTC GCA TCT TGG GCG TGA C	67,9

2.4. Візуалізація зразків у агарозному гелі

Реактиви для горизонтального електрофорезу у агарозному гелі: dH₂O, агароза, 1-кратний Sodium borate буфер, етидіум бромід, M27 маркер мас (SibEnzyme). Розділення отриманих продуктів проводили в 1,2-1,3% агарозному гелі різних об'ємів (80, 100 та 270 мл) з додаванням 20 мкл (0,5 мг/мл) етидій броміду (40 мкл для гелю об'ємом 270 мл). Гель отримали внаслідок розчинення агарози в однократному SB (sodium-borate) буфері наступного складу (на 1л):

Na₂ B₄ O₇ - 1,91 г

H₃BO₃ - 0,5 г

dH₂O – 1 л

Готували 1,3% агарозний гель (до 1,3 г агарози додавали 100 мл Sodium Borate буферу в колбу). Протягом 2-х хвилин доводили до кипіння агарозу в мікрохвильовій печі. Охолоджували суміш до температури 50C, після чого додавали 5 мкл етидіум-броміду. Охолоджену суміш заливали у камеру для електрофорезу та вставляли гребінку. На вощену плівку наносили по 2 мкл буферу нанесення та 10 мкл зразку ДНК у краплини буферу нанесення і ресуспендували. Після того як гель заполімеризувався, виймали гребінку. Після внесення зразків у слоти заливали в камеру 1-кратний SB-буфер та підключали прилад до джерела струму.

Гель-електофорез проходив за напруги 60 V перші півгодини та 90 - 100V до кінця. Зразки змішували з концентруючим буфером (входять бромфеноловий синій, ксилен ціанол та гліцерин). Використовували по 2 мкл

маркерного розчину (M17 Sibenzyme®). Оцінку отриманих результатів здійснювали за рахунок флюоресценції етідій броміду, що інтеркалював між основами ДНК, в спектрі 590 нм (жовто-червоний) при поглинанні за 260 та 360 нм (ультрафіолетовий).

2.4. Візуалізація зразків в акриламідному гелі

Вертикальний денатуруючий електрофорез нуклеїнових кислот проводили у поліакриламідному гелі. Для цього спочатку підбирали рогате та безроге скло. Обидва скла протирали 96% спиртом для знежирення поверхонь. Нерогате скло швидко протирали сіланом, для того, щоб до нього пришився гель. На одне скло готували 40 мл 6% поліакриламідного гелю, для цього брали 8 мл 30% акриламіду, 6 мл 2% бісакриламіду та 16, 8 г сечовини, до 40 мл доводили 1-кратним SB-буфером. Обирали гребінку і спейсери однакової товщини. Спейсери змащували солідолом і прикладали по краях до рогатого скла. Складали обидва скла, поміщали їх в кювету, фіксували зажимами з обох сторін. Для приготування зразків додавали до 10 мкл ампліфікату 10 мкл буферу нанесення (співвідношення 1:1). Від 40 мл гелю відливали 10 мл гелю на пробку. До цих 10 мл гелю додавали 480 мкл ПСА та 24 мкл TEMED і швидко заливали пробку. Чекали поки пробка заполімеризується, щоб запобігти витіканню геля. До 30 мл гелю, що залишився, також додавали 480 мкл ПСА та 24 мкл TEMED. Заливали гель і вставляли гребінку. Чекали поки гель заполімеризується, після чого повільно виймали гребінку. Далі вносили по 20 мкл зразка у слоти і зверху нашаровували 1-кратний SB-буфер. Поміщали скло у камеру для електрофорезу так, щоб всередині камери було рогате, а ззовні нерогате скло. Заливали 1-кратний SB-буфер у камеру. Підключали прилад до джерела струму. Параметри електрофорезу: струм - 20 mA, напруга - 300 V. Після закінчення фореу проявляли продукти. Спочатку роз'єднували скло, далі поміщали те, на якому гель, у розчин для фіксації на 5-7 хвилин. Для фарбування гелю на 10 хвилин поміщали скло у розчин AgNO₃, до якого

попередньо додавали 2, 4 мл формаліну. Промивали скло дистильованою водою. Потім поміщали скло у розчин для проявлення і залишали там, поки продукти, розділені електрофорезом не стануть видимими. Удруге поміщали скло у розчин для фіксації на 2 хвилини.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Візуальне порівняння насіння трьох зразків

Під час огляду плодів-горішків під мікроскопом було виявлено суттєву різницю між видами та погану якість насіння *S. cretenecensis*, при тому, що усі рослини розвивалися в однакових природних умовах, що також дає можливість висловити припущення щодо гібридного походження, і як наслідок, зниження якості та кількості насіння – часткову стерильність.

Насіння *S. nutans* видовженої сплющеної еліпсоїдальної форми, гладеньке, повне, приблизного одного розміру (рис. 3.1.), насіння *S. dumetorum* округле еліпсоїдальне, опушене, повне (рис.3.2.) , у *S. cretenecensis* насіння відрізнялося у розмірах та формі, але в основному широкоеліпсоїдальні, деякі насінини були частково опушені, неправильної форми, пусті (рис.3.3.).

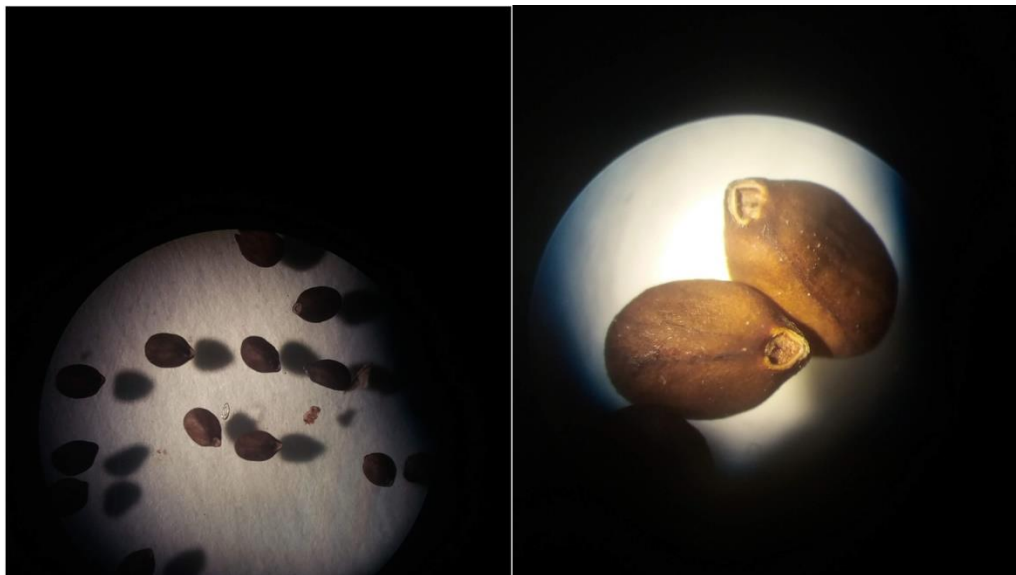


Рис.3.1. Насіння *S. nutans*

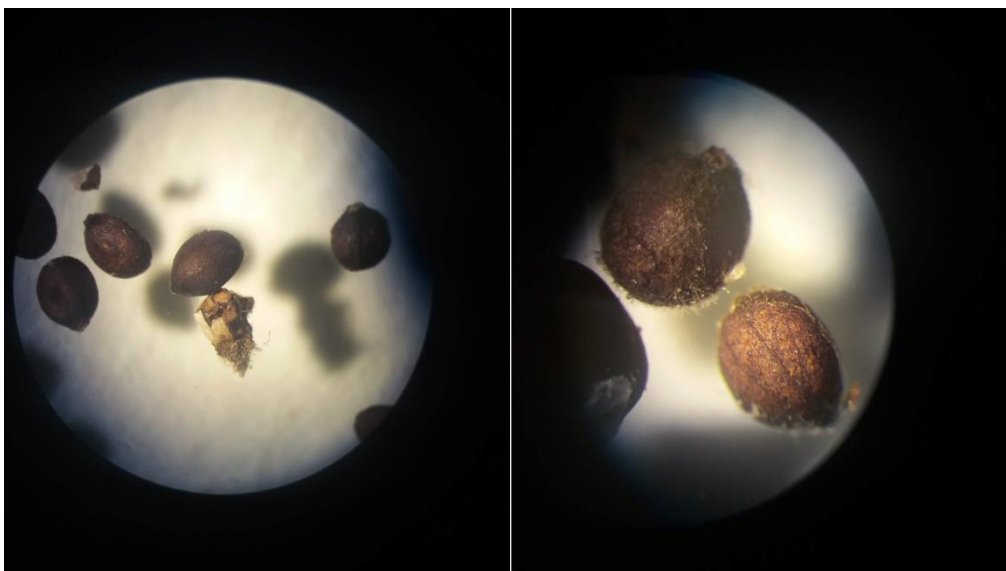


Рис.3.2. Насіння *S. dumetorum*

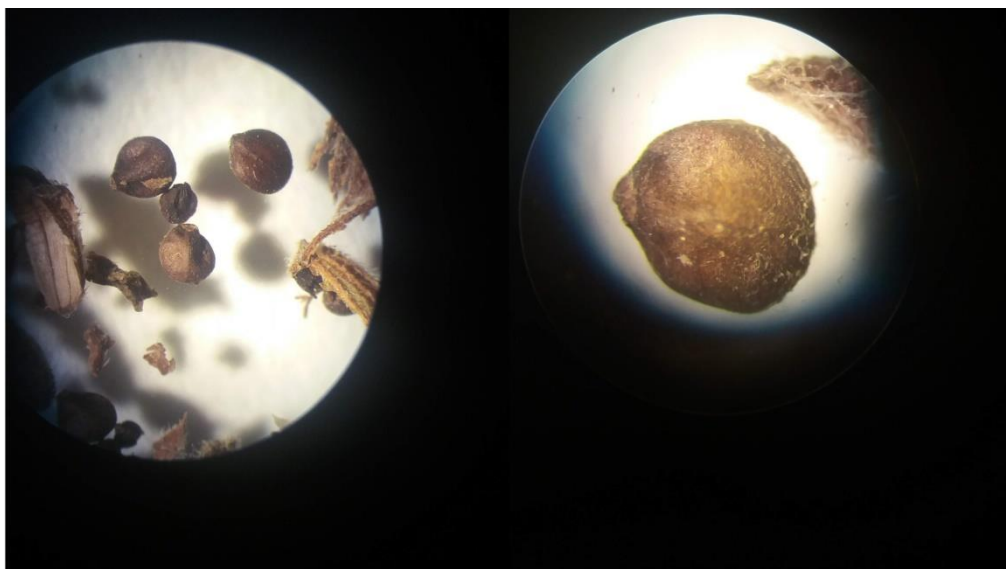


Рис.3.3. Насіння *S. cremenecensis*

3.2. Характеристика отриманих зразків ДНК

ДНК виділяли з різних частин рослини – листків, стебла, суцвіть. Вимірювання проводили 3 рази з розрахунком середнього значення. За отриманими результатами (табл. 3.1.) зразки з суцвіть та стебла у досліді не використовували, оскільки вони не відповідали вимозі чистоти досліджуваного зразку (D_{260}/D_{280} не менше 1,8 для ДНК).

Таблиця 3.1

Спектрофотометричні характеристики отриманих зразків ДНК

Зразок \ Спектри	260нм	280нм
<i>S. cremenecensis</i> стебло	0,0306	0,0252
<i>S. cremenecensis</i> стебло2	0,0508	0,0352
<i>S. cremenecensis</i> стебло3	0,0148	0,0091
<i>S. cremenecensis</i> листя1	0,2831	0,1503
<i>S. cremenecensis</i> листя2	1,2022	0,2673
<i>S. cremenecensis</i> суцвіття1	0,0662	0,0494
<i>S. cremenecensis</i> суцвіття2	0,1504	0,1323
<i>S. nutans</i> листя 1	0,2408	0,9870
<i>S. nutans</i> листя 2	1,2470	0,2359
<i>S. nutans</i> листя 3	0,0101	0,0054
<i>S. nutans</i> стебло1	0,1019	0,071
<i>S. nutans</i> стебло2	0,0316	0,0182
<i>S. nutans</i> суцвіття1	0,003	-0,0011
<i>S. nutans</i> суцвіття2	0,0447	0,025
<i>S. dumetorum</i> стебло1	0,0045	0,0013
<i>S. dumetorum</i> стебло2	0,0398	0,0368
<i>S. dumetorum</i> стебло3	0,069	0,0534
<i>S. dumetorum</i> листя1	0,0446	0,0314
<i>S. dumetorum</i> листя2	0,2094	0,1118
<i>S. dumetorum</i> листя 3	0,115	0,1083
<i>S.dumetorum</i> суцвіття1	0,0098	0,0081
<i>S.dumetorum</i> суцвіття2	0,0534	0,0464

3.3. Результати аналізу

Аналіз з використанням методики REMAP. З восьми використаних праймерів продукт ампліфікації дали лише чотири - SoUZ013, SoUZ014, SoUZ015, SoUZ018 (рис. 3.4. та рис. 3.5.), які і використовувались в подальших комбінаціях та окремо. Також продукти були легшими від очікуваного результату (136 – 260 bp). Продукт завжди був присутній у зразках із шавлією кременецькою та пониклою, але відсутній з SoUZ013 та SoUZ014 у випадку з шавлією кущовою.



Рис.3.4. Розподіл продуктів ПЛР за методом REMAP. Прямокутники відокремлюють матеріал отриманий із однією парою праймерів: 1-3 - SoUZ017, 4-6 - SoUZ016, 7-9 - SoUZ015, 10-12 - SoUZ014, 13-15 - SoUZ013, 16- 18 - SoUZ012; M- молекулярний маркер

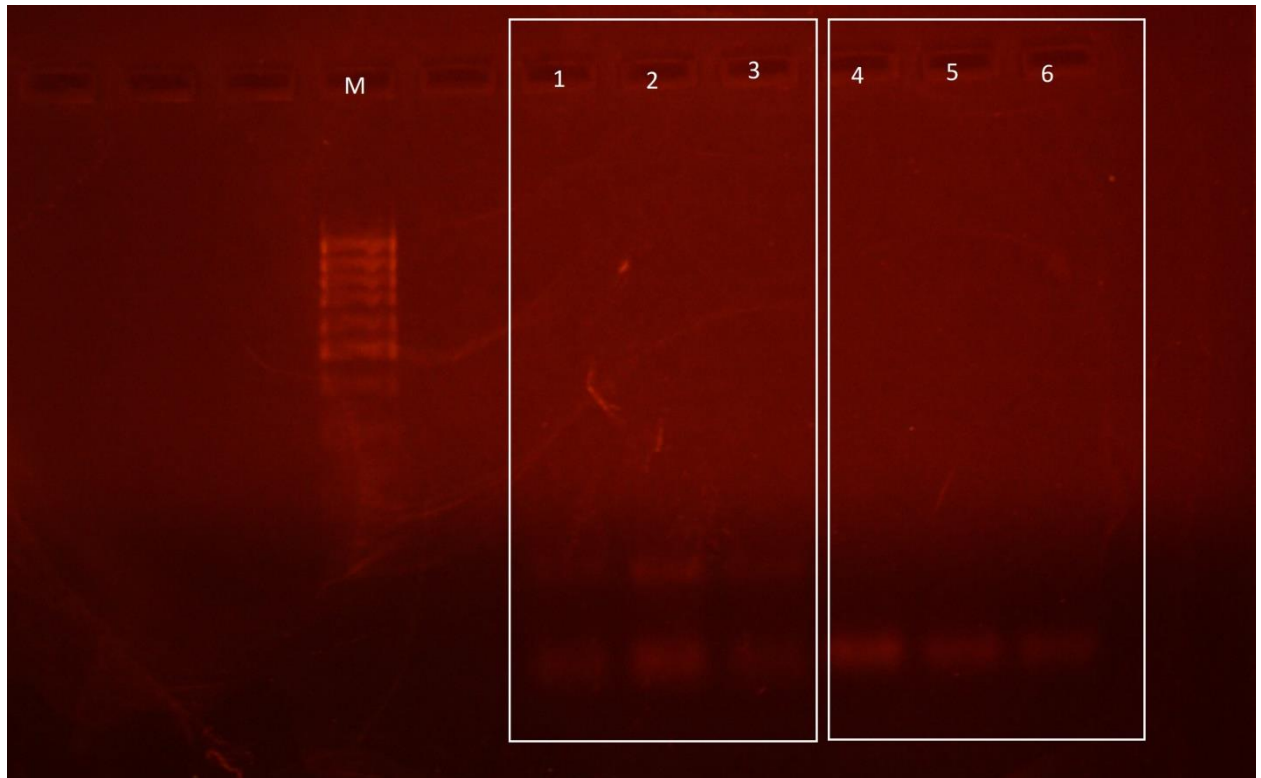


Рис.3.5. Розподіл продуктів ПЛР за методом REMAP. Прямокутники відокремлюють матеріал отриманий із однією парою праймерів:1-3 - SoUZ018, 4-6 - SoUZ019; М- молекулярний маркер

Із праймерами SoUZ013, SoUZ014 та SoUZ018 були отримані такі результати (рис. 3.6): продукти *S. nutans* та *S. cremenecensis* SoUZ014 та SoUZ018 були ідентичними, в той час, як з SoUZ013 в обох зразках продукту не виявлено. Натомість, *S. dumetorum* мала продукт лише з SoUZ018, який також не відрізнявся від перших двох видів. При кожному повторі ПЛР продукти *S. nutans* та *S. cremenecensis* з SoUZ014 та SoUZ018 були однаковими.

Під час другої частини аналізу рослинний матеріал було проскриновано методом IRAP із використанням семи праймерів до довгих термінальних повторів ретротранспозонів, з яких 2 дали утворення продукту. В подальшому їх було використано для створення комбінацій для постановки ПЛР (табл. 3.2).

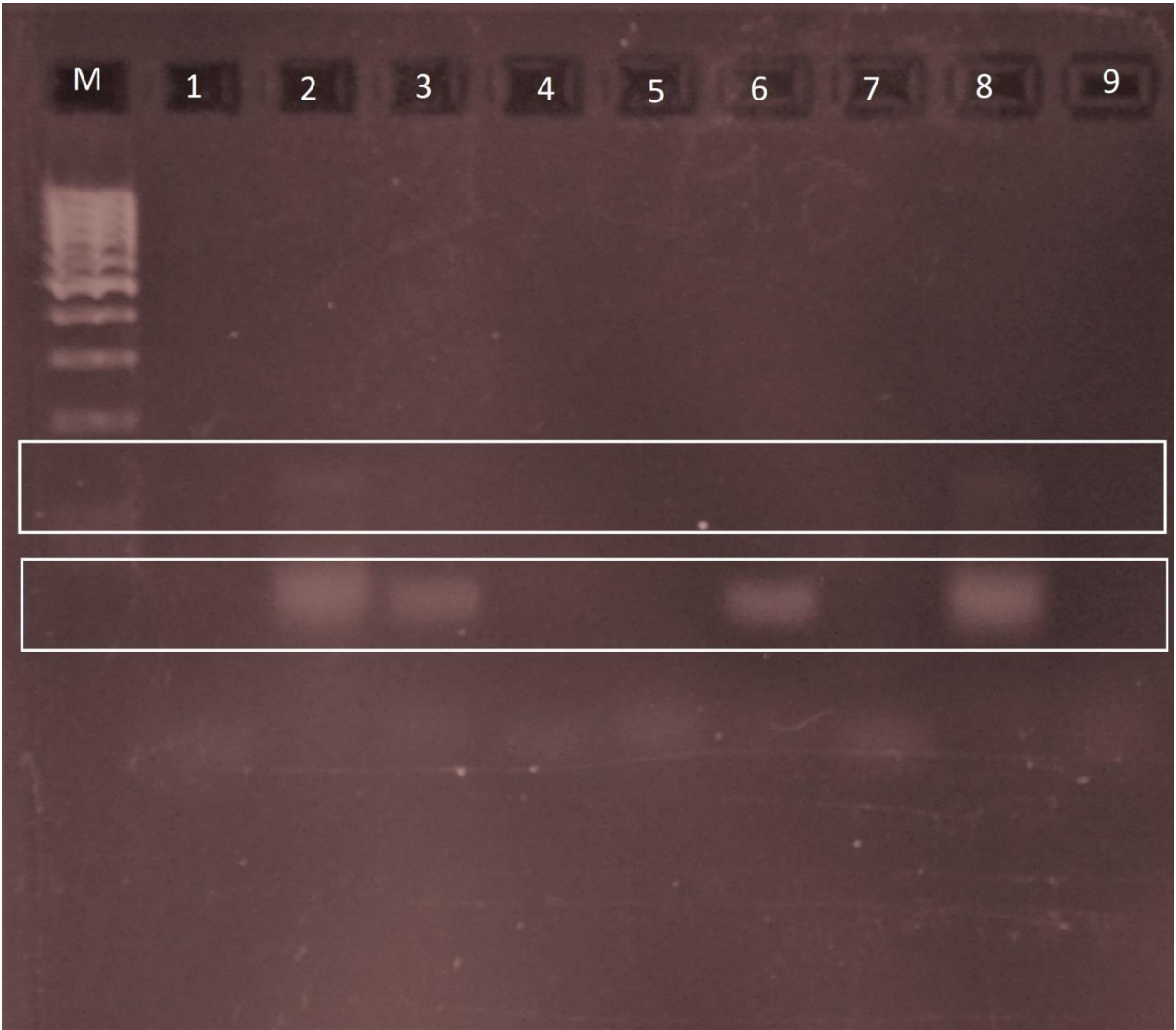


Рис.3.6. Розподіл продуктів ПЛР за методом REMAP. Прямокутники відокремлюють утворені продукти: 1-3 - *S. nutans* з SoUZ013, SoUZ014 та SoUZ018 відповідно; 4-6 - *S. dumetorum* з SoUZ013, SoUZ014 та SoUZ018 відповідно; *S. cretensis* з SoUZ013, SoUZ014 та SoUZ018 відповідно; М- молекулярний маркер

Таблиця 3.2

Використані праймери та їхні комбінації

№	Комбінація	№	Комбінація
1	Nikita x SoUZ013	7	Sukkula x SoUZ015
2	Nikita x SoUZ014	8	Sukkula x SoUZ018

3	Nikita x SoUZ015	9	(CA)9G x SoUZ013
4	Nikita x SoUZ018	10	(CA)9G x SoUZ014
5	Sukkula x SoUZ013	11	(CA)9G x SoUZ015
6	Sukkula x SoUZ014	12	(CA)9G x SoUZ018

В результаті продукт було отримано лише з усіма комбінаціями, в яких був присутній SoUZ014, окрім (CA)9G x SoUZ014 з *S. dumetorum*, та з (CA)9G x SoUZ018. Однак, поліморфізму не виявлено (рис. 3.7). Візуалізація проводилась в акриламідному гелі.



Рис.3.7. Розподіл продуктів ПЛР за методом IRAP із комбінаціями (CA)9G x SoUZ014(1-3), Nikita x SoUZ014 (4 -6), Sukkula x SoUZ014(7-9), (CA)9G x SoUZ018 (10 – 12). Кожна комбінація виділена прямокутником, зразки ДНК йдуть в порядку - *S. dumetorum*, *S. nutans*, *S. cremenecensis*.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Хоча роботи з дослідження гібридизації та загалом геному видів роду *Salvia* як цінного генетичного ресурсу та важливої ланки природного біорізноманіття набувають популярності в останні роки [1, 4, 7, 10], особливо на території Азії, нам дуже мало відомо про види, які не використовуються активно в медицині та садово-парковому господарстві. Не проведено картувань геному шавлій, для багатьох навіть не відома кількість хромосом.

Мікросателітні маркери все ще перебувають у стані розробки та тестування [61, 63]. Багато досліджень сконцентровані на екології популяцій певної території [15, 25, 26, 28]. А геноми досліджуються лише певними вченими, які займаються видом, поширеним та цінним у їх місцевості, наприклад, китайськими дослідниками охарактеризовано ядерний та мітохондріальний геноми *Salvia miltiorrhiza* [54, 66].

Після огляду літератури було виявлено, що геномні дослідження рідкісних шавлій України відсутні. Однак наявність даних про дослідження явища гібридизації серед ендеміків інших країн [61, 63, 64] дають змогу тестувати відомі праймери до мікросателітних послідовностей інших видів.

З отриманих нами даних по ssg аналізу можна зробити висновок, що праймери SoUZ015 та SoUZ018, які визнані неробочими для одних видів (*S. fruticosa*), але підходять для його близькоспорідненого виду (*S. officinalis*) [63], завжди дають продукт ампліфікації для *S. nutans* і *S. cremenecensis*.

Ці продукти не є поліморфними, що дає змогу не спростовувати версію Hedge [13] про можливе гібридне походження *S. cremenecensis* з одним з вихідних батьківських видів *S. nutans* (при тому, що і *S. nutans* і *S. dumetorum* систематично належать до однієї секції, що робить можливість явища гібридизації між ними високою), однак відсутність таких продуктів у *S. dumetorum* вказує на те, що, якщо явище гібридизації і було присутнім, то не з останнім видом. Однак робити точні висновки не можна за відсутності

даних для порівняння та невеликої кількості використаних праймерів. Потрібно проводити подальші дослідження з іншими ssg видів роду.

Розподіл продуктів ПЛР за методом IRAP також не показав поліморфізму взагалі між усіма трьома видами, бо вони є висококонсервативними та неспецифічними для шавлій. Тому робити висновок за цими результатами ми не маємо змоги.

Однак візуальне біоморфологічне порівняння насіння трьох досліджуваних видів нашої роботи на думку про гібридне походження *S. cremenecensis* через його неоднорідність та низький рівень фертильності.

Те, що не всі використані праймери дали продукт ампліфікації збігається з результатами роботи [63], звідки були взяті послідовності для них. Але факт того, що продукт було утворено з послідовностями, які для одного з досліджуваних автором виду визначилися як неробочі, а для наших – інформативними (табл.1), спонукає використати більше відомих маркерних молекул та підібрати робочі саме для *S. dumetorum*, *S. nutans* та *S. cremenecensis*, інформація щодо яких наразі відсутня.

Таблиця 1

Результат ампліфікації

Вид Назва праймеру	<i>S.</i> <i>officinalis</i>	<i>S.</i> <i>fruticosa</i>	<i>S.</i> <i>dumetorum</i>	<i>S. nutans</i>	<i>S.</i> <i>cremenecensis</i>
SoUZ012	+				
SoUZ013	+	+		+	+
SoUZ014	+	+		+	+
SoUZ015	+		+	+	
SoUZ016	+	+			
SoUZ017	+				
SoUZ018	+		+	+	+

SoUZ019	+				
---------	---	--	--	--	--

ВИСНОВКИ

З наявних наразі результатів:

- 1) Не спростовано, але і не підтверджено гібридне походження *S. cremenecensis* через відсутність точних мікросателітних маркерів до досліджуваних видів.
- 2) З восьми використаних мікросателітних маркерів відомих для *S. officinalis* 4 (SoUZ013, SoUZ014, SoUZ015, SoUZ018) виявились підходящими для *S. nutans* та *S. cremenecensis*, і два (SoUZ015, SoUZ018) з них – для *S. dumetorum*.
- 3) Такі фактори як біоморфологічні характеристики насіння та наявність ідентичних продуктів ПЛР з *S. nutans* наштовхують на думку про гібридне походження *S. cremenecensis*, але наявних зараз результатів недостатньо, щоб повністю його підтвердити, адже за біоморфологічними характеристиками рослина давно визначена як окремий вид, хоч і з сумнівами з боку деяких дослідників.
- 4) Варто продовжувати дослідження даних видів з новими мікросателітними маркерами для отримання точних результатів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Torke B.M. A revision of *Salvia* sect. *Ekmania* (Lamiaceae). *Brittonia* [Internet]. 2000 Dec 27; 52 (3): 265-302. Available from: <https://link.springer.com/article/10.2307/2666577> DOI: 10.2307/2666577
2. Chen SY, Dai TX, Chang YT, Wang SS, Ou SL, Chuang WL, Cheng CY, et al. Genetic diversity among *Ocimum* species based on ISSR, RAPD and SRAP markers. *Australian Journal of Crop Science* [Internet]. 2013 Jan ; 7(10):1456-62. Available from: https://www.researchgate.net/publication/285942306_Genetic_diversity_among_Ocimum_species_based_on_ISSR_RAPD_and_SRAP_markers
3. Wang M, Li J, Zhang L, Yang RW, Ding CB, Zhou YH, Yin ZQ. Genetic diversity among *Salvia miltiorrhiza* Bunge and related species using morphological traits and RAPD markers. *Journal of Medicinal Plants Research* [Internet]. 2011 Jul; 5(13):2687-94. Available from: https://www.researchgate.net/publication/267688418_Genetic_diversity_among_Salvia_miltiorrhiza_Bunge_and_related_species_using_morphological_traits_and_RAPD_markers
4. Song Z, Li X, Wang H, Wang J. Genetic diversity and population structure of *Salvia miltiorrhiza* Bge in China revealed by ISSR and SRAP. *Genetica* [Internet]. 2009 Oct 138(2): 241-9. Available from: https://www.researchgate.net/publication/38025731_Genetic_diversity_and_population_structure_of_Salvia_miltiorrhiza_Bge_in_China_revealed_by_ISSR_and_SRAP DOI: 10.1007/s10709-009-9416-5
5. Peng L, Ru M, Wang B, Wang Y, Li B, Yu J, Liang Z. Genetic diversity assessment of a germplasm collection of *Salvia miltiorrhiza* Bunge. based on morphology, ISSR and SRAP markers. *Biochemical Systematics and Ecology*

- [Internet]. 2014 Aug; 55:84-92. Available from: https://www.researchgate.net/publication/260994249_Genetic_diversity_assessment_of_a_germplasm_collection_of_Salvia_miltiorrhiza_Bunge_based_on_morphology_ISSR_and_SRAP_markers DOI: 10.1016/j.bse.2014.01.020
6. Kharazian N, Rahimi S, Shiran B. Genetic diversity and morphological variability of fifteen *Stachys* (Lamiaceae) species from Iran using morphological and ISSR molecular markers. *Biologia* [Internet]. 2015 Apr 70(4):438-52. Available from: https://www.researchgate.net/publication/276424251_Genetic_diversity_and_morphological_variability_of_fifteen_Stachys_Lamiaceae_species_from_Iran_using_morphological_and_ISSR_molecular_markers DOI: 10.1515/biolog-2015-0051
 7. Yousefiazarkhaniani M, Asghardi A, Ahmadi J, Asghari B, Jafari A. Genetic diversity of *Salvia* species assessed by ISSR and RAPD markers. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* [Internet]. 2016 Dec; 44(2):431-36; Available from: https://www.researchgate.net/publication/314968094_Genetic_Diversity_of_Salvia_Species_Assessed_by_ISSR_and_RAPD_Markers DOI:10.15835/nbha44210579
 8. Червона книга України [Інтернет]. 2010 – 2020; Доступно: <https://redbook-ua.org/category/lamiaceae/>
 9. Sepehry Javan Z, Rahmani F, Heidari R. Assessment of genetic variation of genus *Salvia* by RAPD and ISSR markers. *Australian Journal of Crop Science* [Internet]. 2012 Jun; 6(6):1068-73. Available from: https://www.researchgate.net/publication/266054371_Assessment_of_genetic_variation_of_genus_Salvia_by_RAPD_and_ISSR_markers
 10. Zhang Y, Li X, Wang Z. Diversity evaluation of *Salvia miltiorrhiza* using ISSR markers. *Biochemical Genetics* [Internet]. 2013 May; 51(9):707-21. Available

from: https://www.researchgate.net/publication/236949085_Diversity_Evaluation_of_Salvia_miltiorrhiza_Using_ISSR_Markers DOI: 10.1007/s10528-013-9600-2

11. Erzano M, Schühli GS, Santos ÉP. Genetic Variability and Population Structure of *Salvia lachnostachys*: Implications for Breeding and Conservation Programs. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2015 Apr; 16(4):7839-50. Available from: https://www.researchgate.net/publication/274725399_Genetic_Variability_and_Population_Structure_of_Salvia_lachnostachys_Implications_for_Breeding_and_Conservation_Programs DOI: 10.3390/ijms16047839
12. Baricevic D, Sosa S, Della Loggia R, Tubaro A, Simonovska B, Krasna A and Zupancic. Topical antiinflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology* [Internet]. 2001 May; 75: 125–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11297842/> DOI: 10.1016/s0378-8741(00)00396-2
13. Georgiev V., Pavlov A., editors. *Salvia Biotechnology*. Dordrecht: Springer; 2017. 13 p.
14. Hedge IC, *Salvia* L. In: Tutin TG, Heywood VH, Burges NA et al (eds) *Flora Europaea*, vol 3. Cambridge University Press, Cambridge, 1972. pp 188-92
15. Barnes J, Anderson LA and Phillipson JD. *Herbal Medicines*. 2nd ed. Pharmaceutical Press, London, UK; 2002. pp 408-11.
16. Botstein D, White RL, Skolnick M and Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* [Internet]. 1980 May; 32: 314–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6247908/>
17. Farag RS, Salem H, Badei AZMA and Hassanein DE. Biochemical studies on the essential oil of some medicinal plants. *Fette Seifen Anstrichmittel* [Internet].

- 1986; 88: 69–72. Available from:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/lipi.19860880210>
doi.org/10.1002/lipi.19860880210
18. Hohmann J, Zupko I, Redei D, Csanyi M, Falkay G, Mathe I and Janicsak G. Protective effects of the aerial parts of *Salvia officinalis*, *Melissa officinalis*, and *Lavandula angustifolia* and their constituents against enzyme dependent and enzyme-independent lipid peroxidation. *Journal of Medicinal Plant and Natural Product Research* [Internet]. 1999 Aug;; 65: 576–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10532875/> DOI: 10.1055/s-2006-960830
 19. Li G and Quiros CF. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: Its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theoretical and Applied Genetics* [Internet]. 2001 Aug; 103: 455– 61 Available from: https://www.researchgate.net/publication/226843647_Sequence-Related_Amplified_Polymorphism_SRAP_a_new_marker_system_based_on_a_simple_PCR_reaction_Its_application_to_mapping_and_gene_tagging_in_Brassica DOI: 10.1007/s001220100570
 20. Lu Y, Foo LY. Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry* [Internet]. 2000 Nov;55: 263-7. Available from: https://www.researchgate.net/publication/222680939_Flavonoid_and_phenolic_glycosides_from_Salvia_officinalis DOI: 10.1016/S0031-9422(00)00309-5
 21. Saebnazar A, Rahmani F. Genetic Variation Among *Salvia* Species Based on Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP) Marker. *Journal of Plant Physiology and Breeding* [Internet]. 2013 Jun; 3(1): 71-8. Available from: https://www.researchgate.net/publication/282023462_genetic_diversity_among_salvia_species_based_on_RAPD_and_ISSR_molecular_markers
 22. Karimzadeh S, Reza Farahpour M. Topical application of *Salvia officinalis* hydroethanolic leaf extract improves wound healing process. *Indian Journal of Experimental Biology* [Internet]. 2017 Feb; 55: 98-106. Available from:

https://www.researchgate.net/publication/313139838_Topical_application_of_Salvia_officinalis_hydroethanolic_leaf_extract_improves_wound_healing_process

23. Walker JB, Sytsma KJ. Staminal evolution in the genus *Salvia* (Lamiaceae): molecular phylogenetic evidence for multiple origins of the staminal lever. *Ann Bot* [Internet]. 2007 Aug; 100(2): 375–91. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2735309/> doi: 10.1093/aob/mcl176
24. Ozkan M, Soy E. Morphology, Anatomy, Hair and Karyotype Structure of *Salvia blepharoclaena* Hedge and Hub.-Mor. (Lamiaceae), Endemic to Turkey. *Pakistan Journal of Biological Sciences* [Internet]. 2007; 10: 893-98. Available from: <https://scialert.net/fulltext/?doi=pjbs.2007.893.898> DOI: 10.3923/pjbs.2007.893.898
25. Walker JB, Sytsma KJ, Treutlein J, Wink M. *Salvia* (Lamiaceae) is not monophyletic: implications for the systematics, radiation, and ecological specializations of *Salvia* and tribe *Mentheae*. *American Journal of Botany* [Internet]. 2004 Jul; 91(7): 1115-25. Available from: https://www.researchgate.net/publication/51201630_Salvia_Lamiaceae_is_not_monophyletic_Implications_for_the_systematics_radiation_and_ecological_specializations_of_Salvia_and_tribe_Mentheae DOI: 10.3732/ajb.91.7.1115
26. Байкова ЕВ. Закономерности морфологической эволюции шалфеев: *Salvia*, Lamiaceae [диссертация]. Москва: Томский гос.ун-т.; 2005. 513
27. Bozzano G L. Tropical forests: botanical dynamics, speciation and diversity. London: Academic Press; 2012. Architectural concepts for tropical trees; p. 89-100. Available from: https://books.google.com.ua/books?id=lfK-SY_mtKoC&pg=PA89&lpg=PA89&dq=Architectural+concepts+for+tropical+trees+//+Tropical+forests:+botanical+dynamics,+speciation+and+diversity&source=bl&ots=yFwzf9tRca&sig=ACfU3U2jmXSUmh91lfA1FIYSq4N5cxsdUw

&hl=ru&sa=X&ved=2ahUKEwj7zsKdvtrpAhWjtYsKHeI3BsQQ6AEwAnoEC
 AgQAQ#v=onepage&q=Architectural%20concepts%20for%20tropical%20tree
 s%20%2F%2F%20Tropical%20forests%3A%20botanical%20dynamics%2C%
 20speciation%20and%20diversity&f=false

28. Jorge A., Loureiro J, Castro S. Flower biology and breeding system of *Salvia sclareoides* Brot. (Lamiaceae). *Plant Syst Evol* [Internet]. 2015; 301: 1485–97. Available from: https://www.researchgate.net/publication/268125054_Flower_biology_and_breeding_system_of_Salvia_sclareoides_Brot_Lamiaceae DOI: 10.1007/s00606-014-1169-7
29. Barrett SCH. Understanding plant reproductive diversity. *Philos Trans Ser B* [Internet]. 2010 Jan; 365:99–109. Available from: https://www.researchgate.net/publication/40686124_Understanding_plant_reproductive_diversity DOI: 10.1098/rstb.2009.0199
30. Charlesworth D. Evolution of plant breeding systems. *Curr Biol* [Internet]. 2006 Sep 5;16(17):726-35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16950099/> DOI: 10.1016/j.cub.2006.07.068
31. Brigham CA, Schwartz MW. Population viability in plants: conservation, management, and modeling of rare plants. Springer, Heidelberg, 2003. Chapter 2, Threats to rare plant persistence; p. 17–58. Available from: https://www.researchgate.net/publication/233765396_Threats_to_Rare_Plant_Persistence
32. Barrett SCH. Mating strategies in flowering plants: the outcrossing-selfing paradigm and beyond. *Philos Trans Ser B* [Internet]. 2003 Jun 29; 358(1434): 991–1004. Available from: https://www.researchgate.net/publication/288186386_Mating_strategies_in_flowering_plants_the_outcrossing-selfing_paradigm_and_beyond_-_Discussion doi: 10.1098/rstb.2003.1301

33. Harder LD, Johnson SD. Darwin's beautiful contrivances: evolutionary and functional evidence for floral adaptation. *NewPhytol* [Internet]. 2009 Jun 22; 183:530–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19552694/> DOI: 10.1111/j.1469-8137.2009.02914.x
34. Takebayashi N, Morrell PL. Is self-fertilization an evolutionary dead end? Revisiting an old hypothesis with genetic theories and a macroevolutionary approach. *Amer J Bot* [Internet]. 2001 Jul; 88(7):1143-50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11454614/>
35. Goodwillie C, Kalisz S, Eckert CG. The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: occurrence, theoretical explanations, and empirical evidence. *Annual Rev Ecol Evol Syst* [Internet]. 2005 Dec; 36:47–79. Available from: https://www.researchgate.net/publication/228875564_The_Evolutionary_Enigma_of_Mixed_Mating_Systems_in_Plants_Occurrence_Theoretical_Explanations_and_Empirical_Evidence DOI: 10.1146/annurev.ecolsys.36.091704.175539
36. Wright SI, Kalisz S, Slotte T. Evolutionary consequences of self-fertilization in plants. *Proc Roy Soc London Ser B Biol Sci* [Internet]. 2013 Apr; 280:20130133 Available from: https://www.researchgate.net/publication/236224561_Evolutionary_consequences_of_self-fertilization_in_plants DOI: 10.1098/rspb.2013.0133
37. Franklin-Tong VE. Self-incompatibility in flowering: Evolution, Diversity, and Mechanisms. Springer, Heidelberg; 2008. 313 p.
38. Morran LT, Parmenter MD, Phillips PC. Mutation load and rapid adaptation favour outcrossing over self-fertilization. *Nature* [Internet]. 2009 Nov 19; 462(7271):350-2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19847164/> DOI: 10.1038/nature08496
39. Knight T, Steets J, Vamosi J, Mazer S, Burd M, Campbell D. Pollen limitations of plant reproduction: pattern and process. *Annual Rev Ecol Evol Syst*

- [Internet]. 2005 Dec; 36:467–97. Available from: https://www.researchgate.net/publication/228986641_Pollen_Limitation_of_Plant_Reproduction_Pattern_and_Process DOI: 10.1146/annurev.ecolsys.36.102403.115320
40. Mccall AC, Irwin RE. Florivory the intersection of pollination and herbivory. *Ecol Lett* [Internet]. 2006 Dec;9(12):1351-65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17118009/> doi: 10.1111/j.1461-0248.2006.00975.x.
41. Kalisz S, Vogler DW. Benefits of autonomous selfing under unpredictable pollinator environments. *Ecology* [Internet]. 2003 Nov 01; 84:2928–2942 Available from: <https://esajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1890/02-0519> doi.org/10.1890/02-0519
42. Barrett SCH. The evolution of mating strategies in flowering plants. *Trends Pl Sci* [Internet]. 1998 Sep 01; 3(9):335–41 Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1360138598012990> doi.org/10.1016/S1360-1385(98)01299-0
43. Wester P, Claßen-Bockhoff R. Pollination syndromes of New World *Salvia* species with special reference to bird pollination. *Ann Missouri Bot Gard* [Internet]. 2011 Apr 01; 98:101–55 Available from: <https://bioone.org/journals/annals-of-the-missouri-botanical-garden/volume-98/issue-1/2007035/Pollination-Syndromes-of-New-World-Salvia-Species-with-Special-Reference/10.3417/2007035.short> doi.org/10.3417/2007035
44. Navarro L. Is the dichogamy of *Salvia verbenaca* (Lamiaceae) an effective barrier to self-fertilization? *Pl Syst Evol* [Internet]. 1997 Jan; 207:111–17 Available from: https://www.researchgate.net/publication/226044263_Is_the_dichogamy_of_Salvia_verbenaca_Lamiaceae_an_effective_barrier_to_self-fertilization DOI: 10.1007/BF00985212

45. ZhenQiao S, JianHua W, HongGang W, FuJuan Z, LiWu H. Studies of the floral biology, breeding characters of *Salvia miltiorrhiza*. *Acta Horti Sin* [Internet]. 2009 Jun; 36:905–10 Available from: <http://www.ahs.ac.cn/EN/abstract/abstract620.shtml>
46. Navarro L. Effect of pollen limitation, additional nutrients, flower position and flowering phenology on fruit and seed production in *Salvia verbenaca* (Lamiaceae). *Nord J Bot* [Internet]. 1998 Nov; 18:441–46 Available from: https://www.researchgate.net/publication/224007846_Effect_of_pollen_limitation_additional_nutrients_flower_position_and_flowering_phenology_on_fruit_and_seed_production_in_Salvia_verbenaca_Lamiaceae
47. Cantino PD, Harley AM, Wagstaff SJ. Genera of Labiatae: status and classification *Advances in Labiatae Science*. Kew: Royal Botanic Gardens, 1992; p. 511-22. Available from: https://www.researchgate.net/publication/258344651_Genera_of_Labiatae_status_and_classification
48. Kaufmann M, Wink M. Molecular systematics of the Nepetoideae (Family Labiatae): Phylogenetic implications from *rbcL* gene sequences // Z. Naturforsch [Internet]. 1994 ; 49(9-10):635-45. Available from: https://www.researchgate.net/publication/15252914_Molecular_systematics_of_the_Nepetoideae_family_Labiatae_Phylogenetic_implications_from_rbcL_gene_sequences DOI: 10.1515/znc-1994-9-1015
49. Bentham G, Hooker J.D. *Genera plantarum*. 2th ed. London, 1876. Bentham G. *Salvia* L.; p. 1194-96.
50. Koshovyi OM. Morphological and taxonomic research of *salvia* genus by vegetative characteristics. *ScienceRise* [Internet]. 2015 Oct; 10, 4 (15):13–8. Available from: https://www.researchgate.net/publication/283550304_Morphological_and_taxo

nomic_research_of_salvia_genus_by_vegetative_characteristics doi:
10.15587/2313-8416.2015.51699

51. Estilai A, Hashemi A. Chromosome Number and Meiotic Behavior of Cultivated Chia, *Salvia hispanica* (Lamiaceae). HORT SCIENCE [Internet]. 1990 Dec; 25(12):1646-7. Available from: <https://journals.ashs.org/hortsci/view/journals/hortsci/25/12/article-p1646.xml> DOI:10.21273/hortsci.25.12.1646
52. Alberto CM, Sanso AM, Xifreda C.C. Chromosomal studies in species of *Salvia* (Lamiaceae) from Argentina. Bot. J. Linn.Soc. [Internet]. 2003 Jan ; 141(4):483–90. Available from: https://www.researchgate.net/publication/330350227_Chromosomal_studies_in_species_of_Salvia_Lamiaceae_from_Argentina
53. Tychonievich J, Warner MR. Interspecific Crossability of Selected *Salvia* Species and Potential Use for Crop Improvement. J. AMER.SOC.HORT.SCI [Internet]. 2011 Jan; 136(1):41–7. Available from: https://www.researchgate.net/publication/233668354_Interspecific_Crossability_of_Selected_Salvia_Species_and_Potential_Use_for_Crop_Improvement DOI: 10.21273/JASHS.136.1.41
54. Xu H, Song J, Luo H, Zhang Y, Li Q, Zhu Y, et al. Analysis of the genome sequence of the medicinal plant *Salvia miltiorrhiza*. Mol. Plant [Internet]. 2017 Jul 19; 9(6): 949–52. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5517341/> doi: 10.1016/j.molp.2016.03.010
55. Qian J, Song J, Gao H, Zhu Y, Xu J, Pang X. The Complete Chloroplast Genome Sequence of the Medicinal Plant *Salvia miltiorrhiza*. PLoS ONE [Internet]. 2013 Feb 27; 8 (2): e57607. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0057607> DOI: 10.1371/journal.pone.0057607

56. **Yan X**, editor. Dan Shen (*Salvia miltiorrhiza*) in Medicine: Volume 1. Biology and Chemistry, Springer; 2017. Biological Characters of Danshen; p. 35-42. Available from: https://www.researchgate.net/publication/285502857_Dan_Shen_Salvia_miltiorrhiza_in_medicine_Volume_1_Biology_and_chemistry DOI: 10.1007/978-94-017-9469-5

57. Crawford DJ. Electrophoretic data and plant speciation. Syst Bot [Internet]. 1985 Oct; 10(4):405-416. Available from: https://www.researchgate.net/publication/271761477_Electrophoretic_Data_and_Plant_Speciation DOI: 10.2307/2419134

58. Gottlieb LD. Rethinking classic examples of recent speciation in plants. Phytologist [Internet]. 2004 Jan; 161(1):71-82. Available from: https://www.researchgate.net/publication/227782661_Rethinking_classic_examples_of_recent_speciation_in_plants DOI: 10.1046/j.1469-8137.2003.00922.x

59. Takano A, Okada H. Multiple occurrences of triploid formation in Globba (*Zingiberaceae*) from molecular evidence. Plant Syst Evol [Internet]. 2002 Feb ; (3)230:143-59. Available from: https://www.researchgate.net/publication/225127976_Multiple_occurrences_of_triploid_formation_in_Globba_Zingiberaceae_from_molecular_evidence DOI: 10.1007/s006060200001

60. Tychonievich J, and Warner RM. Interspecific crossability of selected *Salvia* species and potential use for crop improvement. J. Am. Society Horticultur. Sci. [Internet]. 2011 Jan; 136(1):41-7. Available from: https://www.researchgate.net/publication/233668354_Interspecific_Crossability_of_Selected_Salvia_Species_and_Potential_Use_for_Crop_Improvement DOI: 10.21273/JASHS.136.1.41

61. Natural hybridization between *Salvia officinalis* L. and *Salvia fruticosa* mill. (*Lamiaceae*) on the island of Vis (Croatia): evidence from morphological and

- molecular data. Zlatko L, Radosavljević I, Bogdanović S, Satovic Z. Croatian Science Foundation Project, 2014. Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/f0eb/bedce09ec6e7e43e638daf4042983c917bb0.pdf>
62. Herraiz-Penalver D, Elguea-Culebras, GO, Vioque RS, Meridas SO. Identification of a hybrid species of sage (*Salvia officinalis* L. x *S. lavandulifolia*) through the study of the essential oil. *Journal of Essential Oil Research*[Internet].2015; 27(5): 363–72. Available from: https://www.researchgate.net/publication/276424989_Identification_of_a_hybrid_species_of_sage_Salvia_officinalis_L_x_S_lavandulifolia_subsp_lavandulifolia_through_the_study_of_the_essential_oil DOI: 10.1080/10412905.2015.1031918
63. Radosavljević I, Jakše J, Javornik B, Šatović Z, Liber Z. New microsatellite markers for *Salvia officinalis* L. (Lamiaceae) and cross-amplification in closely related species. *American Journal of Botany* [Internet]. 2011 Nov; 98: 316-18 Available from: https://www.researchgate.net/publication/51720137_New_microsatellite_markers_for_Salvia_officinalis_Lamiaceae_and_cross-amplification_in_closely_related_species DOI: 10.3732/ajb.1000462
64. Radosavljević I, Bogdanović S, Celep F. et al. Morphological, genetic and epigenetic aspects of homoploid hybridization between *Salvia officinalis* L. and *Salvia fruticosa* Mill.. *Sci Rep* [Internet]. 2019 Mar; 9(1):3276. Available from: https://www.researchgate.net/publication/331454641_Morphological_genetic_and_epigenetic_aspects_of_homoploid_hybridization_between_Salvia_officinalis_L_and_Salvia_fruticosa_Mill doi: 10.1038/s41598-019-40080-0
65. Georgiev V, Pavlov A, editors. *Salvia Biotechnology*. Dordrecht: Springer; 2017 *Molecular Markers in Salvia L.: Past, Present and Future* Mehmet Karaca and Ayse Gul; p. 291-398. Available from:

<https://books.google.com.ua/books?id=sVNSDwAAQBAJ&pg=PA291&lpq=P A291&dq=Molecular+Markers+in+Salvia+L.:+Past,+Present+and+Future+Me hmet+Karaca+and+Ayse+Gul+Ince+Springer+International+Publishing+AG&s ource=bl&ots=z3oRLLhaeh&sig=ACfU3U353K2Sflq- e0uXf1AEaGGMBuE8yw&hl=ru&sa=X&ved=2ahUKEwjqsand6trpAhVnlosK HXfcCr0Q6AEwCnoECAoQAAQ#v=onepage&q=Molecular%20Markers%20in %20Salvia%20L.%3A%20Past%2C%20Present%20and%20Future%20Mehme t%20Karaca%20and%20Ayse%20Gul%20Ince%20Springer%20International% 20Publishing%20AG&f=false> DOI: 10.1007/978-3-319-73900-7_9

66. Wang O, Zhang B, Lu L. Conserved region amplification polymorphism (CoRAP), a novel marker technique for plant genotyping in *Salvia miltiorrhiza*. *Plant Molecular Biology Reporter* [Internet]. 2008 Jun; 27(2):139–43. Available from: https://www.researchgate.net/publication/225781342_Conserved_Region_Amplification_Polymorphism_CoRAP_a_Novel_Marker_Technique_for_Plant_Genotyping_in_Salvia_miltiorrhiza DOI: 10.1007/s11105-008-0065-0