

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ В ИССЛЕДОВАНИИ И ХЕМОСИСТЕМАТИКА

УДК 577.29+582

В.В. Володин

V.V. Volodin

МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ФИЛОГЕНЕТИКИ И ХЕМОСИСТЕМАТИКИ В ИЗУЧЕНИИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ЭКДИСТЕРОИДОВ В ЦАРСТВЕ РАСТЕНИЙ

METHODS OF MOLECULAR PHYLOGENETICS AND CHEMOTAXONOMY IN STUDY OF THE DISTRIBUTION OF PHYTOECDYSTEROIDS IN PLANT KINGDOM

С привлечением методов молекулярной филогенетики и хемотаксономии разработана методология биохимического скрининга региональных флор на содержание фитоэктистероидов – растительных аналогов гормонов линьки насекомых. Проведен анализ образцов 411 видов из 308 родов, принадлежащих 82 семействам флоры европейского северо-востока России. Наибольшее число видов с высоким содержанием эктистероидов обнаружено в семействах Caryophyllaceae и Asteraceae, относящихся к ведущим семействам флоры. На основании анализа типов ареалов установлено, что эктистероиды характерны для растений южных и полизональных широтных групп. На основании сравнения последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS1 и ITS2) яРНК реконструирована молекулярная филогения трибы Cardueae сем. Asteraceae и филогенетическое дерево сем. Caryophyllaceae. Выявлены филогенетические связи между видами-продуцентами, которые проявляются при содержании эктистероидов в растениях в гормонально активных концентрациях, для чего используется биотест на культуре клеток *Drosophila melanogaster*. Впервые с помощью радиоиммунного анализа обнаружены следовые количества эктистероидов в большинстве исследованных видов не зависимо от их систематического положения. Полученные закономерности расширяют знания об эволюции вторичного обмена, а также позволяют использовать полученные данные при составлении хемотаксономического прогноза обнаружения эктистероидов в ранее неисследованных региональных флорах.

Растения синтезируют большое число соединений специализированного обмена, которые играют важную роль в качестве защитных факторов или сигнальных молекул во взаимоотношениях растений с другими организмами. Их наличие/отсутствие отражает адаптационную стратегию видов в процессе эволюции (Харборн, 1985; Wink, 2003). Этот факт находит свое отражение в распределении определенных классов вторичных метаболитов в филогенетической системе растений таким образом, что близкие виды, как правило, содержат преимущественно близкие группы веществ (принцип филогенетического родства растений) (Высочина, 1989). Однако этот принцип не носит абсолютного характера и проявляется как тенденция.

На протяжении последних десяти лет в лаборатории биохимии и биотехнологии Института биологии Коми НЦ УрО РАН (г. Сыктывкар) исследуются фитоэктистероиды – растительные аналоги гормонов линьки и метаморфоза насекомых. Для этих соединений до настоящего времени пока не получены экспериментальные данные, однозначно свидетельствующие об их роли в растениях: являются ли они экорегуляторами между растениями и насекомыми или участвуют в ростовых процессах в самих растениях. Важной предпосылкой для понимания функций эктистероидов у растений является изучение их распространения в царстве растений и выявление между видами-продуцентами возможных филогенетических связей. Получение ответа на этот вопросы позволило бы нам получить не только новые знания об эволюции вторичного обмена и механизмах регуляции биосинтеза вторичных метаболитов в растениях, но и разработать научно обоснованный прогноз обнаружения эктистероидсодержащих растений на принципах хемо- и молекулярной систематики, что имеет важное практическое значение.

Согласно результатам интенсивных исследований растений на содержание эктистероидов, проведенных в 70-е годы XX века, считалось, что эктистероиды характерны, главным образом, для папоротников и голосеменных, а у цветковых растений они встречаются реже (Russell, Fenemore, 1970, 1971). На основании этих данных, а также сведений о том, что папоротники и голосеменные практически не подвергаются нападению насекомых, ранее высказывалось предположение, что эктистероиды обуславливают защитный

механизм устойчивости именно папоротников и голосеменных по отношению к фитофагам. Считалось, что у покрытосеменных растений аналогичную функцию пищевых детеррентов выполняют алкалоиды, дубильные вещества и другие соединения (Харборн, 1985). Однако результаты последующих исследований показали, что экдистероиды также широко распространены и среди цветковых растений. На первоначальном этапе обобщения данных картина распространения экдистероидов в царстве растений складывалась таким образом, что экдистероидсодержащие виды оказывались в таксонах как в филогенетически близких, так и далеко отстоящих друг от друга. В результате исследователи придерживались мнения, что распределение экдистероидов не связано с филогенетической классификацией растений (Lafont, 1997).

В одном из ранних обзоров по распространению экдистероидов в растительном мире в качестве примеров, иллюстрирующих отсутствие связей между распространением и филогенетической классификацией растений, приводился род *Helleborus*, содержащий единственный экдистероидсодержащий вид *H. niger*. В качестве примеров приводились семейства Lamiaceae и Ranunculaceae, содержащие только по одному экдистероидсодержащему роду, соответственно *Ajuga* и *Helleborus*; семейство Caryophyllaceae, содержащее как экдистероидсодержащие (*Lychnis* и *Silene*), так и не содержащие этих соединений (*Cucubalus*, *Dianthus*, *Saponaria*) роды (Ахрем, Ковганко, 1989). Однако по данным других авторов (Hardman, Benjamin, 1976) для рода *Helleborus* указывается десять экдистероидсодержащих видов. Исследования флоры Горного Алтая внесли достаточную ясность в распределение экдистероидсодержащих видов в семействе Caryophyllaceae: экдистероидсодержащие роды *Lychnis* и *Silene* принадлежат одной трибе Lychnideae, в двух других исследованных трибах Alsineae и Diantheae экдистероидсодержащих родов и видов не было обнаружено (Ревина, Ревушкин, Ракитин, 1988). Тенденция концентрирования экдистероидсодержащих видов в определенных родах и трибах оказалась характерна для семейства Chenopodiaceae (Dinan, 1995; Dinan, Whiting, Scott, 1998). Значительные количества экдистероидов были обнаружены у представителей триб Chenopodieae и Atripliceae. Представители триб Camphorosmeae и Corispermatae содержат относительно низкие количества экдистероидов, а в трибе Salicornieae экдистероидсодержащих видов не было обнаружено. Оказалось, что в трибе Beteae два вида из секции Procumbentes рода *Beta* содержат экдистероиды, а остальные являются экдистероидотрицательными. Для спорного в систематическом плане рода *Beta*, обнаружение экдистероидов в видах *B. patellaris* и *B. webbiana* послужили дополнительными биохимическими признаками для выделения их вместе с видом *B. procumbens* в отдельный род *Patellifolia* от остальных представителей рода *Beta* (Williams, Scott, Ford-Lloyd, 1976). Применение ранга трибы при анализе известных данных о распространении экдистероидов в семействе Amaranthaceae показало, что большинство известных экдистероидсодержащих видов принадлежат шести родам из трибы Amarantheae.

В некоторых случаях ранг таксона, объединяющий экдистероидсодержащие виды, может несколько меняться в зависимости от объема того или иного семейства. В случае крупных семейств ранг таксона, объединяющий экдистероидсодержащие виды, может понижаться до подтрибы, а в небольших по объемам семействах или в семействах, содержащих систематически обособленные группы, этот ранг может повышаться до подсемейства. Например, в семействе Asteraceae из шести исследованных триб экдистероиды были обнаружены только у представителей подтрибы Centaureinae (триба Cardueae). Упомянутый нами род *Helleborus* считается настолько обособленным в семействе Ranunculaceae, что выделяется в отдельное подсемейство (Тахтаджян, 1987). В большинстве же семейств рангом таксона, объединяющим экдистероидсодержащие виды в семействах отдела цветковых растений, является триба (Фитоэкдистероиды, 2003).

Следует отметить, что выявленная нами тенденция встречаемости экдистероидсодержащих растений в определенных трибах не носит абсолютный характер, поскольку в пределах «положительных» родов наряду с видами с очень высоким содержанием экдистероидов действительно могут присутствовать виды, вообще не содержащие этих соединений. На первичном этапе обобщения имеющихся в литературе данных мы могли объяснить отклонения от этой закономерности следующими факторами: несовершенством традиционных систем классификации растений, основанных на морфолого-анатомических признаках, чувствительностью применяемых методов анализа, а также тем фактом, что у некоторых видов в ходе эволюции в определенных условиях может наблюдаться утрата способности к биосинтезу экдистероидов. В настоящее время для установления более точных взаимоотношений между распределением экдистероидов и филогенетической классификацией растений нами успешно используются метод молекулярной систематики, основанный на сравнении последовательностей ДНК в сочетании с высокочувствительными методами анализа растительных образцов на содержащие экдистероиды.

На содержание экдистероидов мы проанализировали растения, произрастающие на территории

крупного ботанико-географического района – европейского северо-востока России. Для скрининга привлекались виды, представляющие как можно больше неисследованных семейств изучаемой флоры. При обнаружении экистероидов в каком-либо виде скринингу подвергали как можно большее число представителей рода и трибы, к которым данный вид принадлежит. Для анализа экистероидов использовали биотест на культурах клеток В-II *Drosophila melanogaster*, чувствительный к присутствию в растительных экстрактах веществ, обладающих активностью гормона линьки насекомых; радиоиммунный анализ (РИА) и высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ). При необходимости для идентификации экистероидов использовались методы масс-спектрометрии и ЯМР-спектроскопии. Для проведения трех указанных типов анализа требовался растительный материал в количестве не более 20–100 мг. Биотесты и РИА проводились в лаборатории доктора Лоуренса Дайнана (Великобритания). Аналитические методики приведены в ранее опубликованных работах (Volodin et al., 2002).

На содержание экистероидов нами проанализировано 411 видов из 308 родов, принадлежащих 82 семействам флоры европейского северо-востока России. Большая часть из них (381 вид) представляла случайную выборку видов, произрастающих на территории флоры. Другая часть образцов (30 видов) была отобрана из «положительных» триб, в которых мы ожидали высокую вероятность обнаружения экистероидов. Результаты исследования показали, что экистероиды присущи большому числу видов покрытосеменных растений, причем содержание экистероидов у растений различных видов варьирует в очень широком интервале концентраций: от предельно малых (менее 0,1 мкг экизон эквивалент/г растительного материала) до необычно высоких (более 1000 мкг экизон эквивалент/г растительного материала). Наибольшее число видов с высоким содержанием экистероидов обнаружено в семействах Caryophyllaceae и Asteraceae, относящихся к ведущим семействам флоры (Фитоэкистероиды, 2003). На основании сравнения последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS1 и ITS2) яРНК реконструирована молекулярная филогения трибы Cardueae сем. Asteraceae и филогенетическое древо сем. Caryophyllaceae (Володин и др., 2013). Установлено, что в трибе Cardueae виды с высоким содержанием экистероидов образуют кладу, включающую в себя филогенетически близкие рода *Rhaponticum*, *Serratula*, *Acroptilon*, *Amberboa* и некоторых представителей *Centaurea*. В трибе Sileneae сем. Caryophyllaceae разделение по родам полностью соответствует ее генетической классификации, предложенной В. Oxelman с соавторами (2001). Из выделяемых им восьми родов в работе представлено шесть родов. Род *Silene* разделяется на две субклады Ia и Ib. Субклада Ia представлена экистероидположительными видами, хотя в ней выделяется группа видов, не содержащих экистероиды. В субкладе Ib преобладают виды с отсутствием или с низкой концентрацией экистероидов, но в ней также отделяется группа с высоким их содержанием. Нами показано, что в роде *Silene* виды-продуценты фитоэкистероидов, имеющие положительный ответ в биотесте на культуре клеток *D. melanogaster*, группируются отдельно от видов этого рода, не содержащих экистероиды, и видов со следовыми количествами экистероидов, не активными в биотесте, но обнаруживаемыми с помощью радиоиммунного анализа в концентрации менее 4 мкг/г. Анализ других родов трибы Sileneae (субклада Ic) подтвердил, что экистероидсодержащими родами можно считать рода *Lychnis* и *Petrocoptis*, тогда как представители других родов не синтезируют фитоэкистероиды. В других трибах семейства Caryophyllaceae, представленных в данной работе (клады II–VII), не встречаются виды-продуценты экистероидов, хотя во многих из них присутствуют виды с концентрацией экистероидов в следовых количествах.

Мы впервые установили факт наличия следовых количеств экистероидов (выявляемых только с помощью РИА) едва ли не у всех исследованных покрытосеменных растений. Если принять во внимание, что используемый биотест на культуре клеток *D. melanogaster* основан на гормон-рецепторных взаимодействиях, то можно утверждать, что он может служить в качестве критерия выявления видов, у которых экистероиды выполняют экологическую роль. Именно в этих видах обнаруживаются филогенетические связи. Факт обнаружения следовых количеств экистероидов в большинстве исследованных видов растений убедительно свидетельствует в пользу гипотезы о том, что все растения могут обладать генетически обусловленной способностью синтезировать экистероиды, но они различаются уровнем экспрессии генов или регуляцией активности ферментов, участвующих в биосинтезе экистероидов.

Проведение исследования на территории флоры, как целостного комплекса видов, позволило нам установить не только филогенетические связи между видами-продуцентами экистероидов. Анализ типов ареалов экистероидсодержащих растений во флоре европейского северо-востока России показывает, что экистероиды, по всей видимости, являются вторичными метаболитами, характерными для растений южных и полизональной широтных групп. В будущих исследованиях представляет интерес выявить специфи-

ку видового состава экистероидсодержащих растений в других географически удаленных флорах в связи с историей их формирования и активностью насекомых фитофагов.

Таким образом, использование современных методов молекулярной филогенетики и экспрессных методов обнаружения экистероидов в растительных экстрактах позволяет уточнить филогенетические связи между видами-продуцентами экистероидов и получить новые знания об эволюции вторичного обмена. Полученные закономерности могут быть использованы при составлении хемотаксономического прогноза обнаружения экистероидов в региональных флорах.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 13-04-98814 p_север_a и интеграционного проекта № 12-И-4-2072 Программы фундаментальных исследований УрО РАН.

ЛИТЕРАТУРА

Ахрем А.А., Ковганко Н.В. Экистероиды: Химия и биологическая активность. – Минск: Наука и техника, 1989. – 327 с.

Володин В.В., Шадрин Д.М., Пылина Я.И., Друзь Ю.И., Володина С.О., Чадин И.Ф., Дайнан Л. Молекулярная филогения и хемотаксономия экистероидсодержащих растений семейств Caryophyllaceae Juss. и Asteraceae Dumort. // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии, 2013. – Т. 9, № 1. – С. 21–27.

Высочина Г.И. Хемотаксономический метод в подборе объектов интродукции // Ускорение интродукции растений Сибири: Сб. науч. тр. – Новосибирск: Наука, 1989. – С. 56–60.

Ревина Т.А., Ревушкин А.С., Ракитин А.В. Экистероидсодержащие виды во флоре Горного Алтая // Раст. ресурсы, 1988. – Т. 24, № 4. – С. 565–570.

Тахтаджян А.Л. Система магнолиофитов. – Л.: Наука, 1987. – 438 с.

Фитоэкистероиды / под ред. В.В. Володина. – СПб.: Наука, 2003. – 293 с.

Харборн Д. Введение в экологическую биохимию. – М.: Мир, 1985. – 176 с.

Dinan L. Distribution and levels of phytoecdysteroids within individual plants of species of the Chenopodiaceae // Eur. J. Entomol., 1995. – Vol. 92. – P. 295–300.

Dinan L., Whiting P., Scott A. Taxonomic distribution of phytoecdysteroids in seeds of members of the Chenopodiaceae // Biochem. Systematic. Ecol., 1998. – Vol. 26. – P. 553–576.

Hardman R., Benjamin T.V. The Co-occurrence of ecdysones with bufadienolides and steroidal saponins in the genus Helleborus // Phytochem., 1976. – № 15. – P. 1515–1516.

Lafont R. Ecdysteroids and related molecules in animals and plants // Arch. insect biochem. physiol., 1997. – Vol. 35. – № 1/2. – P. 3–20.

Oxelman B., Liden M., Rabeler R.K., Popp M.A. Revised generic classification of the tribe Sileneae (Caryophyllaceae) // Nordic Journal of Botany, 2001. – Vol. 20. – P. 743–748.

Russell G.B., Fenemore P.G. Insect moulting activity of some New Zealand gymnosperms // New Zealand J. Sci., 1970. – № 13. – P. 61–63.

Russell G.B., Fenemore P.G. Insect moulting hormone activity in some New Zealand ferns // New Zealand J. Sci., 1971. – № 14. – P. 31–54.

Volodin V., Chadin I., Whiting P., Dinan L. Screening plants of European North-East Russia for ecdysteroids // Biochemical Systematics and Ecology, 2002. – Vol. 30. – P. 525–578

Williams J., Scott A.J. Ford-Lloid B. Patellaria: a new genus in the Chenopodiaceae // Feddes repertorium, 1976. – Vol. 87. – P. 289–292.

Wink M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective // Phytochemistry, 2003. – Vol. 64. – P. 3–19.

SUMMARY

The methodology of biochemical screening of regional floras for the presence of phytoecdysteroids, plant analogues of insect molting hormone, is developed with the usage of the methods of molecular phylogenetics and chemotaxonomy. Samples of 411 species from 308 genera and 82 families of the flora of European North-East Russia were analyzed. It was established that Caryophyllaceae and Asteraceae, leading families in this regional flora, are richest in phytoecdysteroids. Analysis of the types of habitats showed that ecdysteroids are characteristic for plants of southern and polyzonal latitudinal groups. Molecular phylogeny of the tribe Cardueae (Asteraceae) and phylogenetic tree of the family Caryophyllaceae are reconstructed by comparison of nucleotide sequences of internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) of rRNA. Phylogenetic relationships among species-producers of ecdysteroids manifest themselves at hormonal active concentration revealed by biotest on cell culture of *Drosophila melanogaster*. These results significantly expand our knowledge about the evolution of plant secondary metabolism, as well as allow us to use the data obtained in drafting chemotaxonomic forecast of the discovering ecdysteroids in unstudied regional floras. For the first time traces of ecdysteroids were detected in most plants studying by radioimmunoassay regardless of their systematic position.