

УДК 582.675.1:577.212.3

Молекулярная филогения семейства Ranunculaceae на основе rbcL и trnL-F последовательностей хлоропластной ДНК

Molecular phylogeny of the family Ranunculaceae on the basis of rbcL and trnL-F sequences of chloroplast DNA

Евдокимов И. Ю.

Evdokimov I. Yu.

Алтайский государственный университет, пр. Ленина, 61, 656049, Барнаул. E-mail: ivan.evdokimov.92@mail.ru

Altai State University, Lenina str., 61, Barnaul, 656049, Russia

Реферат. В статье приведены филогенетические деревья, полученные с использованием фрагментов последовательностей хлоропластной ДНК rbcL и trnL-F. Использовались 63 последовательности trnL-F, включая 18 отсековированных самостоятельно, 42 rbcL последовательности (7 отсековировано самостоятельно, 2 добавлено в дендрограммы). Целью данного исследования является доказательство успешного применения rbcL и trnL-F фрагментов хлоропластной ДНК для исследования филогении Лютиковых и других семейств растений. В статье изложены основные современные способы и методики исследования филогенетических взаимоотношений, представлено практическое применение растений и химических составляющих растений семейства Лютиковые. Также в статье приведен исторический обзор исследований этого семейства. С помощью использования данных фрагментов ДНК мы хотим представить современную систему семейства.

Summary. The article presents phylogenetic trees based on fragments of chloroplast DNA sequences (rbcL and trnL-F). 63 trnL-F sequences trnL-F were used, including 18 new sequencing, 42 rbcL sequences (7 new sequencing, 2 added in dendrogram). The aim of this study is to prove the successful use of rbcL and trnL-F fragments of chloroplast DNA for the study of the phylogeny of Ranunculaceae and other plant families. The article describes the main modern methods and methods for investigating phylogenetic relationships, presents the practical application and chemical constituents of Ranunculaceae plants. Also the article includes a historical review of the research of this family. By using the DNA fragments, we want to present a modern family system.

Семейство Ranunculaceae включает в себя около 2500 описанных видов из 61 рода, распределенных на территории всего мира, но главным образом в умеренных и холодных областях северного полушария (Tamura, 1993; Wu et al., 2003). Изучаемое семейство является фармацевтически важным, что в свою очередь также использовалось как фактор, имеющий филогенетическое значение (Tamura, 1993). Более 30 родов и около 220 видов используются в качестве лекарственных трав в Китае и во многих других странах, например, против лихорадки, рака, аритмии, малярии (Cai et al., 2010). Систематика семейства Ranunculaceae разнообразна как среди крупных таксонов, так и среди мелких (в частности, видов).

В истории изучения систематики семейства Ranunculaceae существует несколько основных значимых работ, которые сыграли основную роль в становлении систематики и позволили определить объем и границы исследуемого семейства.

Основополагающий вклад в становление систематики семейства Ranunculaceae внес М. Тамура (Tamura, 1993, 1995). Он не только обобщил результаты многих частных анатомо-морфологических исследований видов этого семейства, но и дополнительно использовал данные по кариотипам и формированию плодов. Итогом его работ стала система семейства, в состав которой входило 5 подсемейств, 10 триб и 14 подтриб (Евдокимов, 2015).

Для выяснения родственных отношений среди подсемейств лютиковых и взаимосвязи их филогении, химии и медикофармацевтических свойств многие исследования проводились на основе таксономических признаков. Согласно количеству хромосом и характеристикам цветка, М. Tamura (Tamura, 1993) признали шесть подсемейств, а именно *Hydrastidoideae*, *Thalictroideae*, *Ranunculoideae*,

Helleboroideae, *Coptidoideae* и *Isopyroideae*. На основании изучения ядерной 26S рибосомальной ДНК К. Е. Ro et al. (1997) предложили классифицировать и систематизировать семейство на четыре подсемейства: *Hydrastidoideae* Rafinesque, *Coptidoideae* Tamura, *Thalictroideae* Rafinesque и *Ranunculoideae* Arnott. Y. Peng (Peng et al., 2006) представляет свои результаты, основанные на фармофилогенетическом исследовании. Другие ученые использовали цитологические методы (Yang, 2001; Lehnebach et al., 1968), серологические подходы (Jensen, 1968) и кладистический анализ (Hoot, 1991). Некоторые из этих исследований примерно совместимы с текущей классификацией лютиковых, но эта информация должна быть тщательно проверена в свете независимых филогенетических исследований, проводимых ранее, особенно молекулярного секвенирования. В последние годы молекулярная систематика, филогенетика были использованы в дополнение к классическим методам систематики. Из-за различий в эволюции последовательности ДНК растений могут быть использованы при их классификации. Тем не менее, лишь небольшое количество молекулярных маркеров в настоящее время оказалось полезным для филогенетического логического вывода системы цветковых растений (Ro et al., 1997). Доказано, что рибулоза-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/ оксигеназы (*rbcL*) ген из генома хлоропластов подходит для филогенетического анализа (Cai et al., 2010). *RbcL* последовательности в настоящее время широко применяются для изучения молекулярной филогении растений. Кодирующие гены, такие как *rbcL*, вероятно, информативны для решения филогенетических вопросов, как у высших таксономических рангов, так и среди мелких таксонов растений (Tian, Li, 2002). В данном исследовании мы проанализировали *rbcL* последовательности хпДНК лютиковых, а также *trnL-F* последовательности, которые в свою очередь также обладают хорошими показателями при проведении филогенетического анализа у растений (Евдокимов, 2015).

Целью нашего исследования явилось изучение филогении и таксономии семейства *Ranunculaceae* в целом при помощи методов молекулярной биологии с использованием фрагментов хлоропластной ДНК, в частности *rbcL*, *trnL-F*. Для построения дендрограмм были взяты уже имеющиеся последовательности из ведущих генетических банков (EMBL-EBI, NCBI), а также часть видов растений была отобрана из гербарного материала Южно-Сибирского ботанического сада Алтайского государственного университета. После чего нами проводились стандартные процедуры выделения из них ДНК, амплификации необходимых фрагментов, секвенирование амплификатов. Все работы проводились в лаборатории биоинженерии Южно-Сибирского ботанического сада. Были расшифрованы последовательности 25 видов растений для дополнения остального набора сиквенсов. До настоящего времени у 14 представителей изучаемого семейства *trnL-F* фрагменты *trnL-F* не были расшифрованы и, соответственно, отсутствуют в базах данных (*Hegemone lilacina* Bunge, *Trollius altaicus* C. A. Mey., *T. asiaticus* L., *Callianthemum sajanense* (Regel) Witasek, *Halerpestes salsuginosa* (Pall.) Green, *Pulsatilla astragalifolia* Pobed., *P. kostyczewii* (Korshinsky) Juzepczuk, *P. multifida* (Pritz.) Juz., *P. companella* Fisch. ex Regel et Tiling, *Aconitum pallasii* Rchb., *Ranunculus pedatifidus* Smith in A. Rees, *R. longicaulis* C. A. Mey., *R. altaicus* Laxm., *R. albertii* Regel et Schmalhause). Относительно небольшое количество последовательностей *rbcL* фрагментов части видов также до сих пор не было отсеквенировано (*Trollius altaicus* C. A. Mey., *Aconitum pallasii* Rchb.)

Ранее большая часть родов была распределена в разные группы на основе сравнительно-морфологического анализа. Для исследования филогении семейства нами строились дендрограммы и кладограммы на основе данных молекулярной биологии. Наши деревья, построенные на основе последовательностей хлоропластных генов (*rbcL*, *trnL-trnF*), наглядно разделяются на клады (рис. 1–3). Генетическая поддержка разделения на клады различна, но вполне достаточна для определения их в разные филогенетические группы. На их основе мы предлагаем выделить эти группы в ранг подсемейств. Это такие группы, как *Hydrastidoideae*, *Glaucidioideae*, *Coptidoideae*, *Isopyroideae*, *Thalictroideae*, *Aconitoideae*, *Callianthemoideae*, *Trollioideae*, *Calthoideae*, *Actaeaceae*, *Helleboroideae*, *Nigelloideae*, *Anemonoideae*, *Ranunculoideae*. Часть из них ранее была выделена другими авторами на основе морфологического, цитотаксономического и других анализов, например: *Isopyroideae*, *Trollioideae*, *Calthoideae*, *Anemonoideae*, *Ranunculoideae*, *Thalictroideae* (Зиман, 1985; Tamura, 1995 и др.). На основе молекулярно-генетического анализа, помимо ранее выделенных клад, нам представились новые. Как пример, исходя из дендрограммы на основе *trnL-trnF* фрагментов (рис. 1), как и дендрограмм на основе *rbcL* фрагментов (рис 2, 3), видно обособление с минимальной поддержкой от остальных

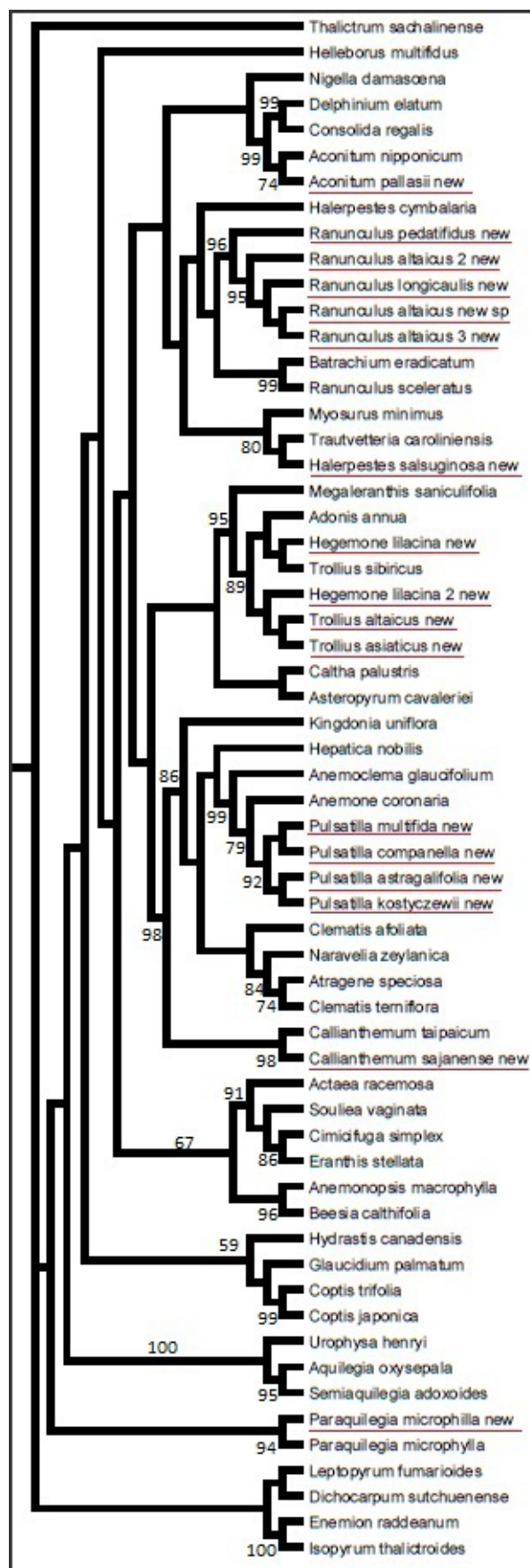


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное на основе trnL–trnF фрагментов хлоропластной ДНК. Отношения родов и видов в сем. Ranunculaceae просчитаны программой MrBayes 3.2.

групп видов р. *Helleborus*; остальные построенные нами деревья по разным фрагментам ДНК демонстрируют то же. Группа с родом *Callianthemum* таким же образом отделяется от всех других клад, поэтому опираясь на данные филогенетического анализа можно определить её самостоятельным подсемейством.

Cai Ying-fan с соавторами ранее проводили подобные работы по использованию *rbcL* фрагментов при изучении филогенетических отношений в семействе Ranunculaceae для установления необходимых свойств этого гена и доказательства его хорошего применения для исследования работ такого

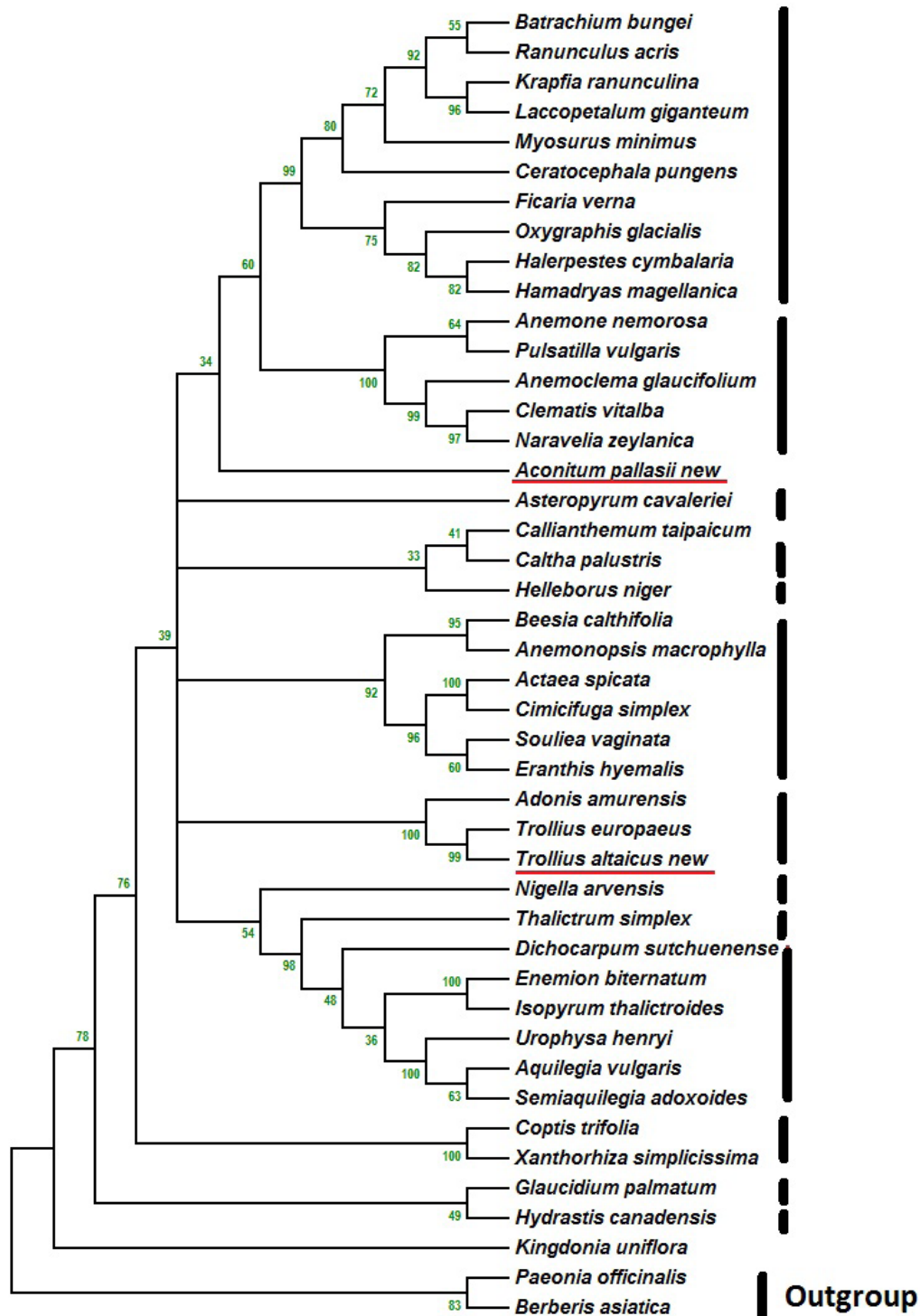


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное на основе *rbcL* фрагментов хлоропластной ДНК. Отношения родов и видов в сем. Ranunculaceae выведены методом ближайших соседей просчитаны в программе MEGA 6.06.

рода (Cai et al., 2010). Во многом наши исследования по результатам применения схожи с ними и взаимодополняют друг друга. Различия были обнаружены между нашей системой по *rbcL* гену и предыдущими таксономическими работами на основе морфологии (рис. 2, 3). Это же происходит и с *trnL-F* генами (рис. 1). Большинство клад, полученных в результате нашего анализа, могут быть охарактеризованы морфологическими или кариологическими признаками, ранее описанными в литературе. Это, в свою очередь, также может служить основой для будущего пересмотра классификации семейства. Многие виды *Ranunculaceae* имеют разнообразную морфологию и химическую структуру, которые могут быть сопоставлены с предполагаемой топологией, полученной на основе последовательностей используемых генов. Анализ последовательностей *rbcL* и *trnL-F* с внутригрупповыми и внешними группами оказался полезным для классификации представителей изучаемого семейства.

Исходя из современных накопленных знаний и наработок о морфологических, кариологических, химических и молекулярных признаках, мы показали, что систематика и классификация семейства *Ranunculaceae* должна быть пересмотрена и система семейства должна включать в себя иное количество подсемейств, чем установлено ранее. Наши исследования молекулярной филогении показывают, что применение молекулярной генетики, в частности секвенирования фрагментов хлоропластной ДНК (*rbcL* и *trnL-F*), не только очень полезно для установления таксономических групп, но также отражает эволюционную историю цветковых растений и предоставляет важную информацию об их развитии.

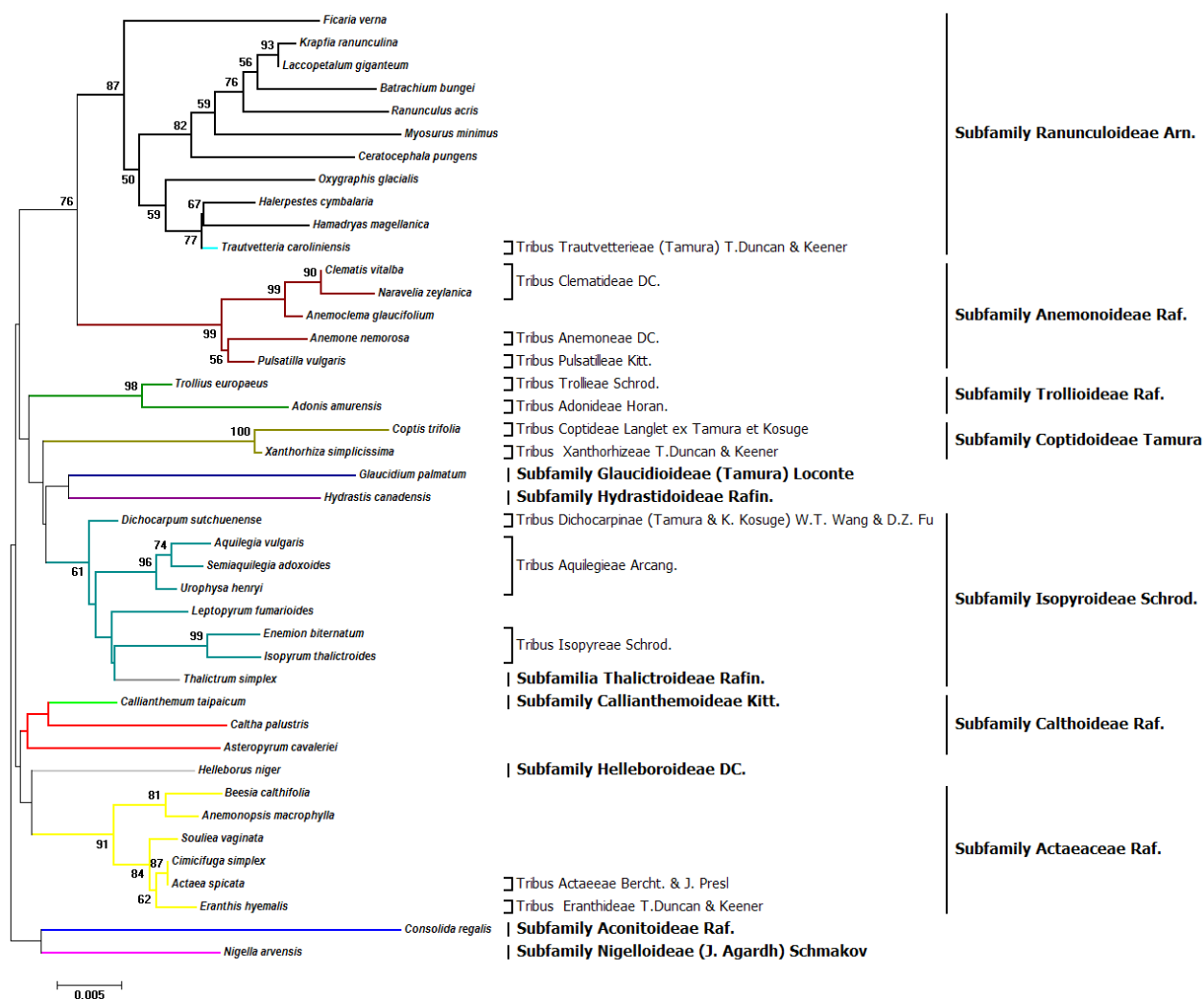


Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное на основе *rbcL* фрагментов ядерной ДНК. Отношения родов и видов в сем. *Ranunculaceae* выведены методом ближайших соседей, просчитаны в программе MEGA 6.06.

ЛИТЕРАТУРА

- Евдокимов И. Ю. Обзор систем семейства Ranunculaceae Juss. в хронологической последовательности // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии: Сборник науч. ст. по материалам XIV междунар. науч.-практ. конф. – Барнаул: Изд-во АГУ, 2015. – С. 140–144.
- Зиман С. Н. Морфология и филогения семейства лютиковых – Киев: Наукова думка, 1985. – 248 с.
- Cai Ying-fan, Li Sheng-wei, Chen Min, Jiang Ming-feng, Yi Liu, Xie Yong-fang, Sun Quan, Jiang Huai-zhong, Yin Xeng-wen, Ling Wang, Zhang R., Cheng-lin Huang, Lei Kairong. Molecular phylogeny of Ranunculaceae based on rbc L sequences // *Biologia*, 2010 – Vol. 65, № 6. – P. 997–1003.
- Hoot S. B. Phylogeny of the Ranunculaceae based on epidermal microcharacters and macromorphology // *Syst. Bot.*, 1991. – Vol. 16. – P. 741–755.
- Jensen U. Serologische Beiträge zur Systematik der Ranunculaceae // *Bot. Jahrb.*, 1968. – Vol. 88. – P. 269–310.
- Lehnebach C. A., Cano A., Monsalve C., McLenachan P., Horandl E., Lockhart. Phylogenetic relationships of the monotypic Peruvian genus *Laccopetalum* (Ranunculaceae). // *Pl. Syst. Evol.*, 1968. Vol. 264. – P. 109–116.
- Peng Y., Chen S. B., Chen S. L., Xiao P. G. Preliminary pharmacogenetic study on Ranunculaceae China // *J. Chin. Materia Medica*, 2006. – Vol. 31. – P. 1124–1128.
- Ro K. E., Keener C. S., McPherson B. A. Molecular phylogenetic study of the Ranunculaceae: Utility of the nuclear 26S ribosomal DNA in inferring intrafamilial relationships // *Mol. Phyl. Evol.*, 1997. – Vol. 8. – P. 117–127.
- Tamura M. Angiospermae. Ordnung Ranunculales. Fam. Ranunculaceae. Systematic Part. II // *Natürliche Pflanzenfamilien*, second Hiepko P. (ed.). – Berlin. Duncker and Humboldt, 1995. – Vol. 17a, IV. – P. 223–519.
- Tamura M. The Families and Genera of Vascular Plants / K. Kubitzki et al. (eds). – Berlin, Springer, Verlag, 1993. – Vol. 2. – P. 563–583.
- Tian X., Li D. Z. Application of DNA sequences in plant phylogenetic study // *Acta Bot. Yunnan*, 2002. – Vol. 24. – P. 170–184.
- Wu Z. Y., Lu A. M., Tang Y. C. The Families and Genera of Angiosperms in China, A Comprehensive Analysis. Beijing, Science Press, 2003. – 378 pp.
- Yang Q. E. Cytology of 12 species in *Aconitum* L. and of 18 species in *Delphinium* L. of the tribe Delphineae (Ranunculaceae) from China // *Acta Phytotax. Sin.*, 2001. – Vol. 39. – P. 502–514.