

УДК 582.675.1

Исследования молекулярной филогении семейства *Ranunculaceae* Juss. на основе внутренних транскрибируемых спейсерных последовательностей (ITS1-ITS2)

Studies of the molecular phylogeny of the family *Ranunculaceae* Juss. based on internal transcribed spacer sequences (ITS1-ITS2)

Евдокимов И. Ю.

Evdokimov I. Yu.

Алтайский государственный университет, г. Барнаул, Россия. E-mail: ivan.evdokimov.92@mail.ru

Altai State University, Barnaul, Russia

Реферат. Семейство *Ranunculaceae* содержит важные лекарственные растения. Чтобы получить новые эволюционные свидетельства в отношении систематики растений изучаемого семейства, мы использовали данные молекулярной биологии (последовательности ДНК) для проверки взаимосвязей, основанных на области внутреннего транскрибируемого спейсера. В данной статье приводятся результаты филогенетического анализа 127 видов *Ranunculaceae*, и в качестве Outgroup взяты представители семейств *Paeoniaceae* и *Berberidaceae*. Результаты анализа не только поддерживали монофилию каждого из этих родов, но также указывали на ряд дополнительных моментов, что, в свою очередь, подтверждает данные наших предыдущих исследований.

Summary. The family *Ranunculaceae* contains important medicinal plants. To obtain new evolutionary evidence on the systematics of plants in the family under study, we used molecular data (DNA sequences) to test the relationships based the internal transcribed spacer. This article presents the results of a phylogenetic analysis of 127 species from family *Ranunculaceae*, and representatives of the families *Paeoniaceae* and *Berberidaceae* are taken as Outgroup. The results of the analysis not only supported the monophilia of each of these genera, but also indicated a number of additional points, which in turn confirms the data of our previous studies.

Ranunculaceae – семейство цветковых растений, которое включает в свой состав 61 род и около 2500 видов (Евдокимов, 2015). Хотя представители изучаемого семейства распространены во всем мире, растения наиболее распределены в умеренных и холодных районах северного полушария. В Китае виды семейства *Ranunculaceae* в основном сосредоточены на юго-западе. Численно, самыми крупными родами в этом семействе являются *Ranunculus* (около 600 видов), *Delphinium* (около 370 видов), *Thalictrum* (около 340 видов), *Clematis* (около 335 видов) и *Aconitum* (около 310 видов). Изучаемое семейство содержит много декоративных растений, некоторые из них имеют подтвержденную важность и ценность как лекарственные. Некоторые виды используются для лечения желтухи, в качестве лекарств против малярии, против раковых заболеваний. Во многих странах растения этого семейства входят в состав лекарственных средств из-за их антибиотических и противовоспалительных свойств (Serkedjjeva, Velcheva, 2003; Wang et al., 2004). Растения, входящие в состав семейства, имеют сложные химические компоненты, многие из которых представляют важные таксономические признаки, и одни и те же химические компоненты распределяются между разными родами (Peng et al., 2006). Это, в свою очередь, также является филогенетически важным признаком (Ro et al., 1997). Исследователи использовали различные таксономические признаки для определения важности связей между филогенезом, химическим составом и даже фармакологическими свойствами. Однако, сведения о филогенетических связях между родами в семействе *Ranunculaceae*, особенно принадлежность к нескольким родам, противоречива. Ориентируясь на М. Tamura, выделяется пять подсемейств: *Hydrastidoideae*, *Thalictroideae*, *Isopyroideae*, *Ranunculoideae* и *Helleboroideae* (Tamura, 1993). Результаты фармафилогенетических ис-

следований некоторых других ученых соответствовали филогенетической схеме, представленной Тамурой (Peng et al., 2006). Химические характеристики подтверждают отделение группы *Isopyroideae* от *Thalictroideae*, представляющего собой самостоятельное подсемейство *Isopyroideae* (Peng et al., 2006). Многие ученые использовали цитологические исследования, серологические подходы, кладистические анализы разного рода для представления филогенетических связей в семействе. Некоторые результаты были совместимы с существующей классификацией семейства, но все исследования были разрозненными и даже противоречивыми. Поэтому необходимо тщательно пересмотреть отношения в свете независимых филогенетических оценок. В последние годы ряд ученых (Cai et al., 2009; Ro et al., 1997; Wang et al., 2004 и др.) использовали методы молекулярной систематики для восстановления систематики растений и решения систематических проблем, которые трудно решить с помощью классической таксономии.

Опираясь на последовательности хлоропластной ДНК (*rbcL*, *trnL-F*), нами уже были проведены исследования (Евдокимов, 2017). Последовательности внутреннего транскрибированного спейсера (ITS) (включая последовательности ITS1 и ITS2) и 5,8S рРНК сохраняя свою длину и высокую степень вариабельности, хорошо подходят для классификационных исследований. Последовательности ядерной рДНК ITS использовались при анализе покрытосеменных растений у разных авторов, в том числе и в изучении семейства *Ranunculaceae*. В статье мы сообщаем о последовательностях и анализе последовательностей ITS *Ranunculaceae* и родственных растений *Paeoniaceae* и *Berberidaceae* и обсуждаем важность классификации растений на молекулярном уровне. Результаты дают новую информацию относительно молекулярных филогенетических отношений в семействе *Ranunculaceae* и растений близкородственных семейств *Paeoniaceae* и *Berberidaceae*.

В качестве материалов для построения филогенетических деревьев были взяты уже имеющиеся в общедоступных крупнейших генетических базах данных последовательности ядерной ДНК, основанных на отрезке ITS1-ITS2. Были взяты 130 последовательностей разных видов представителей семейства *Ranunculaceae* и 2 представителя Outgroup по одному из семейств *Paeoniaceae* и *Berberidaceae*.

Материалы и методы

В работе использовалась программа BLAST для поиска и сравнения нуклеотидных последовательностей на веб-сайте Национального центра биотехнологических исследований (NCBI) для анализа целевого гена. Последовательности, содержащие отсутствующие данные или большое количество пробелов, были исключены из всех анализов. Анализ соседей и Максимального правдоподобия проводили с использованием программы MEGA 7. Для анализа соседства и максимального правдоподобия использовалось программное обеспечение MEGA, данная программа использовалась для реализации эвристической процедуры поиска с 1000 повторами случайного добавления таксонов, чтобы минимизировать возможное смещение от входного порядка.

Результаты

Ряд исследований, проводимых группами ученых из разных стран ранее (Зиман, 1985; Tamura, 1995 и др.), показывают, что основная часть родов была распределена в разные группы на основе сравнительно-морфологического анализа. Для исследования филогении семейства нами строились дендрограммы на основе данных молекулярной биологии. Наши деревья, построенные на основе последовательностей ядерных участков ДНК, наглядно разделяются на группы (рис 1,2). 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 *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: *Isopyroideae*, *Trollioideae*, *Calthoideae*, *Anemonoideae*, *Ranunculoideae*, *Thalictroideae* (Зиман, 1985; Tamura, 1995 и др.). На основе молекулярно-генетического анализа помимо ранее выделенных групп, у нас появились новые. Так, например, исходя из дендрограмм на основе ITS участков видно обособление с минимальной поддержкой от остальных групп видов р. *Helleborus*, остальные, построенные нами де-

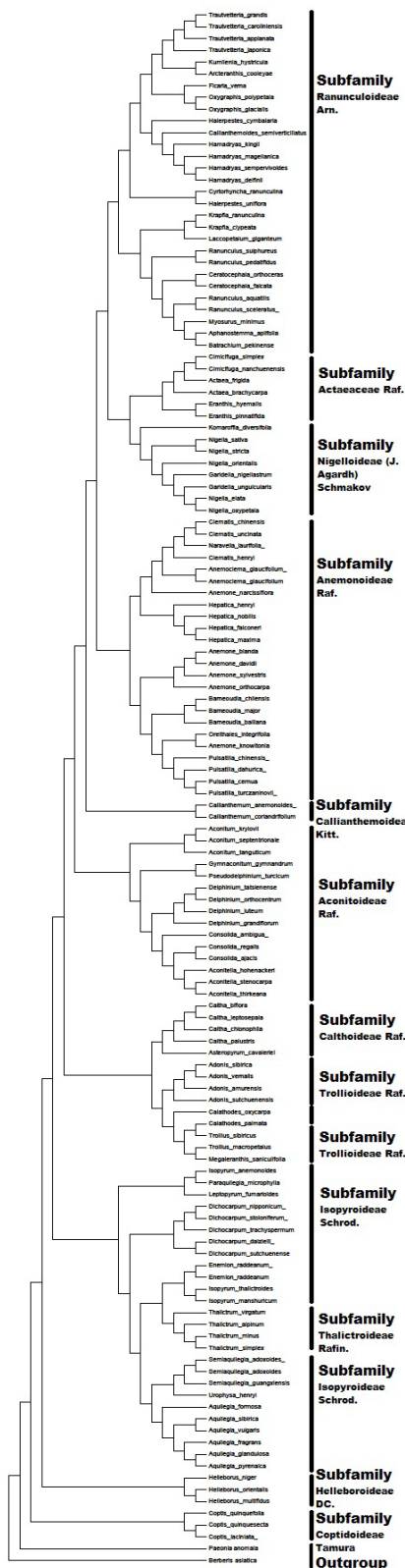


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное на основе ITS1-ITS2 фрагментов ядерной ДНК. Отношения родов и видов в сем. Ranunculaceae просчитаны программой MEGA 7, методом Максимального правдоподобия.

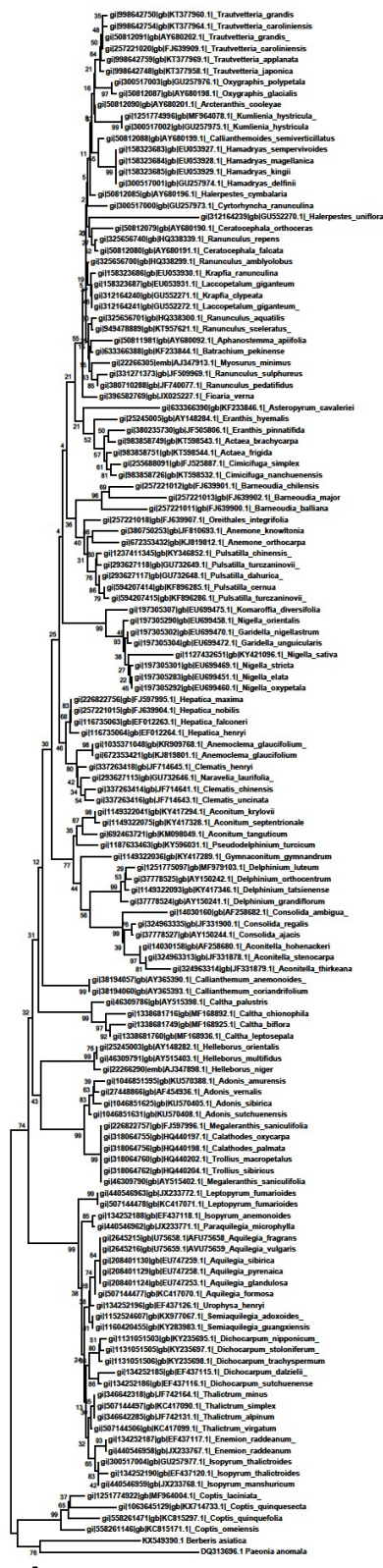


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное на основе ITS1-ITS2 фрагментов ядерной ДНК. К названию каждого организма добавлен номер из генетического банка (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Отношения родов и видов в сем. Ranunculaceae просчитаны программой MEGA 7, методом Ближайших соседей.

ревья по разным фрагментам ДНК демонстрируют то же самое. Группа с родом *Callianthemum* таким же образом отделяется от всех других групп, поэтому опираясь на данные филогенетического анализа можно определить ее самостоятельным подсемейством.

Ying-fan Cai с сотрудниками ранее проводили подобные работы по использованию внутреннего транскрибируемого спейсерного участка для изучения филогенетических отношений в семействе Ranunculaceae для установления необходимых свойств этого гена и доказательства его успешного применения для исследования работ, связанных с филогенетическими отношениями между родами семейств (Cai et al., 2009). Во многом наши исследования по результатам применения схожи с ними и взаимодополняют друг друга. Большинство групп, определившихся в наших анализах, могут быть охарактеризованы морфологическими или кариологическими особенностями, описанными в литературе ранее. Многие виды Ranunculaceae имеют интересную морфологию и химическую структуру, которые в свою очередь можно с полной уверенностью сопоставить в полученной топологии из последовательностей используемых в данной исследовательской работе генов. Анализ последовательностей ядерной ДНК с внутригрупповыми и внешними группами оказался полезным для их классификации.

Исходя из наших современных накопленных знаний и наработок о морфологических, кариологических, химических и молекулярных свойствах, 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 не только очень полезно для установления таксономических групп, но также отражает эволюционную историю цветковых растений и предоставляет важную информацию об их развитии.

ЛИТЕРАТУРА

Евдокимов И. Ю. Обзор систем семейства Ranunculaceae Juss. в хронологической последовательности // Сб. науч. статей по материалам XIV междуна. науч.-практ. конф. «Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии». Барнаул, 2015. – С. 140–144.

Евдокимов И. Ю. Молекулярная филогения семейства Ranunculaceae на основе *rbcl* и *trnl-f* последовательностей хлоропластной ДНК // Сб. науч. статей по материалам XVI междуна. науч.-практ. конф. «Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии». Барнаул, 2017. – С. 240–245.

Зиман С. Н. Морфология и филогения семейства лютиковых. Киев: Наукова думка, 1985. – 248 с.

Cai Ying-fan, Li Sheng-wei, Liu Yi, Quan Sun, Chen Min, Xie Yong-fang, Jiang Huai-zhong, Wei En-zhao, Yin Neng-wen, Wang Ling, Zhang Rui, Huang Cheng-lin, He Xiao-Hong, Jiang Ming-feng. Molecular phylogeny of Ranunculaceae based on internal transcribed spacer sequences // African Journal of Biotechnology, 2009 – Vol. 8, № 20. – P. 5215–5224.

Peng Y., Chen S. B., Chen S. L., Xiao P. G. Preliminary pharmaphylogenetic 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.

Serkedjjeva J., Velcheva M. In vitro anti-influenza virus activity of the pavin alkaloid (-)-thalimonine isolated from *Thalictrum simplex* L. // Antiviral Chem. Chemother, 2003. – Vol. 14. – P. 75–80.

Tamura M. The Families and Genera of Vascular Plants // Kubitzki K. et al. (eds). Berlin. Springer – Verlag, 1993. – Vol. 2. – P. 563–583.

Tamura M. Angiospermae. Ordnung Ranunculales. Fam. Ranunculaceae. Systematic Part. II // Natürliche Pflanzenfamilien, second Hiepkö P. (ed.). Berlin. Duncker and Humblot, 1995. – 17a, IV. – P. 223–519.

Wang R. F., Yang X. W., Ma C. M., Cai S. Q., Li J.N., Shoyama Y. A bioactive alkaloid from the flowers of *Trollius chinensis* // Heterocycles, 2004. – Vol. 63. – P. 1443–1448.