# ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР БИОРАЗНООБРАЗИЯ НАЗЕМНОЙ БИОТЫ ВОСТОЧНОЙ АЗИИ» ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

# НИКУЛИН АРТУР ЮРЬЕВИЧ

# ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ СВЯЗИ И ФИЛОГЕОГРАФИЯ OROSTACHYS SPINOSA (L.) SWEET (CRASSULACEAE J.ST.-HIL.) ПО ДАННЫМ АНАЛИЗА НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ МЕЖГЕННЫХ СПЕЙСЕРОВ ЯДЕРНОЙ И ХЛОРОПЛАСТНОЙ ДНК

03.02.07 - генетика

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

> Научный руководитель: доктор биологических наук, Гончаров Андрей Анатольевич

Владивосток – 2017

# оглавление

СПИ	СОК СОКРАЩЕНИЙ	4
BBE)	ЦЕНИЕ	5
ГЛА	ВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 1	2
1.1.	Семейство Crassulaceae J.StHil. Краткая характеристика и филогения 1	2
1.2.	Лекарственные свойства растений семейства Crassulaceae 1	4
1.3.	Род Orostachys Fisch1	7
1.4.	Вид Orostachys spinosa (L.) Sweet 1	9
1.5.	Филогеография 2	2
1.6.	ITS регион рДНК в филогенетических исследованиях и моделирование	
втори	ичных структур транскриптов спейсеров ITS1 и ITS2 2	3
1.7.	Хлоропластный геном. Использование межгенных спейсеров хпДНК в	
фило	генетических исследованиях 2	5
1.7.1.	Межгенный спейсер <i>trnH–psbA</i> 2	9
1.7.2.	Межгенный спейсер <i>trnQ-rps16</i> 3	1
1.7.3.	Межгенный спейсер <i>rpl32–trnL</i>	2
1.7.4.	Межгенный спейсер <i>trnD–trnT</i> 3	3
1.7.5.	Межгенный спейсер <i>trnS–trnG</i> 3	3
ГЛА	ВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 3	5
2.1.	Материалы 3	5
2.2.	Выделение ДНК 4	1
2.3.	Амплификация ДНК 4	1
2.4.	Электрофорез амплифицированных участков ДНК в агарозном геле 4	4
2.5.	Секвенирование ДНК 4	4
2.6.	Клонирование ITS региона рДНК 4	5
2.7.	Моделирование вторичных структур транскриптов ITS1 и ITS2 рДНК 4	6
2.8.	Анализ молекулярно-генетических данных 4	7
ГЛА	ВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	0

СПИ	СОК ЛИТЕРАТУРЫ1	02
выв	ОДЫ1	00
ЗАКЈ	ІЮЧЕНИЕ	98
4.3.	Филогеография O. spinosa	94
4.2.	Изменчивость межгенных спейсеров хпДНК	93
4.1.	Изменчивость последовательностей ITS региона рДНК	86
ГЛАІ	ВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ	86
3.4.3.	Анализ внутривидовых филогенетических отношений	84
3.4.2.	Оценка генетического разнообразия популяций O. spinosa	78
3.4.1.	Гаплотипический анализ популяций O. spinosa	75
3.4.	Филогения и филогеография O. spinosa по данным хпДНК	68
(Boris	ssova) Н. Ohba рода <i>Orostachys</i>	63
3.3.	Реконструкция родственных отношений в подсекции Appendiculatae	
Thied	e ined. по данным ITS региона рДНК	58
3.2.	Анализ филогенетической структуры трибы Telephieae ('t Hart) Ohba and	
втори	ичных структур транскриптов ITS1 и ITS2	50
3.1.	Вариабельность последовательностей ITS региона и моделирование	

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

пн – пар нуклеотидов

поз. – нуклеотидная позиция в выравнивании

ПЦР – полимеразная цепная реакция

рДНК – рибосомная ДНК

хпДНК – хлоропластная ДНК

BI – Bayesian Inference – байесовский подход (анализ)

CBC – Compensatory Base Change – компенсаторная замена основания

hCBC – hemi-Compensatory Base Change – полукомпенсаторная замена основания

ITS – Internal Transcribed Spacer – внутренний транскрибируемый спейсер

ML – Maximum Likelihood – метод максимального правдоподобия

MP – Maximum Parsimony – метод максимальной экономии (парсимонии)

PP – Posterior probability – апостериорная вероятность (используется в Байесов-

ском анализе)

#### введение

Актуальность исследования. Семейство Crassulaceae J.St.-Hil. (толстянковые) объединяет около 1400 видов растений, классифицируемых в 33 рода (Eggli, 2005). Это, преимущественно, многолетние травянистые растения суккулентного облика, широко распространенные в теплых и засушливых областях. Наибольшее число видов встречается в Южной Африке, Восточной Азии, Средиземноморье и Америке.

Представители семейства являются популярными декоративными растениями (особенно в странах Восточной Азии), однако основной практический интерес представляют виды, обладающие ценными лекарственными свойствами, например, некоторые виды *Rhodiola* L., *Kalanchoe* Adans., *Orostachys* Fisch. и других родов (Бялт, 1999а). Экстракты из многих видов толстянковых широко применяются в народной медицине стран юго-восточной Азии с давних пор (Mayuzumi, Ohba 2004). Медицинское значение они приобрели благодаря наличию биологически-активных веществ, содержащихся в их надземных сочных частях, в частности, большому количеству органических кислот (яблочной, галловой, янтарной, щавелевой), алкалоидов, флавоноидов, кумаринов, антиоксидантов, витаминов и микроэлементов (Zhang et al., 2010). Одним из видов Crassulaceae, используемых в традиционной восточной медицине благодаря своим адаптогенным свойствам, является *Orostachys spinosa* (L.) Sweet (горноколосник колючий, заячья капуста).

Род Orostachys включает 10–15 видов (Eggli et al., 1995; Mayzumi, Ohba, 2004; Eggli, 2005) и характеризуется сложной таксономической структурой, остающейся предметом дискуссий, т.к. морфологические признаки, используемые для разграничения внутриродовых таксонов, высоко полиморфны. Филогенетические отношения между O. spinosa и близкими ему видами до сих пор остаются слабо изученными, хотя представляют большой теоретический и практический интерес. Отличительной особенностью этого вида является нехарактерный для большинства толстянковых протяженный ареал произрастания, охватывающий большую часть северной Азии от побережья Тихого океана до Урала. Исследование полиморфизма нуклеотидных последовательностей *O. spinosa* поможет пролить свет на его положение в трибе Telephieae, в роде, а также на филогеографию этого широко распространенного вида и генетическую структуру его популяций.

Для изучения генетической изменчивости и популяционной структуры, уточнения родственных отношений на различных таксономических уровнях широко используются молекулярно-генетические методы. Межгенные спейсеры хлоропластной (хпДНК) и ядерной ДНК (яДНК) являются удобными маркерами для филогенетических исследований. Прежде всего, это обусловлено тем, что некодирующие межгенные спейсеры ядерного и хлоропластного геномов обладают высокой скоростью накопления мутаций, так как зачастую не несут большой функциональной нагрузки (Gielly, Taberlet, 1994). Кроме того, хпДНК большинства покрытосемянных растений наследуется по материнской линии (Birky, 1995), представлена большим числом копий, не участвует в рекомбинационном процессе, характеризуется селективно нейтральной или почти нейтральной природой мутаций. В свою очередь, рДНК наследуется двуродительски, а наиболее популярный в филогенетике ядерный регион – внутренний транскрибируемый спейсер (ITS), представлен в геноме множеством копий (у растений тандемные повторы генов рДНК насчитывают 100-200 повторяющихся единиц), легко амплифицируется и секвенируется (Матвеева и др., 2011).

Безусловно, у всех маркеров есть свои ограничения, связанные, в основном, с гипервариабельностью последовательностей на высоких таксономических уровнях или, наоборот, с мономорфностью на низких, а также с высоким уровнем гомоплазии. Поэтому хлоропластные межгенные спейсеры обычно используются для исследований на уровне популяций и вида, а ITS является достаточно информативным на более высоких уровнях (род, подсемейство). Отбор подходящих молекулярных маркеров для изучения генетической структуры, филогеографии и филогении требует проведения предварительного скрининга и тщательного анализа последовательностей.

Степень разработанности. Родственные отношения между представителями рода Orostachys ранее практически не изучались. Попытка реконструировать филогенетические связи в роде с помощью сравнения набора морфологических признаков была предпринята лишь В.В. Бялтом (Бялт, 1999а). Другие исследования проводились молекулярно-генетическими методами и включали представителей Orostachys и некоторых других родов/клад трибы Telephieae ('t Hart) Ohba and Thiede ined., но были представлены очень ограниченным числом видов (Mayuzumi, Ohba, 2004; Гончарова, 2006а; Гончарова и др., 2008). Относительно недавно были получены новые генетические данные для типовой подсекции Orostachys (Kozyrenko et al., 2013), но без привлечения других представителей трибы. Исследования же генетической структуры популяций O. spinosa и филогенетических отношений между видами подсекции Appendiculatae (Borissova) H. Ohba ранее не проводились.

**Цель и задачи исследования.** Целью настоящей работы является выявление филогенетических связей, изучение генетического разнообразия и популяционной структуры *O. spinosa* на основании сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей ITS региона рДНК и межгенных спейсеров хпДНК.

Для достижения этой цели решались следующие задачи:

1. Получить нуклеотидные последовательности ITS региона рДНК для *O. spinosa* и близких ему видов подсекции *Appendiculatae* (*O. chanetii* (H. Léveillé) A. Berger, *O. japonica* (Maxim.) A. Berger, *O. thyrsiflora* Fisch.), произвести моделирование вторичных структур транскриптов ITS1 и ITS2.

2. Уточнить родственные связи *O. spinosa* в трибе Telephieae по данным ITS региона рДНК и провести анализ молекулярной датировки, для определения времени диверсификации основных линий трибы.

3. Осуществить поиск информативных на популяционном уровне маркеров хпДНК, секвенировать их нуклеотидные последовательности и дать оценку генетического разнообразия и популяционной структуры *O. spinosa*.

4. Провести анализ генеалогических связей между гаплотипами и реконструировать возможные пути расширения ареала *O. spinosa*.

Научная новизна. Результаты, полученные в данном исследовании, являются новыми и приоритетными. В ходе работы получены 84 нуклеотидные последовательности ITS региона рДНК (ITS1-5.8S-ITS2) представителей 6 видов трибы Telephieae и 621 последовательность некодирующих регионов хпДНК – межгенных спейсеров trnH-psbA, trnQ-rps16, rpl32-trnL 25 популяций O. spinosa. Все нуклеотидные последовательности депонированы в базу данных GenBank EMBL/NCBI. Выполнено моделирование вторичных структур транскриптов спейсерных участков ITS1 и ITS2 рДНК с использованием универсальной номенклатуры основных структурных элементов. На основе анализа ITS региона рДНК установлены с высокой достоверностью филогенетические связи между основными эволюционными линиями трибы Telephieae и определен их возраст методом молекулярной датировки. Впервые показано, что монотипный род Meterostachys Nakai является членом клады подсекции Appendiculatae, а не ее сестринской группой, как считалось paнee. Показано, что образец M. sikokiana (Makino) Nakai был близок к O. thyrsiflora. Впервые обнаружен внутригеномный полиморфизм в ITS1 у вида О. јаропіса.

На основе анализа вариабельности нуклеотидных последовательностей межгенных спейсеров хпДНК *trnH–psbA*, *trnQ–rps16*, *rpl32–trnL* впервые получены знания о генетическом разнообразии, популяционной структуре и филогеографии *O. spinosa*. Установлен предполагаемый центр происхождения вида. Предложена гипотеза расширения ареала *O. spinosa* в восточном и западном направлениях и определены основные пути распространения вида.

**Теоретическая и практическая значимость.** Полученные данные уточняют имеющиеся представления о филогенетических отношениях в семействе Crassulaceae, в целом, и в трибе Telephieae подсемейства Sempervivoideae A. Berger, в частности, а так же обогащают новыми знаниями о генетическом разнообразии, популяционной структуре и филогеографии *O. spinosa* – одного из самых широко распространенных видов семейства. Результаты работы могут быть использованы при чтении курсов лекций для студентов, специализирующихся на кафедрах ботаники, генетики и биотехнологии.

Практическая значимость состоит в том, что эти данные могут быть полезны для мониторинга состояния природных популяций с целью сохранения биоразнообразия, для проведения фармакологических исследований вида и для развития биотехнологических разработок на основе растительного сырья.

Методология и методы диссертационного исследования. В данной диссертационной работе используются стандартные методики проведения молекулярно-генетических исследований. Для подтверждения результатов секвенирования использовали молекулярное клонирование. Привелчен биоинформатический подход: моделирование спиралей вторичных структур транскриптов спейсеров ITS1 и ITS2 с помощью веб-сервера Mfold и построение обобщенных струкур для растений рода Orostachys подсекции Appendiculatae. Филогенетические деревья построены с использованием метода максимального правдоподобия (ML), максимальной экономии (MP) и Баесовского подхода (BI) в программах PAUP\* 4.0b10 (Swofford, 2002) MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck, Ronquist, 2001). Устойчивость топологии реконструированных деревьев оценена методом бутстрепа (для ML и MP; Felsenstein, 1985) и определения апостериорных вероятностей (для BI). Молекулярная датировка (определение времени дивергенции) происхождения основных линий Telephieae проведена в рамках байесовского подхода с пакетом программ BEAST 1.8.1 (Drummond et al., 2012) на основании средних скоростей нуклеотидных замен в ITS регионе рДНК (Zhang et al., 2014). Расчет параметров генетического разнообразия осуществляли в программе Arlequin v. 3.11 (Excofflier et al., 2005).

#### Положения, выносимые на защиту:

1. ITS регион рДНК является информативным маркером для реконструкции родственных отношений в роде *Orostachys* и между видами в трибе Telephieae, а межгенные спейсеры *trnH–psbA*, *trnQ–rps16*, *rpl32–trnL* хпДНК – для изучения генетического разнообразия, популяционной структуры и филогеографии *O. spinosa*.

2. Модели вторичных структур транскриптов спейсеров ITS1 и ITS2 рДНК, построенные для растений рода *Orostachys* подсекции *Appendiculatae*, яв-

ляются эффективным инструментом для выравнивания дивергентных нуклеотидных последовательностей и имеют типичное строение ITS региона растений.

3. Происхождение *O. spinosa* датируется примерно 6 млн. л. н. Распространение вида из центра происхождения (в горах Алтая) могло происходить в трех направлениях: на запад до предгорий Южного Урала и двумя линиями на восток – в район озера Байкал и северо-восточную Азию (Якутия, Магадан). Последняя линия дала начало Восточной группе, предки которой дивергировали около 3,5 млн. л. н., и распространялись в южном направлении (Китай, Приморский край).

4. Специфическое островное распределение местообитаний *O. spinosa* (на скалах, сухих склонах, в расщелинах) привело к изоляции отдельных популяций и постепенному дрейфу генов с накоплением нуклеотидных отличий.

Степень достоверности результатов. Достоверность результатов подтверждается современными молекулярно-генетическими и статистическими методами исследования, которые соответствуют поставленным в работе целям и задачам. Для анализа были использованы выборки достаточного объема – до 10–12 образцов из популяции (конкретного места выборки). Научные результаты подкреплены убедительными фактическими данными, наглядно представленными в приведенных таблицах и рисунках.

Апробация работы и публикации. Результаты работы были представлены на российских и международных конференциях: Х региональной конференции студентов, аспирантов вузов и научных организаций Дальнего Востока России «Актуальные проблемы экологии, морской биологии и биотехнологии» (Владивосток, 2011); II (Х) Международной ботанической конференции молодых ученых в Санкт-Петербурге (Санкт-Петербург, 2012); на ХІ Региональной конференции студентов, аспирантов вузов и научных организаций Дальнего Востока России «Актуальные проблемы экологии, морской биологии и биотехнологии» (Владивосток, 2012); на международном симпозиуме «The East Asian Flora and its role in the formation of the world's vegetation» (Vladivostok, 2012); на I межрегиональной молодежной школе-конференции «Актуальные проблемы биологических наук» (Владивосток, 2013); на конференции «Modern achievements in population, evolutionary and ecological genetics» (MAPEEG; Vladivostok, 2013); на IV международной конференции «Molecular Phylogenetics» (MolPhy; Mockba, 2014); международной конференции «Coxpanenue разнообразия растительного мира в ботанических садах: традиции, современность, перспективы» (Новосибирск, 2016).

**Публикации.** Материалы диссертации изложены в 10 публикациях, из них 2 статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 120 страницах, иллюстрирована 18 рисунками и содержит 13 таблиц. Список литературы содержит 182 источника, из них 144 на иностранном языке.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю Андрею Анатольевичу Гончарову за внимательное и конструктивное руководство. Автор благодарит коллег за помощь в сборе материала для настоящей работы: Ш.Р. Абдуллина, В.А. Бакалина, В.В. Богатова, А.А. Гончарова, Р.В. Дудкина, А.С. Дубровину, К.В. Киселева, Ю.В. Овчинникова, Д.А. Сидорова, В.П. Шохрина, В.В. Шохрину, В.В. Якубова, М. Dobos. Отдельно автор благодарен К.В. Киселеву и А.П. Тюнину за помощь в проведении экспериментов по молекулярному клонированию. Данная работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ (№ 15-29-0250515; 16-34-00176) и ДВО РАН (15-II-6-034).

#### ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

#### 1.1. Семейство Crassulaceae J.St.-Hil. Краткая характеристика и филогения

Семейство Crassulaceae – толстянковые (от лат. «crassus» – толстый) содержит около 1400 видов, классифицируемых в 33 рода (Eggli, 2005), распространенных очень широко, но главным образом в теплых и засушливых областях. Наиболее богата представителями семейства Африка, Восточная Азия, Сев. Америка, однако, они совершенно отсутствуют в Австралии и Полинезии. Представители семейства широко известны как лекарственные, декоративные садовые и комнатные растения.

В большинстве своем толстянковые это многолетние травянистые растения, реже полукустарнички, кустарнички, кустарники или древовидные формы, приспособленные к теплым засушливым условиям – суккуленты. В связи с этим, характерной чертой данного семейства являются мясистые, сочные (за счет особого водоносного слоя) листья и/или стебли, а также произрастание на более или менее сухих открытых местах, очень часто среди камней и в трещинах скал, иногда на лугах и в тенистых ущельях (Удалова, 1994).

Морфологически толстянковые достаточно разнообразны. Стебли многочисленные и ветвящиеся, прямостоячие, либо полегающие и ползучие; листорасположение очередное или супротивное; листья обычно зеленого, реже желтоватого или голубоватого от воскового налета цвета, цельные, сидячие, часто опушенные (Боголюбов, 2001). Для представителей семейства также характерно образование розеток, чашевидной, цилиндрической или луковицеобразной формы. Благодаря этому растения защищены от интенсивного освещения и испарения (Боголюбов, 2001). Некоторым видам, например *Crassula ovata* (Mill.) Druce и *O. japonica*, характерно появление пигментации на листьях, обусловленной присутствием антоцианов, из-за чего листья или их части приобретают красноватый оттенок (Чуб, 2008).

Современные таксономические исследования в семействе все чаще проводятся с использованием молекулярно-генетических методов. Этому способствует огромное фенотипическое разнообразие представителей толстянковых и большое число видов. Усугубляется ситуация гомоплазией некоторых морфологических признаков в семействе. Например, листорасположение, различие в количестве и строении репродуктивных частей цветка часто встречаются независимо у разных групп ('t Hart, 1995; van Ham, 't Hart, 1998; Mort et al., 2001; Гончарова и др., 2008). Поэтому иногда лишь молекулярные данные способны дать необходимую информацию о родственных отношениях в столь полиморфных группах.

Молекулярные маркеры ядерного и хлоропластного геномов широко используются для уточнения систематики, популяционной и видовой идентификации, филогении. Ранние филогенетические исследования семейства Crassulaceae, основанные на сравнении рестрикционных паттернов хпДНК, нуклеотидных последовательностей гена *matK* и межгенного спейсера *trnL-trnF* хпДНК, а так же ITS региона ядерной рДНК, выявили семь основных клад на филогенетическом дереве: Crassula, Kalanchoe, Telephium, Sempervivum, Aeonium, Leucosedum и Acre ('t Hart, 1995; van Ham, 't Hart, 1998; Mort et al., 2001; Mayuzumi, Ohba 2004; Гончарова и др., 2008; Гончарова, Гончаров, 2009). Только клада Crassula cooтветствовала подсемейству Crassuloideae в системе Бергера (Berger, 1930), тогда как освыделенные подсемейства (Kalanchoideae, Cotyledonoideae, тальные ИМ Echiverioideae, Sempervivoideae и Sedoideae) оказались полифилетичными (сборными), а их члены вошли в состав нескольких клад.

Результаты молекулярно-филогенетических исследований были учтены Дж. Тидом и У. Эггли (Thiede, Eggli, 2007) при разработке классификации толстянковых для «The families and Genera of the Vascular Plants». Они выделили три подсемейства в составе Crassulaceae, дав наименования ранее установленных групп: Crassuloideae Burnett, Kalanchoideae Berger и Sempervivoideae. Наиболее богатое родами и видами подсемейство Sempervivoideae (28 родов; 945 видов) было разделено на 5 триб: Telephieae, Umbiliceae Meisn., Semperviveae Dumort., Aeonieae Thiede ined. Sedeae Fr. Четыре И трибы соответствовали монофилетичным группам/кладам толстянковых и лишь Sedeae слагалась 2 кладами: Leucosedum и Acre (Thiede, Eggli, 2007).

По данным секвенирования ITS региона рДНК и межгенных спейсеров хпДНК была получена весьма неожиданная с точки зрения морфологии картина взаимоотношений в трибах Telephieae и Umbiliceae – это наличие высокоустойчивых полиродовых клад *Hylotelephium* + *Orostachys* и *Rhodiola* + *Pseudosedum* (Boiss.) Berger и полифилия секций и подсекций *Hylotelephium* Ohba и *Rhodiola* внутри этих клад (Mayuzumi, Ohba, 2004; Гончарова и др., 2006; Zhang et al., 2014)).

В виду противоречивых результатов ранних исследований филогенетических отношений в пределах трибы Telephieae, основанных на небольшой выборке, статус большинства родов и практически всех надвидовых таксонов остается предметом дискуссии.

Большинство толстянковых флоры России относятся к родам *Hylotelephium* и Orostachys трибы Telephieae и родам Rhodiola, Phedimus Raf. и Aizopsis Grulich трибы Umbiliceae. Поэтому, в данной работе одной из задач является построение устойчивой филогении трибы Telephieae и уточнение родственных связей между основными «проблемными» группами в ней: подсекциями рода Orostachys, родовыми парами Meterostachys–Orostachys подсекции Appendiculatae и Hylotelephium–Orostachys подсекции Orostachys.

#### 1.2. Лекарственные свойства растений семейства Crassulaceae

В последнее время российскими и зарубежными учеными активно ведется поиск источников природных адаптогенов растительного происхождения, средств, способствующих адаптации организма человека к неблагоприятным факторам окружающей среды (Студенцов, 2013). Чаще всего это вторичные метаболиты, обладающие ценными фармакологическими свойствами. Получение клеточных культур лекарственных растений, экспрессирующих искомые вещества, является перспективным направлением в биотехнологии. В связи с этим актуальными являются всесторонние исследования лекарственных растений-продуцентов биологически активных веществ, в том числе их генетическая характеристика. Лекарственные свойства растений семейства толстянковые известны с давних пор (Бялт, 1999а; Гончарова, 2006б). Присутствию большого количества органических кислот (яблочной, галловой, янтарной, щавелевой), алкалоидов, флавоноидов, кумаринов, антиоксидантов, витаминов и микроэлементов (Zhang et al., 2010) отчасти способствует феномен САМ-метаболизма (Crassulacean acid metabolism), впервые обнаруженный у представителей толстянковых и заключающийся в разделении во времени процессов образования органических кислот и их декарбоксилирования (Grams, Thiel, 2002).

Особой известностью в семействе пользуются родиола розовая, хорошо изученный адаптоген (*Rhodiola rosea* L.; золотой корень; Саратиков, 1974), различные виды каланхоэ, называемого также комнатным женьшенем за свои лечебные качества (Блинова, 1990), а также некоторые виды родов *Sempervivum* L. – молодило и *Sedum* L. – очиток, обладающие широким спектром биологических эффектов (Одинец, Антонян, 2011). Целебными свойствами также обладают и представители рода *Orostachys* – *O. spinosa* и *O. japonica* (горноколосник японский), которые уже несколько веков применяются в традиционных медицинских системах стран Азии, в народной медицине Тибета, Монголии, Китая (Fu, Ohba, 2001). Например, свежее растение прикладывают к геморроидальным шишкам, мозолям, порезам, ссадинам; соком листьев горноколосника колючего смазывают ожоги, укусы пчел; настой травы применяют внутрь от эпилепсии, сердечной недостаточности как средство, стимулирующее центральную нервную систему; используют как кровоостанавливающее, бактерицидное, противовоспалительное средство (Частухина, 1995).

Во многих исследованиях отмечены благотворные эффекты введения в организм экстрактов *O. spinosa* и *O. japonica*. Так, метанольный экстракт из горноколосника японского способствует ингибированию патологического остеокластогенеза в культурах макрофагов костного мозга мыши (Youn et al., 2008). Также он характеризуется относительно высоким содержанием ценного флавоноида эпикатехина (Kim et al., 2016). Другими исследователями было показано ингибирующее действие фенольных (флавоноидных) компонентов экстракта на образование проканцерогенных N-нитрозодиметиламинов (Choi et al., 2006). Присутствие в экстракте галловой кислоты, обладающей антиоксидантными свойствами, способствовало значительному повышению активности алкогольдегидрогеназы и альдегиддегидрогеназы печени (Hur, Park, 2006). Корейскими исследователями позднее были изучены молекулярные механизмы действия этил-ацетатной фракции из *O. japonica* (таких действующих веществ как галловая кислота, флавоноиды кемпферол и кверцетин) на противораковую активность в клетках гепатомы человека HepG2 (Lee et al., 2015). Было показано, что эти соединения участвуют в запуске процесса апоптоза, изменяя активность некоторых белков (p-JNK, p-ERK1/2 и др.) митохондриального сигнального пути запуска клеточной гибели (Lee et al., 2015). Установлено ингибирующее действие экстракта полисахаридов горноколосника на пролиферацию и рост раковых клеток прямой кишки человека в культуре HT-29 и запуск процессов апоптоза пораженных клеток (Ryu et al., 2010).

Цикл экспериментов подтвердил перспективность исследования *O. spinosa* с целью введения в медицинскую практику. Экстракт из него проявил стимулирующее, повышающее работоспособность, антигипоксическое и адаптогенное действие (Левента и др., 2012). При введении деалкоголизированного экстракта горноколосника колючего в дозе 0,5 мл/кг *per os* лабораторным животным отмечалась выраженная нейротропная активность, которая сочеталась с заметным стресс-протективным действием. Авторы отмечают, что такой эффект, возможно, связан с активацией стресс-лимитирующих систем организма (Odinets et al., 2013). Для пептических гидролизатов, полученных из измельченного сырья *O. spinosa*, обнаружили сильный радиозащитный эффект (Огрызов и др., 1974).

Лекарственные растения часто вовлечены в интенсивную, нерациональную, практически неконтролируемую деятельность по заготовке сырья. Для выявления особо пострадавших от человеческой деятельности популяций, разработки эффективных мер охраны лекарственных растений *ex situ* необходимы знания о внутривидовой генетической изменчивости растений, которая определяет адаптивный потенциал вида в условиях трансформации окружающей среды и является существенным компонентом стабильности всей экосистемы. Данные о распростране-

нии видов и их генетических характеристиках также важны при исследовании эффективности использования в лечебных целях того или иного вида *Orostachys*, а также для развития биотехнологических разработок на основе растительного сырья. Поэтому, одной из задач нашей работы было получить информацию о генетической изменчивости такого вида как *O. spinosa*.

#### **1.3.** Род Orostachys Fisch.

Научное название рода *Orostachys* образовано из двух греческих слов, «огоs» (горный) и «stachys» (колос). Основанием для такого наименования стали специфическое местообитание (как правило, открытые каменистые склоны, трещины скал) и колосовидная форма соцветий (Гончарова, 2006б). Народам Азии с давних пор были известны горноколосники, употребляющиеся в пищу, применяющиеся в тибетской и монгольской медицине, а также в японской и китайской садовой культуре (Бялт, 1999а). Научное же изучение преставителей рода *Orostachys* началось с работы Карла Линнея «Species Plantarum» (Linneus, 1753), где автором описан наиболее распространенный представитель – *O. spinosa*, отнесенный, однако, к роду *Cotyledon* Tourn. ex L. и названный *Cotyledon spinosa* L.

Род *Orostachys* был впервые представлен Ф. Фишером в труде «Catalogus Horti Gorenkensis» 1808 года (Fischer, 1808). Однако, отсутствие диагноза рода в данной в работе не позволило считать название Фишера валидным. В результате этого, вплоть до конца XX века возникла путаница в определении автора рода, им ошибочно считался либо О.П. Декандоль, либо А. Бергер (Byalt, Sokolova, 1999). Приоритет авторства Фишера был восстановлен С.К. Черепановым (1973), а затем В.В. Бялтом и И.В. Соколовой (Byalt, Sokolova, 1999). Фишер подробно описал род, включив в него 4 вида, в том числе ошибочно *Rosularia serrata* (L.) Berger, и сделал вывод о близости родов *Orostachys* и *Sedum* (в частности с *S. telephium* L.) на основании строения цветка (Fischer, 1808).

Весомый вклад в таксономию подсемейства Sedoideae был внесен Т. Накай (Nakai, 1938). Он предложил выделить *Orostachys* и *Rhodiola* в ранги родов. Также

к его заслугам можно отнести отделение родов *Chamaerhodiola* Nakai и *Meterostachys* из состава рода *Sedum*.

В.В. Бялт в своих работах (1999а, 1999б), касающихся морфологических особенностей представителей рода *Orostachys* и их географии, установил, что род включает в себя 22 вида, 1 подвид и 5 разновидностей в двух подродах – *Orostachys* и *Schoenlandia* H. Ohba, трех секциях и двух рядах. Однако, некоторые специалисты (Гончарова и др., 2006) считают, что В.В. Бялт следовал слишком узкой концепции вида, отмечая, что другие авторы признают лишь 10–15 видов (Eggli et al., 1995; Mayzumi, Ohba, 2004).

Род Orostachys считается одним из самых обособленых с морфологической точки зрения в подсемействе Sedoideae (Ohba, 1978; Бялт, 1999б). Основной особенностью рода является полурозеточная жизненная форма с терминальными колосовидными (початковидными) соцветиями. Ареал распространения горноколосников включает Среднюю Азию, Монголию, Китай, Японию, Европу. В России они распространены в Сибири, на Алтае, Урале, Дальнем Востоке (Рис. 1).



Рисунок 1 – Ареал представителей рода Orostachys (по: Гончарова, 2006а).

В роде выделяют две секции – *Orostachys* и *Schoenlandia* H. Ohba (Ohba, 1978; Eggli, 2005). Виды типовой секции классифицируются в подсекции

*Orostachys* и *Appendiculatae*, представители которых различаются формой листа (плоские или вальковатые) и наличием или отсутствием на них придатков (шипов, хрящеватых выростов и др.). Последняя секция принимается некоторыми авторами как подрод (Бялт, 1999а) или самостоятельный род *Kungia* K.T. Fu (Fu, Ohba, 2001) и не представлена на российском Дальнем Востоке.

Поскольку объем секции Orostachys остается предметом дискуссии (Ohba, 2005; Бялт 1999а; Гончарова, 2006а), в анализах нами используются и признаются следующие таксоны из типовой подсекции – O. boehmeri (Makino) H. Hara, O. malacophylla (Pall.) Fisch., O. maximowiczii Byalt, O. paradoxa (A.P. Khokhr. & Vorosch.) Czerep. и из подсекции Appendiculatae – O. chanetii, O. japonica, O. spinosa, O. thyrsiflora.

#### 1.4. Вид Orostachys spinosa (L.) Sweet

Горноколосник колючий является наиболее широко распространенным и часто встречаемым представителем рода *Orostachys*. Ареал этого вида располагается на территории пяти государств (Россия, Казахстан, Монголия, Китай, Сев. Корея) и простирается от Уральских гор до побережья Тихого океана и от северных районов Китая до Колымы (Рис. 2). Столь обширное распространение не характерно для представителей рода и даже семейства вследствие отсутствия специальных приспособлений для активного расселения. Исключение, помимо *O. spinosa*, составляют только несколько видов толстянковых: *Rhodiola rosea*, *Hylotelephium triphyllum* (Haw.) Holub, *Aizopsis aizoon* (L.) Grulich. На данный момент доподлинно неизвестны направления распространения этих видов из предкового ареала, а также время, в течение которого оно осуществлялось. С.Б. Гончаровой (2006а) высказывалось предположение, что представители *Orostachys* могли продвигаться из Средиземноморья вдоль «центрально-азиатского высокогорного коридора» в направлении на северо-восток.



Рисунок 2 – Карта, изображающая ареал *O. spinosa* (на основании данных Бялт, 1999а) и два варианта его произрастания в природе: а – дерновинки из особей (фото А.А. Гончарова); б – отдельно растущие особи (фото А.Ю. Никулина).

Для более детальной характеристики изучаемого вида далее приводится его морфологическое описание из книги «Флора Сибири» (Пешкова и др., 1994): «Прикорневые розетки листьев шаровидные, темно-зеленые, плотные, 2–7 см в диаметре. Листья продолговатые или обратнояйцевидные, обычно выпукловогнутые, по краю с белой, хрящеватой каймой, на верхушке с относительно широким хрящеватым придатком, суженным в колючку 2–4 мм длиной. Стебли 10-30 см высотой, с многочисленными узколанцетные или узкопродолговатые, на верхушке с шипиком, равные цветкам или длиннее их. Цветки сидячие или на очень коротких ножках. Лепестки зеленовато-желтые или желтоватые, яйцевидно-ланцетные, острые. Пыльники обычно желтые, иногда темноокрашенные».

Горноколосник колючий обычно обитает в сухих каменисто-щебнистых степях, по южным каменистым склонам, на скалах и россыпях. Это светолюбивое растение часто можно встретить и в редколесьях, где обеспечен доступ к солнечному свету и отсутствует конкуренция за него (Бялт и др., 2004). В культуре *O. spinosa* содержат на горках и подпорных стенках, лучше на плодородных почвах,

основательно разрыхленных крупным песком или мелким щебнем (Каюкова, 2009).

Жизненную форму *O. spinosa* характеризуют как травянистый поликарпик с дицилическими монокарпическими побегами суккулентного типа (Серебряков, 1964). Данная жизненная форма обусловлена сложным онтогенезом со сменой поколений, когда развитие осуществляется в серии особей нескольких, образующихся вегетативно, поколений (клонов). Дочерние розетки растут неподалеку от взрослых особей, так что можно проследить все стадии жизненного цикла горноколосника (Рис. 3).



Рисунок 3 – Схема онтогенеза *O. spinosa* (по: Каюкова, 2009). Обозначения: g – проросток; j – ювенильный; im – имматурный; v – виргинильный; v1 – клон, особь вегетативного происхождения; gen – генеративный.

Т.А. Безделевой (1995) отмечалось, что *О. spinosa* может вести себя либо как монокарпик, либо как поликарпик, причем эти формы достаточно четко приурочены к различным частям ареала. Например, на территории Приморского края это многолетник-монокарпик, у которого в течение нескольких лет наблюдается моноподиальный рост вегетативных розеточных побегов, а только затем формируется удлиненный генеративный побег (Рис. 2б) после этого растение отмирает, а в условиях Горного Алтая, Магадана, Якутии – это, как правило, многолетние поликарпические растения, с многочисленными вегетативными розетками, образующие плотные дерновинки (Рис. 2а). Такие отличия являются, вероятно, проявлениями экологической изменчивости – появление различий между группами особей одного вида, связанных с определенным типом местообитаний (например, возвышенности и низменности, заболоченные и сухие участки и т. д.). Возниконовение экотипов, экологически близких популяций вида может быть результатом как модификационных изменений, так и отбора генотипов, лучше приспособленных к местным условиям, в данном случае, вероятно, к суровому климату (Москалюк, 2006). Исходя из вышесказанного, особый интерес представляет изучение этих двух форм с помощью молекулярно-генетических методов – поиск молекулярных признаков, позволяющих реконструировать пути расселения этого вида и предположительное место возникновения данной особенности биологии. Во многих исследованиях отмечалась пригодность молекулярных маркеров для оценки степени дивергенции и разграничения экотипов (Aukerman et al., 1997; Bernatchez et al., 1999; Rice, Knapp, 2000; Hufford, Mazer, 2003; Bolaric et al., 2005). Хромосомное число у *О. spinosa* по разным данным составляет: 2n=12, 18-21, 24 (Uhl, Moran, 1972; Beceлухина, 1976; Пробатова, Соколовская, 1989; Бялт, 2001).

#### 1.5. Филогеография

Термин «филогеография» был впервые предложен Джоном Чарльзом Ависом с соавт. в 1987 году для наблюдаемого распределения генных филогений по ареалу вида (Avise et al., 1987). С тех пор филогеография стала самостоятельным направлением исследований, изучающим закономерности пространственного распределения аллелей, филогенетические взаимоотношения которых известны или могут быть установлены (Булатова, 2002). При этом различные соответствия между генетическими и географическими дистанциями называют филогеографическими паттернами. Уже пару десятков лет поиск и анализ этих паттернов для различных объектов набирает все большую популярность в мировой науке вслед за успехами молекулярно-генетических методов анализа информации, заложенной в митохондриальной и хпДНК. Почему же именно эти геномы пригодны для проведения такого рода исследований? Это объясняется своеобразием их архитектуры и эволюции. Гаплоидность, отсутствие рекомбинации, наследование по материнской линии у большинстав видов покрытосемянных растений и, в основном, нейтральная природа мутаций – важные преимущества перед ядерным геномом (за исключением половых хромосом; Абрамсон, 2007).

Отмечено, что молекулярные маркеры, в отличие от других методов, способны предоставить для филогеографии более полную и детализированную картину взаимоотношений между популяциями одного вида в различных частях его ареала (Avise, 2000; Абрамсон, 2007). Эти данные могут служить основой для реконструкции филогении исследуемой группы; для построения заключений относительно таксономической структуры (таксономия, систематика); для определения времени дивергенции основных линий; для реконструкции вероятных палеоклиматических событий и палеоландшафтов (Абрамсон, 2007).

Используя филогеографический подход могут быть установлены, например, происходившие в прошлом демографические события: фрагментация ареала, его быстрое расширение, прохождение популяций через «бутылочное горлышко», «эффект основателя» и др. (Nei et al., 1975). Изучение этих событий позволяет ответить на многие вопросы, касающиеся исторического развития вида. Одним из таких вопросов является влияние плейстоценового оледенения на судьбу вида и поиск рефугиумов, представляющих собой участки земной поверхности или Мирового океана, где вид или группа видов пережили неблагоприятный период, тогда как на остальных местах эти формы жизни исчезали (Быков, 1983). Другими вопросами, ответы на которые можно получить при помощи филогеографии, являются разграничение близкородственных видов-двойников или криптических видов и наличие или отсутствие гибридизации (Avise, 2000).

# 1.6. ITS регион рДНК в филогенетических исследованиях и моделирование вторичных структур транскриптов спейсеров ITS1 и ITS2

Внутренний транскрибируемый спейсер (ITS) – это участок рибосомного оперона ядерной ДНК, включающий внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1 и ITS2 (некодирующие нуклеотидные последовательности), разделяющие гены 18S, 5.8S и 28S в тандемных повторах. ITS регион транскрибируется в составе предшественника рибосомной РНК, а потом удаляется в результате сплайсинга (Venema, Tollervey, 1999).

В отличие от рибосомных генов, спейсеры ITS1 и ITS2 находятся под меньшим давлением отбора, а мутации, накапливающиеся в них, способны обеспечить устойчивый филогенетический сигнал. Именно поэтому данный маркер обрел и продолжает набирать популярность в молекулярной генетике. В настоящее время в GenBank депонировано более 200 000 последовательностей ITS региона и их число с каждым годом только продолжает увеличиваться.

Полные или частичные последовательности этого участка рДНК широко используются для филогенетических реконструкций в группах растений на видовом и родовом уровнях (Baldwin et al., 1995; Álvarez, Wendel, 2003; Feliner, Rossello, 2007). Ранее сообщалось об успешном применении этого маркера в реконструкции филогении родов семейства Crassulaceae: *Aeonium* Webb & Berthel., *Dudleya* Britton & Rose, *Cotyledon, Aichryson* Webb & Berthel., *Kalanchoe, Echeveria* DC., *Sedum* (Jorgensen, Frydenberg, 1999; Gehrig et al., 2001; Jorgensen, Olesen 2001; Mort et al., 2002, 2005; Fairfield et al., 2004; Carrillo-Reyes et al., 2009; Yost et al., 2013), в том числе в пределах линии *Hylotelephium* (Mayuzumi, Ohba, 2004; Гончарова и др., 2006, 2008; Гончарова, Гончаров, 2009; Kozyrenko et al., 2013).

Предполагается, что пространственная структура обоих спейсеров важна для правильной наводки эндонуклеолитических ферментов к участкам вырезания (Mai, Coleman, 1997). Этому способствуют консервативные мотивы, присутствующие в последовательностях. Участок ITS2 обычно характеризуется более высоким уровнем консервативности, поэтому именно он используется при проведении анализов на более высоких (выше рода) таксономических уровнях (Joseph, 1999; Coleman, 2003).

В данном исследовании мы используем метод построения потенциальных вторичных структур транскриптов спейсеров ITS1 и ITS2, применяемый в филогенетике, где структурная информация рассматривается как дополнительный источник «морфологических» (структурных) признаков, которые невозможно обнаружить в первичной последовательности (Grajales et al., 2007). Анализ этих данных наряду с информацией от нуклеотидных последовательностей позволяет построить наиболее разрешенную и достоверную филогению группы. Например,

замечено, что моделирование вторичных структур транскриптов участков ITS1 и ITS2 способствует созданию более качественного выравнивания дивергентных последовательностей (Grajales et al., 2007; Keller et al., 2010; Heeg, Wolf, 2015).

Решение этой задачи возможно благодаря разработке и совершенствованию компьютерного программного обеспечения для создания и визуализации потенциальных вторичных структур. Кроме того, на данный момент существует и постоянно пополняется база данных вторичных структур ITS2 для различных организмов (Selig et al., 2008; Merget et al., 2012), созданная на базе отдела биоинформатики университета Вюрцбурга, Германия. На момент написания диссертации в эту базу внесены данные 25 образцов семейства толстянковых (23 представителя рода *Rhodiola* и 2 – *Pseudosedum*). Данные из базы, а именно вторичные структуры транскриптов, использовались в данной работе в качестве референсных.

# 1.7. Хлоропластный геном. Использование межгенных спейсеров хпДНК в филогенетических исследованиях

Хлоропласты являются органеллами клеток растений, осуществляющими процесс фотосинтеза – преобразование энергии квантов света в энергию макроэргических связей АТФ. Как и митохондрии, хлоропласты обладают собственным геномом, представленным множественными копиями кольцевой ДНК. Впервые полное секвенирование хлоропластного было генома осуществлено японским исследователем Шинозаки в 80-х годах прошлого века (Shinozaki et al., 1986) для Nicotiana tabacum L. Размер генома пластид современных наземных растений находится в диапазоне от 70 до 217 тыс. пн, в среднем 120-170 тыс. пн (Clegg et al., 1994). Геномы пластид всех наземных растений сходны не только в размере, но и в архитектуре. Содержание генов, их порядок и состав интронов стрептофитной водоросли Chaetosphaeridium Klebahn в значительной степени напоминают геном пластид печеночника Marchantia polymorpha L. Вероятно, строение этих геномов сложилось уже во время эволюции общего предка водорослей и наземных растений (Turmel et al., 2002).

Кольцевая молекула хпДНК состоит из четырех районов:

1. большой однокопийный район (LSC – large single copy);

2. малый однокопийный район (SSC – small single copy);

3. два инвертированных, т.е. имеющих противоположную ориентацию, но идентичных друг другу повтора (IR<sub>A</sub> и IR<sub>B</sub> — inverted repeats), разделяющих LSC и SSC.

Например, геном *N. tabacum* состоит из большого (86686 пн) и малого (18571 пн) однокопийных районов и двух инвертированных повторов размером 25431 пн каждый (Рис. 4).



Рисунок 4 – Генетическая карта хпДНК табака (по: Даниленко, Давыденко, 2003). Гены, изображенные внутри круга, транскрибируются по часовой стрелке, снаружи – против часовой стрелки.

В хпДНК *N. tabacum* гены, кодирующие белок и РНК, составляют только 60% генома. Таким образом, 40% генома состоит из некодирующих областей, таких как межгенные спейсеры – области, отделяющие кодирующие участки ДНК, или интроны – некодирующие участки ДНК в пределах гена. Хотя межгенные спейсеры хпДНК обозначают как некодирующие, они могут нести в себе элементы, необходимые для транскрипции, сплайсинга, трансляции и созревания мРНК. От стартовой точки транскрипции только несколько пар оснований этих спейсеров транскрибируемы, поэтому их называют нетранскрибируемых межгенных спейсерами (например, cпейсер trnT-trnL), в отличие от транскрибируемых межгенных спейсеров (например, trnL-trnF). Именно эти регионы в настоящее время широко используются в качестве маркеров в молекулярно-генетических исследованиях.

Первоначально, хпДНК анализировалась на основе сравнения полиморфизма сайтов рестрикции (Olmstead, Palmer, 1994). С появлением технологии секвенирования ДНК, очень быстро стали накапливаться данные о первичных нуклеотидных последовательностях отдельных регионов хлоропластного генома. Работа Чейз с соавт. (Chase et al., 1993) явилась основополагающей для их активного использования в филогенетических исследованиях. На первых этапах исследователями наиболее активно использовался ген *rbcL* – большой субъединицы РуБисКО (рибулозобисфосфаткарбоксилазы). В дальнейшем стали применять и другие гены, такие как *matK* – ген интронной матуразы К (Johnson, Soltis, 1994); *ndhF* – ген 5-й субъединицы НАДН-дегидрогеназы (Kim, Jansen, 1995; Olmstead, Reeves, 1995) и *atpB* – ген β-субъединицы протонной АТФазы (Hoot et al., 1995).

Наряду с генами для изучения филогенетических отношений на низких таксономических уровнях стали привлекать некодирующие области хлоропластного генома. Секвенирование быстро эволюционирующих спейсеров и интронов нашло широкое применение для анализа эволюционных отношений между близкородственными видами. В числе первых в таких исследованиях опробованы участки: trnT-trnL-trnL-trnF регион (Taberlet et al., 1991), спейсер atpB-rbcL (Golenberg et al., 1993; Hodges, Arnold, 1994), и trnK/matK интрон (Johnson, Soltis, 1994; Steele, Vilgalys, 1994). Отмечено, что эти маркеры являлись достаточно информативны-

ми в одних группах организмов, например, орхидных (Bellstedt et al., 2001) и злаках (Ge et al., 2002), и малоинформативны в других, например, в некоторых группах ирисовых (Goldblatt et al., 2002) и сложноцветных (Samuel et al., 2003). Для того чтобы получить дополнительные данные (количество признаков) и обеспечить более высокую достоверность в филогенетических анализах, последовательности нескольких маркеров хпДНК стали объединять в одно выравнивание.

Большая работа была проведена Шоу с соавт. (Shaw et al., 2005), в которой осуществлялся сравнительный анализ информативности маркеров для межвидовых или внутривидовых филогенетических исследований. Рассмотренные в этом исследовании участки хпДНК (21 некодирующий регион) находились в LSC районе хпДНК и включали межгенные спейсеры и интроны: trnH-psbA; psbA-3'trnK; 3'trnK-matK; matK-5'trnK; интрон rpS16; trnQ-rps16; trnS-trnG; интрон trnG; rpoB-trnC; trnC-ycf6; ycf6-psbM; psbM-trnD; trnD-trnT; trnS-trnfM; trnS-rpS4; rpS4-trnT; trnT-trnL; интрон trnL; trnL-trnF; 5'rpS12-rpL20; psbB-psbH; интрон rpL16 (Рис. 5).

На карте хлоропластного генома *Nicotiana* суммарная длина этих регионов составила 14321 пн (35%) из 40732 пн некодирующего LSC района. Основной целью этого исследования было определение самых «выгодных» областей хпДНК для построения молекулярной филогении на низких таксономических уровнях. Среди наиболее информативных регионов авторами были отмечены межгенные спейсеры *trnH–psbA* и *trnQ–rps16*.



Рисунок 5 – Карта 21 некодирующего региона хпДНК *N. tabacum* (по: Shaw et al., 2005). Ориентация и положение генов обозначены латинскими буквами А–К вдоль LSC района. Нуклеотидные позиции, ограничивающие участок, указаны номерами в начале и конце каждого отрезка. Названия генов даны снизу, а названия праймеров для амплификации и секвенирования – сверху стрелки-указателя. Длина каждой некодирующей области указана снизу в середине каждого спейсера или интрона.

#### 1.7.1. Межгенный спейсер trnH-psbA

Исследования спейсера trnH—psbA начались с работы Элдрич с соавт. (Aldrich et al., 1988), которые показали, что для этого участка свойственно наличие инделей, которые нередко отличают даже близкородственные виды. Сэнг с соавт. (Sang et al., 1997) создали первые праймеры для амплификации генов psbA и trnH, и испытали их на представителях рода *Paeonia* L. Авторами было отмечено, что последовательности спейсера trnH—psbA оказывались более вариабельными, чем пластидный ген *matK* и спейсер trnL—trnF, поэтому первый можно рассматривать как перспективный маркер для реконструкции филогении (Sang et al., 1997). Чуть позже Хэмилтоном (Hamilton, 1999) были разработаны универсальные праймеры (H и PSBA) для амплификации спейсера. В дальнейшем эти праймеры успешно использовались многими исследователями для получения ПЦР-продуктов других покрытосемянных растений. Дальнейшие исследования подтвердили информативность *trnH–psbA* при анализе отношений между видами, а также на внутривидовом уровне (Shaw et al., 2005).

На более высоких таксономических уровнях (род и выше) возможности использования этого маркера оказались ограниченными. Одной из причин этого была повышенная частота возниконвения инверсий, ассоциированных с палиндромными последовательностями, отмеченная во многих группах покрытосемянных растений, например, у представителей Gentianaceae Juss. (Whitlock et al., 2010). Такие мутации, будучи незамеченными, приводят к переоценке количества нуклеотидных замен и, следовательно, к ложным результатам построения дерева. Тем не менее, многие исследователи предложили использовать trnH-psbA в качестве универсального маркера для ДНК-штрихкодирования и идентификации видов растений, дополнительного к уже используемым генам rbcL и matK (Kress et al., 2005; Pang et al., 2012; Gere et al., 2013; Bolson et al., 2015). Некоторые особенности этого участка соответствуют необходимым требованиям к универсальному маркеру для ДНК-штрихкодирования: небольшая длина (около 500 пн), наличие у большинства таксонов растений, высокая межвидовая дивергенция последовательностей и универсальные праймеры, которые позволяют производить легкую амплификацию и секвенирование (Whitlock et al., 2010).

Межгеный спейсер *trnH–psbA* находится между последовательностями генов *psbA*, кодирующего белок D1 фотосистемы II, и *trnH*, тРНК гистидина (Рис. 6). Самый длинный спейсер *trnH–psbA* был найден у клевера – 1077 пн (Shaw et al., 2005).



Рисунок 6 – Схематическое изображение межгенных спейсеров *trnH–psbA* и *trnQ– rps16* хпДНК. Названия праймеров для амплификации и секвенирования даны сверху стрелки-указателя, а названия генов – внизу.

#### 1.7.2. Межгенный спейсер trnQ-rps16

Межгенный спейсер *trnQ-rps16* расположен в области LSC (Рис. 6) между геном trnQ, кодирующим тРНК глутамина, и rps16, кодирующим белок 30S субъединицы рибосомы. Спейсер показал высокую информативность по сравнению с большинством регионов хпДНК покрытосемянных растений (Shaw et et al., 2012; Рис. 7). Однако al., 2007; Dong высокая изменчивость последовательностей этого спейсера нередко затрудняет его использование для исследований на уровне рода (Shaw et al., 2007). В некоторых случаях, этот регион характеризуется невысокой изменчивостью, например, в популяциях Cerasus pseudocerasus Lindl. (Rosaceae Juss.). Данное явление авторами исследования объяснялось эффектом основателя и прохождением популяций вида через «бутылочное горлышко» (Chen et al., 2012а). Средняя длина спейсера trnQ-rps16 у видов покрытосемянных растений составляет 1046 пн и изменяется от 588 до 1975 пн.



Рисунок 7 – Среднее число потенциально информативных признаков (PIC, темные столбцы) и средняя величина вариабельности (серые столбцы), оцененные для 34 регионов хпДНК нескольких десятков групп растений (по: Shaw et al., 2007). Стрелками указаны межгенные спейсеры, используемые нами в исследовании.

#### 1.7.3. Межгенный спейсер rpl32-trnL

Межгенный спейсер *rpl32–trnL* находится в малом однокопийном регионе (SSC) хлоропластного генома между геном *rpl32*, кодирующим белок CL32 большой рибосомной 50S субъединицы, и геном *trnL* тРНК лейцина. Этот участок впервые был охарактеризован как высоко вариабельный (Timme et al., 2007) для рода *Helianthus* L. сем. Compositae Giseke). Дальнейшие исследования подтвердили потенциальную пригодность этого спейсера как маркера для филогенетических исследований на низких таксономических уровнях (Dong et al., 2012). Тем не ме-

нее, имеются данные о сложности выравнивания последовательностей этого участка у представителей рода *Aquilegia* L. из-за протяженных блоков одинаковых нуклеотидов и позиций, по которым выявлен внутригеномный полиморфизм (Эрст, Ваулин, 2013). Длина *rpl32–trnL* у покрытосемянных варьирует от 543 до 1417 пн и в среднем составляет 1018 пн (Shaw et al., 2007).

#### 1.7.4. Межгенный спейсер trnD-trnT

Спейсер trnD-trnT расположен в LSC районе между генами, кодирующими последовательности тРНК аспарагиновой кислоты и тРНК треонина соответственно. Праймеры для амплификации были разработаны на основании нуклеотидных последовательностей представителей родов *Oryza* L., *Nicotiana* и *Marchantia* L. (Demesure et al., 1996). Фризен с соавт. (Friesen et al., 2000) показали, что этот регион был достаточно информативным для уточнения филогенетических отношений среди некоторых видов лука *Allium* L. (Alliaceae J.G. Agardh); реконструированные деревья были хорошо разрешены и сопоставимы с таковыми, построенными на основании последовательностей ITS региона рДНК. Кроме того, спейсер trnD-trnT характеризовался наличием большого числа потенциально информативных линий растений (Рис. 7). Установлено, что длина этого спейсера изменяется от 578 до 1403 пн и в среднем составляет 1066 пн (Shaw et al., 2007).

#### 1.7.5. Межгенный спейсер *trnS–trnG*

Спейсер *trnS-trnG* расположен в LSC регионе между геном *trnS*, кодирующим тРНК серина, и *trnG* – гена тРНК глицина. Хэмилтон (Hamilton, 1999) впервые разработал праймеры для изучения динамики популяций тропических видов деревьев *Corythophora* R.Knuth (Lecythidaceae A. Rich.). Шоу с соавт. (Shaw et al., 2005) усовершенствовали праймеры, используя менее вариабельные места для их посадки. Последующие исследования (Xu et al., 2000; Sakai et al., 2003; Dong et al., 2012) показали, что для этого спейсера характерно наличие значительного количества информативных признаков (Рис. 7). Длина спейсера *trnS-trnG* варьирует от 619 до 1035, в среднем – 763 пн (Shaw et al., 2007).

Таким образом, проанализировав информацию о применении межгенных спейсеров в молекулярно-генетических исследованиях и принимая во внимание, что маркеры trnH–psbA, trnS–trnG, trnT–trnL и rpl32–trnL хпДНК ранее уже были успешно применены для изучения генетической структуры видов типовой подсекции рода *Orostachys* (Kozyrenko et al., 2013), мы решили использовать спейсеры trnH–psbA, trnQ–rps16, rpl32–trnL, trnD–trnT и trnS–trnG хпДНК для изучения генетического разнообразия и популяционной структуры *O. spinosa*.

### ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

#### 2.1. Материалы

Материалом для исследования служило 261 растение из 47 популяций шести видов рода Orostachys: O. spinosa (28 популяций, 211 образцов), O. japonica (14 популяций, 45 образцов), O. thyrsiflora (2 популяции, 2 образца), O. chanetii (1 популяция, 1 образец)) подсекции Appendiculatae и O. boehmeri (1 популяция, 1 образец) и O. paradoxa (1 популяция, 1 образец) подсекции Orostachys (Рис. 8; Табл. 1). Большинство из них были собраны в 2009–2014 гг. в естественных местообитаниях (от 1 до 12 образцов на популяцию), тогда как 15 образцов были любезно предоставлены из частной открытой коллекции. Необходимо отметить, что используемые нами в исследовании виды не являются охраняемыми.



Рисунок 8 – Карта мест сбора растений (*O. spinosa* – белые окружности, *O. japon-ica* – черные). Коды популяций указаны в соответствии с таблицей 1.

№ п/п	Вид	Код популяции	Объем выборки	Широта / Долгота	Место сбора, дата, коллектор
1	O. chanetii	P3	1	_	Садоводческий материал
2		P4	1	_	Садоводческий материал, Япония
3		P5	1	_	Садоводческий материал, Япония
4		P6	1	-	Садоводческий материал, Япония
5		P7	1	_	Садоводческий материал, Ю. Корея, пров. Чхунчхон-намдо. 08.2012.
		1,	-		Гончаров А.А.
					Садоводческий материал, Ю. Корея,
6		P8	2	_	пров. Кенсан-пукто, парк, 08.2012,
					Гончаров А.А.
					Россия, Приморский край, Хасанский
7		P9	12	42°41'28"/131°14'21"	р-он, пос. Славянка, мыс Льва, скалы,
	O. japonica				08.2012, Киселев К.В.
					Россия, Приморский край, Октябрь-
8		P10	10	44°04'09"/131°24'10"	ский р-н, окр. с. Фадеевка, лев. берег р.
		110	10	11 01 07 7151 2110	Раздольная, скалы, 08.2011, Дудкин
					P.B.
		P11 2	2	35°53'49"/129°31'34"	Ю. Корея, пров. Ульсан, Донгхеан,
9					скала у моря, 25.10.2012, Гончаров
					A.A.
10		P12	1	34°40'17"/138°46'44"	Япония, преф. Сидзуока, п-ов Шимода,
					скалы, 04.2009, Гончаров А.А.
11		P13	1	_	Садоводческий материал
12		P14	1	_	Садоводческий материал
13		P15	1	—	Садоводческий материал

Таблица 1 – Список видов и их популяций, обработанных нами в рамках данного исследования
№ п/п	Вид	Код популяции	Объем выборки	Широта / Долгота	Место сбора, дата, коллектор
14		P16	1	_	Садоводческий материал, Япония
15	O. japonica	P19	10	45°18'19"/127°93'53"	Китай, пров. Хейлуньцзян, гора Мя- олшань, горный склон, 08.2012, Гонча- ров А.А.
16		P20	1	_	Садоводческий материал, предположи- тельно Монголия
17		P21	12	54°50'03"/56°11'25"	Россия, Республика Башкортостан, г. Уфа, скала, 07.2010, Абдуллин Ш.Р.
18		P22	10	54°05'00"/57°36'30"	Россия, Республика Башкортостан, Аб- зелиловский р-он, гора Кара-Таш, кам- ни, 08.2010, Абдуллин Ш.Р.
19		P23	12	51°09'58"/86°09'15"	Россия, Республика Алтай, правый берег р. Бийка, рядом с устьем, камни, 09.2012, Абдуллин Ш.Р.
20	O. spinosa	P24	12	51°07'57"/86°10'57"	Россия, Республика Алтай, р. Катунь, напротив устья р. Чеба, камни, 08.2012, Абдуллин Ш.Р.
21		P25	2	52°10'50"/85°58'34"	Россия, дер. Майма, р. Иша, склон 4.05.09, Ю.В. Овчинников
22		P26	12	51°52'28"/104°47'46"	Россия, Иркутская обл., Слюдянский р- н, станция КБЖД "Байкал", скалы, 09.2012, Киселев К.В. и Дубровина А.С.
23		P27	12	51°46'33"/104°10'43"	Россия, Иркутская обл., Слюдянский р- н, станция КБЖД "Киркирей", скалы, 09.2012, Киселев К.В. и Дубровина А.С.

№ п/п	Вид	Код	Объем	Широта / Долгота	Место сбора, дата, коллектор
24		Р28	12	52°01'32"/113°27'34"	Россия, Читинская обл., окрестности г. Чита, Титовская сопка, скалы, 06.2011, Овчинников Ю.В.
25		P29	12	49°13'38"/120°53'11"	Китай, пров. Внутренняя Монголия, окр. г. Якеши, скала, 08.2012, Гончаров А.А.
26	O. spinosa	P30	1	54°06'55"/124°36'53"	Россия, Амурская обл. Сковородин- ский р-он, окр. пос. Соловьёвск, выхо- ды известняка на скале, 06.2011, Дудкин Р.В.
27		P31	15	50°22'11"/127°39'20"	Россия, Благовещенский р-н, окр. с. Моховая падь, окр. оз. Песчаное, юж- ный песчаный склон, 07 2012, Никулины А. и В.
28		P32	3	50°21'33"/127°04'04"	Китай, пров. Хейлуньцзян, г. Хэйхэ, нац. парк, Сунь Янь, каменистый склон, 06.2012
29		P33	12	45°14'27"/131°59'00"	Россия, Приморский край, Ханкайский р-он, окр. с. Турий Рог, песчаные дю- ны, 07.2009, Гончаров А.А.
30		P34	12	43°54'44"/131°59'36"	Россия, Приморский край, Михайлов- ский р-он, окр. с. Михайловка, на хол- ме, 07.2010, Гончаров А.А.

№ п/п	Вид	Код популяции	Объем выборки	Широта / Долгота	Место сбора, дата, коллектор
31		P35	12	43°52'00"/132°55'43"	Россия, Приморский край, Анучинский р-н, окр. с. Староварваровка, на скале, 30.09.2010, Гончаров А.А., 08.2012, Никулины А. и В.
32		P36	13	43°24'40"/133°53'31"	Россия, Приморский край, Лазовский р-н, окр. пос. Лазо, скалы, 09.2010, Си- доров Д. (1 обр.), 07.2012, Шохрина В.В. (12 обр.)
33		P37	4	47°42'59"/136°35'26"	Россия, Хабаровский край, бассейн р. Хор, скала, 09.2012, Дудкин Р.В.
34	O. spinosa	P38	3	54°54'20"/137°40'37"	Россия, Хабаровский край, Шантар- ские острова, скалы, 07.2010, Богатов В.В.
35		P39	8	49°15'17"/140°20'18"	Россия, Хабаровский край, Ванинский р-он., прибрежные скалы, 08.2014, Гончаров А.А.
36		P40	2	63°69'41"/152°24'08"	Россия, Магаданская область, Сусу- манский р-н, 45 км на сев. пос. Сейм- чан, горный склон, 06.2010, Бакалин В.А.
37		P41	1	_	Садоводческий материал
38	O. spinosa (thyrsiflora)*	P43	1	-	Садоводческий материал

Оконча	Окончание таблицы 1					
№ п/п	Вид	Код популяции	Объем выборки	Широта / Долгота	Место сбора, дата, коллектор	
39	0 amin ag a	P44	1	_	Садоводческий материал	
40	(thursiflorg)*	P45	1	_	Садоводческий материал	
41	(ingrsijiora)*	P46	1	—	Садоводческий материал	
42	0 thursiflorg	P49	1	_	Садоводческий материал	
43	0. myrsijiora	P50	1	—	Садоводческий материал	
44	O. boehmeri	P51	1	_	Ю. Корея, пров. Кенсан-пукто, Садо- водческий материал 10.2012, Гончаров А.А.	
45	O. paradoxa	P52	1	49°15'17"/140°20'19"	Россия, Хабаровский край, Ванинский р-он., прибрежные скалы, 08.2014, Гончаров А.А.	
46		P53	12	50°40'17"/87°49'39"	Россия, Республика Алтай, р. Башкаус, речной склон, 08.2012, Абдуллин Ш.Р.	
47	O. spinosa	P54	12	54°58'54"/83°02'37"	Россия, Новосибирская область, г. Но- восибирск, Ключ-Камышенское плато, сухой склон, 09.2013, Овчинников Ю.В.	

### 2.2. Выделение ДНК

Геномную ДНК выделяли из свежезамороженных листьев с использованием набора QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), следуя инструкциям производителя (QIAGEN, 2006), и хранили в морозильной камере (–20 °C).

#### 2.3. Амплификация ДНК

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в термоциклере «ХР Суcler (TC-ХР)» (Вioer Technology Co., Ltd., Zhejiang, China). Для амплификации использовали универсальные праймеры (Табл. 2), синтезированные ЗАО «Синтол». ITS регион амплифицировали в два приема: в первом раунде амплификации использовали праймеры 1400F (Elwood et al., 1985) и ITS055R (Marin et al., 2003); во втором раунде (при необходимости) использовали внутренние праймеры 18Sm10 (Wen, Zimmer, 1996) и ITS4R (White et al., 1990). Для амплификации межгенных спейсеров trnH–psbA, trnQ–rps16, rpl32–trnL, trnD–trnT и trnS–trnG хпДНК использовали праймеры из работ Шоу с соавт. (Shaw et al., 2005, 2007). Параметры ПЦР даны в таблицах 3 и 4. Состав реакционной смеси в расчете на объем 14.9 мкл приведен в таблице 5. При каждом запуске полимеразной цепной реакции использовали отрицательный контроль – реакционная смесь без добавления ДНКматрицы.

Регион	Название праймера	Нуклеотидная последовательность $(5' \rightarrow 3')$
	1400F	CGCATTGGCTTACTTCGTATG
ITS	ITS055R	CTCCTTGGTCCGTGTTTCAAGACGGG
	18Sm10	AGGAGAAGTCGTAACAAGG
	ITS4R	TCCTCCGCTTATTGATATGC
trnH_nshA	trnH (GUG)	CGCGCATGGTGGATTCACAATCC
	psbA	GTTATGCATGAACGTAATGCTC
trnO_rns16	trnQ (UUG)	GCGTGGCCAAGYGGTAAGGC
ing-ipsio	rpS16x1	GTTGCTTTYTACCACATCGTTT
rn132_trnI	rpL32-F	CAGTTCCAAAAAACGTACTTC
	trnL (UAG)	CTGCTTCCTAAGAGCAGCGT
trnD_trnT	trnD (GUC)F	ACCAATTGAACTACAATCCC
	trnT (GGU)	CCCTTTTAACTCAGTGGTA
trn S_trn G	5'trnG2G	GCGGGTATAGTTTAGTGGTAAAA
ims=imo	3'trnG (UUC)	GTAGCGGGAATCGAACCCGCATC

Таблица 2 – Праймеры для проведения ПЦР

Таблица 3 – Параметры ПЦР для амплификации ITS региона и межгенного спейсера *trnH–psbA* 

Этапы ПЦР	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
Предварительный нагрев	95	5 мин	1
Денатурация	95	30 c	
Отжиг	55	25 c	35
Элонгация	72	$80/50^{1}$ c	
Окончательная достройка цепи ДНК	72	5 мин	1

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Время элонгации для МГС *trnH–psbA* 

Таблица 4 – Параметры ПЦР для амплификации спейсеров trnQ-rpS16, rpl32trnL, trnD-trnT, trnS-trnG

Этапы ПЦР	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
Предварительный нагрев	80	5 мин	1
Денатурация	95	45 c	
Отжиг	52	45 c	35
Элонгация	65	3мин 30 с	
Окончательная достройка цепи ДНК	65	5 мин	1

Таблица 5 – Состав реакционной смеси для ПЦР

Компонент	Объем, мкл
Стерильная бидистилированная (деионизированная) вода	10,5
10× Буфер (Fermentas, Lithuania, Vilnius)	1,5
MgCl <sub>2</sub> (25 мМ)	1,2
dNTPs (10мМ) (дезоксинуклео- тидтрифосфаты)	0,4
Праймер прямой (20 мМ)	0,05
Праймер обратный (20 мМ)	0,05
ДНК-матрица	1
Таq-полимераза (5 ед./1 мкл)	0,17

## 2.4. Электрофорез амплифицированных участков ДНК в агарозном геле

Для проверки эффективности ПЦР и определения длины ПЦР-продукта фрагменты ДНК с маркером длин 100+ bp DNA Ladder (Евроген, Россия) разделяли горизонтальным электрофорезом в 1%-ном агарозном геле в присутствии бромистого этидия (0,3 мкл/мл) в 1× ТВЕ буфере (89 мМ трис-борат, 89 мМ борная кислота, 2 мМ ЭДТА, рН 8.0) при напряжении 120В в течение 20 мин при комнатной температуре. После проведения электрофореза гель фотографировали в проходящих УФ-лучах ( $\lambda$ =290 нм), используя систему гель-документации (Gel Doc XR, Bio-Rad Inc., UK).

## 2.5. Секвенирование ДНК

Циклическое секвенирование обеих цепей фрагментов ДНК осуществляли с использованием набора флуоресцентно меченных нуклеотидов Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v.3.1 (Applied Biosystems Inc., Forster City, USA) и тех же универсальных праймеров (Табл. 6, 7).

Таблица 6 – Состав реакционной смеси для циклического секвенирования

Компонент	Объем, мкл
<u> </u>	
Стерильная оидистилированная	5.2-6.2
(деионизированная) вода	0,2 0,2
Смесь Від Dye	1,3
Праймер (1mM)	2
Продукт ПЦР	2–3
Общий объем смеси	12

Этап ПЦР	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
Предварительный нагрев	95	1 мин	1
Денатурация	95	30 c	
Отжиг	55	10 c	25
Элонгация	60	90 c	

Таблица 7 – Параметры проведения циклического ПЦР

Продукты циклического секвенирования очищали при помощи этанола. К реакционной смеси добавляли 9 мкл деионизированой воды, 2,3 мкл 3М ацетата натрия (CH<sub>3</sub>COONa) и 44,8 мкл 96% этанола. Инкубировали при комнатной температуре 20 мин. Затем центрифугировали при максимальных оборотах 20 мин (20000g/14000 об/мин). Супернатант удаляли, а к пробе добавляли 140 мкл 75% этанола и центрифугировали при максимальных оборотах 10 мин. Затем сливали спирт и высушивали пробу.

Определение нуклеотидных последовательностей обеих цепей ПЦРпродуктов проводили на секвенаторе ABI PRIZM 3130 (Applied Biosystems Inc., Foster City, USA) на базе центра коллективного пользования ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН.

#### 2.6. Клонирование ITS региона рДНК

На полученных хроматограммах нескольких образцов *O. japonica* последовательности ITS1 помимо основного набора пиков был обнаружен дополнительный набор коротких пиков. При внимательном прочтении установлено, что слабый сигнал повторял последовательность основных пиков, но со сдвигом вправо. Повторная амплификация и секвенирование дали такие же результаты. Для проверки на наличие геномного полиморфизма в ITS регионе, который нередко встречается в разных группах организмов (O'Donnell, Cigelnik, 1997; Harris, Crandall, 2000; Hoy, Rodriguez, 2013; Potts et al., 2014; West et al., 2014; Zhao et al., 2015), проведено молекулярное клонирование амплифицированных последовательностей.

ПЦР-продукты фрагментов ДНК клонировали в плазмиду pTZ57R/T, используя набор InsT/Aclone PCR Product Cloning Kit (Fermentas, Литва). Затем плазмидную ДНК смешивали со 100 мкл компетентных клеток E. coli, инкубировали 30 мин при +4 °C, прогревали смесь 2 мин при +42 °C. После 10-ти кратного разбавления смеси теплой средой LB (Bertani, 1951) и инкубации при +37 °C в течение 1 часа клетки высевали на чашки Петри с агаризованной средой LB, содержащей ампициллин в концентрации 100 мг/л. Клетки выращивали 14-16 часов при температуре +37 °C. Из каждой чашки Петри затем отбирали колонии и происпользованием универсальных M13 (5'водили ПЦР с праймеров GTAAAACGACGGCCAGT-3' и 5'-AACAGCTATGACCATG-3') и температурного режима для амплификации ITS региона. Эти же праймеры использовались для секвенирования.

## 2.7. Моделирование вторичных структур транскриптов ITS1 и ITS2 рДНК

Подготовку нуклеотидных последовательностей к последующему анализу, их сборку и выравнивание, проводили с использованием программ Staden (Bonfield et al., 1995) и SeaView (Galtier et al., 1996). Границы локусов и структурных доменов в ITS регионе рДНК были определены путем сравнения нашего набора данных с опубликованными ранее последовательностями толстянковых и информацией о вторичной структуре (Gontcharova, Gontcharov 2004; Гончарова и др., 2006).

Вторичные структуры транскриптов спейсеров ITS1 и ITS2 строились с использованием веб сервера Mfold (Zuker, Markham, 1995; Zuker, 2003). Нами производился поиск оптимальных моделей, структур с наиболее низкими показателями свободной энергии при стандартных настройках фолдинга (Mathews et al., 1999; Reuter, Mathews, 2010). Результаты построений для всех последовательностей тщательно сравнивались для выявления общей схемы укладки стеблей. Далее производилась обработка последовательностей, включающая разграничение структурных доменов и кодировка этих данных для создания матрицы последовательностей. Полученная матрица использовалась для построения обобщенных (консенсусных) моделей вторичной структуры ITS1 и ITS2 в программе 4SALE (Seibel et al., 2006).

Для точной характеристики положения основных структурных элементов и консервативных участков вторичных структур была создана универсальная номенклатура по примеру таковой Каисовой с соавт. (Caisova et al., 2011). Данный способ нумерации рассматривает лишь универсальные (консервативные) позиции нуклеотидов для всех последовательностей, в то время как каждый нуклеотид инсерции нумеруется тем же номером, что и предыдущая позиция, но с индексом 1, 2 и т.д.

#### 2.8. Анализ молекулярно-генетических данных

Расчет параметров генетического разнообразия: количество полиморфных сайтов (*pS*); количество гаплотипов (*nH*); количество уникальных гаплотипов (*nHu*); гаплотипическое разнообразие (*h*); нуклеотидное разнообразие ( $\pi$ ), осуществлялся в программе Arlequin v. 3.11 (Excofflier et al., 2005).

Филогенетические деревья были построены с использованием метода максимального правдоподобия (ML) и максимальной экономии (MP) в программе PAUP\* 4.0b10 (Swofford, 2002). Для проведения ML-анализа в программе jModelTest 2.1.1 (Darriba et al., 2012) определялась подходящая для набора данных модель нуклеотидных замен, использовался эвристический поиск оптимальной топологии с алгоритмом TBR (tree bisection-reconnection). Также реконструкция проводилась с помощью Баесовского подхода (BI) в программе MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck, Ronquist, 2001). При BI-анализе полной матрицы создавали 20 миллионов генераций цепей Маркова, отбирая пробы каждые 200 генераций, т.е. 100000 проб. Первые 25% проб (до выхода значений –lnL на плато) исключались из анализа (burn-in).

Устойчивость узлов филогенетических деревьев для ML-анализа рассчитывали с помощью веб-сервера RAxML web server version 7.7.1 (Stamatakis et al., 2008), а методом бутстрепа (Bootstrap Percentage, далее BP) с 1000 репликациями эвристического поиска (Felsenstein, 1985) для MP в PAUP\* 4.0b10. Для оценки достоверности BI-анализа были определены апостериорные вероятности (Posterior Probabilities, далее PP). Значения процента BP менее 50% и PP менее 0.95 не рассматривались. Для оценки парных генетических дистанций (*p*-дистанции) использовали программу MEGA v. 6.06 (Tamura et al., 2013).

Молекулярная датировка (определение времени дивергенции) возникновения основных линий Telephieae проведена в рамках байесовского подхода в пакете программ BEAST 1.8.1 (Drummond et al., 2012). В анализах использована GTR+G модель нуклеотидных замен, модель молекулярных часов – строгие (strict) часы, с нормальным априорным распределением и постоянной численностью популяции. Топология дерева основывалось на начальном UPGMA-дереве. Продолжительность байесовского анализа 5 × 10<sup>7</sup> циклов с отбором каждого 10 тысячного из генерированных деревьев; первые 5 тыс. деревьев не принимались в расчет (burn-in). Были использованы значения скорости нуклеотидных замен, рассчитанные Жанг с соавт. (Zhang et al., 2014) и варьирующие от  $3,46 \times 10^{-9}$  до 8,69 $\times 10^{-9}$  замен на сайт<sup>-1</sup> в год<sup>-1</sup> со средним значением 6,075  $\times 10^{-9}$  и стандартным отклонением 1,59 × 10<sup>-9</sup>. Поскольку данные об ископаемых остатках толстянковых отсутствуют, было невозможно использовать метод калибровочных точек для получения датировок. Поэтому наш анализ основан только на скоростях возникновения нуклеотидных замен в ITS регионе, что накладывает определенные ограничения на достоверность полученных результатов.

Объединение трех межгенных спейсерных регионов хпДНК в одно выравнивание, аппаратный подсчет мутационных событий, построение графика распределения парных нуклеотидных различий осуществляли в программе DnaSP v. 4.50 (Rozas et al., 2003).

Расчет и визуализацию возможных вариантов мутационных переходов между гаплотипами на основе метода максимальной парсимонии с 95%-ным доверительным интервалом осуществляли с помощью программы TCS v. 1.21 (Clement et al., 2000). В этом анализе индели были обозначены как пятое состояние признака, а инверсии закодированы как одно мутационное событие. Участки последовательностей с варьирующими по длине мононуклеотидными повторениями были исключены из анализа.

Генетическая подразделенность популяций определялась в пакете DnaSP по величине индексов фиксации:  $G_{ST}$  (Nei, 1982) и N<sub>ST</sub> (Lynch, Crease, 1990). Значение индекса  $G_{ST}$  основывается только на частотах гаплотипов, а в N<sub>ST</sub> принимается во внимание еще и генетическая дивергенция между гаплотипами. Неравенство N<sub>ST</sub>>G<sub>ST</sub> обычно указывает на наличие филогеографической структуры, то есть преимущественное возникновение близкородственных гаплотипов на конкретной территории, чем более дивергентных (Pons, Petit, 1996).

Расчет значения t-критерия Стьюдента для несвязанных выборок производился с помощью веб-интерфейса «Медицинская статистика» (Марапов, 2013).

Значения индексов генетической дифференциации ( $F_{SC}$ ,  $F_{ST}$ ,  $F_{CT}$ ) внутри, между группами популяций (согласно географическому положению выборок и результатам генеалогического анализа) определялись в ходе анализа молекулярной дисперсии (AMOVA; Excoffier et al., 1992) в программе Arlequin v. 3.11 с тестовыми перестановками (1000 повторов).

## ГЛАВА З. РЕЗУЛЬТАТЫ

Для реконструкции филогенетических отношений представителей трибы *Telephieae*, а также между *O. spinosa* и близкими ему видами, нами были амплифицированы и секвенированы 84 нуклеотидные последовательности ITS региона рДНК (ITS1–5.8S–ITS2). Для исследования популяционной структуры и филогеографии *O. spinosa* были получены 685 последовательностей некодирующих регионов хпДНК, из них по 207 последовательностей каждого спейсера trnH–psbA, trnQ–rps16 и rpl32–trnL, 24 последовательности trnD–trnT и 40 последовательностей спейсера trnS–trnG. Два последних региона секвенировали с целью поиска информативных на популяционном уровне молекулярных маркеров, но не включили в дальнейшие анализы.

# 3.1. Вариабельность последовательностей ITS региона и моделирование вторичных структур транскриптов ITS1 и ITS2

В качестве маркера для проведения первых этапов работы был выбран популярный в современной филогенетике ITS регион рДНК. Из всего пула имеющихся на тот момент последовательностей ITS растений изучаемых групп (полученных в результате данной работы и из базы данных GenBank), нами были созданы 2 набора данных. Первый набор последовательностей создан с целью уточнения положения *O. spinosa* в трибе Telephieae в целом, тогда как второй – для реконструкции филогении в подсекции *Appendiculatae* рода *Orostachys*.

Первый набор данных включал 62 нуклеотидные последовательности, в том числе взятые из GenBank (Табл. 8). Мы заметили, что часть последовательностей не отличались между собой, поэтому было решено далее в анализах использовать риботипы. Например, одна последовательность *O. japonica* и две последовательности *O. spinosa* (№19, 26 и 27 соответственно; Табл. 8) представляли собой риботипы. Риботип R4 (последовательность №19) был обнаружен в образцах из Ю. Кореи (P11) и культурных растениях (P13, P14; Табл. 1); риботип R13 (последовательность С. работип R13); риботип R13 (последовательность С. работип R13); работип R13); работип R13 (последовательность R13); работип R13); раб

тельность №26) выявлен в образцах *О. spinosa* из Республики Башкортостан (Р21, Р22), из Алтая (Р23–Р25) и культурных растениях (Р44, Р45); риботип R14 (последовательность №27) – в популяциях из Иркутской области (Р26, Р27) и коллекции (Р41, Р46).

Таблица 8 – Виды, используемые для анализа родственных отношений в трибе Telephieae, и номера доступа нуклеотидных последовательностей ITS региона в базе данных GenBank

<b>Мо п/п</b>	Dur	Номер в
אַין 11/11	Бид	GenBank
1	Aizopsis (Phedimus) aizoon	AB089767
2	A. hybridum (L.) Grulich	AM039908
3	A. selskiana (Regel et Maack) Grulich	AM039911
4	Hylotelephium cyaneum (J. Rudolf) H. Ohba	AM039914
5	H. ewersii (Ledeb.) H. Ohba	AB088570
б	H. pallescens (Freyn) H. Ohba	AM039915
7	H. pluricaule (Kudo) H. Ohba	AM039916
8	H. pseudospectabile (Praeger) S.H. Fu	AM039917
9	H. sieboldii (Sweet. et Hook.) H. Ohba	AB088567
10	H. tatarinowii (Maxim.) H. Ohba	AB088557
11	H. triphyllum	AM039918
12	H. tsugaruense (Hara) H. Ohba	AB088565
13	H. ussuriense (Kom.) H. Ohba	AM039919
14	H. viride (Makino) H. Ohba	AB088569
15	H. viviparum (Maxim.) H. Ohba	AM039920
16	Meterostachys sikokiana	AB088579
17	Orostachys boehmeri	LN865084
18	O. chanetii	LK022055

Окончание таблицы 8

Мо п/п	Dur	Номер в
JN≌ 11/11	Бид	GenBank
19	O. japonica	LK022056
20	O. japonica	AB480588
21	O. malacophylla	HF565580
22	O. maximowiczii	HF565581
23	O. paradoxa	LN865085
24	O. paradoxa	HF565579
25	O. paradoxa	HF565575
26	O. spinosa	LK022064
27	O. spinosa	LK022065
28	O. spinosa	LK022067
29	O. spinosa	LK022071
30	O. spinosa	LK022072
31	O. thyrsiflora	LK022075
32	Phedimus stellatus Rafin.	AM039926
33	Pseudosedum longidentatum Boriss.	AB088609
34	Rhodiola angusta Nakai	AM039927
35	R. rosea	AB088599
36	Sinocrassula indica A. Berger	AB480611
37	S. yunnanensis A. Berger	AB088582
38	Umbilicus botryoides Hochst. ex A Rich.	AB088586

Примечание: жирным шрифтом выделены нуклеотидные последовательности, полученные в данном исследовании.

Таким образом, набор данных для анализа составил 38 нуклеотидных последовательностей ITS региона рДНК (Табл. 8): Orostachys подсекции Appendiculatae (9 послед., 4 вида), Meterostachys sikokiana (1 послед., 1 вид), *Orostachys* подсекции *Orostachys* (6 послед., 4 вида), *Hylotelephium* (12 послед., 12 видов), *Sinocrassula* (Franchet) А. Berger (2 послед., 2 вида) и представителей трибы Umbiliceae (8 послед., 8 видов), взятых в качестве внешней группы, наиболее близкой Telephieae (Thiede, Eggli, 2007).

Длина последовательностей варьировала от 602 пн (*Phedimus stellatus*) до 621 пн (*Hylotelephium tsugaruense*). В среднем длина спейсера составляла 610±3,6 пн, содержание ГЦ-оснований – 58±0,03%. У всех видов длина ITS1 была меньше, чем ITS2 (185±2,2 и 218±3,5 пн соответственно), а доля ГЦ-оснований, наоборот, выше (64 и 60% соответственно). Ген 5.8S рДНК был инвариантен по длине (161 пн), лишь у *Umbilicus botryoides* он отличался вставкой одного аденилового нуклеотида в 3-й позиции. Содержание ГЦ-оснований в гене 54%. Таким образом, длина матрицы данных составила 612 пн, 331 сайт был полиморфным, из них 203 информативными согласно методу максимальной экономии.

При создании второго набора данных для реконструкции филогенетических отношений в подсекции *Appendiculatae* рода *Orostachys* было привлечено 90 последовательностей представителей этой группы (полученных нами и из базы данных GenBank): *O. spinosa* (64 послед., 29 популяций,), *O. japonica* (22 послед., 16 популяций), *O. thyrsiflora* Fisch. (2 послед., 2 популяции) и *O. chanetii* (2 послед., 2 популяции).

Нуклеотидные последовательности 85 образцов были прочитаны с получением чистых пиков на хроматограммах и трудностей в их сборке не возникло. Однако в 5 образцах, принадлежащих исключительно культивируемым растениям *O. japonica* (популяции P6, P7, P8, P13, P14; Taбл. 1), были обнаружены пики со сдвигом на несколько нуклеотидов в сторону. ПЦР-продукты этих образцов были клонированы в *E. coli* и отсеквенированы (по 10 клонов каждой последовательности). Хроматограммы клонированных последовательностей обладали чистым сигналом, что позволило обнаружить присутствие двух аллельных типов участка ITS1 в равных пропорциях (Рис. 9). Эти внутригеномные варианты, обозначенные нами как риботипы R4 и R5, имели 8 и 7 нуклеотидов в поли-С участке, в положении 83 по универсальной номенклатуре (см. стр. 53 текста). Риботип R4 также был встречен, но в единственном числе, у *О. japonica* из культуры и в природной популяции из Ю. Кореи (Р5 и Р11 соответственно).



Рисунок 9 – Схематическое изображение ITS региона рДНК и внутригеномного полиморфизма в участке ITS1 *O. japonica*, обнаруженного после клонирования (риботипы R4 и R5).

Общая длина ITS региона у представителей подсекции *Аppendiculatae* варьировала от 607 пн (P49) до 614 пн (P47). Участки ITS1 и ITS2 были практически идентичны по длине и содержанию ГЦ-оснований,  $225,7\pm1,5$  пн,  $62,6\pm1,6\%$  и  $225,03\pm1,3$  пн,  $63\pm1,6\%$  соответственно. Ген 5.8S был консервативен по длине (161 пн) и характеризовался более низким, чем у спейсеров, содержанием ГЦоснований ( $54,42\pm0,75\%$ ).

В ходе выравнивания нуклеотидных последовательностей обнаружены позиции с сомнительной гомологией (преимущественно в более вариабельном спейсере ITS1). Такие позиции встречались в участках последовательности, представленных мононуклеотидными повторами, инделями и гипервариабельными участками с идущими подряд (до трех нуклеотидов) заменами. Таким образом, консервативность последовательностей межгенных спейсеров в наборе данных была умеренной: 152 позиции (67%) в ITS1 и 168 позиций (75%) в ITS2 (универсально консервативные позиции). Поэтому для поиска среди них гомологичных, тем самым для сведения к минимуму ложного филогенетического сигнала, нами была привлечена структурная информация, полученная при моделировании вторичной структуры транскриптов спейсеров ITS1 и ITS2 для членов Orostachys подсекции Appendiculatae.

Все обнаруженные гомологичные позиции (401 признак, универсальная позиция) были пронумерованы отдельно для каждого спейсера. Эта номенклатура далее использовалась для указания точного положения вариабельных и консервативных регионов, а также для локализации основных структурных доменов на моделях вторичных структур. Эти универсальные позиции мы классифицировали следующим образом: 100% консервативные нуклеотиды; высоко консервативные позиции, имеющие только одну замену в наборе данных; умеренно консервативные позиции с двумя заменами; вариабельные позиции с тремя и более заменами (Рис. 10).

Обе построенные модели РНК-транскриптов спейсерных участков ITS1 и ITS2 формировали структуры, состоящие из четырех спиральных (стеблевых) доменов, которые разделялись неспаренными одноцепочными участками (Рис. 10). В ITS1 на их долю приходилось около 37% всей длины спейсера, а в ITS2 они были относительно короткими – всего 18% нуклеотидов.

Обобщенная модель транскрипта спейсера ITS1 состояла из нескольких структурных элементов: относительно длинный (поз. 1–42) одноцепочечный регион на 5'-конце; спираль 1, длиной 15 пн (поз. 43–85); спейсер из одного нуклеотида между первой и второй спиралью; спираль 2, длиной 12 пн (поз. 87–122); спейсер из 15 пн между второй и третьей спиралью (поз. 123–137); спираль 3 (5 пн, поз. 138–151); спейсер из 16 пн между третьей и четвертой спиралью (поз. 152–168); самая длинная спираль 4 (18 пн, поз. 169–216), за которой следует терминальный спейсер из 10 пн (Рис. 10).



Рисунок 10 – Обобщенные модели транскриптов спейсеров ITS1 и ITS2 видов *Orostachys* подсекции *Appendiculatae*, реконструированные на основании консервативности (66 и 90% в ITS1 и ITS2 соответственно) 90 последовательностей ITS региона. Цифрами указаны позиции согласно универсальной номенклатуре. В прямоугольнике отмечен внутригеномный полиморфизм ITS1.

Модель обобщенной вторичной структуры транскрипта ITS2 (Рис. 10) имела несколько структурных особенностей, характерных для покрытосемянных рас-

56

тений (Coleman, 2015). Это относительно протяженная верхушечная петля (поз. 20–29) спирали 1 (поз. 7–43), спираль 2 (длиной 11 пн; поз. 46–77), включающая внутреннюю выпуклость (петлю) U-U и C-A (поз. 50–73 и 51–72 соответственно), длинная спираль 3 ( $\geq$ 32 пн; поз. 84–185), содержащая консервативный мотив GGUGGU на 5'-стороне (поз. 118–123). Наличие этих структурных мотивов подтверждает правильность и пригодность к использованию реконструированных нами моделей обобщенных вторичных структур транскриптов. Кроме того, правильность фолдинга нуклеотидной цепи поддерживается наличием компенсаторных (Compensatory Base Changes / CBCs) и полукомпенсаторных замен оснований (hemi-Compensatory Base Changes / hCBCs), обнаруженных в двуцепочечных доменах. Даже самые консервативные регионы спейсера ITS2 (спирали 2 и 3) содержали 15 полукомпенсаторных замен (2 и 13 соответственно). Компенсаторные замены были обнаружены только в стебле 3 ( $_{92}$ G-C<sub>178</sub>→A-T и  $_{123}$ T-A<sub>145</sub>→G-T у последовательностей *O. thyrsiflora*; результаты не показаны).

Нам удалось произвести однозначное выравнивание всего ITS региона (624 позиции; 147 информативных согласно методу максимальной экономии – 88 для ITS1, 6 для 5.8S, 53 для ITS2), за исключением нескольких инделей.

В ходе работы над выравниванием были приняты во внимание последовательности, отличающиеся от других последовательностей того же вида наличием замен нуклеотидов или инделей в относительно консервативных регионах. Ими оказались последовательности из базы данных GenBank. Например, у образца P47 под номером AB480590 ген малой субъединицы (5.8S) имел один дополнительный гуаниновый нуклеотид (поз. 20), в остальном ITS регион был идентичен последовательности популяции P20. Гораздо более значительными изменениями характеризовались последовательности под идентификационными номерами AB088578 и AB480587, содержащие позиции и/или индели, нарушающие фолдинг обобщенной вторичной структуры *Аppendiculatae*. Данный факт можно объяснить наличием ошибок при секвенировании. Для того чтобы избежать ложного филогенетического сигнала, мы решили исключить их из дальнейших анализов. Таким образом, в следующих этапах исследования использовались только те последовательности, которые согласовались со структурными данными обобщенных моделей вторичных структур транскриптов спейсеров ITS1 и ITS2.

Другой тип несоответствия был обнаружен также для последовательностей из GenBank. Последовательности ITS региона представителей *O. thyrsiflora* под номерами доступа AB480590 и AB088577 (Табл. 9) значительно отличались от полученных нами последовательностей этого вида. При проведении предварительных анализов было отмечено, что эти образцы проявляли высокую генетическую схожесть с таковыми *O. spinosa* (общие гаплотипы). Поэтому в таблицах 1 и 9 нами был указан *O. spinosa*, как основной источник ДНК, а *O. thyrsiflora* взят в скобки.

# 3.2. Анализ филогенетической структуры трибы Telephieae ('t Hart) Ohba and Thiede ined. по данным ITS региона рДНК

Данный этап исследования был направлен на изучение филогенетической структуры трибы Telephieae подсемейства Sempervivoideae с охватом большинства родов. Целью этого этапа работы было уточнить филогенетические связи (состав монофилетических групп/родов и порядок их ветвления) между основными «проблемными» линиями трибы: 1) подсекциями Orostachys и Appendiculatae рода Orostachys; 2) членами этих подсекций и родами Meterostachys и Hylotelephium; 3) членами трибы Telephieae и представителями рода Sinocrassula, а так же провести оценку времени диверсификации (молекулярную датировку) основных групп трибы.

Для этого был подготовлен набор данных из 38 нуклеотидных последовательностей (Табл. 8). При реконструкции методом ML с использованием сложной модели замен нуклеотидов (GTR+I+G модель) получено дерево, в котором виды Telephieae были распределены между двумя кладами. Первая устойчивая клада образована представителями подсекции *Appendiculatae* рода *Orostachys* и *Meterostachys sikokiana*, монотипного рода. Вторую кладу с невысокой поддержкой (65%) составили виды рода *Hylotelephium*, подсекции *Orostachys* рода *Orostachys* и виды *Sinocrassula* (Puc. 11).



Рисунок 11 – Филогенетическое дерево трибы Telephieae, основанное на сравнении нуклеотидных последовательностей ITS региона рДНК методом ML, модель GTR+I+G. Цифрами указана устойчивость ветвей, рассчитанная методом бутстрепа. Ветви с поддержкой 100% выделены утолщенными линиями. Жирным шрифтом обозначены последовательности таксонов, полученные в настоящем исследовании. Указаны индели и замены с позициями в универсальном выравнивании: синапоморфные в прямоугольниках и общие для некоторых групп. Клада *Appendiculatae* была хорошо структурирована и большинство ее внутренних ветвей оказались устойчивы. Она разделилась на две подклады: первая включала *O. spinosa*, *O. chanetii*, *O. japonica* (100%), вторая – *Meterostachys sikokiana* и *O. thyrsiflora* (80%). В устойчивой кладе (97%) вида *O. spinosa* была очевидна дивергенция последовательностей на две подклады, условно названные нами Восточной и Западной группами по географическому принципу (100 и 67% соответственно). Последовательности *O. japonica* образовали сестринскую группу к *O. chanetii*, однако статистическая поддержка была слабой (Рис. 11).

Как и в предыдущих исследованиях, клада *Hylotelephium–Orostachys* с умеренной поддержкой (86%) подсекции *Orostachys* была сестринской по отношениию к *Sinocrassula*, но порядок ветвления в ней остался неразрешенным (Рис. 11). Дивергенция последовательностей *Hylotelephium* была велика, что не позволило, вероятно, достоверно установить отношения между ними. Представители *Orostachys* подсекции *Orostachys*, напротив, мало отличались друг от друга и слагали обособленную группу с длинной ветвью в составе *Hylotelephium* (Рис. 11).

В последовательностях *Sinocrassula* обнаружены две мутации (Рис. 11), общие со всеми последовательностями представителей подсекции *Appendiculatae*: делеция С в поз.  $62_1$  и замена А $\rightarrow$ G в поз. 145 в ITS1 (номера позиций даны по универсальному выравниванию Nikulin с соавт., 2015), в то время как у представителей клады *Hylotelephium–Orostachys* подсекции *Orostachys* эти две мутации отсутствуют. Наличие большого числа общих мутаций позволило, вероятно, *Sinocrassula* группироваться с кладой трибы, тогда как в предыдущих анализах она занимала сестринское к Telephieae положение (Mayuzumi, Ohba, 2004; Гончарова и др., 2006). Появление общих мутационных событий может быть обусловлено двумя генетическими сценариями: приобретением этих признаков у предка *Sinocrassula* и Telephieae с дальнейшей утратой у *Hylotelephium* и *Orostachys* подсекции *Orostachys*, либо гомоплазией, т.е. независимым случайным приобретением. Такие сценарии могли быть актуальны и в случае другой мутации – вставки одного нуклеотида (Т в поз. 166 в ITS1), характерной для клады, велючающей *O. spinosa*, *O. chanetii*, *O. japonica* и вида *O. thyrsiflora*, за исключением *M. sikokiana* 

(Рис. 11). Еще одна мутация, вероятно, гомопластической природы, оказалась общей для вышеуказанной клады, слагаемой тремя видами, и представителями *Sinocrassula* (вставка A/G, поз. 12, ITS1).

В нашем анализе представитель *Meterostachys* достоверно (100%) был членом клады подсекции *Appendiculatae* и кластеризовался с *O. thyrsiflora*. Скрининг матрицы данных показал, что все члены клады *Appendiculatae* характеризуются четыремя общими заменами в различных участках ITS, отличающими их от остальных членов трибы Telephieae (Puc. 11). Преимущественно, эти мутации локализованы в более вариабельном ITS1 – три индели в первой спирали ITS1 (вставки A/G/T и G в поз. 42 и 43 соответственно) и делеция C/T в поз. 47<sub>1</sub>. Одна замена (A→G в поз. 95) обнаружена в середине консервативной третьей спирали ITS2. Данные мутации можно рассматривать в качестве молекулярных синапоморфий (Telford, 2002; Marin et al., 2003), приобретенных мутаций, возникших у предка группы (клады) и унаследованных ее членами (Рис. 11).

Говоря о кладах подсекций Orostachys и Appendiculatae рода Orostachys необходимо отметить, что они существенно отличаются длиной внутренних ветвей, отражающих дивергенцию слагающих их последовательностей. Этот факт косвенно указывает на относительную молодость видов в типовой подсекции, еще не успевших аккумулировать большое число мутаций, либо на повышенную скорость накопления замен у видов Appendiculatae (Никулин и др., 2015). Для обеих подсекций рассчитаны показатели: нуклеотидное разнообразие ( $\pi$ ), число полиморфных сайтов (pS) и количество информативных сайтов согласно методу максимальной экономии (nMP). Подсекция **Orostachys** характеризовалась  $\pi$ =0,007±0,001; pS=12; nMP=3, подсекция Appendiculatae:  $\pi$ =0,0620±0,010; *pS*=113; *nMP*=42. Величины этих параметров в последней подсекции превышают таковые в подсекции Orostachys почти на порядок. На рисунке 11 видно, что последовательности образцов O. spinosa из разных частей ареала больше отличаются друг от друга, чем виды в типовой подсекции. Эти различия нашли отражение в результатах молекулярной датировки.

Молекулярная датировка, основанная на данных о средних скоростях нуклеотидных замен в ITS регионе, впервые позволила произвести временную оценку дивергенции видов трибы (Никулин и др., 2015). Согласно результатам, возраст трибы Telephieae составляет около 30 млн. лет (Рис. 12).



Рисунок 12 – Байесовская хронограмма кладогенеза трибы Telephieae и близких к ней таксонов, выраженная в абсолютной временной шкале (млн. лет) с указанием соответствующих геологических эпох. Прямоугольники – 95% интервалы наивысшей апостериорной плотности оценок времени существования клад.

Дивергенция основных клад трибы Telephieae: *Sinocrassula*, *Orostachys* подсекции *Appendiculatae* и *Hylotelephium–Orostachys* подсекции *Orostachys* приходилась на относительно короткий период времени в первой половине миоцена – 20– 18 млн. л. н. Большинство видов *Orostachys* подсекции *Appendiculatae* и *Hylotelephium* возникли на границе миоцена и плиоцена – около 6 млн. л. н., тогда как виды подсекции Orostachys образовались значительно позднее – примерно 1,5 млн. л. н., Восточная и Западная линии популяций O. spinosa дивергировали около 3,5 млн. л. н.

# **3.3.** Реконструкция родственных отношений в подсекции Appendiculatae (Borissova) H. Ohba рода Orostachys

Следующим этапом исследования явилось построение первой молекулярной филогении подсекции *Appendiculatae* рода *Orostachys*. Результаты реконструкции родственных отношений в трибе Telephieae позволили нам сформулировать основные вопросы, которые требовали уточнения с использованием более представительного набора данных: 1) является ли род *Meterostachys* сестринским таксоном к подсекции *Appendiculatae* или ее членом; 2) сохраняется ли генетическая структурированность *O. spinosa* в большей выборке; 3) соответствуют ли генетические данные морфологическим особенностям конкретных видов подсекции. В качестве маркера также был выбран ITS регион рДНК, а для проведения анализов был использован набор данных из 94 нуклеотидных последовательностей растений *Orostachys* подсекции *Appendiculatae* и представителей внешней группы (Табл. 9).

Таблица 9 – Виды, используемые для реконструкции филогении *Orostachys* подсекции *Appendiculatae*, размер выборки и номера доступа нуклеотидных последовательностей ITS региона в базе данных GenBank

Вид	Код популяции	Размер выборки	Homep в GenBank
Meterostachys sikokiana	P1	1	AB088579
Orostachys chanetii	P2	1	AB480586
	P3	1	LK022055
O. japonica	P4	1	LK022056
	P5	1	LK022057
	P6	1	LK022057 / LK022058
	P7	1	LK022057 / LK022058

Рил	Код популяции	Размер Номер в GenBank	
Бид		выборки	Homep B Gelidalik
	P8	1	LK022057 / LK022058
	P9	3	LK022059
	P10	3	LK022060
	P11	1	LK022056
	P12	1	LK022061
O imperior	P13	1	LK022057 / LK022058
O. japonica	P14	1	LK022057 / LK022058
	P15	1	LK022057
	P16	1	LK022056
	P17	1	AB088576
	P18	1	AB480588
	P19	3	LK022062
	P20	1	LK022063
	P21	4	LK022064
	P22	3	LK022064
	P23	3	LK022064
	P24	3	LK022064
	P25	2	LK022064
	P26	3	LK022065
	P27	3	LK022065
	P28	3	LK022066
O. spinosa	P29	3	LK022067
	P30	1	LK022068
	P31	4	LK022069
	P32	2	LK022069
	P33	3	LK022070
	P34	4	LK022070
	P35	3	LK022070
	P36	3	LK022071
	P37	2	LK022068

Окончание таблицы 9

Duu	Код популяции	Размер	Homep в GenBank	
Бид		выборки		
	P38	2	LK022072	
	P39	3	LK022068	
O. spinosa	P40	1	LK022073	
	P41	1	LK022065	
	P42	1	AB480589	
	P43	1	LK022076	
	P44	1	LK022064	
O. spinosa	P45	1	LK022064	
(thyrsiflora)*	P46	1	LK022065	
	P47	1	AB480590	
	P48	1	AB088577	
O through ong	P49	1	LK022074	
0. ingrsijiora	P50	1	LK022075	
Sinocrassula indica	_	1	AB480611	
S. yunnanensis	_	1	AB088582	
Hylotelephium pseudospectabile	_	1	AM039917	

Примечание: код популяций соответствует таковому в таблице 1. Жирным шрифтом выделены нуклеотидные последовательности, полученные в данном исследовании. Звездочками отмечены образцы, положение которых на дереве противоречит указанной ранее видовой принадлежности (в скобках – название вида из коллекции или из базы данных GenBank).

Выявлено 28 риботипов, 14 из которых присутствовали в популяциях *O. spinosa*, ввиду наиболее представительной выборки (64 последовательности). Восемь риботипов этого вида обнаружены в каждой конкретной мономорфной популяции. Риботип R13 присутствовал в большинстве исследуемых популяций: P23–P25 из Алтая, P21 и P22 с Южного Урала, P44 и P45 образцы из культуры. Девять риботипов *O. japonica* обнаружены в 22-х последовательностях, причем 6 риботипов выявлены в мономорфных популяциях. Каждая последовательность *O*.

*thyrsiflora* и *O.chanetii* имела в нашем анализе отдельный риботип (Табл. 9). Стоит особо отметить, что нами не обнаружено общих риботипов для нескольких популяций и общих риботипов у разных видов.

В целом, среднее значение дивергенции последовательностей (*p*-дистанции) в нашем наборе данных (91 образец подсекции *Appendiculatae*) было относительно низким (0,0439±0,0045). Наименьшее значение обнаружено между образцами *O. japonica* (0,0136±0,0029), для *O. spinosa* было вдвое выше (0,0269±0,0045), а для *O. chanetii* дивергенция была еще более заметна и составила 0,0732±0,0114.

На филогенетическом дереве (Рис. 13), построенном методом ML на основании 28 риботипов подсекции *Appendiculatae* и трех последовательностей представителей внешней группы, были выделены четыре высоко поддержанные клады, соответствующие определенному виду: *O. spinosa* (98 и 98%, 1.00 в ML, MP, PP анализах соответственно), *O. japonica* (98 и 97%, 1.0), *O. chanetii* (91 и 70%, 1.0), и *O. thyrsiflora* (100 и 100%, 1.00). *M. sikokiana* оказался достаточно близок к *O. thyrsiflora*. Их умеренно поддержаная клада (79 и 61% в ML и MP соответственно) была сестринской к относительно высоко поддержаной (100 и 99%, 1.0) линии, содержащей *O. spinosa*, *O. japonica* и *O. chanetii*.

Клады видов *O. spinosa* и *O. japonica* были достоверно структурированы. Последовательности *O. spinosa* дивергировали на подклады/группы: Восточную, представляющую собой устойчивую линию (100 и 100%, 1.0) из 6 риботипов (R16–R20, R24), и Западную, включающую с низкой поддержкой (75 и 67% в ML и MP соответственно) риботипы R21 и R22 с Шантарских островов и Северо-Восточной Азии (Магаданская обл.) соответственно. Кроме этого, риботипы *O. spinosa* были сгруппированы согласно географическому расположению популяций. Все риботипы растений из Приморского края (R19, R20, R24), Амурской области (R16–R18), северо-восточной Азии (R21 и R22), Алтайских и Уральских предгорий (R13 и R26) и озера Байкал (R12, R14, R15, R27) образовали высоко и умеренно поддержанные группы (Рис. 13). Сходная, но чуть менее достоверная, картина наблюдается у вида *O. japonica*. Можно отметить географическую структурированность между его риботипами, выявленными на Корейском полуострове и Японии (R3–R5, R8, R9), и риботипами Дальнего Востока России и Северо-Восточного Китая (R6, R7, R10, R11).



Рисунок 13 – ML-дерево, основанное на данных сравнения 28 риботипов ITS региона рДНК (612 пн; модель GTR+I+G) четырех видов Orostachys и M. sikokiana. Поддержка ветвей указана для ML/MP/PP анализов. Бутстреп поддержка менее 50% и апостериорные вероятности менее 0.90 не рассматривались. Толстой линией отмечены ветви со 100% и 1.0 поддержками. В прямоугольниках приведены синапоморфные замены для клад. Последовательности видов Sinocrassula indica, S. yunnanensis и Hylotelephium pseudospectabile использованы в качестве внешней группы.

67

Как упоминалось выше, две нуклеотидные последовательности из базы данных GenBank (AB480590 и AB088577), а также большинство полученных из коллекции (P46–P50) образцов растений, обозначенных как *O. thyrsiflora*, кластеризовались в составе *O. spinosa*, не проявив близкого родства к двум последовательностям *O. thyrsiflora*, полученным в этом исследовании (Табл. 9; Рис. 13).

Расширенный набор последовательностей ITS региона для подсекции Appendiculatae, позволил обнаружить ряд молекулярных синапоморфий для всех основных клад, установленных в нашем анализе (Рис. 13). Все члены подсекции, включая Meterostachys, имели 4 общие замены, отличающие их от всех членов внешней группы \_ представителей ЛИНИИ Hylotelephium (Sinocrassula, *Hylotelephium*, и Orostachys подсекции Orostachys). В ITS1 это U<sub>125</sub> (между спиралями 2 и 3) и G<sub>144</sub> в концевой петле спирали 3. В ITS2 синапоморфными являются замены: спаренный G<sub>95</sub>, в паре G<sub>95</sub>-C<sub>175</sub> в спирали 3 и G<sub>208</sub> в концевой петле спирали 4 (Рис. 10, 13). Основные клады подсекции: O. thyrsiflora/Meterostachys и O. spinosa/O.japonica/O. chanetii характеризовались заменами каждая (А-G, поз. 221 в ITS1 и  $A \rightarrow T$ , поз. 104 в ITS2). Две синапоморфные замены в ITS2 (полукомпенсаторная C-G $\rightarrow$ T<sub>84</sub>-G<sub>185</sub> и A $\rightarrow$ G<sub>222</sub>) маркировали представителей вида *O. spinosa*, а три замены – членов Восточной подклады (замена, нарушающая образование пары G $\rightarrow$ A<sub>205</sub>, полукомпенсаторная замена G-T $\rightarrow$ A<sub>210</sub>-T<sub>176</sub> в ITS1 и полукомпенсаторная замена C-G $\rightarrow$ T<sub>49</sub>-G<sub>74</sub> в ITS2; Рис. 10, 12). Все последовательности *O. japonica* имели две синапоморфные вставки в концевой части спирали 4 ITS1 (А, между поз. 195–196, предположительно обеспечивающая формирование дополнительной пары Т<sub>190</sub>-А<sub>195-1</sub>; С между поз. 197-198 без пары). Кроме того, специфическими для вида были 2 замены: А→Т в поз. 212 ITS1, формирующая дополнительную пару  $T_{212}$ - $G_{174}$  и замена Т $\rightarrow$ С в пятом нуклеотиде ITS2 (Рис. 10).

## 3.4. Филогения и филогеография O. spinosa по данным хпДНК

Анализ данных ядерной ДНК позволил уточнить филогенетические отношения в трибе Telephieae, положение исследуемого вида в ней, а также риботипическую подразделенность популяций *O. spinosa*. Учитывая ограниченную информативность этого маркера на популяционном уровне, с целью более глубокого изучения генетической структуры и степени дифференциации популяций, было решено привлечь маркеры, характеризующиеся другим типом наследования, мутационной динамикой, и потенциальной информативностью, а именно межгенные спейсеры хпДНК.

Так как величина изменчивости нуклеотидных последовательностей межгенных спейсеров хпДНК может широко варьировать среди семейств и даже родов растений, нами был предпринят отбор наиболее информативных регионов для дальнейших анализов. Для этого мы произвели оценку внутри- и межпопуляционной вариабельности пяти межгенных спейсеров хпДНК на примере трех модельных популяций *O. spinosa*. Выбранные нами маркеры характеризовались высокой информативностью на низких таксономических уровнях во многих группах растений: trnH–psbA, trnQ–rpS16, rpl32–trnL, trnD–trnT, trnS–trnG (Shaw et al., 2005, 2007; Kozyrenko et al., 2013; Рис. 5). Секвенирование trnD–trnT и trnS–trnG(24 и 40 последовательностей соответственно) показало, что эти регионы характеризовались слабой полиморфностью на популяционном и видовом уровнях. Так, в trnD–trnT (760 пн) обнаружено всего 8 полиморфных сайтов, а в trnS–trnG (1330 пн) – два таких сайта, поэтому данные участки для дальнейших анализов не использовались.

В ходе данного этапа исследования определены по 207 нуклеотидных последовательностей каждого из трех спейсеров хпДНК (*trnH–psbA*, *trnQ–rps16*, *rpl32–trnL*) 25 популяций *O. spinosa* (Табл. 10). Таблица 10 – Популяции *O. spinosa*, используемые для оценки генетического разнообразия и популяционной структуры, размер выборки и номера доступа нуклеотидных последовательностей каждого региона в базе данных GenBank

N⁰	Код	Размер	Номер последовательности в GenBank			
п/п	популяции	выборки	trnH–psbA	trnQ–rps16	rpl32–trnL	
1	P20	1	LT222671	LT222878	LT223085	
2	P21	12	LT222541–LT222552	LT222748-LT222759	LT222955-LT222966	
3	P22	10	LT222566-LT222575	LT222773-LT222782	LT222980-LT222989	
4	P23	12	LT222627–LT222638	LT222834-LT222845	LT223041-LT223052	
5	P24	12	LT222639–LT222650	LT222846-LT222857	LT223053-LT223064	
6	P26	12	LT222603–LT222614	LT222810-LT222821	LT223017-LT223028	
7	P27	12	LT222615-LT222626	LT222822-LT222833	LT223029-LT223040	
8	P28	12	LT222554-LT222565	LT222761-LT222772	LT222968-LT222979	
9	P29	12	LT222651–LT222662	LT222858-LT222869	LT223065-LT223076	
10	P30	1	LT222667	LT222874	LT223081	
11	P31	15	LT222588-LT222602	LT222795-LT222809	LT223002-LT223016	
12	P32	3	LT222668-LT222670	LT222875-LT222877	LT223082-LT223084	
13	P33	12	LT222500-LT222511	LT222707-LT222718	LT222914-LT222925	
14	P34	12	LT222512–LT222523	LT222719–LT222730	LT222926-LT222937	
15	P35	12	LT222529–LT222540	LT222736-LT222747	LT222943-LT222954	

Окончание таблицы 10

N⁰	Код	Размер	Номер последовательности в GenBank			
п/п	популяции	выборки	trnH–psbA	trnQ-rps16	rpl32–trnL	
16 P36	12	LT222553;	LT222760;	LT222967; LT222990-		
	130	15	LT222576-LT222587	LT222783-LT222794	LT223001	
17	P37	4	LT222663-LT222665	LT222870-LT222872	LT223077-LT223079	
18	P38	3	LT222526-LT222528	LT222733-LT222735	LT222940-LT222942	
19	P39	8	LT222675-LT222682	LT222882-LT222889	LT223089-LT223096	
20	P40	2	LT222524–LT222525	LT222731-LT222732	LT222938-LT222939	
21	P41	1	LT222672	LT222879	LT223086	
22	P43*	1	LT222673	LT222880	LT223087	
23	P45*	1	LT222674	LT222881	LT223088	
24	P53	12	LT222683-LT222694	LT222890-LT222901	LT223097-LT223108	
25	P54	12	LT222695-LT222706	LT222902-LT222913	LT223109-LT223120	

Примечание: коды популяций соответствуют таковым в таблице 1. Звездочками отмечены образцы *O. spinosa (thyrsiflora)*, видовая принадлежность которых была изменена по результатам филогенетических анализов (в скобках – название вида из коллекции или из базы данных GenBank). В последовательностях трех спейсеров обнаружены замены нуклеотидов и инсерции/делеции (индели). Данные мутации четко дифференцировали популяции друг от друга, что свидетельствует о потенциальной информативности и пригодности выбранных молекулярных маркеров для исследования популяционной структуры *O. spinosa*.

Длина спейсера *trnH–psbA* варьировала незначительно (367±1,3 пн). Тем не менее, были отмечены инсерции, например, у представителей популяции Р38 Шантарских островов имелась маркирующая ее вставка 7 пн (ТАТАТТС в поз. 62–68), а достаточно длинная инсерция (14 пн; TTTAGTTTTATCCA; в поз. 308–321) была выявлена только в одной из 12 последовательностей популяции Р53 (Республика Алтай). Особый интерес представляет собой наличие инверсии 4 пн (поз. 245–248), возникшей, вероятно, в результате ошибки при репликации ДНК. Этот участок последовательности был исключен из матрицы данных и кодировался как единичное мутационное событие. Содержание ГЦ-оснований было относительно низким, всего 31%.

Межгенный спейсер trnQ-rps16 отличался значительной длиной, которая изменялась от 1234 до 1272 пн и в среднем составила 1244±7 пн. Максимальная длина была отмечена у двух последовательностей *O. spinosa* из Республики Алтай (Р23), а минимальная – у большинства растений из амурской популяции (Р31), которая характеризовалась делецией 8 пн (АТАААААС; в поз. 213–220). Образцы из популяций Р23, Р24 (Республика Алтай) и Р27 (Иркутская область) маркировались вставкой четырех нуклеотидов (АТТG; поз. 1194–1197). Последняя популяция характеризовалась, кроме того, инсерцией (13 пн; АТТТАААТАGGGG; в поз. 1157–1169), которая представляла собой дупликацию предшествующего мотива из 13 пн. А популяции Р21 и Р22 (Республика Башкортостан) маркировалась вставкой 7 пн (ТТТТАТТ в поз. 1071–1077). Вариабельность длины последовательностей также была обусловлена наличием мононуклеотидных повторов (поли-А и поли-Т, от 8 до 14 повторений). Содержание ГЦ-оснований этого региона было низким, 29%.
Протяженность межгенного спейсера *rpl32–trnL* составляла 614±1,5 пн и была обуславлена вставкой 7 пн (в поз. 368–374) в некоторых последовательностях популяций Р23, Р24 из Республики Алтай и поли-Т регионом в двух последовательностях последней популяции (5 повторов; поз. 384–388). В этом спейсере выявлена инверсия 50 нуклеотидов (поз. 278–327), которая была общей для популяций Р39 (Хабаровский край), Р45 (коллекция) и некоторых образцов Р31 (Амурская обл.). Содержание ГЦ-оснований равнялось 32%, что являлось максимальным значением у исследованных спейсеров.

Расчеты, произведенные на полной матрице данных (2330 пн; около 1,5% пластидного генома), для оценки мутационной динамики последовательностей показали, что при различной длине межгенных спейсеров (388–1316 пн) частота мутационных событий на 1 сайт варьировала от 0,04 до 0,08 (Табл. 11).

Характеристики	trnH–psbA	trnQ–rps16	rpl32–trnL
Длина выравнивания, пн	388	1316	626
Общее число мутаций	31	62	25
Частота возниконовени мутаций, N/пн	0,08	0,05	0,04
Число вариабельных (полиморфных) сайтов	29	61	25
Число МР- информативных сайтов	19	51	12
Общее число инделей	2	20	3
Консервативные регионы (позиции в об- щей матрице)	1–57	1–87; 159–224; 226–292; 310–381; 560–626; 628–706; 1016–1080	1–76; 448– 518; 535– 621

Таблица 11 – Полиморфизм последовательностей межгенных спейсеров *trnH*– *psbA*, *trnQ*–*rps16* и *rpl32*–*trnL* хпДНК в популяциях *O*. *spinosa* 

Максимальное значение соответствовало спейсеру *trnH–psbA* – 8 мутаций на 100 нуклеотидов. Спейсер *trnQ–rps16* имел большое количество информативных сай-

тов, а также инделей, средняя длина которых не превышала 4 пн. Необходимо отметить, что в этом регионе обнаружены 7 консервативных участков: начало спейсера и шесть участков длиной по 65–75 нуклеотидов, расположенных случайно. В последовательностях межгенных спейсеров *trnH–psbA* и *rpl32–trnL* обнаружены мутации по типу инверсий, например в *trnH–psbA* (мотив GAAA→TTTC в поз. 245–248). Популяции Р33, Р34, Р35, Р36 (Приморский край), Р37 (Хабаровский край), Р29 (Китай) содержали исключительно вариант GAAA, а популяции Р38 (Шантарские острова), Р30 (Амурская обл.) и Р32 (Китай) – только TTTC мотив. Основная масса популяций *O. spinosa* содержала оба мотива в различных пропорциях, что и позволило нам сделать вывод о ее гомопластическом характере.

Подобные инверсии, не влияющие на длину последовательности, резко увеличивают число отличий между последовательностями, так как они представляют собой одно мутационное событие, а не многократные независимые замены нуклеотидов (Рис. 14). Так, в случае GAAA—TTTC, речь идет лишь об одном мутационном событии, а не о четырех отдельных. Вероятная причина возникновения подобного вида мутаций состоит в неправильном прохождении ДНК-полимеразы по верхушечной петле во время репликации: не справа налево, а слева направо (Borsch, Quandt, 2009; Рис. 14).

Есть три различных способа использования подобного мутационного события. Первый, когда район инверсии исключается из матрицы данных, однако информация об этой мутации теряется; второй, когда участок может быть искусственно инвертирован в выравнивании, но также будет потеряна информация о мутационном событии; третий, в котором используется кодирование отличий между последовательностями в виде бинарного кода: 1 – наличие определенного мотива/события, 0 – его отсутствие (Quandt et al., 2003), что сохраняет филогенетическую информацию. Согласно третьему сценарию, индели и гомополимерные участки длиной более 3 пн во всех спейсерах были закодированы и внесены в матрицу данных. Таким образом, длина матрицы сократилась и составила 2300 пн.



Рисунок 14 – Пример инверсии участка нуклеотидной последовательноси межгенного спейсера *trnH–psbA*. Прямоугольниками обозначены границы инверсии, прямой и обратный варианты. Показан предполагаемый механизм происхождения инверсий в хпДНК (по: Borsch, Quandt, 2009 с изменениями).

## 3.4.1. Гаплотипический анализ популяций O. spinosa

Выявленная нуклеотидная изменчивость обусловила присутствие большого числа гаплотипов хпДНК (далее хлоротипов). Анализ 207 последовательностей 25 популяций выявил 86 хлоротипов, отношения между которыми были визуализированы в виде сети (Рис. 15). Особый интерес представляет тот факт, что исследуемые популяции *O. spinosa* практически не имеют общих хлоротипов, кроме географически близких популяций (не более 100 км друг от друга) Р34, Р35 (Приморский край) и Р26, Р27 (Иркутская обл.), которые имели хлоротипы Н7 и Н31 соответственно (Рис. 15).



Рисунок 15 – Генеалогическая сеть хлоротипов *O. spinosa*. Окружности пропорциональны частотам встречаемости соответствующего хлоротипа (справа вверху). Черные точки – гипотетические хлоротипы. Отрезки соответствуют одному мутационному шагу. Коды популяций соответствуют таковым в таблице 1. Образцы из частной коллекции P20, P41, P43, P45 окрашены одним цветом.

Сеть хлоротипов состоит из двух дивергентных гаплогрупп, разделенных самой длинной ветвью сети – 11 мутационных шагов (Рис. 15). В первой группе (Восточная группа) объединены 27 хлоротипов (92 образца), обнаруженные в 10 популяциях из восточной части ареала вида – РЗО и РЗ1 Амурской обл.; РЗ7 и РЗ9 Хабаровского края; РЗ3–РЗ6 из Приморского края; Р29 и РЗ2 из Китая. Неожиданным оказался тот факт, что гаплотипы, выявленные на Шантарских островах (Н9 и Н10) и Магаданской обл. (Н8), не входили в эту группу. Топологически в Восточной группе можно отметить дивергенцию на Амуро-Китайскую (Н61–Н65, Н27–Н30) и Приморскую (Н1–Н7, Н11–Н13, Н17, Н25–Н26) линии. В последней линии большинство хлоротипов были связаны, в основном, одномутационными переходами (Рис. 15). Данный паттерн распределения гаплотипов, скорее всего, обусловлен относительно недавним заселением *O. spinosa* этой территории.

Вторую группу (Западная группа) сформировали 59 хлоротипов популяций Хабаровского края (Р38), Магаданской обл. (Р40), Республики Башкортостан (Р21, Р22), Забайкальского края (Р28), Иркутской обл. (Р26, Р27), Республики Алтай (Р23, Р24, Р53), Новосибирской обл. (Р54) и садовых образцов из коллекции: Р20, Р41, Р43, Р45 (Рис. 15).

Количество уникальных гаплотипов в сети велико – 59 (68%). Уникальным считается гаплотип, имеющий оригинальную нуклеотидную последовательность и обнаруженный только в одном образце. В Восточной группе выявлено 16 уникальных гаплотипов хпДНК, тогда как в Западной – 43. В последней группе большинство из них (28) отмечены в трех популяциях *О. spinosa* из Северного Алтая. Образцы данных популяций характеризовались высокой изменчивостью нуклеотидных последовательностей, результатом чего стало отсутствие какихлибо закономерностей распределения в пуле алтайских хлоротипов. Наличие петлевых структур в сети может, вероятно, быть результатом высокого уровня рекомбинации и/или гомоплазии, которая нередко встречается в хпДНК. Интересно отметить отличия в степени дивергенции последовательностей между отдельными линиями внутри Западной группы. Например, хлоротипы H8–H10 североазиатской линии отличались семью мутационными шагами от алтайских, хлоро-

типы H85–H86 новосибирской и H31–H38 иркутской линии – девятью нуклеотидными заменами. Достаточно небольшими мутационными отличиями от алтайского пула хлоротипов характеризовались H14–H16, H23–H24 (P21 и P22, Республика Башкортостан), и H18–H22 (P28, Забайкальский край), причем все эти популяции географически удалены от алтайских более чем на 1900 километров, популяции P21 и P22 расположены западнее, а P28 – восточнее. Хлоротипы H18–H22 популяции Читинской обл. (P28) образуют единую ветвь с одним алтайским хлоротипом (H41), который удален от них на 9 мутационных шагов (Puc. 15).

Для подтверждения наличия филогенетической структуры, мы рассчитали показатели  $G_{ST}$  и  $N_{ST}$ . Первый учитывает только частоты гаплотипов, второй – сходство гаплотипов. Установлено, что  $G_{ST}$ =0.501 (p<0.01), а  $N_{ST}$ =0.822 (p<0.01). Более высокое значение для  $N_{ST}$ , чем  $G_{ST}$  (p<0.05) указывает на присутствие филогеографической структуры.

## 3.4.2. Оценка генетического разнообразия популяций O. spinosa

Основные параметры генетического разнообразия 25 анализируемых популяций представлены в таблице 12. Показатели гаплотипического (h) и нуклеотидного ( $\pi$ ) разнообразия, среднего числа парных нуклеотидных различий (Pi) широко варьировали (0,0000–1,0000; 0,0000–0,0143; 0,0000–32,651515 соответственно). Самыми высокими значениями данных параметров характеризовались все популяции с Алтая (P23, P24, P53), из которых максимальными – популяция P24. Среди популяций из Восточной группы высокими показателями отличалась P35 из Анучинского р-на Приморского края (0,5606; 0,002615; 5,833333). Популяции P20, P30, P32, P41, P43, P45 характеризовались нулевыми значениями параметров генетического разнообразия, так как были представлены в анализе или одним образцом, или были мономорфными.

№ п/п	Код популяции	Размер выборки	S	pS	nH	nHu	h (SD)	$\pi$ (SD)	Pi
1	P20	1	2226	0	1	1	0,0000 (0,0000)	0,000000 (0,000000)	0,000000 (0,000000)
2	P21	12	2230	7	3	1	0,5606 (0,1540)	0,000584 (0,000441)	1,303030 (0,873753)
3	P22	10	2230	4	2	0	0,4667 (0,1318)	0,000837 (0,000590)	1,866667 (1,163922)
4	P23	12	2265	81	10	8	0,9848 (0,0403)	0,013914 (0,007365)	31,515152 (14,816008)
5	P24	12	2269	78	12	12	1,0000 (0,0340)	0,014390 (0,007611)	32,651515 (15,338317)
6	P26	12	2240	4	2	0	0,1667 (0,1343)	0,000298 (0,000276)	0,6666667 (0,548651)
7	P27	12	2247	48	6	4	0,8939 (0,0777)	0,008152 (0,004384)	18,318182 (8,749109)
8	P28	12	2222	13	5	4	0,6818 (0,1482)	0,001514 (0,000939)	3,363636 (1,853185)
9	P29	12	2224	3	2	1	0,3182 (0,1637)	0,000225 (0,000231)	0,500000 (0,456254)
10	P30	1	2221	0	1	1	0,0000 (0,0000)	0,000000 (0,000000)	0,000000 (0,000000)
11	P31	15	2227	27	4	3	0,3714 (0,1532)	0,002540 (0,001447)	5,657143 (2,874093)
12	P32	1	2219	0	1	1	0,0000 (0,0000)	0,000000 (0,000000)	0,000000 (0,000000)
13	P33	12	2229	5	4	2	0,6970 (0,0904)	0,001040 (0,000688)	2,318182 (1,362033)
14	P34	12	2220	2	3	1	0,4394 (0,1581)	0,000321 (0,000291)	0,712121 (0,573042)
15	P35	12	2231	23	3	2	0,5606 (0,1540)	0,002615 (0,001514)	5,833333 (2,999650)

Таблица 12 – Генетическое разнообразие в популяциях *O. spinosa* по данным межгенных спейсеров *trnH–psbA*, *trnQ– rps16* и *rpl32–trnL* хпДНК

Окончание	таблицы	12
-----------	---------	----

№ п/п	Код популяции	Размер выборки	S	pS	nH	nHu	<i>h</i> (SD)	$\pi$ (SD)	Pi
16	P36	13	2220	5	3	2	0,2949 (0,1558)	0,000347 (0,000304)	0,769231 (0,600139)
17	P37	4	2221	0	1	0	0,0000 (0,0000)	0,000000 (0,000000)	0,000000 (0,000000)
18	P38	3	2232	10	2	1	0,6667 (0,3143)	0,002987 (0,002418)	6,666667 (4,327835)
19	P39	8	2225	9	5	3	0,8571 (0,1083)	0,001814 (0,001153)	4,035714 (2,251321)
20	P40	2	2226	0	1	0	0,0000 (0,0000)	0,000000 (0,000000)	0,000000 (0,000000)
21	P41	1	2223	0	1	1	0,0000 (0,0000)	0,000000 (0,000000)	0,000000 (0,000000)
22	P43*	1	2224	0	1	1	0,0000 (0,0000)	0,000000 (0,000000)	0,000000 (0,000000)
23	P45*	1	2218	0	1	1	0,0000 (0,0000)	0,000000 (0,000000)	0,000000 (0,000000)
24	P53	12	2250	58	10	8	0,9697 (0,0443)	0,006505 (0,003531)	14,636364 (7,055687)
25	P54	12	2226	8	2	1	0,1667 (0,1343)	0,000599 (0,000449)	1,333333 (0,888668)

Примечание: S – кол-во исследованных сайтов; pS – кол-во полиморфных сайтов; nH – кол-во гаплотипов; nHu – кол-во уникальных гаплотипов; h – гаплотипическое разнообразие;  $\pi$  – нуклеотидное разнообразие; Pi – среднее число парных различий; SD – стандартное отклонение. Коды популяций указаны в соответствии с таблицей 1. Звездочками отмечены образцы *O. spinosa (thyrsiflora)*, видовая принадлежность которых была изменена по результатам филогенетических анализов (в скобках – название вида из коллекции или из базы данных GenBank). Анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) всей выборки *O. spinosa* выявил достоверно высокую общую межпопуляционную дифференциацию (F<sub>st</sub>=0,76364, *p*<0,001; Табл. 13), на долю которой приходится 76,4% вариабельности, а на долю внутрипопуляционной дисперсии – 23,6%.

Источник	d.f.	Сумма	Компонента	% общей из-	Индекс						
изменчивости		квадратов	изменчивости	менчивости	фиксации						
одна группа: все исследуемые популяции											
Между	24	2509 395	12 35077	7636	For-0 76364*						
популяциями	27	2507,575	12,55077	70,50	151-0,70501						
Внутри	107	605 740	2 82275	22.64							
популяций	102	095,740	5,62275	23,04							
Всего	206	3205,135	16,17352								
две группы (Западная и Восточная)											
Между	1	301 016	2 88773	16 30	E <sub>cr</sub> =0.16302*						
группами	1	571,710	2,00775	10,50	171-0,10302						
Между											
популяциями	23	2117,479	11,00355	62,12	F <sub>sc</sub> =0,74216*						
внутри групп											
Внутри	100	605 740	2 80075	21 59	E _0 79420*						
популяций	182	093,740	3,82273	21,38	Γ <sub>ST</sub> =0,/8420*						
Всего	206	3205,135	17,71402								

Таблица 13 – Результаты анализа молекулярной дисперсии (AMOVA)

Примечание: d.f. - степени свободы; F<sub>ST</sub> – компонента изменчивости, связанная с межпопуляционной изменчивостью; F<sub>CT</sub> – компонента изменчивости, связанная с межгрупповыми различиями; F<sub>SC</sub> – компонента изменчивости, связанная с различием популяций внутри априорно сформированных групп; \* *p*<0,001. Уровень значимости определен на основе 1023 пермутаций.

Иерархический анализ распределения генетической изменчивости показал, что только 16,3% от общей дисперсии обусловлено различиями между Западной и

Восточной группами, а генетические различия между популяциями в группе и внутрипопуляционная изменчивость составили 62,12 и 21,58% соответственно (Табл. 13).

Для проверки гипотезы о демографической экспансии *O. spinosa* проведен тест на распределение парных различий (mismatch distribution test) для 16 популяций, которые были представлены 8 и более образцами (Рис. 16). Графики, построенные для популяций из Западной группы, в основном, имеют мультимодальный характер, что предполагает демографическое равновесие, другими словами, длительную популяционную стабильность (Рис. 16а). Распределение парных генетических различий в популяциях Восточной группы показывает практически полное совпадение с ожидаемым унимодальным распределением модели экспансии (Рис. 16б). Данные графики свидетельствуют о быстром росте популяций в недавнем прошлом (Harpending et al., 1998).



Рисунок 16 – Графики парного распределения нуклеотидных различий в популяциях *O. spinosa*. По оси абсцисс указано число парных различий между последовательностями, по оси ординат – их частота. Сплошная линия – ожидаемое распределение, пунктир – наблюдаемое. Коды популяций указаны в соответствии с таблицей 1.

### 3.4.3. Анализ внутривидовых филогенетических отношений

С целью реконструкции филогенетических отношений между представителями исследуемых популяций *O. spinosa* (86 хлоротипов, 25 популяций, 2300 пн) построена кладограмма методом МР (Рис. 17). В целом, топология сходным образом отражала картину генеалогических связей хлоротипов *O. spinosa*. Однако, поддержки ветвей, в основном, оказались низкие (40–50%). Умеренной и высокой бутстреп поддержкой (70–99%) характеризовались популяции, хлоротипы которых проявляли значительную генетическую дивергенцию в сети (Рис. 15). Таким образом, генетическая изменчивость нуклеотидных последовательностей не позволила получить достоверный порядок ветвления между кладами и популяциями.

Как и в генеалогической сети, нами была установлена дивергенция популяций на Восточную и Западную группы, поддержанная высоким значением бутстрепа (96%; Рис. 17). Распределение популяций между этими группами было идентичным в двух анализах. В составе Восточной группы поддержку имели клады популяций Р33, Р35 и Р31 (71, 89 и 99% соответственно). В Западной группе высокой поддержкой характеризовалась только ветвь (92%), которая объединяла образцы популяции из Новосибирской области (Р54). Как и в анализе генеалогических отношений (Рис. 15), на кладограмме отмечена высокая дивергенция образцов из Алтайского края, а также их близость с представителями популяций Р27 и Р28 из Иркутской области (Рис. 17).

В ходе поиска уникальных молекулярных признаков, характерных для исследуемых групп, были обнаружены две мутации в межгенном спейсере trnQ– rps16, которые маркировали эти группы популяций: А $\rightarrow$ G в позиции 141 и А $\rightarrow$ T в позиции 1136 соответственно. Мы полагаем, что обнаруженные замены в этом регионе хпДНК позволяют достоверно определить, из какой группы популяций *O*. *spinosa* был взят образец.

84



Рисунок 17 – Консенсусная МР-кладограмма (более 500 000 деревьев) гаплотипов *О. spinosa* (86 гаплотипов хпДНК, 2300 пн). Для удобства терминальные клады гаплотипов слиты в виде треугольников. Коды популяций указаны в соответствии с таблицей 1. Цифрами указана устойчивость ветвей, рассчитанная методом бутстрепа (1000 реплик). В серый прямоугольник включены гаплотипы и популяции, принадлежащие к Западной группе.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное молекулярно-генетическое исследование, основанное на сравнении нуклеотидных последовательностей маркеров ядерной и хпДНК, позволило существенно дополнить имеющиеся представления о месте *O. spinosa* в трибе Telephieae, в роде *Orostachys*, а также произвести датировку основных событий истории вида. В ходе проведения анализа большого набора данных была впервые построена филогения подсекции *Appendiculatae* и обозначены определенные несоответствия с предыдущими результатами. Изучена генетическая изменчивость и популяционная структура *O. spinosa*. Полученные результаты позволяют сделать выводы относительно филогеографии этого вида.

#### 4.1. Изменчивость последовательностей ITS региона рДНК

Нуклеотидные последовательности ITS региона рДНК растений рода Orostachys подсекции Appendiculatae характеризовались высокой генетической дивергенцией и оказались достаточно информативными для исследования филогенетических отношений на разных уровнях: для установления родства между близкими родами Orostachys, Hylotelephium, Meterostachys, Sinocrassula и между близкородственными видами O. spinosa, O. chanetii, O. japonica и O. thyrsiflora, a также для изучения филогеографии широко распространенного вида O. spinosa. Говоря об изменчивости последовательностей ITS региона следует отметить, что только 67,2% нуклеотидов в ITS1 и 74% в ITS2 были консервативны. Данная особенность вызвала значительные проблемы с выравниванием последовательностей друг относительно друга. Чтобы осуществить однозначное выравнивание многих спорных участков нуклеотидных последовательностей для создания матрицы данных, нам потребовалось использовать информацию о вторичной структуре спейсерных участков. Построение обобщенных моделей вторичной структуры транскриптов ITS1 и ITS2, а также создание универсальной системы нумерации (Рис. 10), позволили восстановить гомологию нуклеотидных позиций в выравнивании (Nikulin et al., 2015). Достоверность реконструкции моделей подтверждается типичной четырехстеблевой конфигурацией вторичных структур, положением

нескольких структурных особенностей, характерных для покрытосемянных растений (консервативные мотивы первичной и вторичной структуры), наличием компенсаторных и полукомпенсаторных замен в спиралях (Nikulin et al., 2015).

Полученные нами данные относительно мутационной динамики свидетельствуют о разнице в степени дивергенции между видами Orostachys подсекции Appendiculatae. Наибольшей вариабельностью последовательностей характеризовались виды O. spinosa и O. chanetii, в отличие от O. japonica и O. thyrsiflora. Для последнего вида это может объясняться ограниченной выборкой (всего 2 образца), в то время как O. japonica в анализе был представлен 23-мя образцами 16 популяций, охватывающими большую часть ареала. Вообще, для представителей подсекции Appendiculatae были отмечены более высокие уровни генетической изменчивости последовательностей ITS региона, чем для типовой подсекции Orostachys. В первой подсекции на основании 94 последовательностей было обнаружено 27 риботипов (Рис. 13), тогда как для типовой подсекции рода Orostachys – 7 риботипов у 86 последовательностей (Kozyrenko et al., 2013).

Внутригеномные варианты рДНК у растений встречаются довольно часто (Denduangboripant, Cronk, 2000; Bailey et al., 2003; Xiao et al., 2010; Peng et al., 2010; Simon et al., 2012; Song et al., 2012; Matyasek et al., 2012). Полиморфизм такого рода обнаружен нами в гомополимерном регионе ITS1 (риботипы R4 и R5) у пяти образцов *O. japonica* (Табл. 1; Рис. 9, 10), принадлежавших исключительно культивируемым растениям (популяции P6, P7, P8, P13, P14). Кроме того, риботип R4 был обнаружен в популяциях P5, P11 и P15 (Табл. 1). Факт наличия как минимум пары вариантов последовательности ITS региона в упомянутых образцах растений не учитывался нами при реконструкции дерева. В недавних исследованиях (Chen et al., 2012b; Song et al., 2012) чтение нуклеотидных последовательностей осуществлялось методом пиросеквенирования, и было показано, что внутригеномная изменчивость не оказывает большого влияния на достоверность реконструкции филогенетических связей. Таким образом, исключение из матрицы данных информации о внутригеномном полиморфизме практически не несет потери филогенетически важных признаков.

Особый интерес в последовательностях ITS региона представляют молекулярные синапоморфии – уникальные признаки, маркирующие линии (Рис. 11, 13). Обнаружение синапоморфий имеет большое значение для систематики, так как изучаемая нами группа растений является высоко полиморфной в морфологическом плане и не имеет отличительных фенотипических признаков.

Анализ последовательностей ITS региона представителей трибы Telephieae, четырех видов Orostachys и Meterostachys sikokiana выявил одну синапоморфную замену (A $\rightarrow$ G в позиции 95, ITS2), отличающую представителей Orostachys подсекции Appendiculatae, в том числе и Meterostachys, от остальных членов трибы. Филогенетическая значимость остальных мутаций, найденных в этой ветви достоверно не была установлена как в первом (в ITS1: \_ $\rightarrow$ A/G/T, \_ $\rightarrow$ G в поз. 42 и 43 соответственно; C/T $\rightarrow$ \_ в поз.47<sub>1</sub>, C $\rightarrow$ \_ в поз. 62<sub>1</sub>, A $\rightarrow$ G в поз. 145; Рис. 11), так и во втором анализе (C $\rightarrow$ T, поз. 125, A $\rightarrow$ G, поз. 144 в ITS1; C $\rightarrow$ G в поз. 208, ITS2; Рис. 13). Однако в филогенетическом контексте интересны замены, выявленные у O. spinosa (в ITS2: G $\rightarrow$ T в поз. 84 и A $\rightarrow$ G в поз. 222), и в двух дивергентных группах (в ITS1: G $\rightarrow$ A в поз. 205 и G $\rightarrow$ A в поз. 210; C  $\rightarrow$ T в поз. 49, ITS2; Рис. 13).

Сестринские отношения между представителями рода *Sinocrassula* и кладой *Hylotelephium/Orostachys* подсекции *Orostachys* (Рис. 11) оказались несколько неожиданными, поскольку ранее этот род всегда достоверно занимал базальное положение на дереве Telephieae (Mayuzumi, Ohba, 2004; Гончарова и др., 2006). Мы определелили признаки, которые привели к изменению положения *Sinocrassula* на дереве. Предположительно, ими являются три мутации в ITS1:  $\_\rightarrow$ R, в позиции 12, С→\_ в поз. 62<sub>1</sub> и А→G в поз. 145. Вероятно, именно включение в анализ новых последовательностей представителей подсекции *Appendiculatae*, несущих эти признаки, и обусловило изменение положения *Sinocrassula*. Этот факт подчеркивает важность полноты выборки и качества исходных данных для филогении. Однако полученный нами результат, ввиду слабой поддержки в анализе (65%), требует подтверждения с включением большего числа образцов и видов *Sinocrassula*. Этот таксон насчитывает не менее 7 видов, распространенных, преимущественно, в Гималаях и Тибете. Приуроченность к региону, где предположительно возникли Теlephieae (Mayuzumi, Ohba, 2004), косвенно поддерживает базальное положение *Sinocrassula* в трибе. Вместе с тем, более западный ареал части видов из подсекции *Appendiculatae* рода *Orostachys* (северный Казахстан, юг и юго-запад Сибири, Монголия) так же не противоречит тому, что эта группа может рассматриваться в качестве базальной ветви клады Telephieae, поскольку ее предковые формы имели возможность раньше достигнуть данную территорию при продвижении из Средиземноморья, чем *Sinocrassula* – Гималаев.

Результаты нашего исследования показывают, что проведенные ранее анализы, основанные на относительно небольшой выборке последовательностей ITS региона рДНК, могли привести к ошибочным выводам в филогенетических исследованиях некоторых групп толстянковых. Например, установленные ранее сестринские отношения между *Meterostachys sikokiana* и подсекцией *Appendiculatae* (Mayuzumi, Ohba, 2004), подтвердившие тем самым родовой статус первого вида, нами подвергаются сомнению. Более близкие отношения между этими таксонами (Puc. 13) были поддержаны не только высокими значениями бутстрепа (100% и 100%, 1.00 в ML, MP, PP анализах соответственно), но и наличием четырех синапоморфий. Таким образом, род *Meterostachys* достоверно является членом клады подсекции *Appendiculatae*, а не ее сестринским таксоном, как это считалось ранее (Mayuzumi, Ohba, 2004; Гончарова и др., 2006).

В одном из первых таксономических исследований этой группы Ови (Ohwi, 1953) включил *Meterostachys* в состав рода *Orostachys* на основании общих для двух таксонов розеточной биоморфы и цвета лепестков. Хедиаки Оба (Ohba, 1978) полагал, что пазушные метельчатые соцветия и сросшиеся у основания тычинки отличают *Meterostachys* от *Orostachys* с его колосовидными (початковидными), обычно простыми, или кистевидно-колосовидными фрондознобрактеозными соцветиями. Точка зрения этого автора была принята в большинстве таксономических обработок толстянковых, в том числе и в последних ревизиях семейства (Eggli et al., 1995; Ohba, 2001, 2005). Полученные нами данные ставят вопрос о пересмотре концепции *Meterostachys* (Никулин и др., 2015).

В качестве общих фенотипических признаков для подсекции Appendiculatae и рода Meterostachys можно назвать лишь розеточную жизненную форму и нали-

чие хрящеватого шипика на конце листа. Ни один из этих признаков нельзя рассматривать в качестве синапоморфии клады *Meterostachys/Orostachys* подсекции *Appendiculatae*, поскольку они являются гомопластичными и характерны для многих групп толстянковых (Mort et al., 2001; Thiede, Eggli, 2007). Следует отметить, что *M. sikokiana* и близкий к нему *O. thyrsiflora* не только различаются морфологически, но и имеют удаленные друг от друга ареалы, что указывает на давнюю дивергенцию этих видов, около 10 млн. лет назад (Рис. 12). Если современное распространение *Meterostachys* ограничивается Корейским полуостровом и Японией (однажды упоминался для провинции Сычуань в Китае; Бялт, 1997), то ареал *O. thyrsiflora* находится значительно западнее: от Южного Урала до Монголии. Таким образом, мы наблюдаем противоречие между филогенетическими реконструкциями и ботанической классификацией. Однако на данном этапе преждевременно говорить о включении *M. sikokiana* в состав рода *Orostachys*. Необходимо подтвердить полученные молекулярно-генетические данные с привлечением дополнительных образцов *Meterostachys* и других молекулярных маркеров.

Таким образом, результаты филогенетического анализа ITS региона рДНК представителей рода *Orostachys* (Рис. 11) согласуются с ранее высказанными представлениями (Mayuzumi, Ohba, 2004; Гончарова и др., 2006; Гончарова, Гончаров, 2009) о полифилии рода *Orostachys* и требуют соответствующих таксономических корректив. Учитывая, что типовой вид рода (*O. malacophylla*) вошел в состав клады *Hylotelephium*, а подсекция *Appendiculatae* является самостоятельной кладой, она заслуживает выделения в отдельный род, либо объединения с родом *Meterostachys* под именем последнего, поскольку оно будет иметь право приоритета (Никулин и др., 2015).

На основании анализа ITS региона (94 последовательности; Табл. 9) представителей Orostachys подсекции Appendiculatae и информации о вторичной структуре ITS1 и ITS2 построена первая устойчивая филогения группы (Рис. 13). Достоверность результатов подтверждается высокими значениями поддержек ветвей, определенных тремя разными методами (MP, ML, PP). Как и в предыдущем анализе, монотипный род Meterostachys вошел в состав подсекции Appendiculatae (Рис. 13) и показал сродство с O. thyrsiflora. Также подтверждено четкое разграничение близкородственных видов *O. spinosa, O. japonica, O. chanetii* и *O. thyrsiflora*, образцы которых образовали отдельные клады (Рис. 13).

Еще одним важным моментом в нашем исследовании является проблема ошибок в нуклеотидных последовательностях, депонированных в базу данных GenBank нашими коллегами. При детальном поиске уникальных молекулярных особенностей, а также при построении моделей вторичных структур и проведении предварительных филогенетических анализов (результаты не показаны) нами были выявлены последовательности с ошибками, применение которых в филогенетических исследованиях возможно, но с большими ограничениями. В нашем первоначальном наборе данных были найдены последовательности с очевидными ошибками секвенирования (вплоть до отличий в гене 5.8S), а также последовательности, для которых был неправильно указан источник ДНК, например, для двух последовательностей *O. thyrsiflora* из GenBank, которые достоверно слились с риботипами *O. spinosa* (P47, P48). Соответствующие отметки были сделаны в таблицах 1 и 9.

Факт несоответствия генетических и морфологических данных был отмечен еще для четырех образцов O. thyrsiflora, представленных садоводческим материалом из частной коллекции (P43-P46), которые вошли в кладу O. spinosa. Только две последовательности также культурных растений (Р49, Р50) показали удаленность от O. spinosa, образуя отдельную устойчивую видовую кладу (Табл. 9; Рис. 13). В связи с этим, наши данные свидетельствуют, что морфологические особенности не всегда являются достаточным основанием для разграничения некоторых видов. В частности, это относится к дифференциации O. thyrsiflora от O. spinosa и O. cartilaginea Boriss. от O. japonica. Даже если не принимать во внимание образцы из коллекции, имеющие часто сомнительную идентификацию, мы не можем отрицать возможную путаницу при определении этих четырех видов, особенно тех образцов растений, которые были взяты до периода цветения. Различия между O. spinosa и O. thyrsiflora заключаются в цвете лепестков (желтоватые и белорозовые соответственно), цвете пыльников (желтые и малиновые или темнопурпурные) и в килеватых листьях у O. thyrsiflora. Эти особенности обычно хорошо сохраняются у гербарных растений и являются достаточно заметными при

выращивании в культуре. К сожалению, нам не известен цвет лепестков образцов *O. thyrsiflora*, которые были секвенированы ранее, как и фрагментов *O. thyrsiflora*, полученных нами из частной коллекции. Однако для всех образцов этого вида, у которых был отмечен розовый цвет лепестков, видовая принадлежность подтверждена и генетическими методами. В то же время, абсолютно все ошибочно определенные O. thyrsiflora из коллекции имели килеватые листья, характерные для этого вида, но никак не для O. spinosa. Основываясь на этих фактах, мы пришли к выводу, что с помощью такого признака как морфология листа невозможно достоверно отличить O. thyrsiflora от O. spinosa. Необходимо отметить, что ареалы этих двух видов перекрываются (от востока Монголии и Восточного Саяна до Южного Урала и севера Казахстана). Хотя экологические ниши этих видов схожи, они редко встречаются симпатрически (Бялт, 1999а). Например, в ходе сбора растений, осуществленного в районах их общего произрастания, коллегами были обнаружены пять популяций O. spinosa и только две популяции O. thyrsiflora, что наводит на мысль об относительно редкой встречаемости этого вида, по крайней мере, в восточной и северной частях его ареала.

Полученные в данном исследовании результаты подтверждают наблюдения С.Б. Гончаровой (2006б), что морфологически *O. cartilaginea* ничем не отличается от *O. japonica*. При этом, у *O. cartilaginea* в *locus classicus* (Россия, Приморский край, с. Фадеевка, р. Раздольная) отсутствововали хрящевые придатки на кончике листа, основной признак этого вида. В связи с этим, было высказано предположение, что этот отросток может быть артефактом, возникшим при сушке мясистых листьев. Именно поэтому В.В. Бялт (1999а) предложил еще в полевых условиях давать краткое описание основных морфологических признаков собранных образцов (цвет листьев и лепестков, форма и размеры листьев и др.), либо фотографировать их, т.к. при сушке цвет растительных тканей необратимо изменяется. А.Г. Борисова (1939) и другие авторы, принимающие существование вида *O. cartilaginea*, отмечали, что этот вид часто путают с *O. japonica* и *O. fimbriata* (Turcz.) Вегger, но при этом утверждали, что такой признак как наличие хрящевого придатка, его отсутствие и зубчато-хрящевой придаток соответственно, четко дифференцирует эти таксоны. Также было отмечено (Борисова, 1939; Безделева, 1995; Бялт, 1999а), что цвет лепестков не является определяющим признаком для различения этих трех видов (от белого до розоватого, белый, от белого до красноватого соответственно). Сравнение нуклеотидных последовательностей, собранных для данного исследования образцов *O. cartilaginea* из *locus classicus* (P10; Табл. 9; Рис. 13), показало, что обнаруженный здесь риботип R7, является частью генетической линии, включающей популяции *O. japonica* из России (P9, P10, P19) и северо-восточного Китая (P20; Рис 13).

# 4.2. Изменчивость межгенных спейсеров хпДНК

Межгенные спейсеры trnH–psbA, trnQ–rps16, rpl32–trnL хпДНК у представителей *O. spinosa* оказались высоко вариабельными. В этих регионах обнаружено относительно большое количество вариабельных сайтов (в среднем, 38), из них более половины (27) были информативны согласно методу максимальной экономии (Табл. 11). Сравнение 621 нуклеотидной последовательности этих межгенных спейсеров для 207 образцов *O. spinosa* 25 популяций выявило большое число хлоротипов (86) и очень высокую дивергенцию между образцами и популяциями (Рис. 15).

Генеалогическая сеть гаплотипов, как и МР-кладограмма (Рис. 15, 17), позволили установить наличие двух гаплогрупп популяций O. spinosa: Западная группа, которая включала 59 хлоротипов (15 популяций) из западной и северовосточной части ареала вида, и Восточная группа – 27 хлоротипов (10 популяций) из юго-восточной части ареала. В нашем наборе данных Восточная и Западная популяций группы были представлены примерно одинаковым числом последовательностей (92 и 115 соответственно), но при этом гаплотипическое разнообразие Западной группы было достоверно выше такового Восточной (59 и 27 хлоротипов соответственно; p<0,05, согласно t-критерию Стьюдента для несвязанных выборок). Эта дивергенция популяций с высокой достоверностью зафиксирована во всех наших анализах, основанных на изменчивости ядерного маркера и хлоропластных межгенных спейсеров. Так на дереве трибы Telephieae (Рис. 11) бутстреп-поддержки для Западной и Восточной клад были не всегда высоки, но значимы (в ML-анализе 67 и 100% соответственно). В расширенном

анализе представителей рода Orostachys подсекции Appendiculatae (Рис. 13) поддержка была немногим выше (в ML-анализе 75 и 100% соответственно). В то время, как при анализе генеалогических связей хлоротипов дивергенция между группами составляла 11 мутационных шагов (Рис. 15), на MP-кладограмме (Рис. 17) разделение на две группы было высоко поддержано (96%). Кроме того, замены нуклеотидов в спейсере trnQ–rps16 (A $\rightarrow$ G в поз. 141 и A $\rightarrow$ T в поз. 1136) четко маркировали каждую группу. На основании результатов молекулярного датирования (Рис. 12) показано, что дивергенция видов в Западной группе началась значительно раньше (около 2,5 млн. л. н.), чем в Восточной (около 1 млн. л. н.). В связи с этим, мы можем предположить, что молекулярные признаки (замены нуклеотидов) в Западной группе хлоротипов являются более древними – плезиоморфными.

#### **4.3.** Филогеография *O. spinosa*

Как правило, при исследовании особенностей филогеографии того или иного вида основное внимание уделяется поиску общих гаплотипов для двух или нескольких популяций, а также географическому паттерну распределения гаплотипов в популяциях. Обнаружение закономерностей в данных аспектах является условием достоверной реконструкции сценария расселения вида – его филогеографии (Абрамсон, 2009). Исследуемые популяции *O. spinosa* не имеют общих гаплотипов, кроме двух географически близких популяций РЗ4, РЗ5 (Н7) из Приморского края и Р26, Р27 (НЗ1) из Иркутской области, что оказалось несколько неожиданным (Рис. 15). Тем не менее, мы можем сделать некоторые предположения относительно филогеографии *O. spinosa*.

Одним из ключевых вопросов филогеографии является установление предполагаемого места происхождения вида и путей расширения его ареала. Авис с соавт. (Avise et al., 1987) выдвинули гипотезу о том, что внутривидовые монофилетические группировки (клады), разделенные значительными генетическими дистанциями, как правило, возникают в результате длительных внешних (биогеографических) преград свободному потоку генов между популяциями. Безусловно, ряд таких факторов, как разделение популяций вида географическими преградами, расширение ареала и расселение, оказывают непосредственное влияние на характер внутривидовой генетической изменчивости.

Наличие филогеографической структуры ( $N_{ST}$  достоверно выше  $G_{ST}$ , p<0,05) и высокий уровень межпопуляционной дифференциации ( $F_{ST}=0,76364$ , p<0,001) у *O. spinosa* (Табл. 13) указывают на определенную степень филогеографической структурированности популяций. Это может быть результатом ограниченного потока генов между популяциями, вызванным изоляцией и дрейфом генов с накоплением нуклеотидных отличий (Chiang et al., 2006). Несмотря на достаточно широкий ареал *O. spinosa*, его генетическая структура характеризуется «островным» паттерном распределения. Этому, вероятно, способствует специфическое мозаичное распространение вида: на скалах, сухих склонах, в расщелинах.

Хлоротипы популяций из алтайских гор (32, половина хлоротипов Западной группы) характеризовались самыми высокими показателями разнообразия в наборе данных (Табл. 12), причем почти каждый образец нес отдельный (уникальный) гаплотип. Ранее высказывалось предположение (Posada, Crandall, 2001) о том, что согласно теории коалесценции предковые аллели чаще всего занимают внутренние узлы на сети гаплотипов. Именно алтайские хлоротипы: H40, H44, H48, H57–H59, H75, H83, H84 занимают внутреннее положение в сети (Рис. 15) и, вероятно, могут рассматриваться как предковые. Это подтверждается результатами молекулярной датировки – возраст наиболее древних представителей этой гаплогруппы оценивается в 2,5–2 млн. л. (Рис. 12).

Ранее предполагалось (Ohba, 1978; Гончарова, 2006а), что распространение толстянковых в восточную Азию, где они преимущественно обитают в настоящее время, шло из Средиземноморья вдоль формирующихся Гималаев на восток и на северо-восток по горным системам Тянь-Шаня и Памиро-Алая. Учитывая результаты филогенетических анализов и молекулярного датирования, мы предлагаем следующий сценарий распространения *O. spinosa*. Разделение предковых генетических линий основных клад трибы Telephieae (подсекции *Appendiculatae* и *Sinocrassula/Hylotelephium/Orostachys* подсекции *Orostachys*; Рис. 11, 12) произошло в первой половине миоцена (20–18 млн. лет назад). На это время как раз приходится период формирования горной системы Гималаев. Распространение

предков Sinocrassula и клады Hylotelephium/Orostachys подсекции Orostachys шло, веорятно, на восток через Гималаи, а предок подсекции Appendiculatae мог продвигаться на северо-восток в направлении Алтая. Далее, линии O. chanetii и O. japonica, возникшие на границе миоцена и плиоцена (около 6 млн. л. н.), отделились от O. spinosa, в горах Алтая. Именно там, по нашему мнению, находится центр происхождения O. spinosa (Рис. 18). Виды O. chanetii и O. japonica достигли Восточной Азии (Китай, Дальний Восток России и Япония соответственно), продвигаясь вдоль Монгольского Алтая и далее на восток. Распространение O. spinosa происходило в противоположных направлениях: на запад до предгорий Южного Урала и двумя линиями на восток – в район озера Байкал и северо-восточную Азию (Якутия, Магадан). Последняя линия, вероятно, была предковой для Восточной группы гаплотипов, ее потомки продвигались на юго-восток, на территорию современных Амурской области, Хабаровского и Приморского краев и Китая (Рис. 18).



Рисунок 18 – Гипотетическая схема расширения ареала *O. spinosa*, основанная на данных хпДНК. Обозначены места сбора растений с номерами популяций в соответствии с таблицей 1. Пунктирной линией проведена предполагаемая граница между Западной и Восточной группами популяций. Стрелками показаны направления распространения. Затененная окружность – вероятный центр происхождения вида и зона предкового разнообразия.

Что же касается географического положения обнаруженных нами двух групп популяций *O. spinosa*, мы полагаем, что граница между ними пролегает по западным склонам Большого Хинганского хребта на северо-востоке Китая и хребту Джагды на востоке Амурской области (Рис. 18). Данный сценарий подтверждается результатами анализа распределения парных нуклеотидных различий, который показал, что в Западной группе гаплотипов предполагается длительная демографическая стабильность (Рис. 16б), в отличие от Восточной, где отмечен популяционный рост в недавнем прошлом (Рис. 16а).

В целом, обнаруженная нами генетическая подразделенность популяций *O. spinosa* соответствует морфологическим особенностям произрастания в природе (Рис. 2): в виде дерновинок из особей (преимущественно многолетние поликарпические растения в условиях Горного Алтая, Магадана, Якутии) и отдельно растущих растений (многолетники-монокарпики, встречающиеся в Амурской области и Приморском крае). Мы полагаем, что эти отличия могут иметь генетические основания. Вполне вероятно, что незадолго до пересечения географической преграды, разделяющей Восточную и Западную группы (около 3,5 млн. л. н.; Рис. 12), возникли не только мутации, маркирующие эти группы, но и некоторые физиологические особенности *O. spinosa*, унаследованные потомками. Трудно ответить на вопрос, что именно привело к таким изменениям, но мы можем предположить, что этот вид претерпел разделение на экотипы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования получены и депонированы в базу данных GenBank более 700 нуклеотидных последовательностей ITS региона рДНК и межгенных спейсеров trnH-psbA, trnQ-rps16, rpl32-trnL хпДНК О. spinosa и близких ему видов из подсекции Appendiculatae рода Orostachys (Crassulaceae). Высокая дивергенция последовательностей ITS региона рДНК у представителей подсекции и внутригеномный полиморфизм ITS1 у O. japonica обусловили необходимость использования информации о вторичных структурах транскриптов спейсеров ITS1 и ITS2 для создания однозначного выравнивания (поиска гомологий). На разработанных обобщенных моделях ITS1 и ITS2 установлены основные структурные элементы (спиральные и одноцепочечные домены), для их описания была разработана универсальная номенклатура; определены позиции инделей, компенсаторных и полукомпенсаторных замен оснований; проведен поиск гомологичных позиций. Этот набор данных использовался нами для уточнения родственных связей O. spinosa в трибе Telephieae, подсекции Appendiculatae и молекулярной датировки времени диверсификации основных линий Telephieae. Установлено, что O. spinosa близок О. japonica и О. chanetii, и входит в состав одной из двух клад Telephieae устойчивой клады, образованной представителями подсекции Appendiculatae рода Orostachys. Также нами обнаружены синапоморфные замены нуклеотидов, маркирующие основные клады дерева. Согласно байесовскому датированию, возраст наиболее древних представителей Telephieae составляет около 25 млн. л., а предковой ветви вида *О. spinosa* – около 6 млн. л.

Высокая вариабельность нуклеотидных последовательностей маркеров ядерной рДНК и хпДНК обусловили выявление большого числа риботипов и хлоротипов *O. spinosa*. Специфический «островной» паттерн распределения хлоротипов в сети и высокий уровень межпопуляционной дифференциации могут быть обусловлены ограниченным потоком генов между популяциями, вызванным изоляцией и дрейфом генов.

Филогенетический сигнал позволил в анализах методами ML, MP и BI с высокой достоверностью обнаружить разделение популяций *O. spinosa* на Западную и Восточную группы, различающиеся не только генетически, но и особенностями произрастания – в виде дерновинок из особей поликарпиков и отдельно растущих монокарпических растений соответственно. Не исключено, что представители этих групп отличаются между собой и содержанием биологически-активных веществ, поэтому мы советуем фармакологам и хемосистематикам обратить внимание на эту особенность биологии *O. spinosa*.

На основании анализа маркеров хпДНК мы установили предполагаемый центр происхождения *O. spinosa* (горы Алтая) и предложили гипотезу расширения его ареала.

## выводы

1. Разработаны обобщенные модели вторичных структур транскриптов спейсеров ITS1 и ITS2 рДНК для представителей подсекции *Appendiculatae* рода *Orostachys*, позволившие провести выравнивание дивергентных нуклеотидных последовательностей ITS региона.

2. Установлено, что триба Telephieae слагается двумя кладами – устойчивой кладой подсекции Appendiculatae рода Orostachys и слабо-поддержанной Hylotelephium/Orostachys подсекции Orostachys/Sinocrassula.

3. Выявлено близкое родство видов *O. spinosa*, *O. japonica* и *O. chanetii*. Впервые показано, что вид *Meterostachys sikokiana* монотипного рода является членом клады подсекции *Appendiculatae* и близок *O. thyrsiflora*.

4. Согласно результатам молекулярной датировки возраст трибы Telephieae составляет около 30 млн. лет. Большинство видов *Hylotelephium* и *Orostachys* подсекции *Appendiculatae* (в том числе *O. spinosa*) возникли около 6 млн. л. н., а подсекции *Orostachys* – 1,5 млн. л. н.

5. Показано, что межгенные спейсеры *trnH–psbA*, *trnQ–rps16*, *rpl32–trnL* хпДНК являются информативными на популяционном уровне (86 хлоротипов в 207 образцах 25 популяций *O. spinosa*), в то время как нуклеотидные последовательности *trnD–trnT* и *trnS–trnG* оказались мономорфными.

6. Во всех анализах, основанных на данных ядерной и хлДНК, с высокой достоверностью установлена дивергенция популяций *O. spinosa* на две группы. Предполагаемая географическая граница между ними пролегает по западным склонам Большого Хинганского хребта на северо-востоке Китая и хребту Джагды на востоке Амурской области.

7. Выявлены достоверно высокая межпопуляционная дифференциация ( $F_{ST}$ =0,76364; *p*<0,001) и филогеографическая структура ( $N_{ST}$ >G<sub>ST</sub>; *p*<0,05), что указывает на отсутствие потока генов между большинством популяций *O. spinosa* вследствие их изоляции в течение долгого времени.

8. Распространение *O. spinosa* из центра происхождения (в горах Алтая) шло в трех направлениях: на запад до предгорий Южного Урала, на восток, предположительно двумя линиями – в район озера Байкал и северо-восточную Азию (Якутия, Магадан). Последняя линия дала начало Восточной группе, предки которой дивергировали около 3,5 млн. л. н., и распространялись на юг (Китай, Приморский край).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамсон Н.И. Филогеография: итоги, проблемы, перспективы // Вестник ВОГиС. 2007. Т. 11, № 2. С. 307–331.

2. Абрамсон Н.И. Молекулярные маркеры, филогеография и поиск критерия разграничения видов // Труды зоологического института РАН. 2009. Приложение № 1. С. 185–198.

3. Безделева Т.А. Crassulaceae // Сосудистые растения советского Дальнего Востока. СПб. 1995. Т. 7. – С. 214–235.

 Блинова К.Ф., Борисова Н.А., Гортинский Г.Б. и др. Ботаникофармакогностический словарь: Справ. пособие. / Под ред. К.Ф. Блиновой, Г.П. Яковлева. М.: Высшая школа. 1990. – 272 с.

5. Боголюбов А.С. Семейство Толстянковые – Crassulaceae [Электронный ресурс] // Экологический центр "Экосистема". 2001. Режим доступа: http://www.ecosystema.ru/08nature/flowers/040s.htm (дата обращения: 01.02.2015).

6. Борисова А.Г. Семейство Crassulaceae DC. // Флора СССР. М., Л.: 1939. – С. 8–134.

7. Булатова Н.Ш. Открытие «Филогеографии» Джона Си Ависа // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2002. Т. 6, № 19. С. 18–20.

8. Быков Б.А. Экологический словарь // Алма-Ата: Наука. 1983. – С. 216.

9. Бялт В.В. *Meterostachys sikokiana* (Crassulaceae) – новый вид и род для флоры Китая // Ботанический журнал. 1997. Т. 82, № 7. С. 128–130.

10. Бялт В.В. Монография рода горноколосник *Orostachys* Fisch. (Crassulaceae): дис. ... канд. биол. наук. СПб. 1999а. – 290 с.

11. Бялт В.В. Конспект рода *Orostachys* Fisch. // Новости систематики высших растений. Л.: Наука, 1999б. Т. 32. С. 40–50.

12. Бялт В.В. Crassulaceae // Флора Восточной Европы. СПб.: Мир и семья. 2001. С. 249–285.

13. Бялт В.В., Гапон В.Н., Васильева И.М. Очиток, молодило и другие толстянковые. М.: Астрель, АСТ, Транзиткнига. 2004. – 270 с.

14. Веселухина К.П. Кариологическое изучение некоторых арктических и субарктических видов Колымского нагорья // Флора и растительность Магаданской области. Владивосток: Дальнаука. 1976. – С. 111–116.

15. Гончарова С.Б. Очитковые (*Sedoideae*, Crassulaceae) флоры российского Дальнего Востока. Владивосток: Дальнаука, 2006а. – 223 с.

16. Гончарова С.Б. Подсемейство *Sedoideae* (Crassulaceae) флоры Сибири и российского Дальнего Востока: систематика, биоморфология, филогения: дис. ... докт. биол. наук. Владивосток. 2006б. – 301 с.

17. Гончарова С.Б., Артюкова Е.В., Гончаров А.А. Филогенетические связи представителей подсемейства *Sedoideae* (Crassulaceae) на основании сравнения последовательностей ITS региона ядерной рДНК // Генетика. 2006. Т. 42, №6. С. 1–8.

18. Гончарова С.Б., Гончаров А.А. Молекулярная филогения и систематика цветковых растений семейства толстянковых (Crassulaceae DC.) // Молекулярная биология. 2009. Т. 43, №. 5. С. 856–865.

19. Гончарова С.Б., Гончаров А.А., Стефенсон Р. Анализ филогенетических связей в семействе Crassulaceae на основании сравнения нуклеотидных последовательностей ITS региона ядерной рДНК // Ботанический журнал. 2008. Т. 93, № 1. С. 96–113.

20. Даниленко Н.Г., Давыденко О.Г. Миры геномов органелл. Мн.: Тэхналогія. 2003. – 494 с.

21. Каюкова С.Н. Эколого-биологические особенности видов рода *Orostachys* Fisch. в восточном Забайкалье: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Улан-Удэ. 2009. – 21 с.

22. Левента А.И., Усов Л.А., Семинский И.Ж., Одинец А.Д., Шабатурова О.В., Тимофеева С.А., Кузнецов С.М. Исторические аспекты и современные методологические подходы к поиску новых лекарственных средств на основе растительного сырья из биоразнообразия Байкальской Сибири (к 90-летию кафедры фармакологии ИГМУ) // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). 2012. Т. 108, № 1. С. 105–110.

23. Марапов Д.А. Онлайн калькулятор «Расчет t-критерия Стьюдента». [Электронный ресурс]. Медицинская статистика. 2013. Режим доступа: http://medstatistic.ru/calculators/averagestudent.html (дата обращения: 15.12.2016).

24. Матвеева Т.В., Павлова О.А., Богомаз Д.И., Демкович А.Е., Лутова Л.А. Молекулярные маркеры для видоидентификации и филогенетики растений // Экологическая генетика. 2011. Т. 9, № 1. С. 32–43.

25. Москалюк Т.А. Эколого-географический анализ видов. [Электронный pecypc]. Ботанический сад-институт ДВО РАН. 2006. Режим доступа: http://botsad.ru/menu/activity/articles/moskalyuk-t/biogeocenologiya/lekciya-5/ (дата обращения: 15.08.2016).

26. Никулин А.Ю., Никулин В.Ю., Гончаров А.А. К вопросу о филогенетической структуре трибы *Telephieae* (*Sempervivoideae*, Crassulaceae) По данным сравнения нуклеотидных последовательностей ITS-региона рДНК // Ботанический журнал. 2015. Т. 100, № 10. С. 1030–1040.

27. Огрызов Н.К., Гилеев Ю.В., Кугинский Б.Д., Петров Л.Н. О радиозащитном действии некоторых компонентов из состава растительного корма радиорезистентных грызунов в Средней и Центральной Азии // Радиобиология. 1974. Т. 14, № 3. С. 437–440.

28. Одинец А.Д., Антонян Д.М. Применение комплексного подхода к поиску новых лекарственных средств на основе растительного сырья // Наука и современность. 2011. №13. С. 8–11.

29. Пешкова Г.А., Малышев О.Д. и др. Флора Сибири Т.7. Berberidaceae – Grossulariaceae // Новосибирск: Наука. 1994. С. 166–168.

30. Пробатова Н.С., Соколовская А.П. Числа хромосом сосудистых растений из Приморья, Приамурья, Сахалина, Камчатки и Курильских островов // Ботанический журнал. 1989. Т. 74, № 1. С. 120–123.

31. Саратиков А.С. Золотой корень (Родиола розовая). 2-е изд., перераб. и доп. Издательство Томского университета. 1974. – 158 с.

32. Серебряков И.Г. Жизненные формы высших растений и их изучение // Полевая геоботаника. 1964. Т. 3. С. 146–205.

33. Студенцов Е.П., Рамш С.М., Казурова Н.Г., Непорожнева О.В., Гарабаджиу А.В., Кочина Т.А., Воронков М.Г., Кузнецов В. А., Криворотов Д.В. Адаптогены и родственные группы лекарственных препаратов - 50 лет поисков // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2013. Т. 11, № 4. С. 3–43.

34. Удалова Р.А. Агавы, алоэ и другие суккуленты. СПб.: Агропромиздат.
1994. – 112 с.

35. Частухина С.А. Лекарственные и пищевые растения. М.: Высшая школа. 1995. – 76 с.

Черепанов С.К. Свод дополнений и изменений к «Флоре СССР» Л.
 1973. – 667 с.

37. Чуб В. Для чего нужны антоцианы // Цветоводство. 2008. № 6. С. 22—
25.

38. Эрст А.С., Ваулин О.В. Филогенетические отношения некоторых видов рода *Aquilegia* Северной Азии по различным ДНК-маркерам // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013. Т. 17, № 3. С. 477–486.

39. Aldrich J., Cherney B.W., Merlin E., Christopherson L. The role of insertions/deletions in the evolution of the intergenic region between *psbA* and *trnH* in the chloroplast genome // Current Genetics. 1988. Vol. 14, No 2. P. 137–146.

40. Álvarez I., Wendel J.F. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2003. Vol. 29, № 3. P. 417–434.

41. Aukerman M.J., Hirschfeld M., Wester L., Weaver M., Clack T., Amasino R.M., Sharrock R.A. A deletion in the PHYD gene of the *Arabidopsis* Wassilewskija ecotype defines a role for Phytochrome D in red/far-red light sensing // The Plant Cell. 1997. Vol. 9, № 8. P. 1317–1326.

42. Avise J.C. Phylogeography: The history and formation of species. Harvard Univ. Press. Camridge, Massachusetts, London, England. 2000. 447 p.

43. Avise J.C., Arnold J., Ball R.M., Bermingham E., Lamb T., Neigel J.E., Reeb C.A., Saunders N.C. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial bridge between population genetics and systematics // Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics. 1987. Vol. 18, № 1. P. 489–522.

44. Bailey C.D., Carr T.G., Harris S.A., Hughes C.E. Characterization of angiosperm nrDNA polymorphism, paralogy, and pseudogenes // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2003. Vol. 29, № 3. P. 435–455.

45. Baldwin B.G., Sanderson M.J., Porter J.M., Wojciechowski M.F., Campbell C.S., Donoghue M.J. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny // Annals of the Missouri Botanical Garden. 1995. Vol. 82, № 2. P. 247–277.

46. Bellstedt D.U., Linder H.P., Harley E.H. Phylogenetic relationships in *Disa* based on non-coding *trnL-trnF* chloroplast sequences: evidence of numerous repeat regions // American Journal of Botany. 2001. Vol. 88, № 11. P. 2088–2100.

47. Berger A. Crassulaceae. Die Natürlichen Pflanzenfamilien, 2nd ed., Leipzig. 1930. Vol. 18A. P. 352–483.

48. Bernatchez L., Chouinard A., Guoqing L.U. Integrating molecular genetics and ecology in studies of adaptive radiation: whitefish, *Coregonus* sp., as a case study // Biological Journal of the Linnean Society. 1999. Vol. 68, № 1. P. 173–194.

49. Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli* // Journal of Bacteriology. 1951. Vol. 62, № 3. P. 293–300.

50. Birky C.W. Jr. Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: mechanisms and evolution // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1995. Vol. 92, № 25. P. 11331–11338.

51. Bolaric S., Barth S., Melchinger A.E., Posselt U.K. Molecular genetic diversity within and among German ecotypes in comparison to European perennial ryegrass cultivars // Plant Breeding. 2005. Vol. 124, № 3. P. 257–262.

52. Bolson M., Smidt Ed.C., Brotto M.L., Silva-Pereira V. ITS and *trnH-psbA* as efficient DNA barcodes to identify threatened commercial woody Angiosperms from Southern Brazilian Atlantic rainforests // PLoS ONE. 2015. Vol. 10, № 12. P. e0143049

53. Bonfield J.K., Staden R. Experiment files and their application during large-scale sequencing projects // DNA Sequence. 1995. Vol. 6, № 2. P. 109–117.

54. Borsch T., Quandt D. Mutational dynamics and phylogenetic utility of noncoding chloroplast DNA // Plant Systematics and Evolution. 2009. Vol. 282, № 3. P. 169–199.

55. Byalt V.V., Sokolova I.V. Who is the author of the name *Orostachys* (Crassulaceae) // Taxon. 1999. № 48. P. 63–65.

56. Caisova L., Marin B., Sausen N., Pröschold T., Melkonian M. Polyphyly of *Chaetophora* and *Stigeolonium* within the Chaetophorales (Chlorophyceae), revealed by sequence comparisons of nuclear-endoced SSU rRNA genes // Journal of Phycology. 2011. Vol. 47, № 1. P. 164–177.

57. Carrillo-Reyes P., Sosa V., Mort M.E. Molecular phylogeny of the Acre clade (Crassulaceae): dealing with the lack of definitions for *Echeveria* and *Sedum* // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2009. Vol. 53, № 1. P. 267–276.

58. Chase M.W., Soltis D.E., Olmstead R.G., Morgan D., Les D.H., Mishler B.D., Duvall M.R., Price R.A., Hills H.G., Qiu Y.-L., Kron K.A., Rettig J.H., Conti E., Palmer J.D., Manhart J.R., Sytsma K.J., Michaels H.J., Kress W.J., Karol K.G., Clark W.D., Hedren M., Gaut B.S., Jansen R.K., Kim K.-J., Wimpee C.F., Smith J.F., Furnier G.R., Strauss S.H., Xiang Q.-Y., Plunkett G.M., Soltis P.S., Swensen S.M., Williams S.E., Gadek P.A., Quinn C.J., Eguiarte L.E., Golenberg E., Learn G.H. Jr., Graham S.W., Barrett S.C.H., Dayanandan S., Albert V.A. Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL* // Annals of the Missouri Botanical Garden. 1993. Vol. 80,  $N_{2}$  3. P. 528–580.

59. Chen T., Wang X.R., Luo H., Wang C.T., Zhang J.Z., Luo M.M. Chloroplast DNA *trnQ-rps16* variation and genetic structure of nine wild Chinese cherry (*Cerasus pseudocerasus* Lindl.) populations // Hereditas. 2012a. Vol. 34, № 11. P. 1475–1483.

60. Chen X., Liao B., Song J., Pang X., Han J., Chen S. A fast SNP identification and analysis of intraspecific variation in the medicinal *Panax* species based on DNA barcoding // Gene. 2012b. Vol. 530, № 1. P. 39–43. 61. Chiang Y.C., Hung K.H., Schaal B.A., Ge X.J., Hsu T.W., Chaing T.Y. Contrasting phylogeographical patterns between mainland and island taxa of the *Pinus luchuensis* complex // Molecular Ecology. 2006. Vol. 15, № 3. P. 765–779.

62. Choi S.Y., Chung M.J., Seo W.D., Shin J.H., Shon M.Y., Sung N.J. Inhibitory effects of *Orostachys japonicus* extracts on the formation of N-nitrosodimethylamine // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2006. Vol. 54, № 16. P. 6075–6078.

63. Clegg M.T., Gaut B.S., Learn Jr. G.H., Morton B.R. Rates and Patterns of Chloroplast DNA Evolution // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1994. Vol. 91, № 15. P. 6795–6801.

64. Clement M., Posada D., Crandall K. TCS: a computer program to estimate gene genealogies // Molecular Ecolology. 2000. Vol. 9, № 10. P. 1657–1660.

65. Coleman A.W. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons // Trends in Genetics. 2003. Vol. 19, № 7. P. 370–375.

66. Coleman A.W. Nuclear rRNA transcript processing versus internal transcribed spacer secondary structure // Trends in Genetics. 2015. Vol. 31, № 3. P. 157– 163.

67. Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing // Nature methods. 2012. Vol. 9, № 8. P. 772.

68. Demesure B.B., Comps B., Petit R.J. Chloroplast DNA phylogeography of the common beech (*Fagus sylvatica* L.) in Europe // Evolution. 1996. Vol. 50, № 6. P. 2515–2520.

69. Denduangboripant J., Cronk Q.C. High intraindividual variation in internal transcribed spacer sequences in *Aeschynanthus* (Gesneriaceae): implications for phylogenetics // Proceedings of the Royal Society of London. Series B. 2000. Vol. 267, № 1451. P. 1407–1415.

70. Dong W., Liu J., Yu J., Wang L., Zhou S. Highly variable chloroplast markers for evaluating plant phylogeny at low taxonomic levels and for DNA barcoding // PLoS One. 2012. Vol. 7, № 4. P. e35071.
71. Drummond A.J., Suchard M.A., Xie D., Rambaut A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7 // Molecular biology and evolution. 2012. Vol. 29, № 8. P. 1969–1973.

72. Eggli U. Illustrated handbook of succulent plants: Crassulaceae. Berlin Heidelberg New York. 2005. P. 5–8.

73. Eggli U., 't Hart H., Nyffeler R. Towards a consensus classification of the Crassulaceae // Evolution and systematics of the Crassulaceae. Backhuys Publishers. Leiden. 1995. P. 173–192.

74. Elwood H.J., Olsen G.J., Sogin M.L. The small-subunit ribosomal RNA gene sequences from the hypotrichous ciliates *Oxytricha nova* and *Stylonychia pustulata* // Molecular Biology and Evolution. 1985. Vol. 2, № 5. P. 399–410.

75. Excoffier L., Smouse P.E., Quattro J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data // Genetics. 1992. Vol. 131, № 2. P. 479–491.

76. Excoffier L., Laval G., Schneider S. Arlequin version 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis // Evolutionary Bioinformatics On-line. 2005. Vol. 1. P. 47–50.

77. Fairfield K.N., Mort M.E., Santos-Guerra A. Phylogenetics and evolution of the Macaronesian members of the genus *Aichryson* (Crassulaceae) inferred from nuclear and chloroplast sequence data // Plant Systematics and Evolution. 2004. Vol. 248,  $N_{\rm P}$  1. P. 71–83.

78. Feliner N.G., Rosselló J.A. Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of rDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2007. Vol. 44, № 2. P. 911–919.

79. Felsenstein, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the boot-strap // Evolution. 1985. Vol. 39, № 1. P. 783–791.

80. Fischer F.E.L., von. Catalogus horti gorenkensis (Catalogue du jardin des plantes du Comte A. de Razoumoffsky a Goreki pres de Moscou). – Moscou. 1808. P.
99.

81. Friesen N., Fritsch R.M., Pollner S., Blattner F.R. Molecular and morphological evidence for an origin of the aberrant genus *Milula* within the Himalayan species of *Allium* (Alliaceae) // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2000. Vol. 17, N 2. P. 209–218.

82. Fu K.J., Ohba H. Crassulaceae Flora of China. Vol. 8. Edited by: Wu Z.Y., Raven P.H. St. Louis: Science Press, Beijing and Missouri Botanical Garden. 2001. P. 202–268.

83. Galtier N., Gouy M., Gautier C. SeaView and Phylo\_win: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny // Computer Applications in the Biosciences. 1996. Vol. 12, № 6. P. 543–548.

84. Ge S., Li A., Lu B.R., Zhang S.Z., Hong D.Y. A phylogeny of the rice tribe *Oryzeae* (Poaceae) based on *matK* sequence data // American Journal of Botany. 2002. Vol. 89, № 12. P. 1967–1972.

85. Gehrig H., Gaubmann O., Marx H., Schwarzrott D., Kluge M. Molecular phylogeny of the genus *Kalanchoe* (Crassulaceae) inferred from nucleotide sequences of the ITS–1 and ITS–2 regions // Plant Science. 2001. Vol. 160, № 5. P. 827–835.

86. Gere J., Kowiyou Y., Daru B., Mankga L., Maurin O., van der Bank M. Incorporating *trnH-psbA* to the core DNA barcodes improves significantly species discrimination within southern African Combretaceae // ZooKeys. 2013. Vol. 365. P. 129– 147.

87. Gielly L., Taberlet R. Chloroplast DNA polymorphism at the intrageneric level: implications for the establishment of plant phylogenies // Comptes Rendus de l Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie. 1994. Vol. 317, № 7. P. 685–692.

88. Goldblatt P., Savolainen V., Porteous O., Sostaric I., Powell M., Reeves G., Manning J.C., Barraclough T.G., Chase M.W. Radiation on the Cape flora and the phylogeny of peacock irises *Moraea* (Iridaceae) based on four plastid DNA regions // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2002. Vol. 25, № 2. P. 341–360. 89. Golenberg E.M., Clegg M.T., Durbin M.L., Doebley J., Ma D.P. Evolution of a noncoding region of the chloroplast genome // Molecular Phylogenetics and Evolution. 1993. Vol. 2, № 1. P. 52–64.

90. Gontcharova S.B., Gontcharov A.A. Sequence and secondary structure evolution of ITS rDNA in the family Crassulaceae // Chromosome Science. 2004. Vol. 8, № 4. P. 142–144.

91. Grajales A., Aguilar C., Sánchez J.A. Phylogenetic reconstruction using secondary structures of Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2, rDNA): finding the molecular and morphological gap in Caribbean gorgonian corals // BMC Evolutionary Biology. 2007. Vol. 7, № 1. P. 90.

92. Grams T.E., Thiel S. High light-induced switch from C(3)-photosynthesis to Crassulacean acid metabolism is mediated by UV-A/blue light // Journal of Experimental Botany. 2002. Vol. 53, № 373. P. 1475–1483.

93. Hamilton M.B. Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation // Molecular Ecology. 1999. Vol. 8, № 3. P. 521–523.

94. Harpending H.C., Batzer M.A., Gurven M., Jorde L.B., Rogers A.R., Sherry S.T. Genetic traces of ancient demography // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1998. Vol. 95, № 4. P. 1961–1967.

95. Harris D.J., Crandall K.A. Intragenomic Variation Within ITS1 and ITS2 of Freshwater Crayfishes (Decapoda: Cambaridae): Implications for Phylogenetic and Microsatellite Studies // Molecular Biology and Evolution. 2000. Vol. 17, № 2. P. 284–291.

96. Heeg J.S., Wolf M. ITS2 and 18S rDNA sequence-structure phylogeny of *Chlorella* and allies (Chlorophyta, Trebouxiophyceae, Chlorellaceae) // Plant Gene. 2015. Vol. 4. P. 20–28.

97. Hodges, S.A., Arnold M.L. Columbines: a geographically widespread species flock // Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. 1994. Vol. 91, № 11. P. 5129–5132.

98. Hoot S.B., Culham A., Crane P.R. The utility of *atpB* gene sequences in resolving phylogenetic relationships: comparison with *rbcL* and 18S ribosomal DNA sequences in the Lardizabalaceae // Annals of the Missouri Botanical Garden. 1995. Vol. 82,  $N_{2}$  2. P. 194–207.

99. Hoy M.S., Rodriguez R.J. Intragenomic sequence variation at the ITS1 - ITS2 region and at the 18S and 28S nuclear ribosomal DNA genes of the New Zealand mud snail, *Potamopyrgus antipodarum* (Hydrobiidae: mollusca) // Journal of Molluscan Studies. 2013. Vol. 79, № 3. P. 205–2017.

100. Huelsenbeck J.P., Ronquist F. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees // Bioinformatics. 2001. Vol. 17, № 8. P. 754–755.

101. Hufford K.M., Mazer S.J. Plant ecotypes: genetic differentiation in the age of ecological restoration // Trends in Ecology and Evolution. 2003. Vol. 18, № 3. P. 147–155.

102. Hur J.M., Park J.C. Effects of the aerial parts of *Orostachys japonicus* and its bioactive component on hepatic alcoholmetabolizing enzyme system // Journal of Medicinal Food. 2006. Vol. 9, № 3. P. 336–341.

103. Johnson L.A., Soltis D.E. *matK* DNA sequence and phylogenetic reconstruction in Saxifragaceae s.s. // Systematic Botany. 1994. Vol. 19, № 1. P. 143–156.

104. Jorgensen T.H., Frydenberg J. Diversification in insular plants: inferring the phylogenetic relationship in *Aeonium* (Crassulaceae) using ITS sequences of nuclear ribosomal DNA // Nordic Journal of Botany. 1999. Vol. 19, № 5. P. 613–621.

105. Jorgensen T.H., Olesen J.M. Adaptive radiation of island plants: evidence from *Aeonium* (Crassulaceae) of the Canary Islands // Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics. 2001. Vol. 4, № 1. P. 29–42.

106. Joseph N., Krauskopf E., Vera M., Michot B. Ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) exhibits a common core of secondary structure in vertebrates and yeast // Nucleic Acids Research. 1999. Vol. 27, № 23. P. 4533–4455.

107. Keller A., Förster F., Müller T., Dandekar T., Schultz J., Wolf M. Including RNA secondary structures improves accuracy and robustness in reconstruction of phylogenetic trees // Biology Direct. 2010. Vol. 5, № 1. P. 4.

108. Kim J.H., Lee S.H., Lee, H.W., Sun Y.N., Jang W.H., Yang S.Y., Jang H.B., Kim Y.H. (-)-Epicatechin derivate from *Orostachys japonicus* as potential inhibitor of the human butyrylcholinesterase // International journal of biological macromolecules. 2016. Vol. 91, № 1. P. 1033–1039.

109. Kim K.J., Jansen R.K. *ndhF* sequence evolution and the major clades in the sunflower family // Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. 1995. Vol. 92, № 22. P. 10379–10383.

110. Kozyrenko M.M., Gontcharova S.B., Gontcharov A.A. Phylogenetic relationships among *Orostachys* subsection *Orostachys* species (Crassulaceae) based on nuclear and chloroplast DNA data // Journal of Systematics and Evolution. 2013. Vol. 51,  $N_{2}$  5. P. 578–589.

111. Kress W.J., Wurdack K.J., Zimmer E.A., Weigt L.A., Janzen D.H. Use of DNA barcodes to identify flowering plants // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 2005. Vol. 102, № 23. P. 8369–8374.

112. Lee W.S., Yun J.W., Nagappan A., Jung J.H., Yi S.M., Kim D.H., Kim H.J., Kim G.S., Ryu C.H., Shin S.C., Hong S.C., Choi Y.H., Jung J.-M. Flavonoids from *Orostachys japonicus* A. Berger induces caspase-dependent apoptosis at least partly through activation of p38 MAPK pathway in U937 Human Leukemic Cells // Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2015. Vol. 16, № 2. P. 465–469.

113. Linneus C. Species Plantarum Holmiae. 1753. P. 1231.

114. Lynch, M., Crease, T.J. The analysis of population survey data on DNA sequence variation // Molecular Biology and Evolution. 1990. Vol. 7, № 4. P. 377–394.

115. Mai J.C., Coleman A.W. The internal transcribed spacer 2 exhibits a common secondary structure in green algae and flowering plants // Journal of Molecular Evolution. 1997. Vol. 44, № 3. P. 258–271.

116. Marin B., Palm A., Klingberg M., Melkonian M. Phylogeny and taxonomic revision of plastid-containing euglenophytes based on ssu rDNA sequence comparisons and synapomorphic signatures in the ssu rRNA secondary structure // Protist. 2003. Vol. 154,  $N_{\rm P}$  1. P. 99–145.

117. Mathews D.H., Burkard M.E., Freier S.M., Wyatt J.R., Turner D.H. Predicting oligonucleotide affinity to nucleic acid targets // RNA. 1999. Vol. 5, № 11. P. 1458–1469.

118. Matyasek R., Renny-Byfield S., Fulnecek J., Macas J., Grandbastien M.-A., Nichols R., Leitch A., Kovařík A. Next generation sequencing analysis reveals a relationship between rDNA unit diversity and locus number in *Nicotiana* diploids // BMC Genomics. 2012. Vol. 13,  $\mathbb{N}$  1. P. 722.

119. Mayuzumi S., Ohba H. The phylogenetic position of Eastern Asian *Sedoideae* (Crassulaceae) as inferred from Chloroplast and nuclear DNA sequences // Systematic Botany. 2004. Vol. 29, № 3. P. 587–598.

120. Merget B., Koetschan C., Hackl T., Förster F., Dandekar T., Müller T., Schultz J., Wolf M. The ITS2 Database // Journal of Visualized Experiments. 2012. Vol. 61, № 1. P. e3806.

121. Mort M.E., Levsen N., Randle C.P., Jaarsveld E.V., Palmer A. Phylogenetics and diversification of *Cotyledon* (Crassulaceae) inferred from nuclear and chloroplast DNA sequence data // American Journal of Botany. 2005. Vol. 92, № 7. P. 1170–1176.

122. Mort M.E., Soltis D.E., Soltis P.S., Francisco-Ortega J., Santos-Guerra A. Phylogenetic relationships and evolution of Crassulaceae inferred from *matK* sequence data // American Journal of Botany. 2001. Vol. 88,  $N_{2}$  1. P. 76–91.

123. Mort M.E., Soltis D.E., Soltis P.S., Francisco-Ortega J., Santos-Guerra A. Phylogenetics and evolution of the Macaronesian clade of Crassulaceae inferred from nuclear and chloroplast sequence data // Systematic Botany. 2002. Vol. 27, № 2. P. 271–288.

124. Nakai T. On the Japanese Species of the Genus *Rhodiola* L. // The Journal of Japanese Botany. 1938. Vol. 14, № 8. P. 491–508.

125. Nei M. Evolution of human races at the gene level. Human genetics, part A: the unfolding genome. Alan R. Liss, New York. 1982. P. 167–181.

126. Nei M., Maruyama T., Chakraborty R. The bottleneck effect and genetic variability in populations // Evolution. 1975. P. 1–10.

127. Nikulin A.Yu., Nikulin V.Yu., Gontcharova S.B., Gontcharov A.A. ITS rDNA sequence comparisons resolve phylogenetic relationships in *Orostachys* subsection *Appendiculatae* (Crassulaceae) // Plant Systematics and Evolution. 2015. Vol. 301,  $N_{2}$  5. P. 1441–1453.

128. Odinets A.D., Leventa A.I., Alekseeva Y.V. Influence of extracts *Eleutherococcus senticosus*, *Rhodíola rósea* and *Orostachys spinoza* dough for indicators an open field before and after an immobilizationny stress // Scientific enquiry in the contemporary world: theoretical basics and innovative approach. 2013. Vol. 1,  $N_{\rm P}$  1. P. 108–109.

129. O'Donnell K., Cigelnik E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus Fusarium are nonorthologous // Molecular Phylogenetics and Evolution. 1997. Vol. 7, N 1. P. 103–116.

130. Ohba H. Generic and infrageneric classification of the old world *Sedoideae* (Crassulaceae) // Journal of Science University of Tokyo. 1978. Sec. III. Vol. 12, № 4.
P. 139–198.

131. Ohba H. Crassulaceae. Flora of Japan. Kodasha. Tokyo. 2001. Vol. 2b. P. 10–31.

132. Ohba H. Orostachys. In: Eggli U. (ed) Illustrated handbook of succulent plants: Crassulaceae. Springer. 2005. P. 135–142.

133. Ohwi J. Crassulaceae. Flora of Japan. Shibundo, Tokyo. 1953. P. 585–592.

134. Olmstead R.G., Palmer J.D. Chloroplast DNA systematics: a review of methods and data analysis // American Journal of Botany. 1994. Vol. 81, № 9. P. 1205–1224.

135. Olmstead R.G., Reeves P.A. Evidence for the polyphyly of the Scrophulariaceae based on chloroplast *rbcL* and *ndhF* sequences // Annals of the Missouri Botanical Garden. 1995. Vol. 82,  $N_{2}$  2. P. 176–193.

136. Pang X., Liu C., Shi L., Liu R., Liang D., Li H., Cherny S.S., Chen S. Utility of the *trnH–psbA* Intergenic Spacer Region and Its Combinations as Plant DNA Barcodes: A Meta-Analysis // PLoS ONE. 2012. Vol. 7, № 11. e48833. 137. Peng Y.Y., Baum B.R., Ren C.Z., Jiang Q.T., Chen G.Y., Zheng Y.L., Wei Y.M. The evolution pattern of rDNA ITS in *Avena* and phylogenetic relationship of the *Avena* species (Poaceae: Aveneae) // Hereditas. 2010. Vol. 147, № 5. P. 183–204.

138. Pons O., Petit R.J. Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles // Genetics. 1996. Vol. 144, № 3. P. 1237–1245.

139. Posada D., Crandall K.A. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks // Trends in ecology & evolution. 2001. Vol. 16, № 1. P. 37–45.

140. Potts A.J., Hedderson T.A., Grimm G.W. Constructing phylogenies in the presence of intra-individual site polymorphisms (2ISPs) with a focus on the nuclear ribosomal cistron // Systematic Biology. 2014. Vol. 63, N 1. P. 1–16.

141. QIAGEN DNeasy® Plant Handbook DNeasy Plant Mini Kit For miniprep purification of total cellular DNA from plant cells and tissues, or fungi [Electronic resource] // Hilden, Germany. 2006. – Mode of access: http://www.ebiotrade.com/buyf/productsf/qiagen/1015107HBDNY\_0800WW.pdf (дата обращения: 20.03.2013).

142. Quandt D., Müller K., Huttunen S. Characterisation of the chloroplast DNA *psbT-H* region and the influence of dyad symmetrical elements on phylogenetic reconstructions // Plant Biology. 2003. Vol. 5, N 4. P. 400–410.

143. Reuter J.S., Mathews D.H. RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis // BMC Bioinformatics. 2010. Vol. 11, № 1. P. 129.

144. Rice K.J., Knapp E.E. Evolutionary factors affecting the probability of local adaptation or should we expect to see ecotypes behind every rock? In: 2nd Interface Between Ecology and Land Development in California (Keeley, J.E. et al., eds.). 2000. P. 221–226.

145. Rozas J., Sánchez-DelBarrio J.C., Messeguer X., Rozas R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods // Bioinformatics. 2003. Vol. 19, № 18. P. 2496–2497.

146. Ryu D.S., Baek G.O., Kim E.Y., Kim K.H., Lee D.S. Effects of polysaccharides derived from *Orostachys japonicus* on induction of cell cycle arrest and apoptotic cell death in human colon cancer cells // BMB Reports. 2010. Vol. 43, № 11. P. 750–755.

147. Sakai M., Kanazawa A., Fujii A., Thseng F.S., Abe J., Shimamoto Y. Phylogenetic relationships of the chloroplast genomes in the genus *Glycine* inferred from four intergenic spacer sequences // Plant Systematics and Evolution. 2003. Vol. 239, № 1. P. 29–54.

148. Samuel R., Stuessy T.F., Tremetsberger K., Baeza C.M., Siljak-Yakovlev S. Phylogenetic relationships among species of *Hypochaeris* (Asteraceae, Cichorieae) based on ITS, plastid *trnL* intron, *trnL–F* spacer, and *matK* sequences // American Journal of Botany. 2003. Vol. 90,  $N_{2}$  3. P. 496–507.

149. Sang T., Crawford D.J., Stuessy T.F. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae) // American Journal of Botany. 1997. Vol. 84, № 8. P. 1120–1136.

150. Seibel P.N., Müller T., Dandekar T., Schultz J., Wolf M. 4SALE — a tool for synchronous RNA sequence and secondary structure alignment and editing // BMC Bioinformatics. 2006. Vol. 7, № 1. P. 498.

151. Selig C., Wolf M., Müller T., Dandekar T., Schultz, J. [Электронный реcypc]. The ITS2 Ribosomal RNA Database II. 2008. Режим доступа: http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de (дата обращения: 20.08.2016).

152. Shaw J., Lickey E.B., Beck J.T., Farmer S.B., Wusheng L., Miller J., Siripun K.C., Winder C.T., Schilling E.E., Small R.L. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis // American Journal of Botany. 2005. Vol. 92,  $N_{2}$  1. P. 142–166.

153. Shaw, J., Lickey E. B., Schilling E. E., Small R. L. The Tortoise and the Hare III. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms // American Journal of Botany. 2007. Vol. 94, № 3. P. 275–288.

154. Shinozaki K., Ohme M., Tanaka M., Wakasugi T., Hayashida N., Matsubayashi T., Zaita N., Chunwongse J., Obokata J., Yamaguchi-Shinozaki K., Ohto C., Torazawa K., Meng B.Y., Sugita M., Deno H., Kamogashira T., Yamada K., Kusuda J., Takaiwa F., Kato A., Tohdoh N., Shimada H., Sugiura M. The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome–its gene organization and expression // EMBO Journal. 1986. Vol. 5, № 9. P. 2043–2049.

155. Simon U.K., Trajanoski S., Kroneis T., Sedlmayr P., Guelly C., Guttenberger H. Accession-specific haplotypes of the internal transcribed spacer region in *Arabidopsis thaliana* - a means for barcoding populations // Molecular Biology and Evolution. 2012. Vol. 29,  $N_{2}$  9. P. 2231–2239.

156. Song J., Shi L., Li D., Sun Y., Niu Y., Chen Z., Luo H., Pang X., Sun Z., Liu C., Lv A., Deng Y., Larson-Rabin Z., Wilkinson M., Chen S. Extensive pyrosequencing reveals frequent intra-genomic variations of internal transcribed spacer regions of nuclear ribosomal DNA // PLoS One. 2012. Vol. 7, № 8. P. e43971.

157. Stamatakis A., Hoover P., Rougemont J. A rapid bootstrap algorithm for theRAxML Web servers // Systematic Biology. 2008. Vol. 57, № 5. P. 758–771.

158. Steele K.P., Vilgalys R. Phylogenetic analyses of Polemoniaceae using nucleotide sequences of the plastid gene *matK* // Systematic Botany. 1994. Vol. 19, № 1.
P. 126–142.

159. Swofford D.L. PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 2002.

160. 't Hart H. Intrafamilial and generic classification of the Crassulaceae // Evolution and Systematics of the Crassulaceae, Leiden, Backhuys. 1995. P. 151–158.

161. Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA // Plant Molecular Biology 1991. Vol. 17, № 5. P. 1105–1109.

162. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 // Molecular Biology and Evolution. 2013. Vol. 30, № 12. P. 2725–2729.

163. Telford M.J. Cladistic analyses of molecular characters: the good, the bad and the ugly // Smithsonian Contributions to Zoology. 2002. Vol. 71, № 1. P. 93–100.

164. Thiede J., Eggli U. Crassulaceae In: Kubitzki, K. (Ed.) Flowering Plants. Eudicots. Springer, Berlin, Germany. 2007. Vol. 9. P. 83–118.

165. Timme R., Kuehl E.J., Boore J.L., Jansen R.K. A comparative analysis of the *Lactuca* and *Helianthus* (Asteraceae) plastid genomes: identification of divergent regions and categorization of shared repeats // American Journal of Botany. 2007. Vol. 94, No 3. P. 302–313.

166. Turmel M., Otis C., Lemieux C. The chloroplast and mitochondrial genome sequences of the charophyte *Chaeotosphaeridium globosum*: insights into the timing of the events that reconstructed organelle DNAs within the green algal lineage that led to land plants // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 2002. Vol. 99,  $N_{\odot}$  17. P. 11275–11280.

167. Uhl C.H., Moran R. Chromosomes of Crassulaceae from Japan and South Korea // Cytologia. 1972. Vol. 37, № 1. P. 59–81.

168. van Ham R.C.H.J., 't Hart H. Phylogenetic relationships in the Crassulaceae inferred from chloroplast DNA restriction-site variation // American Journal of Botany. 1998. Vol. 85, № 1. P. 123–134.

169. Venema J., Tollervey D. Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* // Annual Review of Genetics. 1999. Vol. 33, № 1. P. 261–311.

170. Wen J., Zimmer E.A. Phylogeny of *Panax* L. (the *Ginseng* Genus, Araliaceae): inference from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA // Molecular Phylogenetics and Evolution. 1996. Vol. 6,  $N_{2}$  2. P. 167–177.

171. West C., James S.A., Davey R.P., Dicks J., Roberts I.N. Ribosomal DNA sequence heterogeneity reflects intraspecies phylogenies and predicts genome structure in two contrasting yeast species // Systematic Biology. 2014. Vol. 63, № 4. P. 543–554.

172. White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. Amplifcation and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (eds) PCR Protocols: a guide to methods and applications. 1990. Academic Press, San Diego. P. 315–322.

173. Whitlock B.A., Hale A.M., Groff P.A. Intraspecific inversions pose a challenge for the *trnH-psbA* plant DNA barcode // PloS one. 2010. Vol. 5, № 7. P. e11533.

174. Xiao L.Q., Moller M., Zhu H. High nrDNA ITS polymorphism in the ancient extant seed plant *Cycas*: incomplete concerted evolution and the origin of pseudogenes // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2010. Vol. 55, № 1. P. 168– 177.

175. Xu D.H., Abe J., Sakai M., Kanazawa A., Shimamoto Y. Sequence variation of non-coding regions of chloroplast DNA of soybean and related wild species and its implications for the evolution of different chloroplast haplotypes // Theoretical and Applied Genetics. 2000. Vol. 101,  $N_{2}$  5. P. 724–732.

176. Yost J.M., Bontrager M., McCabe S.W., Burton D., Simpson M.G., Kay K.M., Ritter M. Phylogenetic relationships and evolution in *Dudleya* (Crassulaceae) // Systematic Botany. 2013. Vol. 38, № 4. P. 1096–1104.

177. Youn Y., Lim E., Lee N., Kim Y., Koo M., Choi S. Screening of Korean medicinal plants for possible osteoclastogenesis effects in vitro // Genes & Nutrition. 2008. Vol. 2, № 4. P. 375–380.

178. Zhang H.Y., Oh J.S., Jang T.-S., Min B.S., Na M.K. Glycolipids from the aerial parts of *Orostachys japonicus* with fatty acid synthase inhibitory and cytotoxic activities // Food Chemistry. 2010. Vol. 131, № 4. P. 1097–1103.

179. Zhang J.Q., Meng S.-Y., Wen J., and Rao G.-Y. Phylogenetic relationships and character evolution of *Rhodiola* (Crassulaceae) based on nuclear ribosomal ITS and plastid *trnL-F* and *psbA-trnH* // Systematic Botany. 2014. Vol. 39,  $N_{2}$  2. P. 441–451.

180. Zhao Y., Tsang C., Xiao M., Cheng J., Xu Y., Lau S.K.P., Woo P.C.Y. Intra-Genomic Internal Transcribed Spacer Region Sequence Heterogeneity and Molecular Diagnosis in Clinical Microbiology // International Journal of Molecular Sciences. 2015. Vol. 16, № 10. P. 25067–25079.

181. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction // Nucleic Acids Research. 2003. Vol. 31, № 13. P. 3406–3415.

182. Zuker M., Markham N. [Электронный ресурс]. The mfold Web Server. 1995. Режим доступа: http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/ (дата обращения: 12.02.2014).