

На правах рукописи

НИКУЛИН ВЯЧЕСЛАВ ЮРЬЕВИЧ

**ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОТНОШЕНИЯ В РОДЕ *SEDUM* L.  
(CRASSULACEAE J.ST.-HIL.) И БЛИЗКИХ ЕМУ РОДАХ НА  
ОСНОВАНИИ СРАВНЕНИЯ НУКЛЕОТИДНЫХ  
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ЯДЕРНОЙ И ХЛОРОПЛАСТНОЙ ДНК**

03.02.07 – генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Владивосток – 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» Дальневосточного отделения Российской академии наук

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук **Гончаров Андрей Анатольевич**

**Официальные оппоненты:**

**Шанцер Иван Алексеевич**, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина Российской академии наук, ведущий научный сотрудник лаборатории гербарий

**Чичвархин Антон Юрьевич**, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Национальный научный центр морской биологии» Дальневосточного отделения Российской академии наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной систематики

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Защита диссертации состоится « 20 » октября 2017 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 005.008.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Национальный научный центр морской биологии» Дальневосточного отделения Российской академии наук по адресу: 690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17.  
Факс: (423) 2310-900, e-mail: inmarbio@mail.primorye.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Национальный научный центр морской биологии» Дальневосточного отделения Российской академии наук: <http://www.wimb.dvo.ru/misc/dissertations/index.php/sovets-d-005-008-01/36-nikulin-vyacheslav-yurevich>

Отзывы просим присылать на e-mail: mvaschenko@mail.ru

Автореферат разослан «\_\_» августа 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, кандидат биологических наук

*Вашенко*

Вашенко Марина Александровна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Crassulaceae J.St.-Hil. (толстянковые) – семейство цветковых растений, включающее около 1400 видов, широко распространенных по всему земному шару. Основными центрами разнообразия семейства считаются Мексика, Средиземноморье, Южная Африка, Макаронезия и Восточная Азия. Большинство видов имеет суккулентный облик и населяет засушливые и горные районы. Представители семейства популярны как декоративные, комнатные и лекарственные растения (алоэ, толстянка, каланхоэ, родиола).

Систематика толстяковых имеет долгую историю, однако классификация внутри семейства до сих пор остается объектом дискуссии. Большое морфологическое разнообразие и гомоплазия фенотипических признаков, используемых в систематике, затрудняют реконструкцию филогенетических отношений и построение естественной системы семейства Crassulaceae.

Таксономические проблемы семейства сконцентрированы главным образом в родовой и внутривидовой классификации подсемейства Sedoideae Berger (очитковые) и его типового рода *Sedum* L. – очиток (Mayuzumi, Ohba, 2004). Род характеризуется большим числом видов (около 420), отличающихся высоким морфологическим разнообразием и широким ареалом (Центральная и Южная Америка, Северная Африка, Европа, Юго-Восточная Азия). В *Sedum* часто включали виды, не подпадающие под диагнозы других родов, и в настоящее время он представляет собой конгломерат, объединяющий около 30% видового разнообразия семейства. Однако в большинстве исследований толстянковых с использованием молекулярных маркеров представители рода либо не были представлены вовсе, либо выборки включали ограниченное число видов. Таким образом, несмотря на центральное положение в семействе, род *Sedum* до настоящего времени остается слабо изученным, и его филогенетические отношения с другими представителями семейства Crassulaceae невыясненными. Для решения неясных вопросов, касающихся как систематики, так и филогении *Sedum* и близких ему родов, необходимы исследования как можно более широкой выборки, представляющей все видовое разнообразие рода, с использованием молекулярных маркеров из разных растительных геномов.

**Степень разработанности.** Исследователями систематики толстянковых уже предпринимались попытки изучения родственных отношений в семействе Crassulaceae на основании сравнения нуклеотидных последовательностей хлоропластных генов и некодирующих участков генома (ITS и ETS регионов рДНК; *trnL-trnF*, *rps16* и *matK* хпДНК (Mort et al., 2002; Acevedo-Rosas et al., 2004; Mayuzumi, Ohba, 2004; Carrillo-Reyes et al., 2008, 2009; Гончарова и др., 2008; Kozyrenko et al., 2013, Nikulin et al., 2015). Полученные в этих анализах данные существенно изменили представления о

структуре семейства, основанные на фенотипических признаках. Тем не менее, информативности этих маркеров оказалось недостаточно для построения устойчивых филогений, как на уровне всего семейства, так и отдельных клад и родов. Слабая представленность последовательностей *Sedum* в базе GenBank (около 10% видов) также характеризует род как слабо изученный.

**Цель и задачи исследования.** Целью данной работы является изучение филогенетических отношений в роде *Sedum* и близких ему родах на основании сравнения нуклеотидных последовательностей ITS региона (ITS1–5.8S–ITS2) рДНК и участка гена *matK* хДНК.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Получить нуклеотидные последовательности ITS региона рДНК, участка гена *matK* хДНК и создать матрицы данных для филогенетических анализов.

2. Провести выравнивание высокодивергентных последовательностей ITS региона рДНК, используя информацию о вторичной структуре транскриптов спейсеров ITS1 и ITS2.

3. Реконструировать филогенетические связи в роде *Sedum* и близких ему родах по данным молекулярных маркеров ядерной и хлоропластной ДНК.

**Научная новизна.** В ходе исследования было получено 85 последовательностей ITS региона и 44 – участка гена *matK*, большинство из которых принадлежало представителям проблемного рода *Sedum* (71 и 35 последовательностей соответственно). Были построены и проанализированы модели вторичных структур транскриптов спейсерных участков ITS1 и ITS2 рДНК. Показано, что данные модели соответствуют универсальным моделям ITS растений. Изучены филогенетические отношения в вершинной группе семейства толстянковые (трибы *Aeonieae*, *Semperviveae* и *Sedaeae*) на основании наиболее представительной на сегодняшний день выборки, включающей 223 последовательности ITS региона (из них 140 принадлежат представителям изучаемого рода *Sedum* (120 видов)) и 102 последовательности гена *matK* (из которых 71 принадлежит представителям *Sedum* (57 видов)). В составе триб выделены четыре клады/кластера: *Aeonium*, *Acre*, *Sempervivum* и *Leucosedum*, подтверждена сборная природа рода *Sedum*. Кроме того, установлена дивергенция клады *Acre* на Евроазиатскую и Американскую подклады. В Евроазиатской подкладе выделяются две линии азитских представителей *Sedum*. Также на основании анализа двух маркеров обнаружена близость нескольких макаронезийских видов к представителям Американской подклады.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Результаты исследования вносят существенный вклад в область систематики и филогении растений. Работа может служить фундаментальной основой для проведения ревизии таксономической структуры триб *Aeonieae*, *Semperviveae*

и *Sedeae* в целом, и рода *Sedum* в частности. Полученные результаты важны для понимания микроэволюционных процессов, происходящих в геноме растений. Результаты диссертационной работы могут быть использованы при чтении курсов лекций для студентов биологических специальностей ВУЗов и для проведения практических занятий.

**Методология и методы диссертационного исследования.** В настоящей работе для изучения филогенетических отношений в роде *Sedum* и близких ему родах были определены нуклеотидные последовательности ITS региона ядерной рДНК и участка гена *matK* хлДНК. Для достоверного выравнивания последовательностей ITS региона были разработаны модели вторичных структур транскриптов спейсерных участков ITS1 и ITS2 рДНК. На основании полученных последовательностей двух маркеров были созданы матрицы данных и проведены филогенетические анализы изучаемой таксономической группы с помощью современных компьютерных программ.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Разработанные модели вторичной структуры транскриптов ITS1 и ITS2 рДНК представителей *Sedum* и близких родов в целом соответствуют универсальным моделям ITS растений.

2. Раздельные и совместные анализы последовательностей ITS региона рДНК и участка гена *matK* хлДНК позволили реконструировать филогению на разных таксономических уровнях: триб *Aeonieae*, *Semperviveae* и *Sedeae*, а также слагающих их родов и внутривидовых эволюционных линий.

3. Полиморфный род *Sedum* является полифилетическим. Его представители входят в состав всех клад/кластеров филогенетического древа: *Aeonium* (триба *Aeonieae*), *Sempervivum* (*Semperviveae*), *Acre* и *Leucosedum* (*Sedeae*), перемежаясь с видами других родов. Подтверждена искусственность рода *Sedum* и показана необходимость ревизии его концепции.

**Степень достоверности результатов.** Достоверность результатов обеспечена использованием современных молекулярно-филогенетических методов, обработкой полученных данных с помощью актуальных методов (максимального правдоподобия (ML) и Байесовского подхода (BI)) и статистического анализа. Были проанализированы не только полученные нами последовательности ДНК двух маркеров (85 последовательностей ITS региона и 44 – участка гена *matK*), но и депонированные в базу данных GenBank последовательности *Sedum* и близких родов (138 последовательностей ITS региона и 58 – участка гена *matK*). Для подтверждения результатов исследования приведены табличные данные, диаграммы, филогенетические деревья и модели вторичных структур.

**Апробация работы.** Результаты работы были представлены на российских и международных конференциях: «X региональная конференция студентов, аспирантов вузов и научных организаций Дальнего Востока

России» (Владивосток, 2011), «II (X) международная ботаническая конференция молодых ученых в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2012), XI региональная конференция 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» (Владивосток, 2012), на I межрегиональной молодежной школе-конференции «Актуальные проблемы биологических наук (Владивосток, 2013), на конференции Modern achievements in population, evolutionary and ecological genetics (МАРЕЕГ – 2013; Владивосток, 2013), на 4-й международной конференции «Molecular Phylogenetics» (MolPhy-2014, Москва, 2014).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 9 работ, в том числе 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 114 страницах, иллюстрирована 23 рисунками и содержит 8 таблиц в основной части и одну таблицу в приложении. Список литературы насчитывает 195 наименований, из них 180 на иностранном языке.

**Благодарности.** Автор искренне благодарит научного руководителя д.б.н. Гончарова А.А. за обучение, всестороннюю помощь и поддержку на всех этапах исследования. Автор выражает признательность Артюковой Е.В. за помощь в подготовке диссертации. Автор благодарен частным коллекционерам Ray Stephenson, Marko Doboš и Milan Hornát, приславшим образцы растений.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ (№16-34-00176 и №15-29-0250515) и ДВО РАН (№15-II-6-034).

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В первой подглаве кратко изложены биологические особенности и история воззрений на филогенетическую структуру представителей семейства толстянковые. Приводятся данные о несоответствии филогений, основанных на молекулярных и морфологических данных. Далее представлена характеристика рода *Sedum*: ареал, количество видов, полиморфизм, слабая изученность рода. В следующей подглаве дано определение молекулярного маркера и перечислены основные качества, которыми он должен обладать. Затем рассмотрено строение ITS региона ядерной рДНК и указаны преимущества использования этого маркера. Далее кратко описывается явление согласованной эволюции в мультигенных семействах, его механизмы и влияние на результаты филогенетических анализов. Отдельной подглавой изложены способы изучения вторичной

структуры транскриптов и полученная на данный момент информация о структуре спейсеров ITS1 и ITS2 различных организмов. Даны определения компенсаторных и полукомпенсаторных замен оснований, описана их важность для сохранения спаренности нуклеотидов в функционально значимых спиральных вторичной структуры. В заключительной подглаве рассмотрено строение гена *matK* хпДНК и преимущества использования данного маркера.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**2.1. Материалы.** Материалом для исследования послужили 85 образцов растений семейства толстянковые (трибы Aeonieae, Semperviveae и Sedeae), из которых 71 принадлежал роду *Sedum*, а 14 – близким родам/видам. Также в работу были включены все доступные на июль 2016 года нуклеотидные последовательности ITS региона рДНК и гена *matK* хпДНК представителей триб Aeonieae, Semperviveae и Sedeae из международной базы данных GenBank.

**2.2. Выделение ДНК.** Выделение тотальной клеточной ДНК проводили из листьев и соцветий, используя DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Maryland, USA) и следуя инструкциям производителя. Образцы ДНК хранили при –20 °С.

**2.3. Амплификация ДНК.** Для амплификации с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) полного ITS региона рДНК (ITS1–5.8S–ITS2), использовали универсальные праймеры: 1400F (Elwood et al., 1985) и ITS055R (Marin et al., 2003) для первого раунда амплификации и внутренние праймеры 18Sm10 (Wen, Zimmer, 1996) и ITS4R (White et al., 1990) для второго раунда (если это было необходимо). Ген *matK* амплифицировали, используя две пары праймеров: LAM\_F и 3F\_KIM (Dunning, Savolainen, 2010) для первого раунда амплификации и SAX\_F1 с 3F\_KIMm (Dunning, Savolainen, 2010) для второго раунда.

**2.4. Электрофорез ДНК.** Определение размера продуктов ПЦР проводили методом электрофореза с использованием маркера молекулярного веса в 1%-ном агарозном геле с бромистым этидием (0,3 мкл/1мл) в 1× TBE буфере при напряжении 120 Вольт в течение 20 минут. После проведения электрофореза гель фотографировали в проходящем УФ-свете.

**2.5. Секвенирование ДНК.** Реакцию циклического секвенирования продуктов ПЦР проводили с набором Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v.3.1 (Applied Biosystems Inc., Foster City, USA), используя праймеры 18Sm10 и ITS4R для ITS региона, SAX\_F1 и 3F\_KIMm для гена *matK*. Очистку продуктов реакции циклического секвенирования проводили переосаждением этанолом. Определение нуклеотидных последовательностей обеих цепей продуктов ПЦР проводили на секвенаторе ABI PRIZM 3130 (Applied Biosystems Inc., Foster City, USA) на базе центра коллективного пользования ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН. Полученные нуклеотидные

последовательности собирались и визуально проверялись по хроматограммам в пакете программ Staden Package v. 1.4 (Bonfield et al., 1995).

**2.6. Моделирование вторичных структур.** Построение моделей вторичной структуры транскриптов участков ITS1 и ITS2 проводили с использованием сервера Mfold Web Server (<http://mfold.rna.albany.edu>; Zuker, 2003).

**2.7. Матрицы данных и выравнивание последовательностей.** Для филогенетических анализов были созданы три основных матрицы данных: 223 последовательности ITS региона рДНК, из которых 140 принадлежали представителям изучаемого рода *Sedum* (120 видов; 590 пн); 102 последовательности гена *matK* хпДНК, из которых 71 принадлежала представителям *Sedum* (57 видов; 717 пн) и комбинированная матрица двух маркеров (75 последовательностей, из них 51 – представителей рода *Sedum*; 1307 пн). Последовательности выравнивались вручную в программе SeaView (Galtier et al., 1996).

**2.8. Филогенетический анализ.** Филогенетические деревья строили методом ML в программе PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002), а также BI, используя программу MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck, Ronquist, 2001). Подбор модели эволюции для нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы jModelTest 2.1.1 (Darriba et al., 2012). Отсутствие противоречий между филогенетическими сигналами двух маркеров (ITS регион и участок гена *matK*) оценивали в программе PAUP 4.0b10 с помощью опции Partition Homogeneity Test (PHT) с использованием 100 реплик. Устойчивость узлов филогенетических деревьев, полученных методом ML, рассчитывали с помощью сервера RAxML web server version 7.7.1 (<http://embnet.vital-it.ch/raxml-bb/>; Stamatakis et al., 2008) методом бутстрепа (Bootstrap Percentage, далее BP; Felsenstein, 1985), и определяя апостериорные вероятности (Posterior Probabilities, далее PP) в BI.

Характеристики последовательностей (длина, содержание ГЦ-оснований) были получены в программе PAUP 4.0b10. Для оценки попарных генетических дистанций (*p*-дистанций) использовалась программа MEGA v.6.06 (Tamura et al., 2013). График распределения нуклеотидных замен (*Pi*) строили в программе DnaSP ver. 5.10 (Librado, Rozas, 2009). Статистическую обработку результатов проводили в программном продукте Microsoft Office Excel 2007.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

**3.1. Общая характеристика последовательностей ITS региона.** В матрице из 223 последовательностей ITS региона рДНК общая длина участка ITS1–5.8S–ITS2 варьировала от 576 пн у *Monanthes minima* (Bolle) Christ до 614 пн у *Sempervivum* spp. и в среднем составляла 601±6 пн. Процентное содержание оснований гуанина+цитозина (ГЦ-оснований) было в пределах

47–61% (в среднем  $56,0 \pm 3,3\%$ ). Средняя длина спейсера ITS1 была  $225 \pm 6$  пн ( $56,3 \pm 4,4\%$  ГЦ). Экзон 5.8S рДНК был высококонсервативен по длине и имел протяженность 161 пн, за исключением образца *Aichryson palmense* Webb ex Bolle (160 пн), вероятно, из-за ошибки секвенирования. Содержание ГЦ-оснований в экзоне колебалось от 50 до 55%. Длина участка ITS2 варьировала от 197 пн у *S. treleasei* Rose до 226 пн у большинства представителей рода *Sempervivum* L. и в среднем составляла  $215 \pm 3$  пн ( $58,4 \pm 4,5\%$  ГЦ).

В исследуемых последовательностях ITS региона длинные консервативные участки почти отсутствовали, что усложняло выравнивание (поиск гомологичных нуклеотидов). Поэтому нами было решено использовать термодинамическое моделирование вторичных структур транскриптов участков ITS1 и ITS2 для поиска функционально консервативных доменов и проведения выравнивания на основании этой информации.

**3.2. Вторичная структура спейсеров ITS1 и ITS2.** Используя алгоритмы, основанные на термодинамическом фолдинге (Mfold Web Server), нами были построены гипотетические модели вторичной структуры транскриптов ITS1 и ITS2 для всех исследуемых последовательностей. Многочисленные компенсаторные и полукompенсаторные замены оснований, выявленные в структурах этих спейсеров, подтверждают реалистичность разработанных моделей. На рисунке 1 показаны вторичные структуры ITS1 и ITS2 для *Sedum acre* L. – типового вида рода. Согласно полученным нами моделям, каждый спейсер характеризовался наличием 4 спиральных и 5 одноцепочечных участков. В спиральных участках наблюдалось более высокое содержание ГЦ-оснований (в среднем 66%), по сравнению с одноцепочечными участками (в среднем 36%).

В ITS1 спирали были относительно короткими, и в общей сложности не более 65% нуклеотидов спейсера участвовали в их формировании. Нуклеотиды, консервативные у 90% последовательностей, составляли в ITS1 не более 43% от их общего числа. У представителей макаронезийских родов *Aeonium* Webb & Berth., *Aichryson* Webb & Berth., *Monanthes* Haw и нескольких североафриканских видов *Sedum* наблюдалось заметное укорочение спирали I: 21–25 нт против 38–48 нт у других таксонов (в описании вторичной структуры транскриптов мы используем сокращение «нт» – нуклеотидов, обращая внимание на то, что данная структура свойственна одноцепочечной молекуле РНК). Вторая спираль ITS1 у большинства образцов включала 33–38 нт (Рис. 1), однако у видов рода *Dudleya* Britton & Rose и нескольких американских видов *Sedum* (*S. debile* S. Watson, *S. oreganum* Nuttall, *S. spathulifolium* Hooker и *S. ternatum* Michaux) она была укорочена и состояла из 20–23 нт.

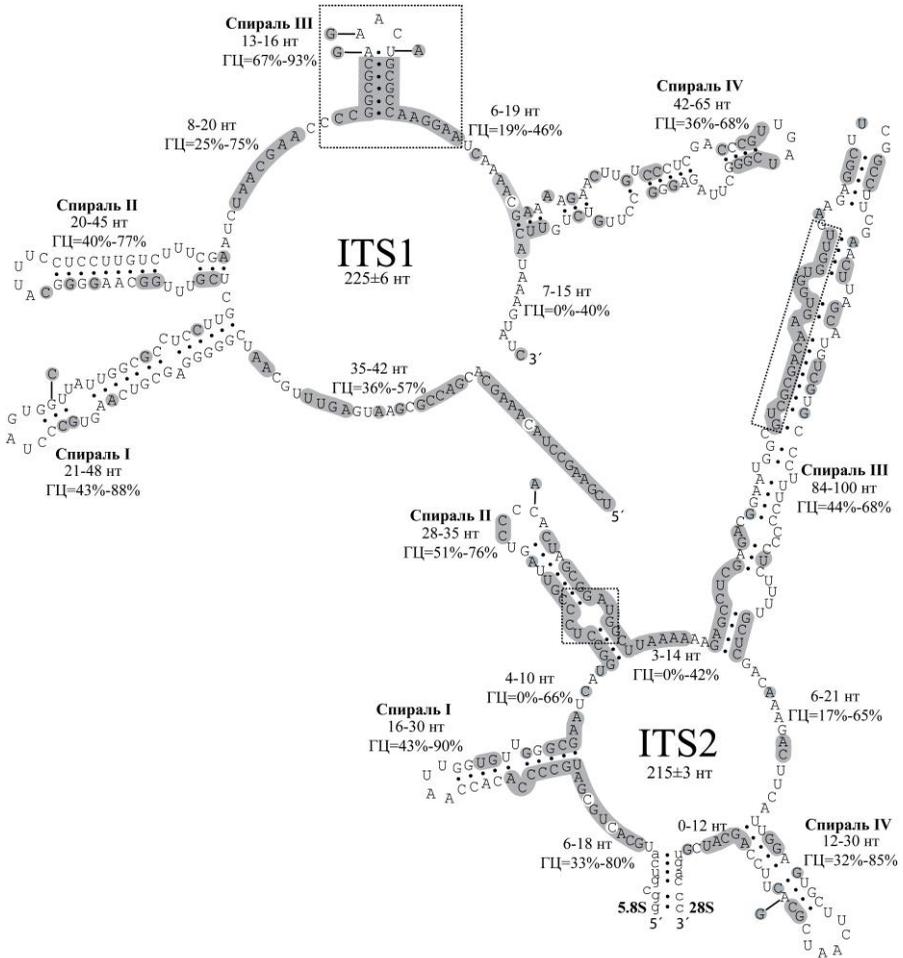


Рисунок 1 – Вторичная структура ITS1 и ITS2 *S. acre*. Серым отмечены нуклеотиды, консервативные у 90% последовательностей. В выносках находятся нуклеотиды, консервативные у 90% последовательностей, но отличные у *S. acre*. Рамками отмечены наиболее консервативные регионы вторичной структуры. Также указаны вариации в длине и содержании ГЦ-оснований для каждого домена.

Третья спираль ITS1 являлась самой короткой из всех в ITS1 и ITS2. Кроме того, она была практически неизменна по числу нуклеотидов в ее составе (15 нт) и консервативна по первичной последовательности. Достаточно консервативный домен, включающий спираль III и окружающие его одноцепочечные участки соответствует универсальному мотиву

покрытосеменных растений (Angiosperm Universal Core motif; GGCRY-(N)<sub>4-7</sub> GYGYCAAGGAA, где Y = C или T; R = G или A; N = любой нуклеотид; Liu, Schardl, 1994). Данный участок использовался нами в качестве ориентира для выравнивания последовательностей ITS1. Четвертая спираль ITS1 включала от 42 нт до 65 нт.

В ITS2 доля вовлеченных в спирали нуклеотидов была выше (80%), чем в ITS1, и длина спиралей соответственно больше. Спейсер ITS2 был в целом более консервативным, чем ITS1, что делало моделирование его вторичной структуры более надежным. Нуклеотиды, консервативные у 90% последовательностей, составляли в ITS2 около 56% от их общего числа.

Первая спираль ITS2 включала от 16 (*S. treleasei*) до 30 нт (*S. rupestre* L.). Характерной особенностью данной спирали являлся консервативный для покрытосеменных участок в основании с высоким содержанием гуанин-цитозиновых пар (2–6 нт; Hershkovitz, Zimmer, 1996). Вторая спираль ITS2 являлась относительно консервативной по длине (28–35 нт) и по вторичной структуре. Ближе к основанию спирали (4–5 пар от ее начала) находился характерный для ITS2 эукариот мотив – консервативная пиримидин-пиримидиновая внутренняя петля (Coleman, 2003, 2007; Schultz et al., 2005). Третья спираль ITS2 была самой длинной из всех спиралей спейсеров ITS региона и включала от 84 нт у образца *Semp. ciliosum* Craib до 100 нт у *S. multicaule* Wallich ex Lindley. Данная спираль имела характерную структуру с несколькими дву- и односторонними боковыми петлями и высококонсервативным у большинства эукариот мотивом в 20 нт, содержащим последовательность UGGU и расположенным с 5'-стороны спирали, вблизи вершинной петли (Mai, Coleman, 1997; Coleman, 2003, 2007; Schultz et al., 2005). Четвертая спираль ITS2 характеризовалась высокой вариабельностью (от 12 нт у *S. multiceps* Cosson & Durand до 29 нт у образца *S. brevifolium* DC.).

**3.3. Общая характеристика последовательностей гена *matK*.** Длина продукта ПЦР гена *matK* составляла в среднем 800 пн. После выравнивания длина последовательностей в матрице данных (102 последовательности, 71 из них представителей рода *Sedum*) варьировала от 398 пн у *S. obcordatum* R.T. Clausen до 716–717 пн у *S. nudum* Aiton, *S. lancerottense* Murray, *S. fusiforme* Lowe. Эти различия были обусловлены тем, что некоторые последовательности из базы GenBank были получены с помощью праймеров, сайты посадки которых были отличны от наших и расположены ближе к началу гена. Кроме того, в последовательностях гена *matK* было обнаружено несколько гомопластических инделей, которые были сохранены в матрице для филогенетических анализов. Процентное содержание ГЦ-оснований в последовательностях было относительно низкое – в пределах 31–38% (в среднем 34,1±1%), что характерно для хлоропластных генов.

**3.4. Филогения рода *Sedum* и близких ему родов на основании последовательностей ITS региона.** Филогенетический анализ

представителей *Sedum* и 14 близких родов (трибы *Sedeae*, *Semperviveae* и *Aeonieae*) на основании сравнения последовательностей ITS региона рДНК методом ML (модель GTR+I+G) позволил нам получить дерево, показанное на рисунках 2 и 3. Исследуемые таксоны вошли в состав 3 основных клад (названия клад соответствуют первой молекулярной филогении семейства; van Ham, 1995): *Aeonium*, *Sempervivum*, *Acra*, и парафилетического кластера *Leucosedum* (кластером мы называем клады, установленные в исследованиях других авторов, но не получившие поддержки в наших анализах).

Ранее было показано, что макаронезийские рода *Aeonium*, *Aichryson* и *Monanthes* занимают обособленное положение и формируют в филогенетических реконструкциях устойчивую кладу *Aeonium*, взаимоотношения в которой хорошо выяснены (Mes, 't Hart, 1996; Mes et al., 1997; Jorgenson, Frydenberg, 1999; Mort et al., 2002; Fairfield et al., 2004; Klein, Kadereit, 2015). Мы выбрали несколько наиболее дивергентных последовательностей этой клады для наших анализов.

Клада *Sempervivum* (17 образцов) была поддержана (и то слабо, 50%) только в анализе методом ML (Рис. 26). В составе этой клады выделились две высокоустойчивые подклады: первая включала представителей рода *Sempervivum* (10 видов), вторая – членов *Sedum* ser. *Rupestris* Berger (7 последовательностей, 6 видов).

Кластер *Leucosedum* включал 42 последовательности, которые были распределены между двумя неравными парафилетически ветвящимися линиями: большая (55/0.99) включала 39 представителей родов *Sedum* и *Dudleya*, в то время как во вторую, без статистической поддержки, вошли три таксона (*Rosularia serrata* (L.) Berger, *Sedum* sp. и *S. cepaea* L.; Рис. 26). Порядок ветвления в *Leucosedum* был лишь частично установлен. Самая крупная клад в составе этого кластера (87/1.00) включала американские таксоны: девять последовательностей рода *Dudleya* (95/1.00) и пять – рода *Sedum*. Она была названа нами кладой *Dudleya* (Рис. 26). Монофилетический род *Prometheum* (Berger) Ohba (98/0.99) был близок к *S. hispanicum* L. (90/1.00). Выделялась также клад видов *Sedum* (12 последовательностей), поддержанная только в ВI-анализе (0.99; Рис. 26). В ней *S. brevifolium* и *S. pallidum* M. von Bieberstein оказались близки к *S. album* L./*S. hirsutum* Allioni (73/0.98) и *S. gracile* C.A. Meyer/*S. subulatum* (C.A. Meyer) Boissier соответственно. Близость к ним *S. stefco* Stefanoff была статистически недостоверна.

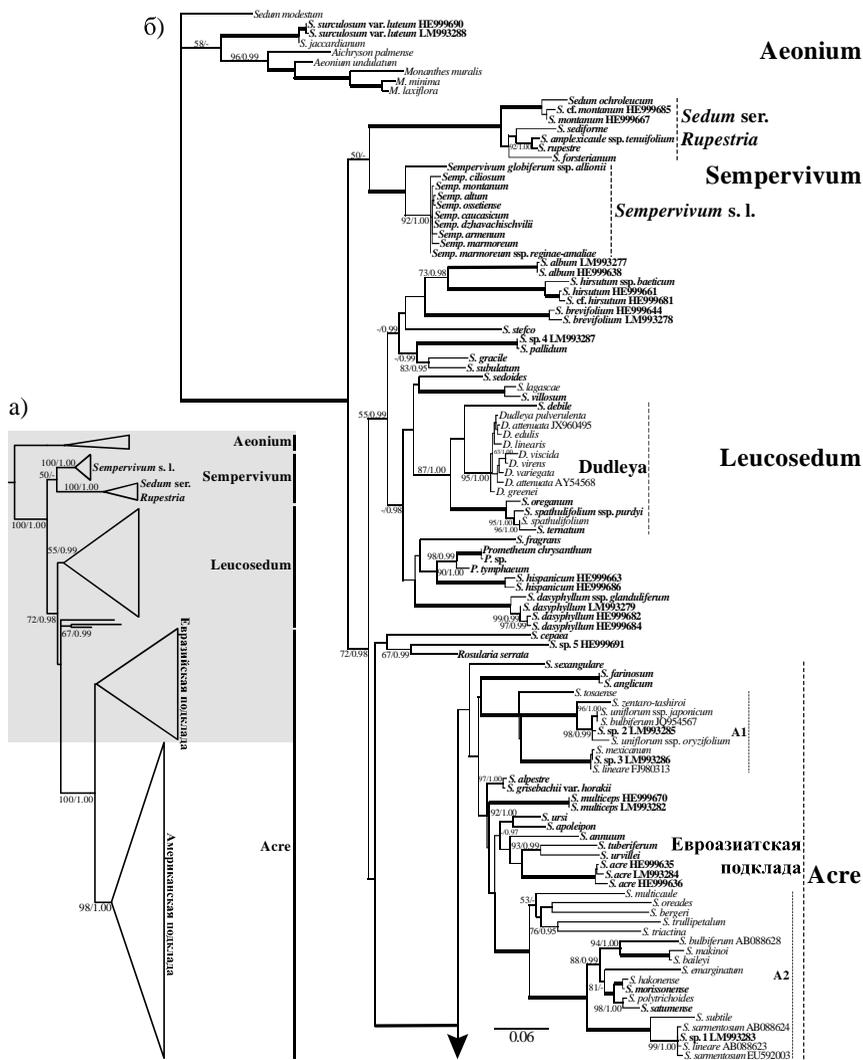


Рисунок 2 – Филогенетическое дерево триб Sedeae, Semperviveae и Aeonieae, основанное на сравнении 223 последовательностей ITS региона (590 пп) методом ML (модель GTR+I+G). Обозначения: а – схематичное изображение дерева; б – увеличенная часть дерева, включающая клады Aeonium, Sempervivum, кластер Leucosedum и Евразийскую подкладу клады Acre. Значения BP выше 50% и PP более 0.95 даны над или под ветвями (ML/BI). Ветви со 100% BP и 1.00 PP показаны утолщенными линиями. Номера доступа приведены для таксонов, представленных в матрице данных более чем одной последовательностью. Таксоны, последовательности которых получены в этом исследовании, выделены жирным шрифтом.

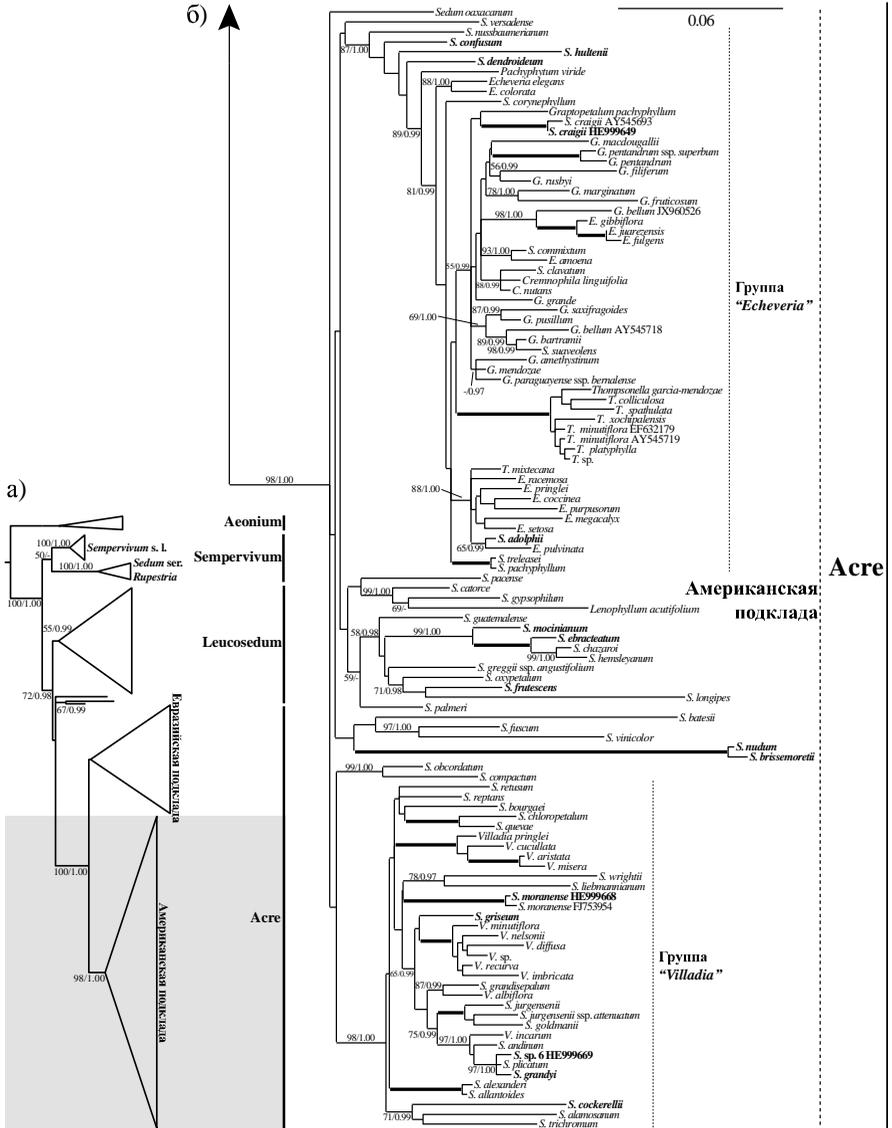


Рисунок 3 – Филогенетическое дерево триб Sedeae, Sempervivaceae и Aeonieae, основанное на сравнении 223 последовательностей ITS региона (590 пн) методом ML (модель GTR+I+G). Обозначения: а – схематичное изображение дерева; б – увеличенная часть дерева, включающая Американскую подкладку клady Асге. Описание соответствует рисунку 2.

Клада *Acre* в нашем анализе включала наибольшее число видов и родов толстянковых (155 и 8 соответственно). Она получила максимальную статистическую поддержку в анализах ML и BI. Клада *Acre* подразделялась на неподдержанную подкладу евроазиатских очитков (42 последовательности) и хорошо поддержанную (98/1.00) подкладу американских членов трибы *Sedeae* (113 последовательностей). Евроазиатская подклада была представлена исключительно видами *Sedum*. В ее состав входили две устойчивые линии азиатских видов, не проявляющие близости друг к другу и названные нами A1 и A2 (9 и 18 последовательностей соответственно; Рис. 2б), парафилетическая группа из 12 европейских образцов, последовательность *S. sexangulare* L., а также близкие между собой *S. anglicum* Hudson и *S. farinosum* Lowe. Порядок ветвления в азиатских кладах был хорошо поддержан, в отличие от неразрешенных отношений между европейскими видами (Рис. 2б). Последние были представлены в основном серией *Alpestria* Berger (9 видов), но при этом не формировали на древе соответствующую линию.

Единственным исключением в Американской подкладу были близкие между собой последовательности *S. nudum* и *S. brissemoretii* Hamet с острова Мадейра (Рис. 3б), образующие на древе отдельную длинную ветвь. Кроме *Sedum*, в Американскую подкладу *Acre* входили представители еще семи родов толстянковых (*Echeveria* DC., *Graptopetalum* Rose, *Pachyphytum* Link, Klotzsch & Otto, *Thompsonella* Britton & Rose, *Cremonophila* Rose, *Lenophyllum* Rose и *Villadia* Rose; Рис. 3б). Члены этих родов, как правило, были близки между собой, хотя ни один род не образовал монофилетическую линию. В общем, порядок ветвления в Американской подкладу был плохо разрешен. Наиболее поддержанными группами были "*Villadia*" (98/1.00; Рис. 3б) и "*Echeveria*" (89/1.00), установленные ранее Carrillo-Reyes с соавторами (2009).

**3.5. Филогения рода *Sedum* и близких ему родов на основании участка гена *matK*.** Филогенетическое древо для триб *Sedeae*, *Semperviveae* и *Aeonieae*, построенное методом ML на основании сравнения 102 последовательностей участка гена *matK*, показано на рисунке 4. На нем последовательности распределены между тремя кладами – *Aeonium*, *Leucosedum* и *Acre*, а также парафилетическим кластером *Sempervivum*. Последний слагается двумя устойчивыми (100/1.00) подкладами – хорошо структурированной *Sedum* ser. *Rupestris* и *Sempervivum* s. l., представленной 4 последовательностями.

Поддержка *Leucosedum* была минимальной (56% методом ML), при этом большинство ее внутренних ветвей получили от слабой до высокой поддержки (Рис. 4). Базальное положение в этой кладу занимала пара *S. serpaea*/*S. magellense* Tenore (89/0.99). Большая часть последовательностей (32) вошли в подкладу, слагаемую двумя устойчивыми группами и видом *S. stefco*.

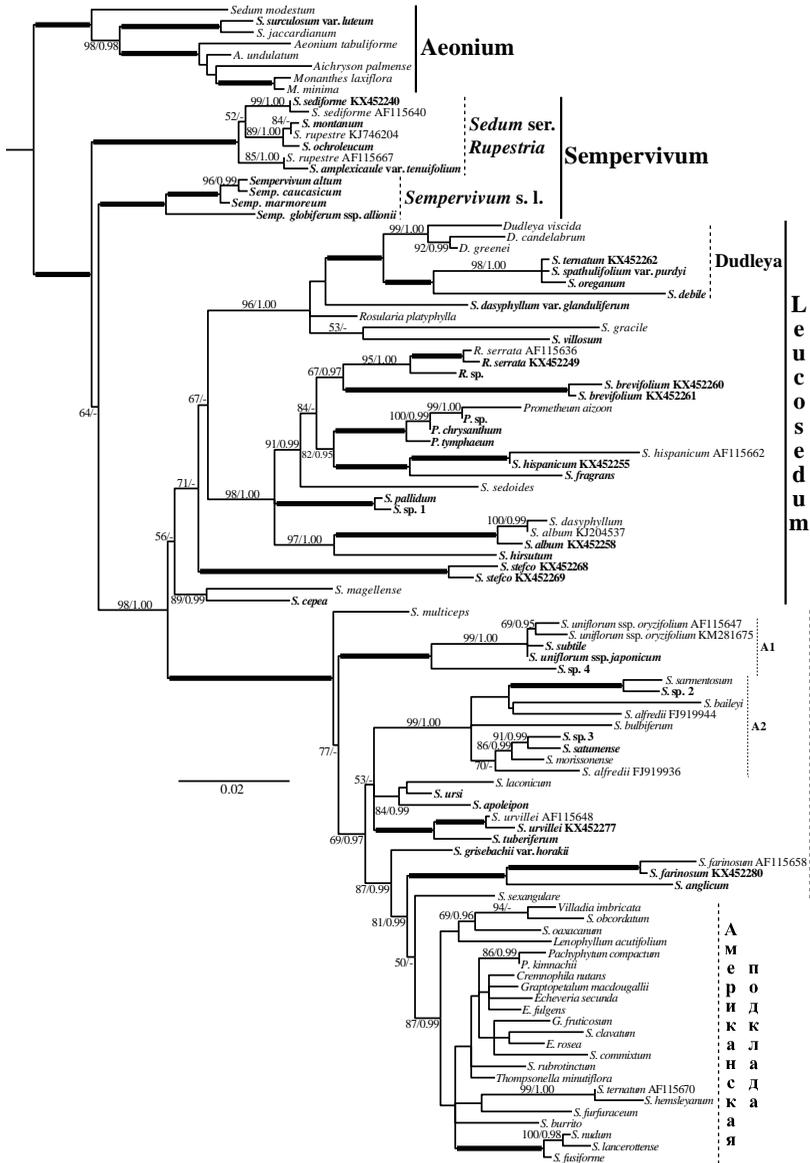


Рисунок 4 – Филогенетическое дерево триб Sedeae, Semperviveae и Aeonieae, основанное на сравнении 102 последовательностей гена *matK* (717 пн) методом ML (модель TVM+G). Описание соответствует рисунку 2.

Первая группа (21 последовательность; 98/1.00) объединяла виды *Sedum*, *Rosularia* (DC.) Stapf и *Prometheum* из Европы. Вторая группа (11 последовательностей, 96/1.00) включала как европейские виды (*S. gracile*, *S. villosum* L., *S. dasyphyllum* var. *glanduliferum* (Gussone) Moris и *Rosularia platyphylla* (Schrenk) Berger), так и американские таксоны – *S. debile*, *S. ternatum*, *S. oreganum*, *S. spathulifolium* var. *purdyi* (Jepson) R.T. Clausen и *Dudleya* spp. (клада *Dudleya*; Рис. 4).

Сестринской по отношению к *Leucosedum* была клада *Acre* (48 последовательностей), характеризующаяся высокой поддержкой в анализах (100/1.00). В ее состав вошли евроазиатские (преимущественно Средиземноморье и Азия) и американские виды *Sedum*, а также представители американских эндемичных родов (*Graptopetalum*, *Echeveria*, *Cremnophila*, *Lenophyllum*, *Thompsonella*, *Pachyphytum* и *Villadia*), которые не формировали соответствующие родовые линии, а перемежались с видами *Sedum*. Все американские таксоны (23 последовательности), а также 3 макаронезийских вида *Sedum* (*S. fusiforme*, *S. nudum* и *S. lancerotense*) вошли в умеренно поддержанную (87/0.99) вершинную подкладу, порядок ветвления в которой был слабо разрешен (Рис. 4). Евроазиатские виды (25 последовательностей/21 вид) не формировали единого кластера, а располагались парафилетически в основании Американской подклады с умеренной поддержкой. Азиатские виды *Sedum* были распределены между двумя устойчивыми группами (Рис. 4): A1 (100/1.00) и A2 (99/1.00), тогда как отношения между европейскими видами остались в значительной степени неразрешенными. Среди европейских видов *S. farinosum*, *S. anglicum* (81/0.99) и *S. sexangulare* (50/-) проявили наибольшую близость к Американской подкладе.

**3.6. Анализ объединенной матрицы последовательностей ITS региона и гена *matK*.** Учитывая, что при анализе последовательностей ITS региона и гена *matK* по отдельности некоторые ветви не получили статистической поддержки, нами была предпринята попытка добиться большей разрешенности топологии древа путем увеличения матрицы данных (числа анализируемых позиций). Для этого мы объединили последовательности *matK* хпДНК и ITS рДНК 75 представителей триб *Sedeae*, *Semperviveae* и *Aeonieae*. Общая длина матрицы составила 1307 пн. Последовательности обоих маркеров для большей части видов (40 из 75) были получены нами из одного образца ДНК.

Необходимо отметить, что результаты теста РНТ отвергли нулевую гипотезу о конгруэнтности наборов последовательностей гена *matK* и ITS региона ( $P=0.01$ ). Вместе с тем, сравнение топологий, полученных при анализе этих маркеров по отдельности, не выявило противоречий между ними как в порядке ветвления, так и в значениях поддержки основных клад. Этот факт позволил нам предположить, что оба маркера в целом сходным образом отражают родственные отношения в изучаемой группе, поэтому мы

сочли возможным провести анализ их объединенной матрицы. Полученное дерево представлено на рисунке 5.

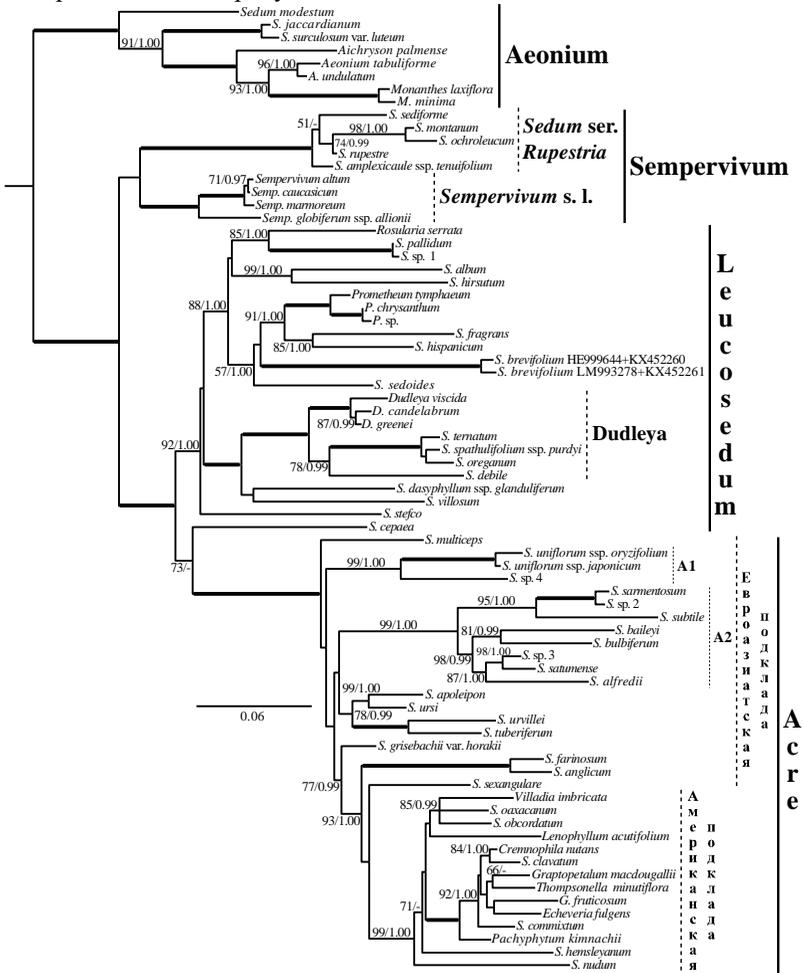


Рисунок 5 – Филогенетическое дерево триб Sedeae, Semperviveae и Aeonieae, основанное на сравнении 75 последовательностей ITS+matK (1307 пн) методом ML (модель GTR+I+G). Описание соответствует рисунку 2.

Филогенетический анализ объединенных последовательностей двух маркеров отражал основные черты индивидуальных. На дереве (Рис. 5) установлены следующие основные группировки: клада Aeonium, кластер Sempervivum, включающий две устойчивые (100/1.00) подклады (*Sedum* ser. *Rupestria* и *Sempervivum* s. l.), парафилетический кластер Leucosedum и

устойчивая клада *Acre* (100/1.00). Большая часть последовательностей *Leucosedum* была обособлена с хорошей поддержкой (92/1.00), лишь *S. seraea* проявлял близость к кладе *Acre* (73% BP), что и обусловило парафилетичность *Leucosedum* в целом. В кластере четко (100/1.00) выделилась клада *Dudleya*, включающая представителей *Dudleya* ssp. и четырех американских видов *Sedum* (Рис. 5). Как и в предыдущих анализах каждого маркера, клада *Acre* получила максимальную поддержку (100/1.00). Евроазиатские виды в *Acre* формировали парафилетическую группу, при этом азиатские линии (A1 и A2; Рис. 5) сохраняли высокую поддержку (99/1.00). *S. farinosum/S. anglicum* (100/1.00) и *S. sexangulare*, как и в анализе гена *matK*, проявили близость к Американской подкладе. Поддержка последней была чуть выше, чем в отдельных анализах двух маркеров (99/1.00 по сравнению с 87/0.99 для *matK* и 98/1.00 для ITS).

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

**4.1. Вторичная структура спейсеров ITS1 и ITS2.** Полученные нами модели вторичной структуры спейсеров ITS1 и ITS2 для представителей триб *Sedeae*, *Semperviveae* и *Aeonieae* согласуются с моделями, предложенными для других групп растений (Liu, Schardl, 1994; Goertzen et al., 2003; Schultz et al., 2005; Coleman, 2015). Многочисленные компенсаторные и полукompенсаторные замены оснований, выявленные в структурах ITS1 и ITS2 толстянковых, подтверждают реалистичность разработанных моделей.

Оба спейсера включали четыре спирали и разделяющие их одноцепочечные участки. В ITS1 толстянковых было обнаружено два консервативных мотива. Первый соответствовал универсальному мотиву покрытосеменных растений (Liu, Schardl, 1994) и находился в спирали III и следующем за ним одноцепочечным участком нашей модели (Рис. 1). Второй консервативный мотив включал 5'-конец спейсера, но имел меньшую гомологию последовательности с представителями других групп покрытосеменных. Было отмечено несколько консервативных участков и в ITS2: спираль II имела внутреннюю петлю в основании, представленную непарными пиримидинами (pyrimidine-pyrimidine mismatch), третья спираль являлась самой длинной и содержала консервативный участок с мотивом UGGU в дистальной части (Рис. 1).

Большинство инделей являлись неинформативными аутапоморфными длиной 1–2 пн, и только в двух случаях в ITS1 они были синапоморфными. Одна из них, укороченная спираль I, характеризовала североафриканские виды *Sedum* и макаронезийские рода *Aeonium*, *Aichryson*, *Monanthes* (клада *Aeonium*) и возникла, вероятно, у их общего предка. Другой структурной синапоморфией была укороченная спираль II, характерная для видов рода *Dudleya* и группы американских видов *Sedum*, формирующих кладу *Dudleya* в *Leucosedum*.

Данные, полученные в ходе моделирования вторичной структуры спейсеров, позволяют сделать вывод о том, что для толстянковых характерна высокая лабильность вторичной структуры ITS1 и ITS2, выражающаяся в непостоянстве расположения одно- и двусторонних боковых петель, даже в слабо различающихся последовательностях. И, несмотря на это, данные структуры наблюдаются у нормально развивающихся организмов.

Применение метода моделирования вторичной структуры транскриптов спейсеров ITS1 и ITS2 способствовало более достоверному выравниванию последовательностей.

**4.2. Филогения рода *Sedum*.** Анализ большого числа нуклеотидных последовательностей толстянковых из ядерного (223 – ITS региона рДНК) и хлоропластного (102 – гена *matK* хпДНК) геномов позволил построить в значительной мере устойчивую филогению богатого видами и таксономически сложного рода *Sedum* и близких ему родов (трибы *Aeonieae*, *Semperviveae* и *Sedeae*). Полученные топологии, как правило, согласуются с результатами предыдущих исследований филогении толстянковых (с ограниченными выборками очитков) на основании последовательностей гена *matK*, ITS региона и спейсера *trnL-trnF* (Mort et al., 2001, 2002; Acevedo-Rosas et al., 2004; Mayuzumi, Ohba, 2004; Гончарова и др., 2008; Carrillo-Reyes et al., 2009).

В результате анализов ядерного и хлоропластного маркеров были установлены одни и те же основные клады со сравнимой статистической поддержкой и сходным порядком ветвления (Рис. 2, 3, 4). Близость топологий, базирующихся на данных из ядерного и хлоропластного геномов, имеющих собственную эволюционную динамику, позволяет предположить, что филогенетические гипотезы, основанные на этих построениях, достоверно отражают родственные отношения в исследуемой группе *Crassulaceae*. Высокая устойчивость клад деревьев также позволяет говорить о том, что ITS регион и ген *matK* являются хорошими маркерами для реконструкции филогении толстянковых на разных таксономических уровнях. К сожалению, комбинированный анализ двух маркеров существенно не повысил устойчивость основных клад и подклад дерева (Рис. 5).

Результаты анализов показали, что виды *Sedum* вошли в состав всех клад/кластеров дерева (Рис. 2, 3, 4, 5), что указывает на полифилетичность этого рода и искусственность его концепции (Nikulin et al., 2016; Никулин, Гончаров, 2017). Наиболее сложной является таксономическая ситуация в трибе *Sedeae*, объединяющей большую часть видов рода, а также 11 родов, состоятельность которых весьма сомнительна.

Отдаленное родство некоторых видов *Sedum* из Северной Африки (серии *Caerulea* Fröd., *Pubescens* Mes и *Monanthoidea* (Batt.) Fröd.) с остальной частью рода и их близость к макаронезийским родам (триба *Aeonieae*/клада *Aeonium*) были установлены более 20 лет назад (Mes, 't Hart, 1994; Mes, 1995), но данный факт до сих пор не принят во внимание

систематиками ('t Hart, Bleij, 2005; Thiede, Egli, 2007). Эта близость была подтверждена результатами нескольких анализов (в том числе и нашими) для серии *Monanthoidea* (*S. modestum*, *S. surculosum* var. *luteum* и *S. jaccardianum*) и поддержана не только высокой устойчивостью клады *Aeonium*, но и наличием синапоморфных инделей в последовательностях гена *matK* и ITS региона рДНК (Mort et al., 2001; Гончарова и др., 2008; Nikulin et al., 2016).

Клада *Sempervivum* (sensu van Ham, 1995) характеризовалась минимальной поддержкой в анализе последовательностей ITS региона (50% BP), представляла собой парафилетический кластер в анализе участка гена *matK* и была установлена без поддержки в анализе комбинированной матрицы. В то же время монофилия подклад *Sempervivum* s. l. (Klein, Kadereit, 2015) и *Sedum* ser. *Rupestris*, слагающих трибу, не вызывает сомнений (Рис. 26, 4, 5). Клада *Sempervivum* признается некоторыми авторами в качестве трибы *Semperviveae* (Thiede, Egli, 2007). Grulich (1984) выделил *Sedum* ser. *Rupestris* в самостоятельный род *Petrosedum*, но, несмотря на подтверждение его обособленности от *Sedum* рядом фенотипических признаков (Mauritzon, 1933; Stevens et al., 1994, 1996), новый род был признан не всеми систематиками (Thiede, Egli, 2007).

Большинство видов *Sedum* принадлежат к трибе *Sedeae* и распределены между кластером *Leucosedum* и кладой *Acre* (Рис. 26, 36, 4, 5). По результатам рестрикционного анализа хлДНК (van Ham, 't Hart, 1998) *Leucosedum* получил высокую поддержку, однако в дальнейших анализах, основанных на сравнении нуклеотидных последовательностей, образовывал парафилетическую группу (Mort et al., 2001; Mayuzumi, Ohba, 2004; Гончарова и др., 2008). В нашем исследовании установлено лишь несколько устойчивых подклад в составе *Leucosedum*, но они не проявляли ни морфологическую, ни биогеографическую структурированность. Большинство членов *Leucosedum* формировали на древе слабо поддержанную кладу (55%/0,99 в анализе ITS региона; 71/- в анализе *matK*). При этом несколько последовательностей (три в ITS: *S. cepaea*, *Sedum* sp., *Rosularia serrata* и две в *matK*: *S. cepaea*, *S. magellense*; Рис. 26, 4, 5) не входили в нее, а располагались на отдельной ветви.

С помощью расширенной выборки таксонов мы подтвердили, что североамериканский род *Dudleya* является частью *Leucosedum* и показали его близость к видам *Sedum* подрода *Gormanina* с того же континента (*S. oreganum*, *S. spathulifolium* var. *purdyi*, *S. ternatum* и *S. debile*; Рис. 26, 4, 5). Эта близость была поддержана и молекулярной синапоморфией в ITS регионе рДНК, а именно укороченной спиралью II в ITS1 всех американских видов *Leucosedum*.

В основном, европейские виды, близкие к американской кладе *Dudleya* (Рис. 26, 4), распространены по атлантическому побережью Европы и Северной Африки, однако вид *S. villosum* имеет очень широкий ареал (Северная Европа, Исландия и Северная Америка (Гренландия и Северная

Канада)). Такое распространение позволяет предположить, что *S. villosum* и все американские виды *Leucosedum* имели общего предка, проникшего в Северную Америку через Исландию и Гренландию. В дальнейшем он мигрировал в южном направлении, где и произошла дивергенция представителей клады *Dudleya* и их диверсификация.

Имеющиеся молекулярные данные не подтверждают монофилию *Rosularia*. По данным ITS региона, образец *R. serrata* группировался с *S. cepaea* и неопределенным видом *Sedum* (Рис. 2б), формируя отдельную ветвь в *Leucosedum*. На дереве *matK* последовательности рода *Rosularia* вошли в состав двух групп *Leucosedum* (Рис. 4). При этом *R. serrata* и *R. sp.* проявляли близость к *S. brevifolium*, а *R. platyphilla* была близка на древе к кладе *Dudleya* и видам *S. villosum*, *S. dasyphyllum* L., *S. gracile*, хотя и без поддержки. Несмотря на то, что несколько видов *Rosularia* были перенесены в *Prometheum* и *Sedum*, этот род всё ещё насчитывает около 20 видов, относимых к двум секциям на основании фенотипических признаков (Thiede, Eggl, 2007). Имеющиеся на сегодняшний день данные указывают на отсутствие близкого родства между этими секциями.

Клада *Acra* характеризуется наибольшим разнообразием родов (7), видов (>500 ssp.) и фенотипов среди линий толстянковых. В нашем исследовании она получила максимальную поддержку двумя методами (Nikulina et al., 2016; Никулин, Гончаров, 2017), при этом в предыдущих работах ряда авторов клада *Acra* имела умеренную или высокую поддержку (van Ham, 1995; Mort et al., 2001; Maizumi, Ohba, 2004; Гончарова и др., 2008). Наши данные установили четкое разделение *Acra* на Евразийскую и Американскую подклады, и только положение видов *S. nudum*, *S. brissemoretii*, *S. fusiforme* и *S. lancerotense* с островов Макаронезии в Американской подкладе (98%/1.00 для ITS и 100%/1.00 для *matK*; Рис. 2, 3, 4) было исключением. Расположение этих таксонов на древе позволяет предположить единичный занос предка этих видов из Америки и последующую диверсификацию в Макаронезии.

Интересным фактом является то, что высокое фенотипическое разнообразие и морфологическая обособленность американских родов *Graptopetalum*, *Echeveria*, *Cremnophila*, *Lenophyllum*, *Thompsonella*, *Pachyphytum* и *Villadia*, выделенных в подсемейство *Echeverioideae sensu Berger*, противоречат их низкому генетическому разнообразию, выявленному в анализах последовательностей ITS региона рДНК и гена *matK* хпДНК. Филогенетические отношения в Американской подкладе *Acra* остаются лишь частично установленными. По результатам анализа последовательностей ITS региона было показано, что американские таксоны сгруппировались в две основные линии ("*Villadia*" и "*Echeveria*") и смешанную группу представителей *Sedum* spp.+*Lenophyllum* (Рис. 3б), что подтверждает результаты мультилокусного анализа ядерных и хлоропластных маркеров

(Carrillo-Reyes et al., 2009). На древе *matK*, ввиду небольшой выборки американских таксонов, эти линии четко не формировались.

Евроазиатская подклада *Acre*, формирующая по данным ITS региона сестринскую линию Американской подкладе, включала исключительно представителей рода *Sedum* (Рис. 2б, 4). Следует отметить, что в эту подкладу входил типовой вид рода – *S. acre*. В филогении на основании гена *matK* евроазиатские таксоны *Acre* не формировали общей подклады, а располагались парафилетически в основании Американской (Рис. 4). Азиатские виды *Sedum* формируют две обособленные группы (A1 и A2; Рис. 2б, 4, 5). Обе они включают таксоны, обитающие в Восточном Китае, Тайване, Корее и Японии, но, несмотря на значительное перекрытие их ареалов, нет свидетельств их общего происхождения. Присутствие в подкладе A2 видов, обитающих в Гималаях и прилегающих к ним районах (*S. multicaule*, *S. oreades* (Decaisne) Hamet, *S. bergeri* Hamet, *S. trullipetalum* Hooker fil. & Thompson и *S. triactina* Berger; Рис. 2б) может указывать на их вселение в восточную Азию через эти территории. В состав подклады A1 входят только восточноазиатские таксоны, и их происхождение остается неизвестным. Расширение выборки за счет растений из Гималаев и Тибетского плато, где наблюдается значительное разнообразие очитков (Fu, Ohba, 2001), может прояснить диверсификацию представителей рода в Азии.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате анализов нуклеотидных последовательностей ядерного и хлоропластного маркеров было показано, что виды рода *Sedum* s. str. распределены между всеми кладами/кластерами филогенетических деревьев, представляющими 3 трибы толстянковых. При этом представители *Sedum* перемежаются с видами других родов. Все это отражает сборную природу рода и неадекватность его концепции. Систематикам еще предстоит исправить эту ситуацию. По нашему мнению, возможны три пути её решения. Первый путь заключается в том, чтобы отнести все таксоны, группирующиеся в устойчивую монофилетическую кладу *Acre* (Рис. 2, 3), в том числе и *S. acre* (типовой вид рода), к роду *Sedum*. Второй путь состоит в еще большем расширении *Sedum* за счет членов *Leucosedum* (клады *Acre*+*Leucosedum*). Эти варианты потребуют объединения морфологически различных таксонов, и составление диагноза для рода будет еще более проблематичным. Также возможно признание монофилетических групп в качестве самостоятельных родов, при этом *Sedum* будет представлять собой монотипный род, включающий только *S. acre*. Это потребует описания большого числа родов из бывших видов этого рода.

Следует отметить, что до сих пор выборка представителей *Sedum* s. l. в анализах далеко неполная, и многие отношения в пределах *Acre* и *Leucosedum* остаются невыясненными, поэтому необходимы дальнейшие исследования, как филогенетических взаимоотношений, так и изучение

фенотипических признаков, характеризующих монофилетические группировки.

## ВЫВОДЫ

1. Информация, полученная в результате моделирования вторичной структуры транскриптов спейсеров ITS1 и ITS2, позволила провести достоверное выравнивание высокодивергентных последовательностей ITS региона рДНК представителей *Sedum* и близких ему родов для филогенетических анализов.

2. Результаты отдельных и совместных анализов последовательностей ITS региона рДНК и гена *matK* хпДНК подтвердили сборную природу *Sedum* и показали необходимость ревизии его концепции. Виды рода *Sedum* вошли в состав четырех полиродовых сложно структурированных клад/кластеров: *Aeonium* (триба *Aeonieae*), *Sempervivum* (*Semperviveae*), *Acre* и *Leucosedum* (*Sedeae*), перемежаясь с видами других родов. В *Aeonium* и *Sempervivum* род был представлен ограниченным числом видов, но они составляли большинство в *Acre* и *Leucosedum*.

3. Для клад *Aeonium* и *Dudleya* в *Leucosedum* обнаружены синапоморфные индели в ITS1, влияющие на вторичную структуру спейсера: укороченные спирали I и II соответственно.

4. В кладе *Acre* выявлено разделение на устойчивую Американскую подкладу и Евроазиатскую, установленную только топологически. Показано, что виды *Sedum*, распространенные в Восточном Китае, Корее, Японии и на Тайване, формируют две устойчивые линии (A1 и A2). Вероятно, представители этих линий произошли от разных предков.

5. Установлено неоднократное пересечение Атлантического океана видами *Sedum*. Широкий ареал *S. villosum* (*Leucosedum*) и близость этого вида с членами клады *Dudleya* предполагает их происхождение от европейского предка, проникшего в С. Америку из Европы через Исландию и Гренландию, а близость некоторых макаронезийских видов с представителями Американской подклады *Acre* указывает на обратный занос из Америки.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### *Статьи в журналах из списка, рекомендованного ВАК:*

1. **Nikulin V.Yu.**, Gontcharova S.B., Stephenson R., Gontcharov A.A. Phylogenetic relationships between *Sedum* L. and related genera (Crassulaceae) based on ITS rDNA sequence comparisons // *Flora*. 2016. Vol. 224. P. 218–229.

2. **Никулин В.Ю.**, Гончаров А.А. Молекулярно-филогенетическая характеристика *Sedum* L. (Crassulaceae) и близких ему родов на основании сравнения нуклеотидных последовательностей гена *matK* хлоропластной ДНК и ITS региона рибосомной ДНК // *Ботанический журнал*. 2017. Т. 102, № 3. С. 309–328.

*Работы в материалах конференций:*

3. **Никулин В.Ю.**, Гончаров А.А. Анализ вторичной структуры внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS) рДНК растений семейства Crassulaceae – Толстянковые // Актуальные проблемы экологии, морской биологии и биотехнологии: материалы X Региональной конференции студентов, аспирантов вузов и научных организаций Дальнего Востока России. Владивосток, 4–6 мая 2011 г. Владивосток: Издательство Дальневосточного университета, 2011. С. 182–186.

4. **Никулин В.Ю.**, Гончаров А.А. Моделирование вторичной структуры внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS) рДНК растений семейства Crassulaceae DC. – Толстянковые // Актуальные проблемы экологии, морской биологии и биотехнологии: тезисы докладов XI Региональной конференции студентов, аспирантов вузов и научных организаций Дальнего Востока России. Владивосток, 3–4 мая 2012 г. Владивосток: Издательство Дальневосточного университета, 2012. С. 196–201.

5. **Никулин В.Ю.**, Гончарова С.Б. Анализ филогенетических отношений в роде *Sedum* L. (Crassulaceae) и родственных ему родах на основании сравнения нуклеотидных последовательностей внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS) рДНК // II (X) Международная ботаническая конференция молодых ученых в Санкт-Петербурге: тезисы докладов. Санкт-Петербург, 11–16 ноября 2012 г. СПб: БИН РАН, 2012. С. 20.

6. **Nikulín V.Y.**, Gontcharova S.B. Phylogenetic relationships in the genus *Sedum* L. (Crassulaceae) and closely related genera based on ITS rDNA sequence comparisons // The East Asian Flora and its role in the formation of the world's vegetation: abstracts of the symposium. Vladivostok, September 23–27, 2012. Vladivostok: BGI FEB RAS, 2012. P. 59.

7. **Никулин В.Ю.** Филогенетические отношения в роде *Sedum* L. и близких ему родах (Crassulaceae) по результатам сравнения нуклеотидных последовательностей гена *matK* хпДНК и спейсера ITS ярдНК // Актуальные проблемы биологических наук: материалы I Межрегиональной молодежной школы-конференции. Владивосток, 13–18 мая 2013 г. Владивосток: Издательство «Русский остров», 2013. С. 204–209.

8. **Nikulín V.Y.**, Gontcharov A.A. Analysis of phylogenetic relationships in the genus *Sedum* L. (Crassulaceae) and closely related genera based on ITS nrDNA and *matK* cpDNA sequence comparisons // Modern achievements in population, evolutionary and ecological genetics: International Symposium. Vladivostok, September 2–6, 2013. P. 54.

9. **Nikulín V.Yu.**, Gontcharov A.A. Secondary structure helps to align divergent ITS rDNA Crassulacean sequences // Molecular Phylogenetics: Contributions to the 4th Moscow International Conference. Moscow, September 23–26, 2014. Moscow: Torus Press, 2014. P. 50.

НИКУЛИН ВЯЧЕСЛАВ ЮРЬЕВИЧ

**ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОТНОШЕНИЯ В РОДЕ *SEDUM* L.  
(CRASSULACEAE J.ST.-HIL.) И БЛИЗКИХ ЕМУ РОДАХ НА  
ОСНОВАНИИ СРАВНЕНИЯ НУКЛЕОТИДНЫХ  
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ЯДЕРНОЙ И ХЛОРОПЛАСТНОЙ ДНК**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук