

**О самостоятельности вида *Pulsatilla astragalifolia* (Ranunculaceae)****On the identity of the species *Pulsatilla astragalifolia* (Ranunculaceae)**

Зайков В. Ф., Шмаков А. И.

Zaikov V. F., Shmakov A. I.

Алтайский государственный университет, г. Барнаул, Россия. E-mails: vz1703@mail.ru; ssbgbot@mail.ru  
Altai State University, Barnaul, Russia

**Реферат.** *Pulsatilla* – род раннецветущих, декоративных, отчасти лекарственных растений, отличающихся высоким уровнем гибридизации. В связи с чем многие из них являются редкими и эндемичными для отдельных территорий. За обширную историю изучения рода было сделано немало всевозможных номенклатурных комбинаций, что нередко вызывает споры между учеными. Один из примеров – таксон *Pulsatilla astragalifolia* Pobed. Для попытки решения этого вопроса были секвенированы ITS фрагменты ядерной ДНК трех близких видов (*Pulsatilla bungeana* С. А. Мей. ex Ledeb., *P. astragalifolia* Pobed., *P. tenuiloba* (Hayek) Juz.). Согласно полученным результатам, изучаемые образцы разделились на несколько групп. Одна группа состоит из двух клад: первая – образцы *P. tenuiloba*, вторая – образцы *P. astragalifolia*. Другая группа образована несколькими кладами с образцами *P. bungeana* и *P. astragalifolia*, что может свидетельствовать о наличии нескольких форм этих видов. В последующем планируется привлечение новых точек распространения этих видов, а также анализ других фрагментов ДНК. Тем не менее полученные данные указывают на то, что *Pulsatilla astragalifolia* является самостоятельным видом, имея как морфологические, так и генетические отличия от близких видов.

**Ключевые слова.** Молекулярная филогенетика, *Pulsatilla astragalifolia*, *Pulsatilla bungeana*, *Pulsatilla tenuiloba*.

**Summary.** *Pulsatilla* is a genus of early-flowering, ornamental, partly medicinal plants, characterized by a high level of hybridization. In this connection, many of them are rare and endemic to individual territories. Several different nomenclature combinations have been made over the extensive history of the genus revising, which often causes debates between scientists. One of the cases is the taxon *Pulsatilla astragalifolia* Pobed. To try to solve this issue, ITS fragments of nuclear DNA of three close species (*Pulsatilla bungeana* С. А. Mey. ex Ledeb., *P. astragalifolia* Pobed., *P. tenuiloba* (Hayek) Juz.) were sequenced. Another group is formed by several clades with samples of *P. bungeana* and *P. astragalifolia*. According to the results obtained, the studied samples were divided into several groups. One group consists of two clades: the first – *P. tenuiloba* samples, the second – *P. astragalifolia* samples. Which may indicate the presence of several forms of these species. Subsequently, it is planned to study new occurrences of these species, as well as the analysis of the other DNA fragments. However, the findings indicate that *Pulsatilla astragalifolia* is a separate species, having both morphological and genetic differences from related species.

**Key words.** Molecular phylogenetics, *Pulsatilla astragalifolia*, *Pulsatilla bungeana*, *Pulsatilla tenuiloba*.

Род *Pulsatilla* Mill. (Ranunculaceae) включает в себя около 35–40 таксонов, произрастающих в умеренных широтах Северного полушария. Прострелы – это раннецветущие, декоративные, а также перспективные для фармакогнозии растения (Krvavych et al., 2019; Jinmiao et al., 2022; Liu et al., 2022). Вместе с тем существует проблема идентификации видов, связанная с высокой степенью морфологической изменчивости, а также гибридизацией видов (Akeroyd, 1993; Бакин, 2005; Степанов, 2014; Li Q-j. et al., 2019; Sramko et al., 2019; Valuyskikh et al., 2020). В связи с чем система рода неоднократно пересматривалась, но консенсус не был достигнут (Aichele, Schwegleb, 1957; Tamura, 1995; Grey-Wilson, 2014; Sramko et al., 2019).

Вид *Pulsatilla astragalifolia* Pobed. был описан Е. Г. Победимовой в 1935 г. (Победимова, 1935) позже был перенесен в ранг разновидности – *P. bungeana* var. *astragalifolia* (Pobed.) Gubanov (Губанов, 1996). Эти виды отличаются следующими признаками: дважды перистые листья, много надрезанные доли обертки, крупные цветки, желтые пыльники у *P. bungeana* С. А. Мей. ex Ledeb. и просто перистые листья, широкие, слабозубчатые доли обертки, более мелкие цветки, фиолетовые пыльники у *P. astragalifolia* (Победимова, 1935). В связи с чем последний «растворился» в виде *P. bungeana*, и в настоящее время эти два таксона являются синонимами (Global Biodiversity Information Facility. URL: <https://www.gbif.org/>).

Наличие гербарного материала и новых сборов дали возможность проверить, насколько сходны или различны эти два таксона с помощью молекулярно-генетических методов. Для этого были отобрано 13 гербарных образцов, идентифицированные как *P. bungeana*, *P. astragalifolia*, а также близкий вид *P. tenuiloba* (Hayek) Juz. из гербария ALTB (табл. 1).

Таблица 1

Географическое положение изученных гербарных образцов видов рода *Pulsatilla*

Название вида/рабочий номер	Географическое положение / координаты
<i>Pulsatilla tenuiloba</i> (Puls18)	Россия, Республика Алтай, Кош-Агачский р-н, долина р. Юстыд СВ бывшего поселка Актал, правый берег. Высота 1824 м / N49.91750°, E88.91056°
<i>P. tenuiloba</i> (Puls70)	Россия, Республика Тува, Монгун-Тайгинский р-н, долина р. Карга выше заставы. Высота 1750 м / N50.29022°, E90.64403°
<i>P. astragalifolia</i> (Puls 90)	Монголия, Кобдосский аймак, дол. р. Хонго-гол в месте выхода из гор / N48.38330°, E91.10000°
<i>P. astragalifolia</i> (Puls 92)	Монголия, Кобдосский аймак, 5 км ЮВ от г. Ховд / N47.96670°, E91.70000°
<i>P. astragalifolia</i> Hovd	
<i>P. bungeana</i> (Puls 35)	Монголия, Хубсугульский аймак, левобережье р. Селенги, ок-ти с. Их-Ула, степь. Высота 1118 м / N49.45420°, E101.48000°
<i>P. bungeana</i> (Puls 47)	Монголия, Хубсугульский аймак, горы между р. Джаргалант-Гол и оз. Цаган-Нур. Высота 1813 м / N49.42610°, E98.10810°
<i>P. astragalifolia</i> (Puls 418)	Монголия, Кобдосский аймак, хр. Монгольский Алтай, 11 км зап. Пос. Мунххайрхан, перевал между ур. Их-Хаг и Дунд-хаг. Высота 2834 м / N47.05310°, E91.70670°
<i>P. bungeana</i> (Puls 34)	Монголия, Ховдский аймак, Монгольский Алтай, перевал Хара-Белчир-Даба / N47.19000°, E92.26000°
<i>P. bungeana</i> (Puls 45)	
<i>P. bungeana</i> Manhan	
<i>P. astragalifolia</i> (Puls 96)	Монголия, Кобдосский Аймак, Монгольский Алтай, центральный водораздел, 10 км СВВ пер. Бага-Улан-Даба (2845 м). Высота 2700 м / N46.71670°, E92.41670°
<i>P. astragalifolia</i> Mongolia	

Тотальную ДНК выделяли из листьев с помощью метода DimondDNA по инструкции производителя (Diamond DNA Plant Kit, Россия). ПЦР реакция ставилась в 30 мкл и содержала 15 мкл HS-Taq PCR-Color (2x) (включает в себя ДНК-полимеразу HS-Taq, смесь dNTP, 2x буфер для ПЦР) (Biolabmix, Россия), по одному мкл праймеров, 1 мкл матричной ДНК, 12 мкл стерильной воды. Ядерный регион ITS амплифицировали с использованием праймеров ITS-for (CGTAACAAGGTTTCCGTAAG) и ITS-rev (GGAATCCTTGTAAGTTTCTTT) (Куцев и др., 2014), используя следующую программу: 95 °С – 4 мин; 35 циклов: 95°С – 20 с, 57°С – 30 с, 72°С – 1 мин; 72 °С – 7 мин. ПЦР продукт подвергали электрофорезу в 1,5%-м агарозном геле и очищали с помощью магнитных частиц (Евроген, Россия). Секвенирование по Сэнгеру проводилось в ЦКП «Геномика» (Новосибирск, Россия). Результаты обрабатывались в программе MEGA X. Полиморфные сайты исследуемых образцов представлены в таблице 2.

Филогенетическое дерево строилось с помощью метода максимального правдоподобия (ML) (рис. 1). Для достоверности результатов помимо исследуемых видов в анализ были включены и другие виды прострелов из коллекции ALTB. В качестве внешней группы использовались следующие виды: *Anemone occidentalis* S. Watson (МК341852.1), *Anemone ranunculoides* L. (FJ639889.1), *Anemone sylvestris* L. (MN151396.1), *Hepatica nobilis* Schreb. (FJ639904.1), *Clematis henryi* Oliv. (JF714645.1).

Таблица 2

Полиморфные сайты ITS фрагмента ядерной ДНК у исследуемых видов рода *Pulsatilla*

Позиция	9	16	34	35	38	40	48	59	73	82	102	148
	C	C	T	A	C	T	A	G	T	A	T	G
<i>P. astragalifolia</i> (Puls 96)												
<i>P. astragalifolia</i> (Puls 90)	T	T	A	G	A	C	C		C	C	C	A
<i>P. astragalifolia</i> (Puls 92)	T	T	A	G	A	C	C		C	C	C	A
<i>P. bungeana</i> Hovd	T	T	A	G	A	C	C		C	C	C	A
<i>P. astragalifolia</i> (Puls 418)			W					R	Y			
<i>P. astragalifolia</i> Mongolia												
<i>P. astragalifolia</i> (Puls 45)												
<i>P. bungeana</i> (Puls 34)												
<i>P. bungeana</i> Manhan												
<i>P. bungeana</i> (Puls 47)			R						C			
<i>P. bungeana</i> (Puls 35)			A						C			
<i>P. tenuiloba</i> (Puls 18)			A	G	A	C	C		C	C	C	A
<i>P. tenuiloba</i> (Puls 70)			A	G	A	C	C		C	C	C	A
Позиция	372	405	435	495	501	502	504	534	544	545	546	547
	T	C	C	G	C	C	C	A	G	T	A	C
<i>P. astragalifolia</i> (Puls 96)						Y						
<i>P. astragalifolia</i> (Puls 90)	C			A	Y		A		C	A	G	T
<i>P. astragalifolia</i> (Puls 92)	C		Y	A	Y		A		C	A	G	T
<i>P. bungeana</i> Hovd	C			A			A		C	A	G	T
<i>P. astragalifolia</i> (Puls 418)				A								
<i>P. astragalifolia</i> Mongolia												
<i>P. astragalifolia</i> (Puls 45)												
<i>P. bungeana</i> (Puls 34)												
<i>P. bungeana</i> Manhan												
<i>P. bungeana</i> (Puls 47)				A		T				Y		
<i>P. bungeana</i> (Puls 35)				A		T						
<i>P. tenuiloba</i> (Puls 18)	C	T		A			A	G	C			A
<i>P. tenuiloba</i> (Puls 70)	C	T		A			A	G	C			A

Интересующие нас образцы разделились на несколько групп. Первая ветвь включает две группы. Под номером 1 (желтый цвет) мы наблюдаем образцы вида *P. tenuiloba*, соседствующая с ними клада (голубой цвет) состоит из образцов *P. astragalifolia*. Вторая ветвь объединяет несколько клад, здесь можно выделить кладу номер 3 (синий цвет), представленную видами *P. bungeana*, и кладу номер 4 (коричневый цвет). В последней мы наблюдаем образцы, идентифицированные как *P. astragalifolia*, и *P. bungeana*. Данная группа требует более тщательного изучения. Также интерес представляет образец, определенный нами как *P. astragalifolia* (Puls 418), при визуальном осмотре хроматограммы были обнаружены двойные пики, что косвенно может свидетельствовать о гибридных процессах. В последующем планируется привлечь данные других фрагментов ДНК, а также расширить выборку новыми местами сбора. Тем не менее уже сейчас можно предположить, что *Pulsatilla astragalifolia* является самостоятельным видом. Для наглядности места сбора гербарных образцов, исследованных нами представлены на картосхеме (рис. 2).



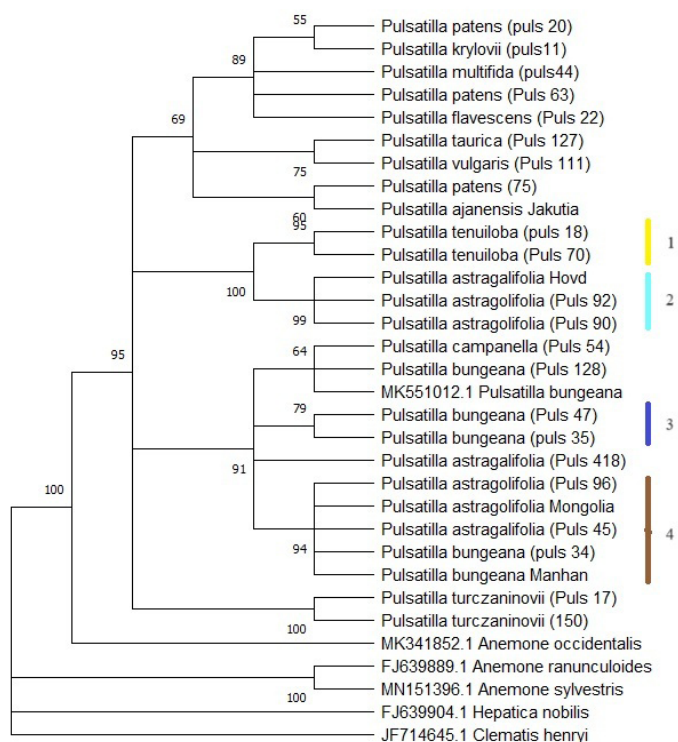


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное на основе ITS фрагмента ядерной ДНК методом максимального правдоподобия (ML). Исследуемые группы отмечены цифрами 1–4.

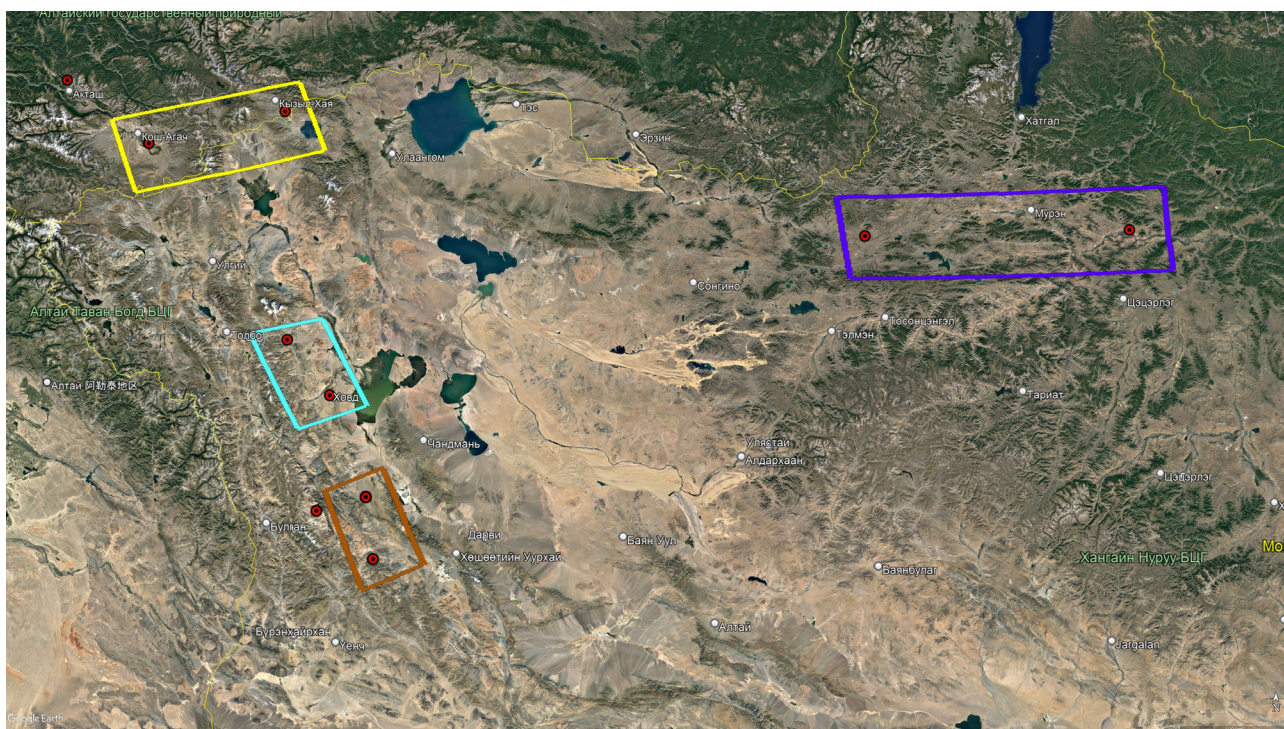


Рис. 2. Места сбора гербарных образцов *Pulsatilla*, взятых для ДНК анализа. Цветом выделены группы, согласно полученному филогенетическому дереву: желтый – группа 1; голубой – группа 2; синий – группа 3; коричневый – группа 4.

#### ЛИТЕРАТУРА

Бакин О. В. О роде *Pulsatilla* Mill. (Ranunculaceae) во флоре Татарстана // Труды Волжско-Камского государственного природного заповедника, 2005. – Вып. 6. – С. 193–198.

- Губанов И. А.** Конспект флоры внешней Монголии (сосудистые растения) / Под ред. Р. В. Камелина. – М.: «Валланг», 1996. – 136 с.
- Куцев М. Г., Уварова О. В., Сеницына Т. А.** Набор синтетических олигонуклеотидов для амплификации и секвенирования ITS1-5.8s-ITS2 сосудистых растений. – № RU 2 528 063 C1; заявл. 18.02.2013; Опубл. 10.09.2014, Бюл. № 25. – 7 с.
- Победимова Е. Г.** Растительность центральной части Монгольского Алтая // Труды Монгольской комиссии, 1935. – № 19. – С. 50–52.
- Степанов Н. В.** Заметки о некоторых видах *Pulsatilla* L. (Ranunculaceae) из приенисейских Саян // Систематические заметки по материалам гербария им. П. Н. Крылова томского государственного университета, 2014. – № 109. – С. 6–19.
- Aichele D., Schwegleb H. W.** Die Taxonomie der Gattung *Pulsatilla* // Repertorium novarum specierum regni vegetabilis, 1957. – Vol. 60. – P. 1–230. DOI: 10.1002/fedr.19570600103
- Akeroyd J. R.** *Pulsatilla* Miller // Flora Europaea / Tutin T. G., Burges N. A., Chater A. O. et al. (eds.). – Cambridge: Cambridge University Press, 1993. – Vol. 1. – P. 264–266.
- GBIF [2023]. Global Biodiversity Information Facility. URL: <https://www.gbif.org/> (Accessed 30 September 2023).
- Grey-Wilson C.** Pasque-flowers. The genus *Pulsatilla*. – Kenninghall: The Charlotte-Louise Press, 2014. – 216 p.
- Jinmiao Z., Lihua T., Meiwang C., Chengwei H.** Pharmacological activities and molecular mechanisms of *Pulsatilla saponins* // Chinese Medicine, 2022. – Vol. 17, No. 59. – P. 1–12. DOI: 10.1186/s13020-022-00613-8
- Krvavych A., Reviakina N., Zhurakhivska L., Hubytska I., Konechna R.** *Pulsatilla alba*: Analytical Review of Spread, Chemical Composition, Biological Activity and Medical Application // Scientific Journal «ScienceRise: Biological Science», 2021. – Vol. 29. – No. 4. – P. 10–14. DOI: 10.15587/2519-8025.2021.249850
- Liu H., Hu Y., Qi B., Yan C., Wang L., Zhang Y., Chen L.** Network pharmacology and molecular docking to elucidate the mechanism of *Pulsatilla decoction* in the treatment of colon cancer // Front. Pharmacol, 2022. – Vol. 300. DOI: 10.3389/fphar.2022.940508
- Li Q-j., Wang X., Wang J-r., Su N., Zhang L., Ma Y-p., Chang Z-y., Zhao L., Potter D.** Efficient Identification of *Pulsatilla* (Ranunculaceae) Using DNA Barcodes and Micro-Morphological Characters // Front. Plant Sci., 2019. – Vol. 10. – e1196. DOI: 10.3389/fpls.2019.01196
- Sramko G., Laczko L., Volkova P. A., Bateman R. M., Mlinarec J.** Evolutionary history of the Pasque-flowers (*Pulsatilla*, Ranunculaceae): Molecular phylogenetics, systematics and rDNA evolution // Mol. Phylogenet. Evol., 2019. – Vol. 135. – P. 45–61. DOI: 10.1016/j.ympev.2019.02.015
- Tamura M.** Systematic Part // Die Natürlichen Pflanzenfamilien nebst ihren Gattungen und wichtigsten Arten, insbesondere den Nutzpflanzen. Band 17 a IV. Angiospermae: Ordnung Ranunculales, Fam. Ranunculaceae / P. Hiepko (Ed.). – Berlin: Duncker & Humbolt, 1995. – P. 223–519.
- Valuyskikh O. E., Teteryuk L. V., Pylina Y. I., Sushentsov O. E., Martynenko N. A., Shadrin D. M.** Phylogenetic relationships and status of taxa of *Pulsatilla uralensis* and *P. patens* s. str. (Ranunculaceae) in north-eastern European Russia // PhytoKeys, 2020. – Vol. 162. – P. 113–130. DOI: 10.3897/phytokeys.162.53361