

## Молекулярные маркеры ITS и matK в исследовании филогении рода *Anemone* s. l. (Ranunculaceae)

### Investigation of the genus *Anemone* s. l. (Ranunculaceae) phylogeny using ITS and matK molecular markers

Ямских И. Е.<sup>1</sup>, Мариничева А. Н.<sup>1</sup>, Новикова С. В.<sup>1</sup>, Степанов Н. В.<sup>1</sup>, Куцев М. Г.<sup>1,2</sup>

Yamskikh I. E.<sup>1</sup>, Marinicheva A. N.<sup>1</sup>, Novikova S. V.<sup>1</sup>, Stepanov N. V.<sup>1</sup>, Kutsev M. G.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, Россия. E-mails: iyamskikh@mail.ru, alexandra.marinicheva@outlook.com, serafima\_novikova\_11@mail.ru, stepanov-nik@mail.ru, m\_kucev@mail.ru

<sup>1</sup> Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia

<sup>2</sup> Алтайский государственный университет, г. Барнаул, Россия

<sup>2</sup> Altai State University, Barnaul, Russia

**Реферат.** Впервые проведен филогенетический анализ сибирских представителей рода *Anemone* s. l. на основе сравнительного изучения нуклеотидного полиморфизма последовательностей участка ITS (Internal Transcribed Spacer) ядерного генома и гена matK (Maturase K) хлоропластного генома. Для анализа были использованы 54 последовательности ДНК (по 27 для каждого маркера) и 8 последовательностей ДНК из GenBank. Построено 2 филогенетических дерева, каждое из которых является объединенным для методов максимального правдоподобия (ML) и байесовского вывода (Bayesian inference, BI). Топологии, полученные из двух отдельных наборов данных, в большей части согласуются друг с другом. Однако имеются отличия в местоположении отдельных видов (*A. sylvestris*, *A. osinovskiensis*). На двух построенных деревьях последовательности четко распадаются на две хорошо поддерживаемые клады: первую образуют ветреницы с основным числом хромосом  $x = 8$ , вторую – с  $x = 7$ . Полученные нами результаты согласуются с данными других авторов, разработавших систематику рода *Anemone* как на основе морфологических признаков, так и с использованием молекулярных маркеров. Особи одного и того же вида, произрастающие в географически удаленных частях ареала, либо не отличаются друг от друга по изучаемым последовательностям ДНК, либо имеют 1–3 точечные мутации.

**Ключевые слова.** Нуклеотидная изменчивость, транзиции, трансверсии, филогения, *Anemone*, ITS, matK.

**Summary.** The phylogenetic analysis of Siberian representatives of genus *Anemone* s. l. were performed for the first time, based on a comparative study of nucleotide polymorphism of ITS (Internal Transcribed Spacer) region of the nuclear genome and matK (Maturase K) gene of the chloroplast genome. 54 DNA sequences (27 for each marker) and 8 DNA sequences from GenBank were used for analysis. Two phylogenetic trees were built, each of which is combined for the maximum likelihood (ML) and Bayesian inference (BI) methods. Topologies derived from two separate datasets are mostly consistent with each other. However, there are differences in the location of individual species (*A. sylvestris*, *A. osinovskiensis*). On two constructed trees, the sequences clearly split into two well-supported clades: the first is formed by anemone with karyotype  $x = 8$ , the second with  $x = 7$ . Our results are consistent with the data of other authors who have developed the taxonomy of the genus *Anemone* both on the basis of morphological features and using molecular markers. Individuals of the same species, growing in geographically distant parts of the range, either do not differ from each other in the studied DNA sequences, or have 1–3 point mutations.

**Key words.** *Anemone*, ITS, matK, nucleotide variability, transition, transversion, phylogeny.

Род *Anemone* L. s. l. относится к семейству Ranunculaceae Juss. и включает свыше 200 видов травянистых растений, распространенных преимущественно в умеренных и холодных районах Северного полушария. Изучение генетической изменчивости и филогении рода *Anemone* с применением молекулярных данных уже проводилось рядом исследователей (Hoot et al., 1994; Ehrendorfer, Samuel, 2001; Schuettpehl et al., 2002; Ehrendorfer et al., 2009; Meyer et al., 2010; Hoot et al., 2012; Mlinarec et al., 2012; Zhang et al., 2015; Jiang et al., 2017). При этом в исследования были вовлечены исключительно азиат-

ские, африканские, южноамериканские и европейские виды. Также в данных публикациях обсуждаются преимущественно вопросы их филогении, а виды, встречающиеся на территории России, остаются малоисследованными.

Цель работы – филогенетический анализ сибирских представителей р. *Anemone* s. l. на основе сравнительного изучения нуклеотидного полиморфизма последовательностей участка ITS (Internal Transcribed Spacer) ядерного генома и гена *matK* (Maturase K) хлоропластного генома.

Выделение геномной ДНК производили с использованием набора DiamondDNA (ООО «Алтайбиотех», Россия). Для амплификации внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS1-5.8S-ITS2) использовали праймеры ITS-F и ITS-R (Куцев и др., 2013), гена *matK* – праймеры 1R\_KIM и 3F\_KIM (Gouy et al., 2010; Jiang et al., 2017) производства ЗАО «Евроген» (г. Москва). Полимеразную цепную реакцию проводили с использованием реактивов МастерHS-Taq ПЦР-Color 2x (ООО «Биолабмикс», г. Новосибирск). Параметры циклов амплификации: 3 мин 95 °С; 35 циклов: 20 сек 95 °С, 30 сек 57 °С; 30 сек 72 °С; 5 мин 72 °С. Определение нуклеотидных последовательностей проводили методом Сэнгера на секвенаторе ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, MD, USA) (ЦКП «Геномика» СО РАН, г. Новосибирск).

Процедуру выравнивания последовательностей проводили в программе Seaview (Hollingsworth et al., 2009) с помощью встроенного алгоритма MUSCLE при стандартных значениях параметров. Подбор моделей осуществлялся с помощью пакета ModelFinder в ПО Iqtree 2.0.5 (Minh et al., 2020). Для ITS участка оптимальными оказались параметры модели TPM3+F+G4, для *MatK* – K3Ru+F+G4. Далее проводилось построение филогенетических деревьев в программе Iqtree методом максимального правдоподобия (maximum likelihood, ML) со значением параметра бутстрепа 5000. Филогенетическое дерево на основе байесовского вывода (Bayesian inference, BI) было построено с помощью ПО MrBayes (Ronquist, Huelsenbeck, 2003). Визуализация филогенетических деревьев проводилась в программе TreeGraph 2 (Stöver, Müller, 2010).

Изученные нами виды ветрениц произрастают преимущественно в Сибири, некоторые также в европейской части России, на Дальнем Востоке и в Белоруссии (табл. 1). Всего в анализе были использованы 54 последовательности (по 27 для каждого маркера). В анализ были включены 8 последовательностей из базы данных GenBank. В качестве аутгруппы использовали вид *Anemone glaucifolium* (Franch.) W. T. Wang.

Таблица 1

## Объекты исследований

№ п/п	Вид, номер образца	Места сбора
1	<i>Anemone jenseensis</i> (Korsh.) Krylov 1-2	Красноярский край, окр. г. Красноярск
2	<i>Anemone jenseensis</i> (Korsh.) Krylov 5-1	Красноярский край, Усинская котловина (пойма р. Иджим)
3	<i>Anemone jenseensis</i> (Korsh.) Krylov 6-1	Красноярский край, окр. д. Григорьевка,
4	<i>Anemone jenseensis</i> (Korsh.) Krylov 8-1	Респ. Хакасия, окр. пос. Коммунар
5	<i>Anemone reflexa</i> Steph. 2-1	Красноярский край, окр. г. Красноярск
6	<i>Anemone reflexa</i> Steph. 4-1	Иркутская обл., окр. г. Байкальск,
7	<i>Anemone altaica</i> Fisch. ex C.A. Mey. 2-1	Респ. Алтай, оз. Телецкое
8	<i>Anemone altaica</i> Fisch. ex C.A. Mey. 3-1	Респ. Бурятия, пойма р. Снежная,
9	<i>Anemone ranunculoides</i> L. 1-1	Брянская обл., окр. г. Брянск
10	<i>Anemone sylvestris</i> L. 1-2	Красноярский край, окр. г. Красноярск
11	<i>Anemone sylvestris</i> L. 2-1	Тюменская обл., окр. г. Тобольск
12	<i>Anemone sylvestris</i> L. 3-1	Брянская обл., окр. г. Брянск
13	<i>Anemone nemorosa</i> L. 1-2	Брянская обл., окр. г. Брянск
14	<i>Anemone nemorosa</i> L. 2-1	Беларусь, окр. г. Минска
15	<i>Anemone dichotoma</i> L. 1-2	Тюменская обл., окр. г. Тобольск
16	<i>Anemone dichotoma</i> L. 2-1	Красноярский край, окр. г. Красноярск

№ п/п	Вид, номер образца	Места сбора
17	<i>Anemone narcissiflora</i> ssp. <i>biarmiensis</i> (Juz.) J alas 1	Красноярский край, окр. г. Красноярска
18	<i>Anemone narcissiflora</i> L. 2	Красноярский край, окр. г. Красноярска
19	<i>Anemone narcissiflora</i> ssp. <i>sibirica</i> (L.) Hultén 3	Красноярский край, окр. г. Красноярска
20	<i>Anemone caerulea</i> DC. 1-1	Респ Алтай, окр. пос. Манжерок
21	<i>Anemone caerulea</i> DC. 2-1	Респ. Хакасия, окр. пос. Коммунар
22	<i>Anemone caerulea</i> DC. 3-1	Новосибирская обл., окр. г. Новосибирска, Академгородок
23	<i>Anemone baicalensis</i> Turcz. ex Ledeb. 1-2"	Красноярский край, окр. пос. Танзыбей
24	<i>Anemone baicalensis</i> Turcz. ex Ledeb. 9-1"	Респ. Бурятия, окр. с. Выдрино
25	<i>Anemone osinovskiensis</i> Stepanov	Красноярский край, окр. г. Красноярска
26	<i>Anemone umbrosa</i> C.A. Mey. 1-1	Казахстан, окр. г. Серебрянска
27	<i>Anemone amurensis</i> (Korsh.) Kom.	Приморский край, окр. г. Владивостока

В общей сложности было построено 2 филогенетических дерева. Каждое дерево является объединенным для методов максимального правдоподобия (ML) и байесовского вывода (Bayesian inference, BI), то есть содержит и значения бутстреп поддержки, и байесовские вероятности для ветвей. В качестве примера на рисунке 1 приведено филогенетическое дерево, построенное с использованием ITS маркера.

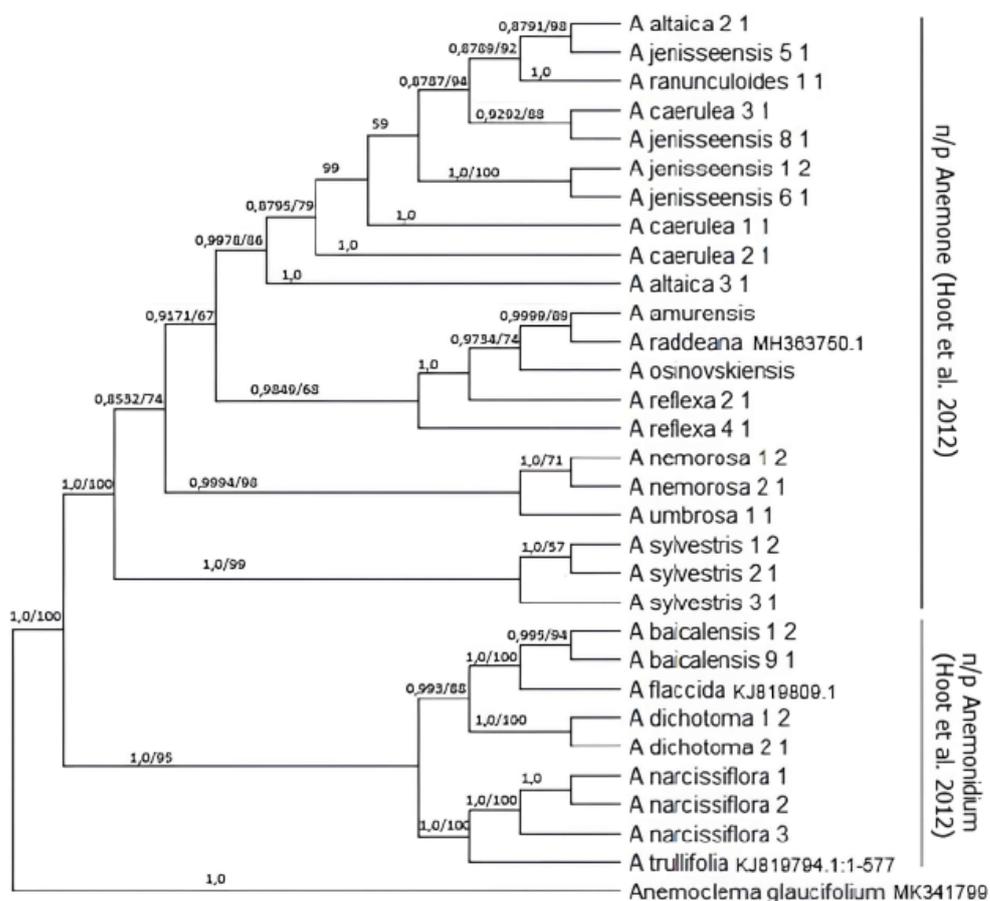


Рис. 1. Филогенетическое дерево р. *Anemone* s. l., построенное на основании сравнения последовательностей района ITS1-5.8S рДНК-ITS2 методами максимального правдоподобия (ML) и байесовского вывода (Bayesian inference, BI). Цифрами обозначены коэффициенты поддержки ветвей (BI – байесовский вывод / ML – бутстреп-индекс).

Нами были исследованы образцы видов из разных, часто значительно удаленных друг от друга частей ареалов. Выявлено, что отсутствуют различия в парных сиквенсах ITS у образцов *A. caerulea*, собранных на Алтае и в горах Кузнецкого Алатау, *A. dichotoma* (Красноярск, Тобольск), *A. nemorosa* (Брянск, Беларусь), разных подвидов *A. narcissiflora* (Красноярск). Интересно, что между алтайским и красноярским образцами *A. altaica* выявлено 16 однонуклеотидных замен (10 транзиций и 6 трансверсий). В сиквенсах остальных особей, принадлежащих одному виду, обнаружено по 1–3 замены.

Анализ последовательностей гена *matK* показал идентичность внутривидовых сиквенсов у *A. dichotoma*, *A. narcissiflora*, *A. nemorosa*, *A. sylvestris* (Тобольск, Красноярск), *A. jennisseeensis* (Красноярск, Хакасия, Усинск). Также сходны между собой сиквенсы алтайского образца *A. altaica* и европейского *A. nemorosa*. Байкальские и саянские особи *A. baicalensis* отличаются друг от друга 3 однонуклеотидными заменами.

В целом, топологии, полученные из двух отдельных наборов данных, в большей части согласуются друг с другом. Однако имеются отличия в местоположении отдельных видов на дендрограммах. На двух построенных деревьях последовательности четко распадаются на две хорошо поддерживаемые клады: первую образуют ветреницы с основным числом хромосом  $x = 8$ , вторую – с  $x = 7$ . Формирующие вторую группу виды *A. baicalensis*, *A. flaccida*, *A. dichotoma*, *A. narcissiflora* и *A. trullifolia* отличаются от первой группы по 22 и 7-нуклеотидным вставкам в ITS1, 5 и 7 делециям и 6–9-нуклеотидной вставке в ITS2. В последовательностях гена *matK* делеции и вставки отсутствуют, однако наблюдается большое количество точечных мутаций.

*A. sylvestris*, относимая В. Н. Стародубцевым (1991) к роду *Anemone* и входящая в первый кластер, занимает на двух деревьях разное положение. На ITS-дереве она формирует отдельную хорошо поддерживаемую кладу, а на *matK*-дереве объединяется вместе с *A. reflexa*, *A. nemorosa*, *A. altaica* в отдельный субкластер.

Различное положение на двух филогенетических деревьях также занимает недавно описанный вид *A. osinovskiensis* (Степанов, 2006), близкородственный *A. reflexa*. Если на ITS дереве он входит в одну кладу с *A. reflexa*, *A. raddeana*, *A. amurensis*, то на дереве *matK* данный вид обнаруживает абсолютное сходство с хакасским образцом *A. caerulea*, а от *A. reflexa* отличается по 5 заменам (1 транзиция и 4 трансверсии).

В целом, полученные нами результаты согласуются с данными других авторов (Стародубцев, 1991; Tamura, 1995; Луферов, 2004; Ziman et al., 2008; Hoot et al., 2012; Jiang et al., 2017), разработавших систематику рода *Anemone* как на основе морфологических признаков, так и с использованием молекулярных маркеров. Согласно реклассификации Hoot et al. (2012), основанной на секвенировании ядерного ITS региона и пластидного спейсера *atpB-rbcL*, единственный род *Anemone* делится на два подрода (*Anemonidium* с основным числом хромосом  $x = 7$  и *Anemone* с  $x = 8$ ). Более поздняя работа Jiang et al. (2017) на основе анализа ядерного и 6 пластидных маркеров подтвердила исследования Hoot et al. (2012). Клады, формируемые на наших филогенетических деревьях, соответствуют секциям и подсекциям, выделяемым данными авторами.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Куцев М. Г., Уварова О. В., Синицина Т. А. Набор синтетических олигонуклеотидов для амплификации и секвенирования ITS1-5.8S-ITS2 сосудистых растений / Патент на изобретение RU 2528063 С1, 10.09.2014. Заявка № 2013106976/10 от 18.02.2013
- Луферов А. Н. Таксономический конспект лютиковых (Ranunculaceae) Дальнего Востока России // Turczaninowia, 2004. – Т. 7, № 1. – С. 5–84.
- Стародубцев В. Н. Ветреницы: систематика и эволюция. – Л.: Наука, 1990. – 200 с.
- Степанов Н. В. Флора северо-востока Западного Саяна и острова Отдыха на Енисее (г. Красноярск). – Красноярск: Изд-во Краснояр. гос. ун-та, 2006. – 122 с.
- Ehrendorfer F., Samuel R. Contributions to a molecular phylogeny and systematics of *Anemone* and related genera (Ranunculaceae-Anemoninae) // Acta Phytotax. Sin., 2001. – Vol. 39. – P. 293–307.
- Ehrendorfer F., Ziman S. N., König C., Keener C. S., Dutton B. E., et al. Taxonomic revision, phylogenetics and transcontinental distribution of *Anemone* section *Anemone* (Ranunculaceae) // Bot. J. Linn. Soc., 2009. – Vol. 160. – P. 312–354. DOI: 10.1111/j.1095-8339.2009.00861
- Gouy M., Guindon S., Gascuel O. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building // Molecular Biology and Evolution, 2010. – Vol. 27, No 2. – P. 221–224. URL: <http://doua.prabi.fr/software/seaview>

**Hollingsworth M. L., Clark A. A., Forrest L. L., et al.** Selecting barcoding loci for plants: evaluation of seven candidate loci with species-level sampling in three divergent groups of land plants // *Molecular Ecology Resources*, 2009. – Vol. 9. – P. 439–457.

**Hoot S. B., Meyer K. M., Manning J. C.** Phylogeny and reclassification of *Anemone* (Ranunculaceae), with an emphasis on austral species // *Systematic Botany*, 2012. – Vol. 37. – P. 139–152. DOI: 10.1600/036364412X616729

**Hoot S. B., Reznicek A. A., Palmer J. D.** Phylogenetic relationships in *Anemone* (Ranunculaceae) based on morphology and chloroplast DNA // *Systematic Botany*, 1994. – Vol. 19, No 1. – P. 169–200. DOI: 10.2307/2419720

**Jiang N., Zhou Z., Yang J.-B., Zhang S.-D., Guan K.-Y., Tan Y.-H., et al.** Phylogenetic reassessment of tribe *Anemoneae* (Ranunculaceae): Non-monophyly of *Anemone* s. l. revealed by plastid datasets // *PLoS ONE*, 2017. – Vol. 12, No 3. DOI: 10.1371/journal.pone.0174792

**Meyer K. M., Hoot S. B., Arroyo M. T. K.** Phylogenetic affinities of south American *Anemone* (Ranunculaceae), including the endemic segregate genera, *Barneoudia* and *Oreithale* // *Int. J. Plant Sci.*, 2010. – Vol. 171. – P. 323–331. DOI: 10.1086/650153

**Minh B. Q., Schmidt H. A., Chernomor O., Schrempf D., Woodhams M. D., Haeseler A. von, Lanfear R.** IQ-TREE 2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era // *Mol. Biol. Evol.*, 2020. – Vol. 37. – P. 1530–1534. URL: <http://www.iqtree.org>

**Mlinarec J., Šatović Z., Mihelj D., Malenica N., Besendorfer V.** Cytogenetic and phylogenetic studies of diploid and polyploid members of tribe *Anemoninae* (Ranunculaceae) // *Plant Biol.*, 2012. – Vol. 14. – P. 525–536. DOI: 10.1111/j.1438-8677.2011.00519

**Ronquist F., Huelsenbeck J. P.** MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // *Bioinformatics*, 2003. – Vol. 19. – P. 1572–1574. URL: <http://nbisweden.github.io/MrBayes/manual.html>

**Schuettpelz E., Hoot S. B., Samuel R., Ehrendorfer F.** Multiple origins of southern hemisphere *Anemone* (Ranunculaceae) based on plastid and nuclear sequence data // *Plant Syst. Evol.*, 2002. – Vol. 231. – P. 143–151. DOI: 10.1007/s006060200016

**Stöver B. C., Müller K. F.** TreeGraph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses // *BMC Bioinformatics*, 2010. – Vol. 11, No 7. URL: <http://treegraph.bioinfweb.info>

**Tamura M.** *Anemone* L. // Hiepko P. (ed.), *Die Natürlichen Pflanzenfamilien*, 1995. – Vol. 17a. – P. 324–349.

**Zhang Y., Hong Y., Ren C., Tang M., Hoot S. B., Yang Q.** Palynology, cytology, and molecular systematics of *Anemone* section *Begoniifolia* (Ranunculaceae) // *Plant Syst. Evol.*, 2015. – Vol. 301. – P. 411–424. DOI: 10.1007/s00606-014-1082-0

**Ziman S. N., Bulakh E. V., Kadota Y., Keener C. S.** Modern view on the taxonomy of the genus *Anemone* L. sensu stricto (Ranunculaceae) // *J. Jpn. Bot.*, 2008. – Vol. 83. – P. 127–155.