

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

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
Гончаров Андрей Анатольевич

ВЛАДИВОСТОК – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Краткая характеристика и история изучения сем. Crassulaceae J.St.-Hil.....	11
1.2. Род <i>Sedum</i> L.....	16
1.3. Маркеры для филогенетических исследований	20
1.4. Внутренние транскрибируемые спейсеры рибосомных генов.....	21
1.5. Большое число копий рДНК и их согласованная эволюция.....	24
1.6. Моделирование вторичной структуры ITS региона	26
1.7. Компенсаторные и полукompенсаторные мутации	33
1.8. Ген <i>matK</i> и его применение в филогенетических исследованиях.....	34
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	38
2.1. Материалы.....	38
2.2. Выделение ДНК.....	38
2.3. Амплификация ДНК	38
2.4. Электрофорез ДНК.....	40
2.5. Секвенирование ДНК.....	41
2.5.1. Реакция циклического секвенирования	41
2.5.2. Отчистка продуктов реакции циклического секвенирования	42
2.5.3. Определение нуклеотидных последовательностей.....	42
2.6. Моделирование вторичных структур	42
2.7. Матрицы данных и выравнивание последовательностей	43
2.8. Филогенетический анализ	43
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	45
3.1. Общая характеристика последовательностей ITS региона.....	45
3.2. Вторичная структура спейсеров ITS1 и ITS2	47
3.3. Общая характеристика последовательностей гена <i>matK</i>	56
3.4. Филогения рода <i>Sedum</i> и близких ему родов на основании последовательностей ITS региона.....	57

3.5. Филогения рода <i>Sedum</i> и близких ему родов на основании участка гена <i>matK</i> ...	64
3.6. Анализ объединенной матрицы последовательностей ITS региона и гена <i>matK</i> .	67
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ	71
4.1. Вторичная структура спейсеров ITS1 и ITS2	71
4.2. Филогения рода <i>Sedum</i>	73
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	81
ВЫВОДЫ	83
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	84
ПРИЛОЖЕНИЕ	105

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГЦ – сокращение от "гуанин+цитозин"

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

М – моль

мкл – микролитр

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

нт – нуклеотидов

об./мин – оборотов в минуту

пн – пар нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

рДНК – рибосомная ДНК

РНК – рибонуклеиновая кислота

рРНК – рибосомная РНК

тРНК – транспортная рибонуклеиновая кислота

хпДНК – хлоропластная ДНК

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

BI – Bayesian Inference – Байесовский подход (анализ)

CAM – Crassulacean Acid Metabolism – метаболизм карбоновых кислот по типу толстянковых

CBC – Compensatory Base Change – компенсаторная замена оснований

ETS – External Transcribed Spacer – внешний транскрибируемый спейсер

hCBC – hemi-Compensatory Base Change – полукомпенсаторная замена оснований

ITS регион – Internal Transcribed Spacer – регион внутреннего транскрибируемого спейсера, состоящий из двух спейсерных участков (ITS1 и ITS2) и гена 5.8S ядерной рибосомной ДНК

ML – Maximum Likelihood – метод максимального правдоподобия

MP – Maximum Parsimony – метод максимальной экономии (парсимонии)

PP – Posterior Probability – апостериорная вероятность (используется в Байесовском подходе)

SNP – Single Nucleotide Polymorphism – однонуклеотидный полиморфизм

TBE – Tris / Borate / EDTA-buffer – трис-боратный ЭДТА-буфер

ВВЕДЕНИЕ

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. 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 исследо-

вания 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) так же 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* хпДНК.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Получить нуклеотидные последовательности ITS региона рДНК, участка гена *matK* хпДНК 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 *Sedeae*) 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 азиатских 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* хпДНК. 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* хпДНК позволили реконструировать филогению на разных таксономических уровнях: триб *Aeonieae*, *Semperviveae* и *Sedaeae*, а также слагающих их родов и внутривидовых эволюционных линий.

3. Полиморфный род *Sedum* является полифилетическим. Его представители входят в состав всех клад/кластеров филогенетического дерева: *Aeonium* (триба *Aeonieae*), *Sempervivum* (*Semperviveae*), *Acre* и *Leucosedum* (*Sedaeae*), 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).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Краткая характеристика и история изучения сем. Crassulaceae J.St.-Hil.

Семейство Crassulaceae (толстянковые) включает в себя растения преимущественно суккулентного облика, адаптированные к ксерофитным условиям и характеризующиеся специфическим САМ-метаболизмом. Благодаря яркому обильному цветению и декоративной листве толстянковые широко известны среди цветоводов. Кроме того, представители семейства обладают выраженными лекарственными свойствами (*Rhodiola rosea* L., *Hylotelephium triphyllum* (Haw.) Holub, *Aizopsis aizoan* (L.) Grulich. и др.) и издревле применяются в народной медицине разных стран (Саратиков, 1974; Саратиков и др., 1987; Melo et al., 2005; Jung et al., 2008). В современной фармакологии толстянковые практически не используются, хотя их лекарственное воздействие подтверждено медицинскими исследованиями (Шретер, 1975; Гнедков, Шретер, 1977; Kim et al., 2004; Moon et al., 2009; Huang et al., 2010).

Семейство насчитывает около 1400 видов, классифицируемых в 33 родах (Eggli, 2005). Члены семейства имеют почти космополитное распространение и населяют, главным образом, засушливые и горные районы. Хотя толстянковые встречаются почти во всем мире, большинство видов сосредоточено в пяти центрах разнообразия: Мексика (приблизительно 330 видов), Средиземноморье (100 видов), Макаронезия (63 вида), Южная Африка (около 250 видов) и Восточная Азия (300 видов; Carrillo-Reyes et al., 2009). Семейство не представлено только в Австралии и Полинезии.

Первая классификация Crassulaceae принадлежит Бергеру (Berger, 1930), который выделил в нем 6 подсемейств (Рис. 1).

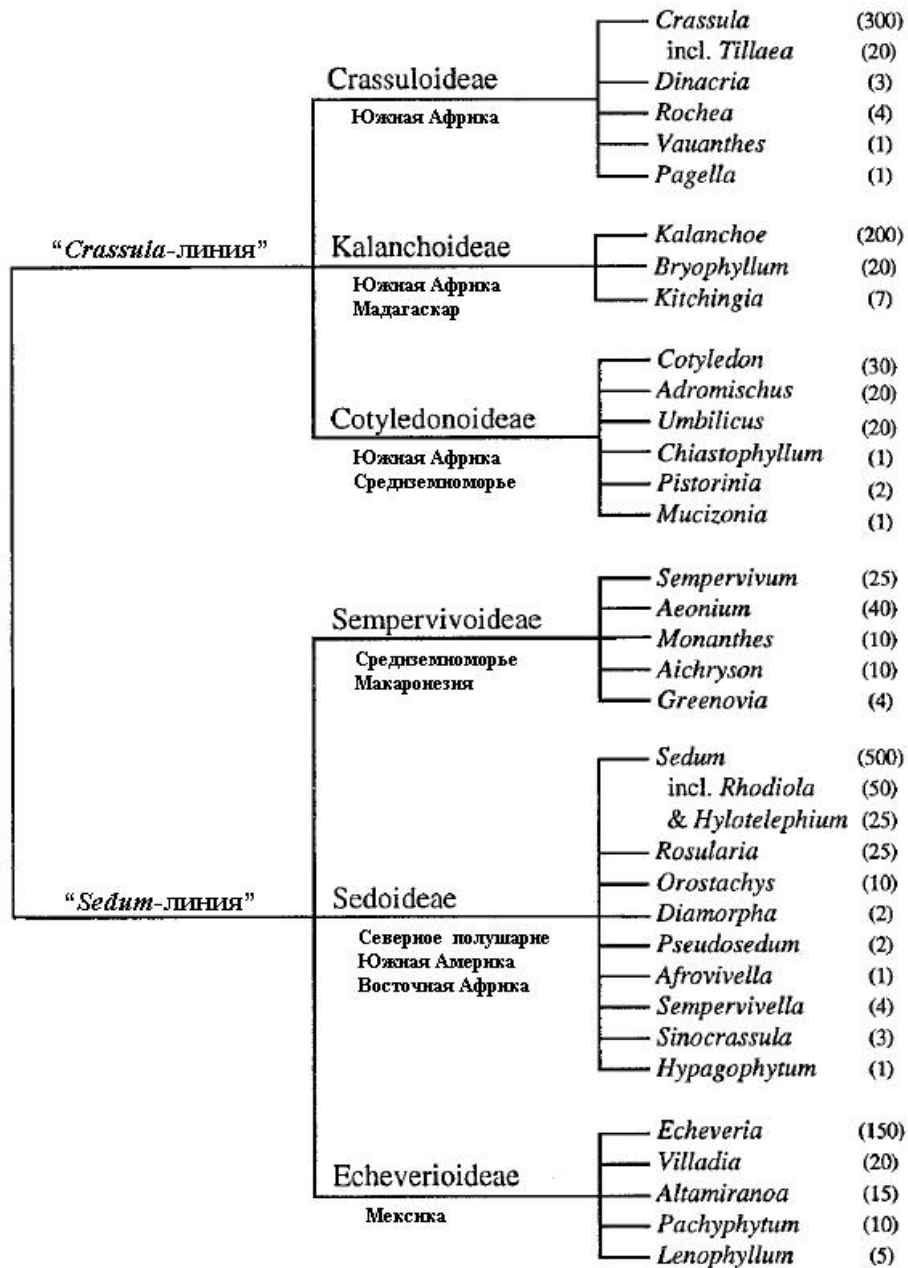


Рисунок 1 – Классификация семейства Crassulaceae по Бергеру (по: van Ham, 't Hart, 1998, с дополнениями). В кавычках указаны основные эволюционные линии. Названия подсемейств и их географическое распространение указаны над/под ветвями. Числа в круглых скобках указывают примерное число видов в родах.

Бергер разделил подсемейства на две биогеографические группы: «Crassula-линия» (Crassuloideae, Kalanchoideae и Cotyledonoideae), включающая таксоны из Южного полушария и «Sedum-линия» (включающая Sempervivoideae, Sedoideae и Echeverioideae) – из Северного. Подсемейства были выделены на основании при-

знаков числа и расположения частей цветка, степени сростнолепестности, филотаксису и включали по одному из крупных родов (*Crassula* L., *Kalanchoe* Adanson, *Cotyledon* L., *Sempervivum* L., *Sedum* и *Echeveria* DC.), именем которых и были названы.

Цитогенетические исследования Чарльза Ула (Charles Uhl) позволили получить важные для систематики Crassulaceae данные. Им была подтверждена монофилия Crassuloideae (Uhl, 1963), Kalanchoideae (Uhl, 1948). Однако общий вывод этих исследований заключался в том, что подсемейства, описанные Бергером, в значительной степени искусственны (Cotyledonoideae, Uhl, 1948; Sempervivoideae, Uhl, 1961; Sedoideae, Uhl, 1963), а признаки, используемые для определения этих таксонов, независимо возникали в семействе несколько раз.

Основываясь на описанных выше цитогенетических исследованиях и других данных (морфология пыльцы, биогеография, генетика), некоторые авторы предложили сократить число подсемейств до трех (Thorne, 1992; Takhtajan, 1997; Thiede, Eggli, 2007). Thorne (1992) описал подсемейства Sedoideae (включающее Echeveroideae и Sempervivoideae), Crassuloideae и Cotyledonoideae (включающее Kalanchoideae), а позже сократил число подсемейств до 2: Crassuloideae и Sempervivoideae (по праву приоритета имени над Sedoideae; Thorne, 2000). Тахтаджян (1997) признал те же подсемейства, но предложил Kalanchoideae в качестве более предпочтительного названия для группы, ранее известной как Cotyledonoideae.

Появление молекулярно-филогенетических методов позволило получить огромное количество новых данных для пересмотра систематики толстянковых. Уже первая попытка установить родственные отношения между видами семейства на основе молекулярно-филогенетических методов (van Ham, 1995) проявила существенные противоречия между генетическими данными и общепринятой системой семейства. На основании результатов рестриктазного анализа хпДНК van Ham установил в составе семейства 7 монофилетических групп (Рис. 2): клада *Crassula*, включающая представителей подсемейства Crassuloideae sensu Berger;

клада *Kalanchoe*, представленная видами из подсемейств *Kalanchoideae* и *Cotyledonoideae*;

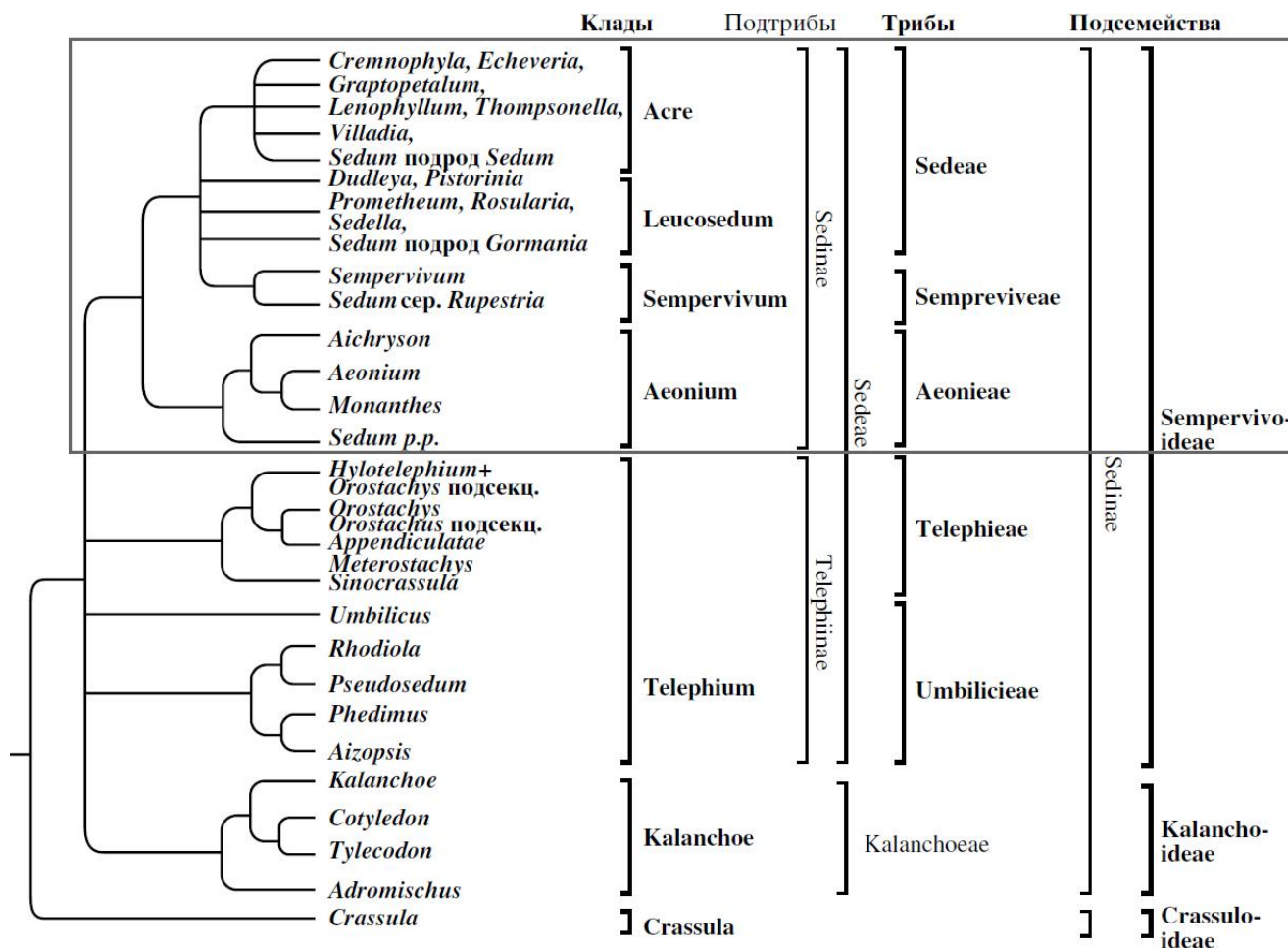


Рисунок 2 – Обобщенная схема филогенетических отношений в семействе *Crassulaceae*, основанная на результатах рестриктазного анализа хпДНК (van Ham, 1995; van Ham, 't Hart, 1998) и сравнения нуклеотидных последовательностей гена *matK*, межгенного спейсера *trnL-F* хпДНК и ITS региона ядерной рДНК (Mort et al., 2001; Mayuzumi, Ohba, 2004; Thiede, Eggli, 2007; Гончарова и др., 2008), отражающая общие для всех анализов черты (по: Гончарова, Гончаров, 2009). Названия клад соответствую первой молекулярной филогении семейства (van Ham, 1995), таксономическая структура - системе, предложенной Тидом и Эггли (Thiede, Eggli, 2007). Обычным шрифтом показаны надродовые таксоны, предложенные Хартом ('t Hart, 1995). Рамкой отмечена изучаемая нами группа.

клада *Telephium*, содержащая род *Umbilicus* DC. из подсемейства *Cotyledonoideae*, рода *Rhodiola* L., *Hylotelephium* H. Ohba и некоторых представителей *Sedum* s. l. (*Phedimus* Rafinesque, *Aizopsis* Grulich) из подсемейства *Sedoideae*; клада

Sempervivum, слагаемая одноименным родом из *Sempervivoideae* sensu Berger и некоторыми представителями *Sedum* s. str.; клада *Leucosedum*; клада *Aeonium*, включающая макаронезийские/североафриканские члены *Sempervivoideae* и *Sedum* s. str.; клада *Acre*, объединяющая американское подсемейство *Echeverioideae* и *Sedum* s. str.

't Hart (1995) предложил собственную систему семейства, основываясь на выводах van Ham и анализах последовательностей межгенного спейсера *trnL-F* у 26 родов толстянковых. Он уменьшил число подсемейств до 2: *Crassuloideae* и *Sedoideae*. Если *Crassuloideae* соответствовало традиционному, то *Sedoideae* включало оставшиеся пять подсемейств в понимании Berger. В *Sedoideae* он выделил 2 трибы: африканскую *Kalanchoeae* (соответствует кладе *Kalanchoe* в понимании van Ham) и *Sedeae*, включающую таксоны из Северного полушария. Трибу *Sedeae* этот автор разделил на две подтрибы: *Telephiinae* и *Sedinae*.

Thiede и Eggli (2007) разработали детальную современную классификацию *Crassulaceae*, которая подытоживала молекулярно-филогенетические данные. Они выделили три подсемейства на основании устойчивости их клад в филогенетических исследованиях. В *Sedoideae* они установили пять триб, также представляющих собой клады с различной степенью поддержки в анализах хпДНК (van Ham, 't Hart, 1998; Mort et al., 2001).

Филогенетические исследования больших выборок покрытосеменных растений подтвердили монофилию семейства *Crassulaceae* и поместили его в *Saxifragales* Dumort. (Chase et al., 1993; Soltis, Soltis, 1997; Savolainen et al., 2000; Soltis et al., 2000). Этот порядок включает совокупность семейств, которые в ранних классификациях, основанных на морфологии, были помещены в несколько подклассов, включая *Hamamelidae*, *Rosidae*, *Dilleniidae* и *Magnoliidae* sensu Cronquist (Cronquist, 1981; Takhtajan, 1997; Soltis et al., 2005). Филогенетические анализы *Saxifragales* установили монофилетическую, хорошо поддержанную ветвь *Crassulaceae*, которая является сестринской группой *Haloragaceae* R.Br. (Fishbein et al., 2001; Fishbein, Soltis, 2004; Soltis et al., 2005). В свою очередь, кла-

да Crassulaceae+Haloragaceae с умеренной поддержкой является сестринской к альянсу Saxifragaceae (Saxifragaceae Juss., Grossulariaceae DC., Iteaceae J. Agardh и Pterostemonaceae Small).

В итоге, значительное морфологическое разнообразие и четкая географическая приуроченность большинства родов, обуславливающие наличие в семействе нескольких эволюционных ветвей, способствовали тому, что внутрисемейственная классификация этой группы до сих пор остается спорной (Гончарова и др., 2006).

1.2. Род *Sedum* L.

Настоящее исследование посвящено изучению филогенетической структуры наиболее богатого видами, фенотипически разнообразного и сложного в таксономическом отношении рода *Sedum* (очиток). Род включает травянистые, преимущественно многолетние растения, широко распространенные в умеренном поясе Северного полушария – Европе, Средиземноморье, Восточной Азии, Северной и Южной Америках (Рис. 3).

Род *Sedum* насчитывает около 420 видов, что составляет примерно треть от общего числа видов семейства (Thiede, Eggli, 2007).



Рисунок 3 – Распространение рода *Sedum* (по: Гончарова, 2006). На карте серым цветом выделен ареал рода.

Наибольшим разнообразием род *Sedum* характеризуется в Западном полушарии, где произрастают примерно 170 видов, из них около 30 в Канаде и США, примерно 120 в Мексике и около 20 видов в Центральной и Южной Америке. Азия занимает второе место по числу видов (130-140), в то время как в Европе, Северной Африке и Атлантических островах произрастает около 100 видов. В России насчитывается 54 вида (для сравнения род *Rhodiola* представлен 21 видом). В Сибири встречаются 2 вида *Sedum*, а на Дальнем Востоке России род не представлен, хотя границы ареала подходят к нему очень близко (Ворошилов, 1966).

Молекулярные данные убедительно продемонстрировали полифилетическую природу рода с распределением его видов между четырьмя основными клдами филогенетического древа толстянковых: *Acre*, *Aeonium*, *Leucosedum* и *Sempervivum* (van Ham, 1995; van Ham, 't Hart, 1998; Mort et al., 2001, 2010; Гончарова и др., 2008; Рис. 2).

Примечательно, что эти клды слагают 3 трибы: *Aeonieae*, *Semperviveae* и *Sedeae* (Thiede, Egli, 2007), т.е. представители *Sedum* входят в состав трех надродовых таксонов одновременно! Основными причинами столь необычного состояния систематики *Sedum* являются высокое морфологическое разнообразие его представителей и гомоплазия фенотипических признаков, традиционно используемых для разграничения родов толстянковых. Следует отметить, что очитки характеризуются большим разнообразием числа (в основном от 4 до 38; Uhl, 1980, 1992) и морфологии хромосом. Именно в *Sedum* было обнаружено максимальное их число для цветковых растений: $2n=384$ у *S. farinosum* Lowe и $2n=640$ у *S. suaveolens* Kimmach (Uhl, 1978; 't Hart, 1984). Не удивительно, что искусственная природа рода была очевидна задолго до начала молекулярно-филогенетических исследований, и *Sedum* уже тогда называли сборным (catch-all) таксоном (Moran, 1942; Uhl, 1963; Spongberg, 1978). Хотя концепция рода за последние 50 лет существенно изменилась, и ряд внутривидовых таксонов был выведен из состава *Sedum*, род до сих пор нельзя четко охарактеризовать фенотипически (Mort et al.,

2001, 2010; 't Hart, Bleij, 2005; Thiede, Eggli, 2007). Необходимо отметить, что некоторые из выделенных родов (например, *Graptopetalum* Rose, *Dudleya* Britton & Rose, *Prometheum* (Berger) Ohba, *Sedella* Britton & Rose и т.д.) в филогенетических анализах проявили близость к видам *Sedum*, что отвергает их независимый статус или, что более вероятно, текущую концепцию рода *Sedum*.

Среди систематиков нет и не было единого мнения относительно внутривидовой структуры *Sedum*. В роде выделяли до 30 секций (Praeger, 1921; Berger, 1930; Alexander, 1942; Clausen, 1943; Fu, 1965, 1974; Jacobsen, 1974; Uhl, 1980; 't Hart, 1991), некоторые из них были возведены в ранг подродов (Clausen, 1943, 1979). На основании географического распространения и морфологии плодов Fröderström (1930, 1931) выделил семь групп видов *Sedum*, две из которых позже были описаны как секции: *Filipes* (Fröd.) S.H. Fu и *Oreades* (Fröd.) K.T. Fu (Fu, 1965, 1974). В настоящее время в *Sedum* признают два подрода: *Gormaniana* (Britton) Clausen и *Sedum* ('t Hart, Bleij, 2005; Thiede, Eggli, 2007). *Gormaniana* включает 110 видов, которые входят в состав клад *Aeonium*, *Sempervivum* и *Leucosedum*, а подрод *Sedum* насчитывает 320 видов, слагающих кладу *Acre* (van Ham, 't Hart, 1998; Mort et al., 2001; Thiede, Eggli, 2007). К последней так же относятся около 180 видов из родов *Cremnophila* Rose, *Echeveria*, *Graptopetalum*, *Lenophyllum* Rose, *Pachyphytum* Link, Klotzsch & Otto, *Thompsonella* Britton & Rose и *Villadia* Rose. Виды *Gormaniana* обычно опушены железистыми волосками, имеют широко сидячие обычно изомерные чашелистики и ребристые семена, в то время как представители *Sedum* – это в основном гладкие, со свободными килеватыми чашелистиками, с сетчатой/сетчато-мелкобугорковой поверхностью семян. Однако существуют исключения в подродовой классификации некоторых таксонов, например, *S. sedoides* (Decaisne) Pau ex Vidal y Lopez, *S. hispanicum* L., *S. gracile* C.A. Meyer и др. ('t Hart, Bleij, 2005; Thiede, Eggli, 2007).

Слабая изученность изменчивости очитков в природных популяциях и их исследование в основном по спорадическим сборам привели к многократному описанию многих видов и запутанным родственными отношениями внутри рода

(Кожевников, 1988). Род в целом считался наиболее примитивным и древним членом семейства толстянковых (Schönland, 1891), но результаты молекулярно-филогенетических анализов опровергли эту гипотезу, поместив его в вершинную кладу древа толстянковых, классифицируемую как подсемейство *Sempervivoideae* (Thiede, Eggli, 2007). В подсемействе виды *Sedum* составляют основу клад *Acrae* и *Leucosedum* (триба *Sedeae*), где они перемешаны с представителями некоторых других родов. Несколько североафриканских *Sedum* вошли в состав клады *Aeonium* (триба *Aeonieae*), объединяющей макаронезийские рода *Aeonium* Webb & Berth., *Aichryson* Webb & Berth. и *Monanthes* Haw. Виды *Sedum* ser. *Rupestris* Berger (род *Petrosedum* Grulich) формируют отдельную подкладу (или независимую кладу) в клade *Sempervivum* (триба *Semperviveae*; van Ham, 't Hart, 1998; Mort et al., 2001, 2002; Mayuzumi, Ohba, 2004; Гончарова и др., 2008; Carrillo-Reyes et al., 2009). В филогенетическом анализе на основании рестрикционных фрагментов хпДНК *Leucosedum* являлась одной из самых поддержанных клад (van Ham, 1995; van Ham, 't Hart, 1998). Однако, во всех дальнейших исследованиях, основанных на сравнении нуклеотидных последовательностей ядерной и хлоропластной ДНК, эта клада выделялась либо без статистической поддержки (Mort et al., 2001), либо как парафилетическая группа (Mayuzumi, Ohba, 2004; Гончарова и др., 2008). *Leucosedum* включает в себя виды *Sedum* подрода *Gormaniana* и некоторые североамериканские (*Dudleya* и *Sedella*) и евроазиатские рода (*Rosularia* (DC.) Stapf, *Prometheum* и *Pistorinia* DC.). Считается, что данная группа включает около 200 видов, представленных пятью – семью традиционными родами, которые до сих пор плохо изучены современными методами молекулярной биологии. В дополнение к видам *Gormaniana*, в *Leucosedum* также могут входить члены подрода *Sedum* (Mort et al., 2001; Mayuzumi, Ohba, 2004; Гончарова и др., 2008).

Клада *Acrae* включает около 500 видов, традиционно классифицируемых в семи родах. Она имела хорошую поддержку во всех проведенных анализах (Thiede, Eggli, 2007). В кладу входят представители *Sedum* подрода *Sedum* и большинство эндемичных американских родов (например, *Echeveria*, *Graptopetalum*,

Lenophyllum, *Pachyphytum*, *Villadia* и *Thompsonella*). При сравнении нуклеотидных последовательностей было установлено разделение этой клады на Евроазиатскую и Американскую ветви (Гончарова и др., 2008; Carrillo-Reyes et al., 2009). Последняя образовывала хорошо поддержанную подкладу с макаронезийским *S. farinosum* в качестве сестринского таксона. Азиатские и европейские виды были представлены несколькими устойчивыми линиями с неразрешенными отношениями, а их общая ветвь не получила поддержки. В Американской кладе были установлены 5 линий, 2 из которых, "*Echiveria*" и "*Villadia*", были полиродовыми (Carrillo-Reyes et al., 2009). Монофилия была подтверждена только для трех родов: *Lenophyllum*, *Thompsonella* и *Pachyphytum*.

Таким образом, род *Sedum* по-прежнему слабо исследован и порядок ветвления основных клад и линий остается лишь предварительно установленным, только родство *Acre/Leucosedum* неоспоримо.

1.3. Маркеры для филогенетических исследований

Молекулярный или ДНК-маркер – участок ДНК, представляющий собой определенный ген или некодирующую последовательность с известным расположением на хромосоме, который может использоваться для идентификации организмов на разных таксономических уровнях. Молекулярные маркеры считаются третьим поколением генетических маркеров (Хлесткина, 2013). Им предшествовали классические генетические и белковые маркеры. При этом классический генетический маркер соответствует гену, аллели которого различаются на уровне фенотипа, в то время как белковый маркер соответствует гену, аллели которого отличаются по молекулярной массе на уровне белкового продукта. ДНК-маркер соответствует гену или же некодирующей последовательности генома, варианты (аллели) которого различаются на уровне ДНК (Хлесткина, 2013). Эти отличия (ДНК полиморфизм) можно обнаружить несколькими способами:

- гибридизацией с определенными нуклеотидными последовательностями;

- обработкой ДНК эндонуклеазами рестрикции;
- сравнением длин фрагментов, полученных методом полимеразной цепной реакции (ПЦР);
- определением нуклеотидной последовательности (секвенированием).

Молекулярные маркеры активно применяются для решения различных вопросов, включающих определение видовой принадлежности, выяснение степени родства разных групп организмов, их генетического полиморфизма, установление филогении, обнаружение того или иного полезного признака.

Для анализов филогенетических отношений используются ДНК-маркеры из разных компартментов клетки – ядерные, митохондриальные, хлоропластные гены и некодирующие (спейсерные) участки. Как правило, при исследованиях на низких таксономических уровнях (вид–род–семейство) предпочтение отдается более вариабельным (более информативным) маркерам, а на высоких – более консервативным, но все-таки изменчивым локусам.

Основными качествами хорошего генетического маркера являются:

- встречаемость в ДНК большого числа организмов, что позволяет использовать данный маркер на высоких таксономических уровнях;
- удобство экспериментальной работы с маркером для получения достоверных данных (небольшая длина, отсутствие участков со сложной структурой, повторов, мобильных элементов и псевдогенов, которые могут повлиять на полученные результаты);
- высокая скорость накопления мутаций.

Таким образом, выбор ДНК-маркера, подходящего для того или иного исследования, является очень важной задачей.

1.4. Внутренние транскрибируемые спейсеры рибосомных генов

Местом локализации рДНК на хромосомах являются ядрышкообразующие регионы (ЯОР), в которых рибосомные гены организованы в виде множества тандемных повторов (кластеров), каждый из которых содержит гены 18S, 5.8S и

28S/26S РНК, разделенные внутренними транскрибируемыми спейсерами (ITS1 и ITS2). Спейсеры транскрибируются в составе предшественника рибосомной РНК (рРНК), а затем удаляются в результате сплайсинга.

На рисунке 4 изображен кластер рибосомных генов, содержащий ITS регион, который состоит из трех структурных единиц: спейсеров ITS1, ITS2 и высококонсервативного экзона 5.8S рДНК, расположенного между ними (Wheeler, Honeycutt, 1988).

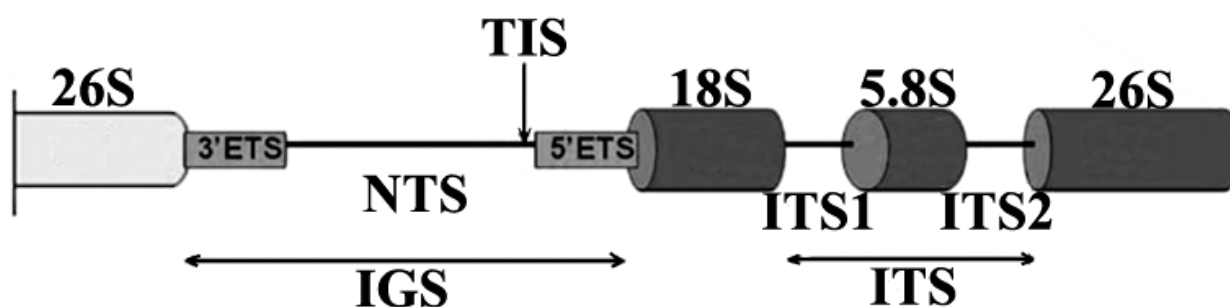


Рисунок 4 – Схематическое изображение области рДНК растений (по: Roszai, Huvönen, 2010). Обрзначения: ITS – ITS регион; ITS1 и ITS2 – внутренние транскрибируемые спейсеры; IGS – межгенный спейсер; ETS – внешний транскрибируемый спейсер; NTS – нетранскрибируемый спейсер; TIS – участок начала транскрипции.

Длина ITS региона растений варьирует от 500–700 пн у покрытосемянных (Baldwin et al., 1995) до 1500–3700 пн у некоторых голосемянных (Álvarez, Wendel, 2003). У позвоночных животных длина каждого спейсера (ITS1 и ITS2) превосходит 500 пн. При этом у рыб и амфибий эта длина составляет 400–600 пн, у рептилий 400–700 пн, у птиц и млекопитающих достигает 1000 пн (Coleman, 2015).

Спейсеры ITS1 и ITS2 не входят в зрелые рибосомы, так как вырезаются во время созревания рибосомной РНК (Hadjilova et al., 1984; Venema, Tollervey, 1999). Следовательно, можно было бы предположить, что эти спейсеры находятся под меньшим давлением отбора, чем гены рРНК, и их можно рассматривать как нейтрально эволюционирующие маркеры. Однако эти спейсеры содержат сигналами

лы к процессингу рРНК, и весь процесс созревания во многом зависит от вторичной структуры ITS. Было установлено, что консервативная вторичная структура обоих спейсеров важна для правильного наведения эндонуклеолитических ферментов к специфическим сайтам вырезания (Mai, Coleman, 1997; Coleman, 2015). Экспериментально было показано, что в случае, когда определенные структуры ITS2 не образовывались, происходило нарушение сборки больших субъединиц рибосом (Côté et al., 2002; Chen et al., 2004; Gottschling et al., 2004).

Начиная с работы Porter и Collins (1991), ITS регион стал широко использоваться для филогенетической реконструкции, в основном, на родовом и видовом уровне (Baldwin et al., 1995; Álvarez, Wendel, 2003; Feliner, Rosselló, 2007).

По сравнению с другими ДНК-маркерами ITS регион обладает следующими преимуществами:

- ПЦР амплификация с универсальными праймерами для разных групп организмов.
- Мультикопийная структура. Из-за того, что в геноме присутствует большое количество тандемных повторов ядерных рДНК (сотни и иногда даже тысячи копий), они амплифицируются легче, чем большинство низкокопийных ядерных локусов.
- Умеренный размер, позволяющий относительно легко секвенировать последовательности.
- Двуродительское наследование. Так как кластеры генов, кодирующих рибосомные РНК, находятся в ядерном геноме, последовательности ITS региона наследуются от обоих родителей, что отличает их от локусов хпДНК. Благодаря этой особенности маркер может использоваться для изучения явлений сетчатой эволюции, видообразования путем гибридизации или полиплоидизации (Rieseberg et al., 1990; Rieseberg, Soltis, 1991; Baldwin, 1992; Rieseberg, Wendel, 1993; Kim, Jansen, 1994; Baldwin et al., 1995; Wendel et al., 1995).
- Быстрый темп эволюции этого участка (от $1,72 \times 10^{-9}$ до $8,34 \times 10^{-9}$ замен/сайт/год у травянистых растений и от $0,38 \times 10^{-9}$ до $7,83 \times 10^{-9}$ замен/сайт/год у

многолетних древесных растений; Кау et al., 2006), что делает его удобным маркером для исследований в филогенетике, видообразовании и биогеографии.

Благодаря перечисленным преимуществам, ITS регион рДНК является одним из самых популярных ДНК-маркеров, используемых в филогенетических реконструкциях.

1.5. Большое число копий рДНК и их согласованная эволюция

В геноме эукариот находится большое число повторяющихся нуклеотидных последовательностей. Большая их часть является некодирующей ДНК, остальные представляют собой мультигенные семейства (Liao, 1999). Мультигенные семейства возникают в результате нескольких дупликаций одного предкового гена, при которых число копий в итоге может достигать от нескольких единиц, до нескольких тысяч. Гены таких семейств могут располагаться в одном локусе хромосомы либо в нескольких (иногда даже на разных хромосомах). Среди примеров мультигенных семейств можно привести гены актина, гемоглобина, иммуноглобулинов, тубулинов, интерферонов, гистонов, гены рДНК и т.д.

При изучении мультигенных семейств было отмечено, что если в одной из копий гена происходит мутация, все остальные копии со временем получают точно такую же мутацию. Это событие, при котором происходит гомогенизация повторяющихся последовательностей, называется согласованной эволюцией (Arnheim, 1983; Elder, Turner, 1995; Zimmer et al., 1980).

На рисунке 5 показана модель согласованной эволюции мультигенных семейств. Мутация, возникающая в спейсере одной из копий тандемных повторов на хромосоме, распространяется по спейсерам других копий с помощью механизмов внутривнутрихромосомной гомогенизации. Затем, путем межхромосомной генной конверсии, мутация распространяется на один из спейсеров гомологичной хромосомы. Далее мутация фиксируется во всех остальных копиях дополнительными циклами внутривнутрихромосомной гомогенизации (Liao et al., 1997). Процесс, посредством которого мутации распространяются как внутри генома, среди генов мульт-

тигенного семейства (гомогенизация), так и среди особей в популяции (фиксация) Доувер (Dover, 1982) назвал «молекулярным драйвом» (molecular drive). Молекулярный драйв также можно назвать последовательностью различных событий, основанных на механизмах одностороннего переноса ДНК внутри одной хромосомы и между хромосомами: генной конверсии, транспозициях, проскальзывающей репликации и РНК-опосредованном переносе (Dover, 1986).

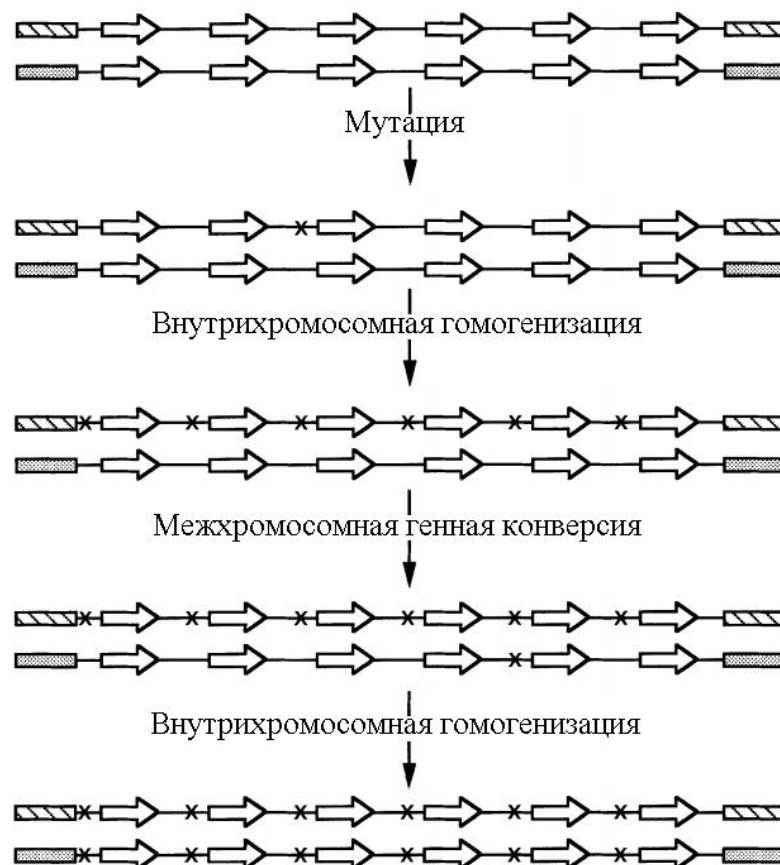


Рисунок 5 – Модель согласованной эволюции мультигенных семейств (по: Liao et al., 1997). Показаны тандемные повторы ДНК в двух гомологичных хромосомах. Гены изображены стрелками, межгенные спейсеры – линиями, мутации показаны в виде крестиков.

Было установлено, что после скрещивания, полиплоидизации или геномных изменений (генная и хромосомная дупликация, и другие формы гомологичных и негомологичных рекомбинаций) согласованная эволюция не происходит мгновенно. Следовательно, после этих событий генные копии не гомогенизированы, и в геноме могут быть представлены дивергентные ДНК-повторы. ITS регион рДНК

может быть важным источником информации для выявления данных событий (Emshwiller, Doyle, 1998; Vargas et al., 1999). Однако в этом случае стоит учитывать, что дивергентные копии будут амплифицироваться как консенсус многих участков со сходными праймерными сайтами в одном или нескольких локусах, обычно расположенных на разных хромосомах (Felinier, Rosselló, 2007). Есть два типа копий, которые могут быть обнаружены в результате ПЦР. Первый – это последовательности из других локусов, имеющие тот же размер, но отличающиеся нуклеотидными полиморфизмами (SNPs) в различных положениях этих последовательностей. Второй – отличные по размеру последовательности из-за вставок или делеций. Поэтому определение нуклеотидных последовательностей локусов из мультигенных семейств проще проводить после завершения согласованной эволюции, так как все повторы идентичны и не будут вызывать наложение пиков на хроматограмме при секвенировании.

Однако у некоторых видов растений обнаружены свидетельства несогласованной эволюции ITS региона (Ruggiero, Procaccini, 2004; Harpke, Peterson, 2006; Bayly, Ladiges, 2007). Это может быть следствием того, что видообразование идет быстрее, чем согласованная эволюция. При этом в одном геноме будут присутствовать разные паралогичные копии. С другой стороны, паралогичные последовательности рДНК могут располагаться на негомологичных хромосомах, что может препятствовать их полной гомогенизации (Ochieng et al., 2007). Некоторые копии могут терять свою функциональность, их называют псевдогенами. Как правило, эти нефункциональные копии характеризуются повышенной скоростью накопления мутаций в консервативных регионах, что приводит к уменьшению стабильности вторичной структуры спейсеров ITS1 и ITS2 (Bailey et al., 2003).

1.6. Моделирование вторичной структуры ITS региона

Рибонуклеиновая кислота (РНК) состоит из четырех видов азотистых оснований: аденин (А), гуанин (G), цитозин (С) и урацил (U). Стоит отметить, что молекулы РНК, в отличие от ДНК, построены из одной полинуклеотидной цепи.

Вторичная структура РНК возникает при взаимодействии комплементарных друг другу участков цепи. При этом образуются двойные спирали и оставшиеся неспаренными одноцепочечные участки. В формировании вторичной структуры участвуют водородные (Уотсон-Криковские) связи, возникающие между основаниями некоторых нуклеотидов. Такие связи могут возникать между А и U, между С и G и между G и U. Пары оснований А–U и С–G называются классическими, комплементарными; пара G–U – неклассической ("wobble" пара). Связь С–G – самая сильная, тогда как связь G–U является самой слабой и может возникать только при определенных условиях. Кроме вторичной структуры, РНК может образовывать третичную и четвертичную структуры. Третичная структура РНК часто стабилизируется ионами двухвалентных металлов, например ионами Mg^{2+} , связывающимися не только с фосфатными группами, но и с основаниями. Четвертичная структура РНК характеризуется взаимодействием отдельных молекул РНК между собой и с белками.

Одиночные пары оснований термодинамически не стабильны, однако присутствие нескольких последовательных пар приводит к значительному увеличению стабильности: образуется спираль (стебель). На рисунке 6 приведены различные элементы вторичной структуры РНК.

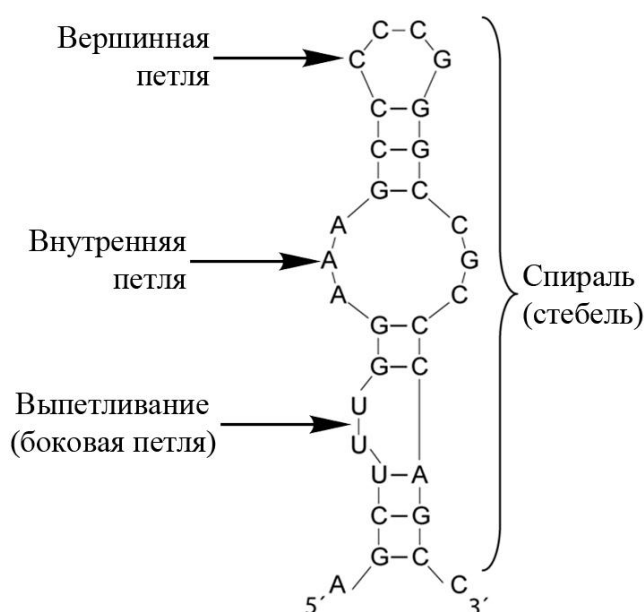


Рисунок 6 – основные элементы вторичной структуры РНК.

Однонитевые участки РНК, ограниченные спаренными основаниями, называются петлями. Петли могут быть как на конце спирали (верхушечная петля), так и внутри самой спирали (внутренняя петля). Группа неспаренных оснований только в одной из нитей РНК называется выпетливанием или выпуклостью.

Вторичная структура молекул РНК играет важную роль в жизни клетки: участвует в регуляции таких процессов, как транскрипция ДНК, сплайсинг РНК, изменение активности генов с помощью микроРНК и рибопереключателей (Wan et al., 2011). Кроме того, структура может влиять на взаимодействие РНК с молекулами, например, со специфическими белками RBP (RNA binding proteins).

Изучение вторичной структуры может проводиться с помощью электронной микроскопии (Gonzales et al., 1990), химических исследований (Yeh, Lee, 1990), сайт-направленного мутагенеза (Sande et al., 1992) и рентгеноструктурного анализа (Guo et al., 2004), но все эти методы сложны и дорогостоящи. С развитием компьютерного моделирования появилось множество программ и интернет сервисов, позволяющих смоделировать вторичную структуру данного региона РНК (Schultz et al., 2005).

Одним из способов предсказания структур является ковариационный (эволюционный) метод (Еникеев, 2014). Он основан на том факте, что множество известных структур РНК консервативны, то есть сохраняются в процессе эволюции, поскольку любое отклонение от этой структуры может повлечь за собой серьезные нарушения и смерть организма. Например, все тРНК имеют структуру, подобную листу клевера, поскольку это важно для их участия в процессе синтеза белка. В ковариационном методе производится поиск консервативных пар нуклеотидов среди гомологичных генов (эволюционировавших от общего предкового гена) и вторичная структура определяется путем исследования паттернов консервативности пар нуклеотидов в генах из матрицы данных (Hofacker et al., 2002).

Если в распоряжении исследователя имеется не огромная матрица данных, а только одна или несколько последовательностей, имеет смысл воспользоваться термодинамическим моделированием. Молекулы РНК стремятся к состоянию с

минимумом свободной энергии (ΔG), поэтому на основании минимизации этого параметра, строятся всевозможные конфигурации вторичной структуры. Далее среди них проводят поиск наиболее стабильной, которая и считается наиболее вероятной структурой.

Тиноко с соавторами (Tinoco et al., 1971) разработали метод оценки вторичной структуры РНК на основании разделения последовательности на отдельные части, а именно петли, выпетливания и спирали. Этим элементам присваивается определенное числовое значение, в зависимости от того, стабилизирует ли элемент общую вторичную структуру или дестабилизирует. Например, петлям присваивается отрицательное значение, что ведет к увеличению свободной энергии, а спиральям присваивается положительное значение, что в свою очередь ведет к уменьшению свободной энергии. Также авторами вводится понятие матрицы спаривания нуклеотидов. В этом случае уже каждой паре нуклеотидов присваивается некоторое положительное значение, если они могут образовать пару, или отрицательное, если не могут. Далее на основании матрицы спаривания нуклеотидов и информации о положительном и отрицательном вкладе в энергию спиралей и петель можно рассчитать наиболее вероятную вторичную структуру (Виноградова, 2016).

В 1981 году был разработан алгоритм динамического программирования Зукера (Zuker, Stiegler, 1981), в котором свободная энергия вторичной структуры считается как сумма свободных энергий отдельных элементов – петель и пар оснований, образующих спираль. Этот принцип заложен в процессе компьютерного моделирования вторичных структур сервера Mfold (Zuker, 2003) и в очень кратком виде его можно представить как пошаговый, отражающий последовательный рост молекулярной цепи РНК. Вначале длина цепи устанавливается равной некоторой величине, называемой начальной длиной. Удлинение вторичной структуры производится повторяющимся добавлением к ней новых спиралей так, чтобы обеспечивался минимальный отрицательный прирост свободной энергии молекулы (Козырева и др., 2001).

Важно отметить, что результаты термодинамического моделирования вторичной структуры необходимо внимательно анализировать, так как часто программы рассчитывают для одной последовательности сразу несколько структур, близких по значению свободной энергии (Goertzen et al., 2003). Кроме того, было показано, что структура РНК, характеризующаяся минимальной свободной энергией, не всегда реализуется в клетке и выполняет биологические функции (Ding et al., 2005). Это объясняется тем, что структуры в клетке стабилизированы третичными и четвертичными взаимодействиями. Более того, некоторые РНК (например, рибопереклюватели) существуют сразу в нескольких функциональных конформациях (Vitreschak et al., 2004; Coppins et al., 2007).

Благодаря открытию способности одноцепочечной рРНК формировать вторичную структуру, появилось новое направление в филогенетике. Модели вторичной структуры стали использовать для однозначного выравнивания дивергентных последовательностей, так как они дают возможность определять участки, формирующие гомологичные спирали РНК (An et al., 1999; Kelchner, 2000; Gottschling et al., 2001). Кроме того, важность метода моделирования структур состоит в том, что он позволяет реконструировать филогению, основанную не только на информации о первичных последовательностях (секвенировании), но также и на особенностях вторичной структуры.

В настоящее время установлены вторичные структуры транскриптов ITS1 и ITS2 большого числа эукариотических организмов (Coleman, 2015; Рис. 7). Обобщенная вторичная структура спейсера ITS1 большинства беспозвоночных представляет собой три спирали (I, II и III), за которыми следует СА-богатый одноцепочечный участок и короткая спираль IV (Coleman, 2015; Рис. 7). Общей особенностью для них является одноцепочечная А-богатая последовательность, примыкающая к гену 5.8S рРНК. Было отмечено, что у дрожжей спираль IV часто отсутствует.

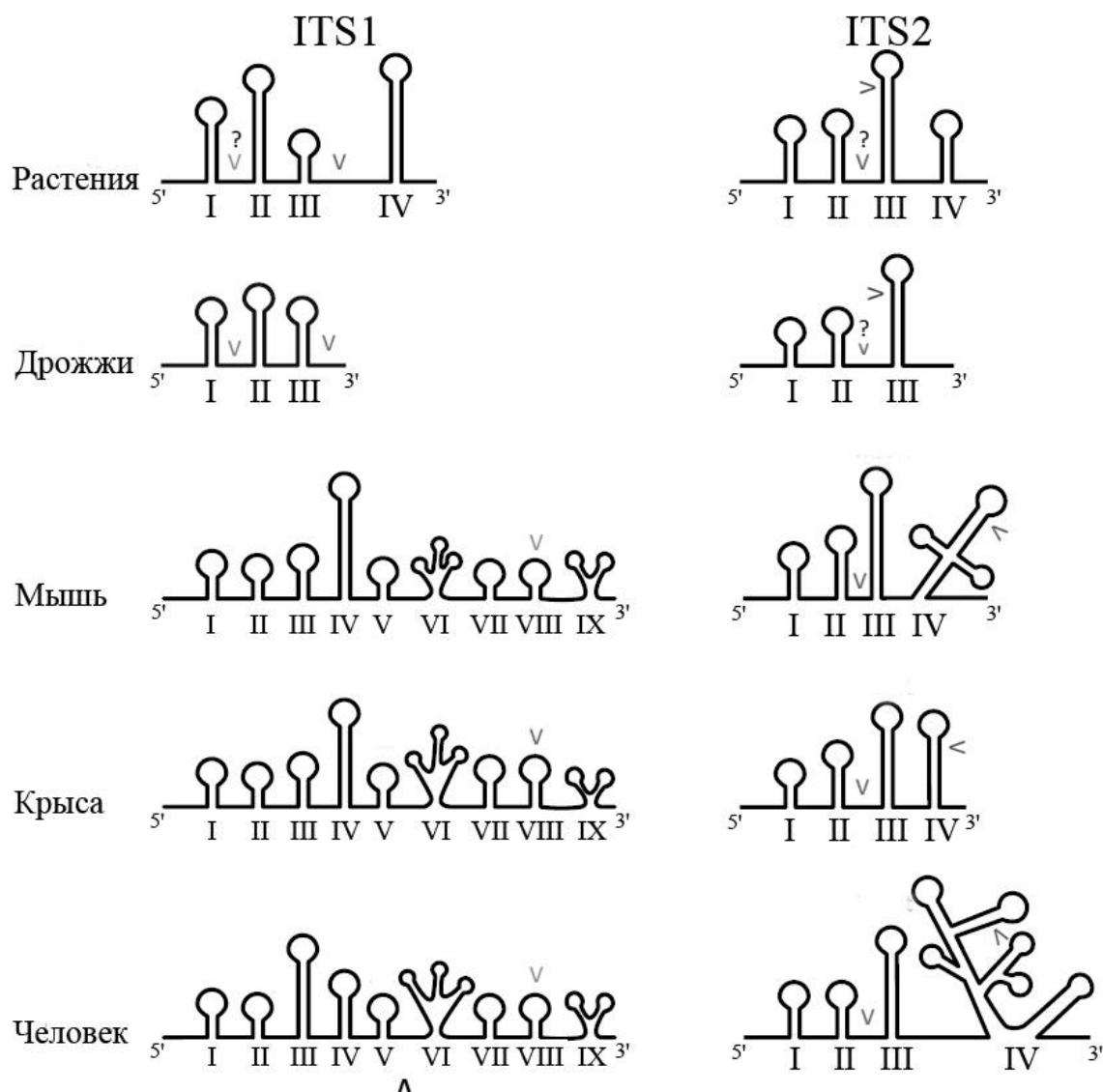


Рисунок 7 – Обобщенные вторичные структуры внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1 и ITS2 растений, дрожжей и позвоночных (по: Coleman, 2015, с изменениями). Галочки обозначают сайты рестрикции. Знаком вопроса отмечены предполагаемые сайты рестрикции, существование которых еще не было доказано экспериментально.

Спейсер ITS1 позвоночных отличается от такового у других организмов. У млекопитающих он имеет девять спиралей, некоторые из которых являются разветвленными. Кроме того, отсутствует СА-богатый одноцепочечный участок. Отличительная особенность ITS1 птиц и млекопитающих заключается в практически идентичной (с разницей лишь в один нуклеотид) последовательности длиной 15 нт на 3'-стороне короткой спирали V.

Говоря о моделировании ITS региона рДНК, можно отметить, что в филогенетических исследованиях структурное моделирование ITS2 больше распространено, чем ITS1 (Coleman, 2003). Это обусловлено тем, что спейсер ITS2 более консервативен, поэтому считается, что он играет более важную роль в биогенезе рибосом (Coleman, 2015).

Наиболее распространенная структура спейсера ITS2 растений включает четыре спиральных участка (Coleman, 2007): спирали I и II, затем консервативная одноцепочечная область богатая пуринами, относительно длинная и иногда разветвленная спираль III, и, как правило, короткая вариабельная спираль IV. Выделяются два высококонсервативных мотива: спираль II имеет у основания пиримидин-пиримидиновую петлю (выпуклость), спираль III включает консервативный UGGU мотив на 5'-стороне вблизи вершины. Дрожжи являются исключением, так как их короткий ITS2 не образует спираль IV (Рис. 7).

Увеличение длины ITS2 позвоночных сопровождалось усложнением вторичной структуры (Coleman, 2015): стандартные спирали I и II по-прежнему узнаваемы, спираль III часто разветвлена и имеет высококонсервативную последовательность на 5'-стороне вблизи вершины, спираль IV.

Но и для вариабельного спейсера ITS1 в настоящее время разработано несколько достоверных моделей вторичной структуры (van Nues et al., 1994; Schilthuizen et al., 1995; Coleman et al., 1998; Coleman, 2015; Рис. 7) и установлены высококонсервативные участки. Так Liu и Schardl (1994) идентифицировали высококонсервативную область 20 пн (GGCRY-[4-7N]-GYGYCAAGGAA, где Y=C/U, R=G/A, N – любой нуклеотид) в смоделированной ими вторичной структуре ITS1 покрытосемянных растений. Информация о других консервативных мотивах в пределах структуры ITS1 на данный момент отсутствует.

С развитием компьютерных технологий моделирование структур макромолекул становится все более доступным, поэтому использование данного метода в филогенетических исследованиях только набирает обороты.

1.7. Компенсаторные и полукompенсаторные мутации

Наличие устойчивой и функционально важной вторичной структуры РНК может быть установлено сравнением гомологичных участков у различных организмов и проведением поиска мутирующих нуклеотидов, которые поддерживают спаренность оснований в двухцепочечных участках РНК, указывая, таким образом, на присутствие внутримолекулярных спиралей (Gutell et al., 1994; Mai, Coleman, 1997). Спаренность оснований в спиральных РНК может поддерживаться двумя эволюционными процессами: двухсторонними и односторонними заменами. Замене, произошедшей с одной стороны спирали (например, G→C), которая нарушает спаренность нуклеотидов, может быть дана компенсация для сохранения этой спаренности при замене нуклеотида на противоположной стороне спирали (то есть C→G; Рис. 8). Двухстороннюю замену (например, C–G→G–C) называют компенсаторной заменой оснований (Compensatory Base Change, CBC; Gutell et al., 1994). Кимура (Kimura, 1985) определяет компенсаторные мутации как пара мутаций в различных сайтах, которые являются индивидуально вредными, но нейтральны в соответствующей комбинации. Компенсаторные мутации можно рассматривать как своеобразный механизм репарации нарушений вторичной структуры, обеспечивающий сохранение функционально-активных РНК (Hancock et al., 1988).

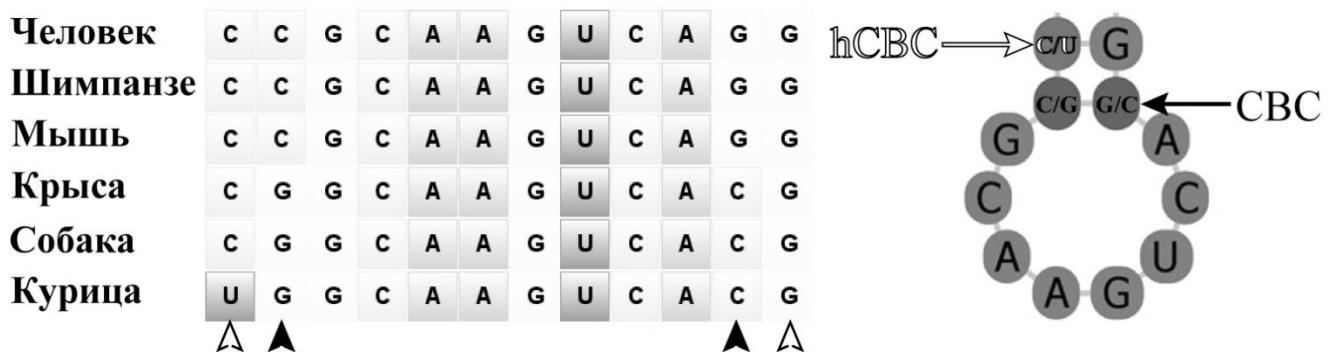


Рисунок 8 – Примеры компенсаторных и полукompенсаторных замен оснований (по: Еникеев, 2014, с изменениями). Стрелками указаны взаимодействующие друг с другом нуклеотиды: белые показывают полукompенсаторную замену основания (hCBC), черные – компенсаторную замену (CBC). Несмотря на эти замены, конфигурация вторичной структуры сохраняется (справа).

Существование неканонической пары (G–U), которая термодинамически устойчива в молекулах РНК, дает возможность происходить односторонним заменам, сохраняющим спаренность нуклеотидов в двухцепочечной спирали. Такие мутации названы полукompенсаторными заменами оснований (hemi-Compensatory Base Change, hCBC; например, G–C→G–U; Рис. 8).

Информация о вторичной структуре спейсера ITS2 также может быть использована для предсказания способности организмов к скрещиванию, иными словами для разграничения видов. Данный подход, предложенный Coleman (Coleman, 2000, 2009), состоит в сравнении вторичных структур ITS2 близкородственных организмов, рассматривая только компенсаторные замены в спиральных ITS2. В её исследовании количество компенсаторных замен оснований в консервативных спиральных II и III спейсера ITS2 коррелировало со способностью организмов к скрещиванию. Однако компенсаторные замены в менее консервативных областях, например в спиральных I и IV, как и полукompенсаторные замены в консервативных доменах, не влияли на способность к скрещиванию. В то же время в исследованиях ITS региона зеленых водорослей (Caisová et al., 2011) подход Coleman оказался неприменим.

1.8. Ген *matK* и его применение в филогенетических исследованиях

Однокопийный ген хлоропластного генома *matK* (Рис. 9) расположен в интроне гена лизиновой тРНК (*trnK_{UUU}*; Sugita et al., 1985) и кодирует фермент матуразу, участвующую в сплайсинге и фолдинге интронов (Saldanha et al., 1993; Vogel et al., 1997). Открытая рамка считывания *matK* у большинства покрытосемянных растений составляет приблизительно 1500 пн, что соответствует 500 аминокислотам (Hilu et al., 1999).

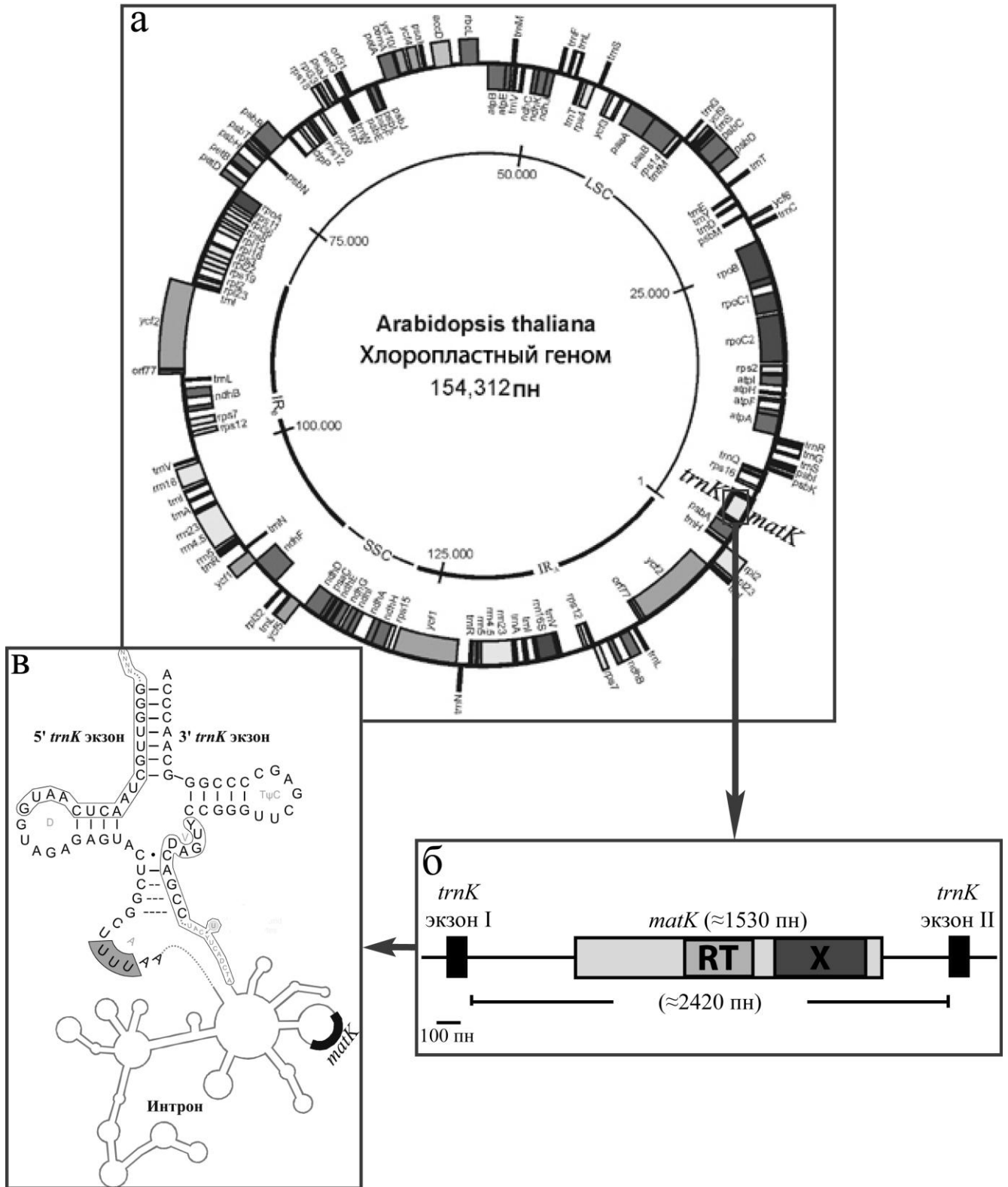


Рисунок 9 – Положение и структура гена *matK*. Обозначения: а – хлоропластный геном *Arabidopsis thaliana* (по: Sato et al., 1999); б – схема строения гена *matK* (по: Young, deRampolis, 2000); RT – область обратной транскриптазы; X – домен X; в – вторичная структура транскрипта гена *trnK* и его интронной области с экзоном гена *matK* в ней (по: Wicke, Quandt, 2009).

В анализе последовательностей *matK* были обнаружены типичные области для большинства матураз (Рис. 9): обратно-транскриптазный домен (RT; укорочен в *matK*), вероятно унаследованный от ретротранспозонов, и консервативный домен X – примерно 448 пн, с помощью которого фермент осуществляет свою матуразную функцию (Mohr et al., 1993). Механизм работы белкового продукта гена *matK* остается слабо изученным, однако исследователи предполагают, что он подобен работе матураз интронов группы II. Важно отметить, что *matK* – единственный ген в хлоропластном геноме высших растений, который содержит матуразную область (Neuhaus, Link, 1987). Исследование белого ячменя (мутант по хлоропластным рибосомам) показало, что часть интронов может процессироваться матуразами, закодированными в ядерном геноме, но существуют, по крайней мере, 16 интронов группы II, находящихся в 15 хлоропластных генах (Kohchi et al., 1988; Ems et al., 1995; Vogel et al., 1997), которым для сплайсинга необходима хлоропластная матураза.

Экспрессия и функциональные возможности гена *matK* в хлоропластном геноме долгое время оставались под вопросом. Высказывались предположения, что *matK* может быть псевдогеном (Kores et al., 2000; Whitten et al., 2000; Goldman et al., 2001), так как наличие инделей, высокая частота замен и преждевременные стоп-кодона, встречающиеся в *matK* некоторых семейств растений (Kores et al., 2000), ставят вопрос о том, сохраняет ли ген с этими особенностями необходимую структуру белка и его функцию. Однако было отмечено, что чаще всего в гене происходят нейтральные замены, почти не влияющие на аминокислотную последовательность белка. Кроме того, длины большинства инделей, обнаруженных в *matK*, были кратны трём, что сохраняло рамку считывания (Hilu, Liang, 1997; Whitten et al., 2000; Hilu et al., 2003). Также функциональную значимость данной матуразы подтверждает тот факт, что ген *matK* был найден в остаточном хлоропластном геноме паразитического растения *Epifagus virginiana*, утратившего более 60 процентов хлоропластных генов, главным образом, участвующих в фото-

синтезе (Ems et al., 1995). Вероятно, ген *matK* имеет некоторые существенные митохондриальные функции, которые не были заменены ядерным геномом.

Темп эволюции *matK* отличен от других хлоропластных генов. Было установлено, что замены нуклеотидов в этом гене происходят в три раза чаще, чем в большой субъединице 1,5-бифосфаткарбоксилазы/оксигеназы (*rbcL*; Johnson, Soltis, 1994; Olmstead, Palmer, 1994). Это определяет *matK* как быстро эволюционирующий ген. Из-за этого свойства *matK* стал использоваться в качестве молекулярного маркера для определения филогенетических отношений во многих группах растений (Hilu et al., 2003), включая Saxifragaceae (Johnson, Soltis, 1994), Orchidaceae Juss. (Kores et al., 2000; Whitten et al., 2000; Goldman et al., 2001), Asteridae Cronquist (Bremer et al., 2002). Благодаря высокой скорости накопления нуклеотидных замен, филогенетические реконструкции, основанные на последовательностях гена *matK*, часто более правдоподобны, чем таковые, основанные на совместном использовании в анализах нескольких генов (Hilu, Liang, 1997; Hilu et al., 2003).

Совместное использование последовательностей ITS региона рДНК и гена *matK* хпДНК, благодаря описанным выше преимуществам каждого из маркеров, позволяет уточнить филогенетические отношения в таксономически сложных группах растений и решить спорные вопросы систематики.

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. Растения были любезно предоставлены коллекционерами Ray Stephenson, Marko Doboš и Milan Hornát или собраны в природе Андреем Анатольевичем Гончаровым. 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.

Номенклатура таксонов соответствует 't Hart и Bleij (2005). Список видов растений, анализируемых в данном исследовании, и номера доступа баз данных EMBL/GenBank приведены в приложении.

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 (ITS1–5.8S–ITS2), использовали универсальные праймеры: 1400F и ITS055R (Табл. 1) для первого раунда амплификации и внутренние праймеры 18Sm10 и ITS4R для второго раунда (если это было необходимо).

Таблица 1 – Праймеры для амплификации и циклического секвенирования

Участок ДНК	Праймер	Последовательность (5'→3')	Ориентация	Ссылка
ITS1– 5.8S– ITS2	1400F	CTGCCCTTTGTACACACCGCCC GTC	Прямой	Elwood et al., 1985
	ITS055R	CTCCTTGGTCCCGTGTTC AAGA CGGG	Обратный	Marin et al., 2003
	18Sm10	AGGAGAAGTCGTAACAAGG	Прямой	Wen, Zimmer, 1996
	ITS4R	TCCTCCGCTTATTGATATGC	Обратный	White et al., 1990
<i>matK</i>	LAM_F	TCATAATTTACGATCAATYC	Прямой	Dunning, Savolainen, 2010
	3F_KIM	GTACAGTACTTTTGTGTTTACG AG	Обратный	Dunning, Savolainen, 2010
	SAX_F1	TCATAATTTACGATCAATTCA	Прямой	Dunning, Savolainen, 2010
	3F_KIMm	CGTACAGTACTTTTGTGTTTAC G	Обратный	Dunning, Savolainen, 2010

Ген *matK* амплифицировали, используя две пары праймеров: LAM_F и 3F_KIM (Табл. 1) для первого раунда амплификации и SAX_F1 с 3F_KIMm для второго раунда (Рис. 10).

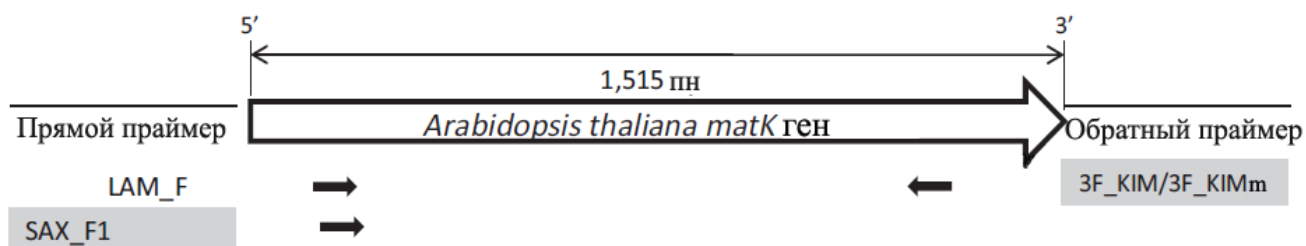


Рисунок 10 – Схема посадки используемых праймеров на гене *matK* *Arabidopsis thaliana* (L.) Heunh. (по: Dunning, Savolainen, 2010, с изменениями).

Амплификацию проводили в термоциклере «XP Cycler (TC-XP)» (Bioer Technology Co., Ltd., Zhejiang, China). Параметры проведения ПЦР приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Параметры проведения ПЦР

Этапы ПЦР	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
Предварительный нагрев	95	5 мин	1
Денатурация	95	30 сек	35
Отжиг праймеров	55 (48 для <i>matK</i>)	30 сек	
Элонгация цепи	72	60 сек	
Окончательная достройка цепи ДНК	72	5 мин	1

Состав реакционной смеси для ПЦР общим объемом 15 мкл на один амплифицируемый образец ДНК приведен в таблице 3.

Таблица 3 – Состав реакционной смеси для ПЦР

Компонент	Объем
Стерильная бидистиллированная (деионизированная) вода	10,5 мкл
10× <i>Taq</i> -буфер (Fermentas, Литва, Вильнюс)	1,5 мкл
MgCl ₂ (25 мМ)	1,2 мкл
dNTPs (10 мМ) (дезоксинуклеотидтрифосфаты)	0,4 мкл
Праймер прямой (20 мМ)	0,05 мкл
Праймер обратный (20 мМ)	0,05 мкл
ДНК-матрица	1 мкл
<i>Taq</i> -полимераза (5 единиц активности/1 мкл)	0,17 мкл

2.4. Электрофорез ДНК

Определение размера продуктов ПЦР проводили методом электрофореза с использованием маркера молекулярного веса (100+ bp DNA Ladder, Евроген, Россия) в 1%-ном агарозном геле с бромистым этидием (0,3 мкл/1мл) в 1× TBE буфере (1× трис-боратный буфер: 89 мМ трис-борат, 89 мМ борная кислота, 2 мМ ЭД-

ТА, рН 8.0) при напряжении 120 Вольт в течение 20 минут. После проведения электрофореза гель фотографировали в проходящем УФ-свете, используя систему визуализации (Gel Doc XR, Bio-Rad Inc., UK).

2.5. Секвенирование ДНК

2.5.1. Реакция циклического секвенирования

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* (Табл. 1). Состав реакционной смеси и параметры для циклического секвенирования приведены в таблицах 4 и 5.

Таблица 4 – Состав реакционной смеси для циклического секвенирования

Компонент	Объем
Стерильная бидистиллированная (деионизированная) вода	6,2 мкл
Смесь Big Dye	1,3 мкл
Праймер прямой или обратный (1 мМ)	2 мкл
ПЦР-продукт	2 мкл
Общий объем смеси	11,5 мкл

Таблица 5 – Параметры проведения ПЦР при циклическом секвенировании

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

2.5.2. Очистка продуктов реакции циклического секвенирования

Очистку продуктов реакции циклического секвенирования проводили по описанной ниже схеме:

1. В пробирку после реакции добавляли 7,6 мкл очищенной H_2O , 2 мкл ацетата натрия (3М), 38,4 мкл этанола (95%).
2. Инкубировали образцы 20 минут при комнатной температуре.
3. Центрифугировали образцы в течение 20 минут при 14000 об./мин.
4. Удаляли образующийся супернатант.
5. Добавляли 150 мкл этанола (75%).
6. Центрифугировали образцы в течение 10 минут при 14000 об./мин.
7. Удаляли образующийся супернатант.
8. Подсушивали образцы в течение 3 минут при 50 °С и 1 минуту при 90 °С.
9. Перед секвенированием к сухому остатку добавляли 13 мкл формамида Ni-Di™.
10. Денатурировали ДНК при 95 °С в течение 5 минут с последующим охлаждением.

2.5.3. Определение нуклеотидных последовательностей

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) с параметрами, заданными по умолчанию.

Данный сервер моделирует процесс фолдинга вторичной структуры РНК на основе минимизации свободной энергии молекулы. При моделировании учитывалась схожесть структур для близких таксонов. Для оценки правдоподобности разработанных моделей, были проанализированы компенсаторные (CBC) и полукомпенсаторные (hCBC) замены оснований в спиральных участках ITS1 и ITS2.

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). Выравнивание ITS региона проводилось с учетом консервативных элементов первичной и вторичной структуры (Mai, Coleman, 1997; Goertzen et al., 2003; Gontcharova, Gontcharov, 2004; Kozyrenko et al., 2013).

2.8. Филогенетический анализ

Филогенетические деревья строили методом ML в программе RAUP 4.0b10 (Swofford, 2002), а также BI, используя программу MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck, Ronquist, 2001).

Подбор модели эволюции для нуклеотидных последовательностей ITS региона рДНК и гена *matK* хпДНК проводили с помощью программы jModelTest 2.1.1 (Darriba et al., 2012) с использованием трёх критериев: информационного критерия Акаике (Akaike information criterion, AIC; Akaike, 1974), байесовского информационного критерия (Bayesian information criterion, BIC; Schwarz, 1978) и выбора модели эволюции на основании теории принятия решений (decision theory performance-based selection, DT; Minin et al., 2003).

Отсутствие противоречий между филогенетическими сигналами двух маркеров (ITS регион и ген *matK*) оценивали в программе RAUP 4.0b10 с помощью опции Partition Homogeneity Test (PHT) с использованием 100 реплик.

Для ML анализа использовали эвристический поиск оптимальной топологии с алгоритмом TBR (tree bisection-reconnection). При BI-анализе матрицы последовательностей ITS региона (223 последовательности) создавали 10 миллионов генераций цепей Маркова, отбирая пробы каждые 1000 генераций, т.е. 10000 проб. При анализе матрицы гена *matK* (102 последовательности) создавали 70 миллионов генераций цепей Маркова, отбирая пробы каждые 1000 генераций, т.е. 70,000 проб. Для анализа совмещенной матрицы данных ITS региона и гена *matK* (75 последовательностей) создавали 10 миллионов генераций цепей Маркова, отбирая пробы каждые 1000 генераций, т.е. 10000 проб. Первые 25% проб (до выхода значений $-\ln L$ на плато) исключались из анализа как "burn-in". 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. Значения BP менее 50% и PP менее 0.95 не рассматривались и не были указаны на рисунках.

Характеристики последовательностей (длина, содержание ГЦ-оснований) были получены в программе RAUP 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

Для изучения филогенетических отношений представителей *Sedum* и близких родов нами были получены хроматограммы последовательностей ITS региона рДНК и гена *matK* хпДНК, которые были хорошо читаемыми по всей длине без двойных пиков.

В общей сложности для анализов было выбрано 248 последовательностей ITS региона и 160 последовательностей гена *matK* представителей 15 родов толстянковых (полученные нами и взятые из базы данных). После удаления идентичных (критерием отбора служило присутствие двух и более нуклеотидных отличий) и неполных последовательностей, их число сократилось до 223 для ITS региона (85 получено в данном исследовании и 138 из GenBank) и 102 для *matK* (44 получено в данном исследовании и 58 из базы GenBank).

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 гуанина+цитозина (ГЦ-оснований) было в пределах 47–61% (в среднем $56,0 \pm 3,3\%$). Как иллюстрируют диаграммы на рисунке 11, длина и содержание ГЦ-оснований в анализируемых последовательностях ITS1 и ITS2 сильно варьировали.

Средняя длина спейсера ITS1 была 225 ± 6 пн ($56,3 \pm 4,4\%$ ГЦ), однако, у некоторых образцов (*Aeonium undulatum* Webb & Berthelot, *Aichryson palmense* Webb ex Bolle, *Dudleya* spp., *Graptopetalum fruticosum* Moran, *Monanthes* spp., *S. debile* S.Watson, *S. jaccardianum* Maire & Wilczek, *S. modestum* Ball, *S. moranense* Kunth и *S. surculosum* var. *luteum* (Emberger) Maire) она была меньше, и составляла в среднем 208 ± 2 пн.

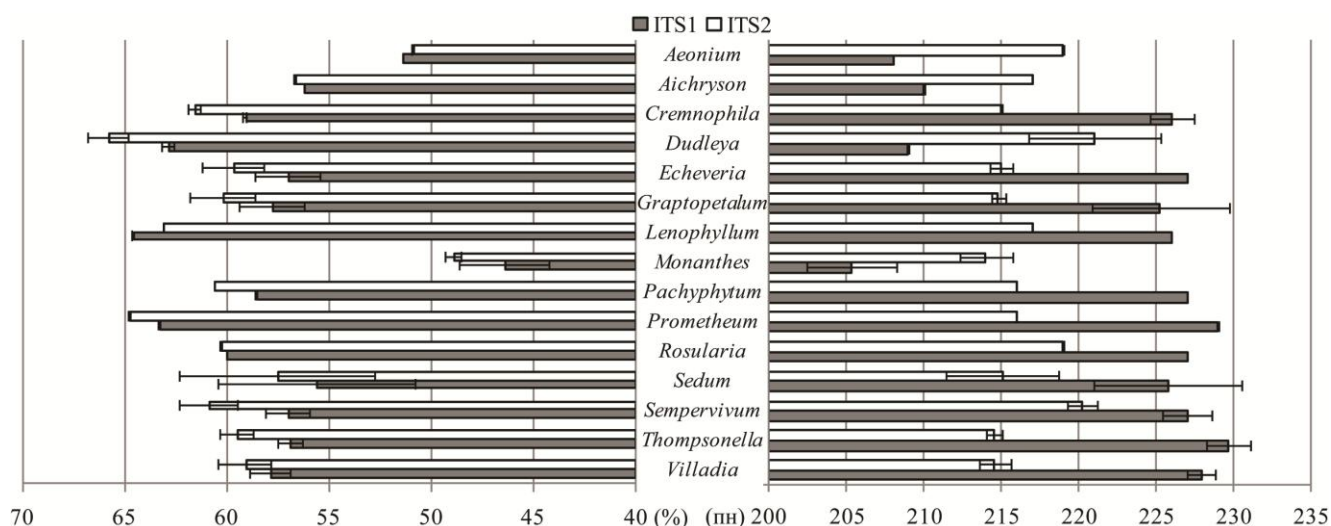


Рисунок 11 – Соотношение длин (справа) и содержания ГЦ-оснований (слева) последовательностей участков ITS1 и ITS2 в анализируемых родах толстянковых.

Экзон 5.8S рДНК был высококонсервативен по длине и имел протяженность 161 пн, за исключением образца *Aichryson palmense* (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* и в среднем составляла 215 ± 3 пн ($58.4 \pm 4.5\%$ ГЦ).

Анализ распределения нуклеотидных замен (Рис. 12) показал, что 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. Данный метод широко применялся многими исследователями (Grajales et al., 2007; Keller et al., 2010; Letsch et al., 2010; Wolf, 2015; Zhang et al., 2015).

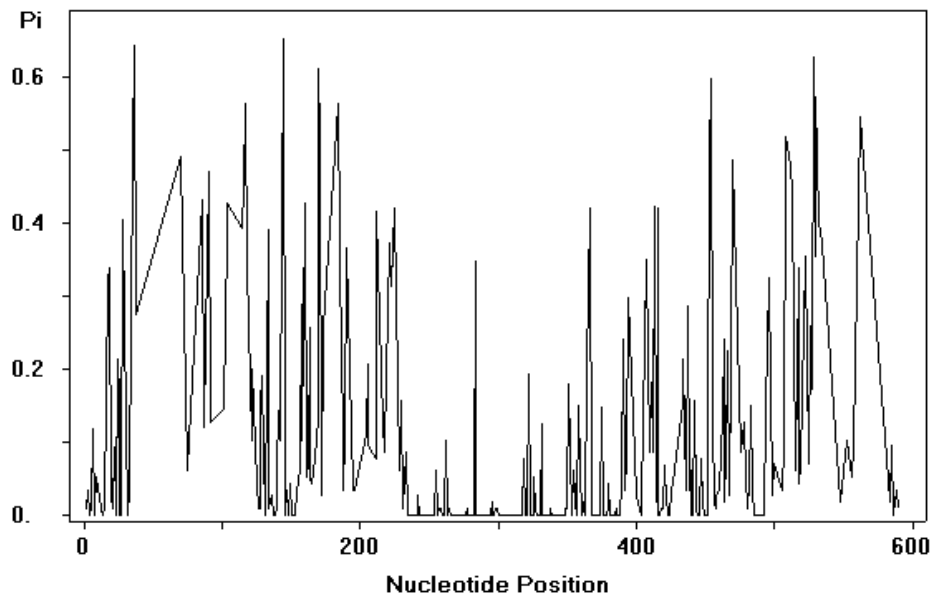


Рисунок 12 – Распределение нуклеотидных замен (Pi) в матрице данных ITS региона (223 последовательности).

3.2. Вторичная структура спейсеров ITS1 и ITS2

Используя алгоритмы, основанные на термодинамическом фолдинге (Mfold Web Server), нами были разработаны гипотетические модели вторичной структуры транскриптов ITS1 и ITS2 для всех исследуемых последовательностей.

Как правило, сервер Mfold предлагает несколько вариантов фолдинга (вторичных структур) для одной последовательности, лишь незначительно отличающихся друг от друга величиной свободной энергии. При выборе оптимального варианта структуры для конкретной последовательности, мы руководствовались следующими правилами: 1) модели транскриптов спейсеров ITS1 и ITS2 близкородственных видов должны иметь сходные структурные элементы; 2) присутствие компенсаторных и полукompенсаторных замен в спиральях ITS1 и ITS2 отражает важность сохранения элементов вторичной структуры, даже при мутациях. Такие замены были обнаружены в каждой спирали ITS1 и ITS2 (Рис. 13), что подтверждает устойчивость построенных нами гипотетических моделей вторичной структуры транскриптов.

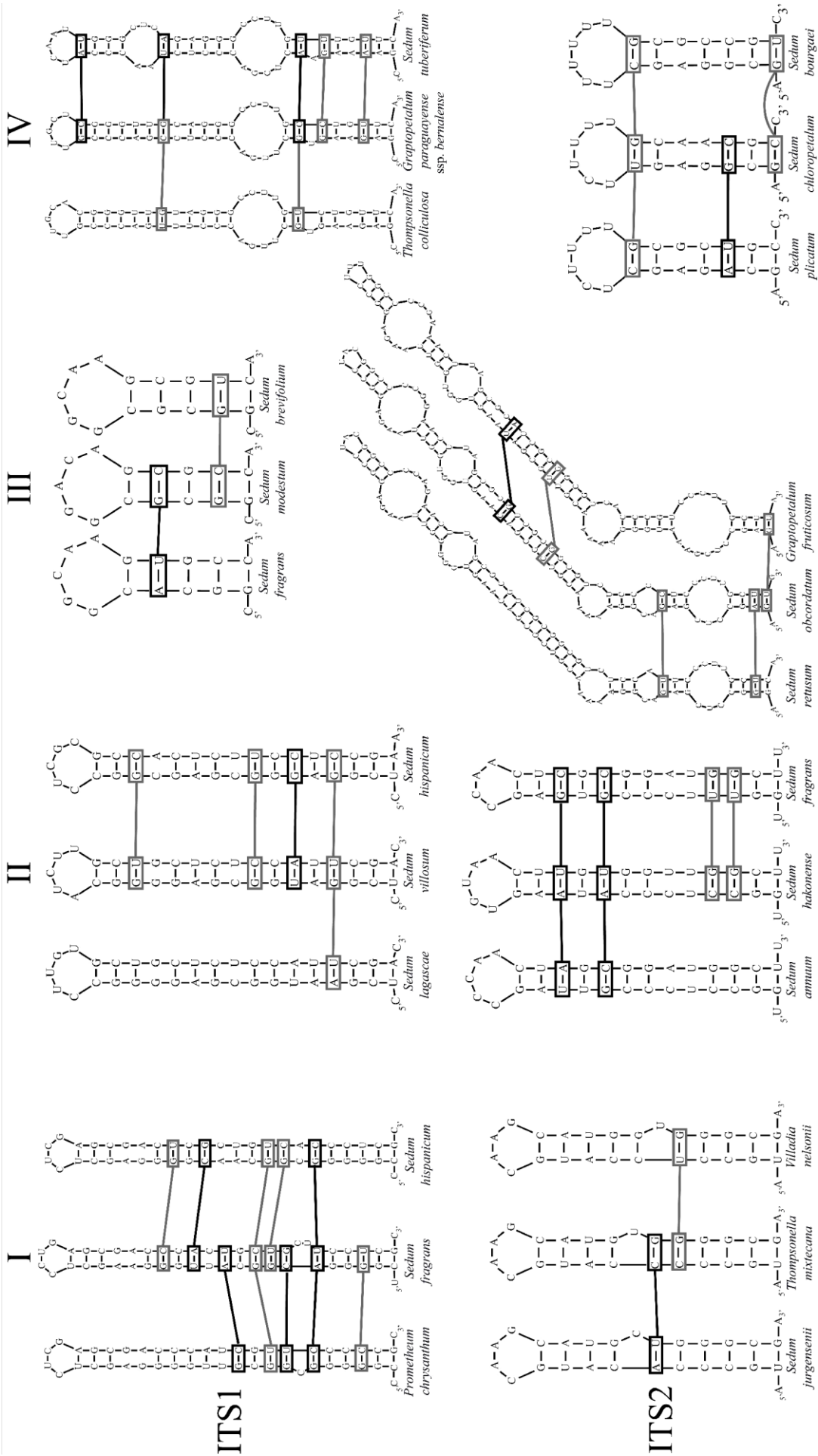


Рисунок 13 – Компенсаторные (отмечены черным) и полукompенсаторные (отмечены серым) замены оснований в спиралях ITS.

На рисунке 14 показаны полученные нами вторичные структуры спейсеров ITS1 и ITS2 для *Sedum acre* L. – типового вида рода. Согласно разработанным моделям, каждый спейсер характеризовался наличием 4 спиральных и 5 одноцепочечных участков. В ITS1 спирали были относительно короткими, и в общей сложности не более 65% нуклеотидов спейсера участвовали в их формировании. В спиральных участках наблюдалось более высокое содержание ГЦ-оснований (в среднем 66%), по сравнению с одноцепочечными участками (в среднем 36%). Это обусловлено тем, что гуанин и цитозин образуют между собой более стабильные три водородные связи, в отличие от других нуклеотидов, и именно поэтому гуанин-цитозиновые пары участвуют в стабилизации функционально важных спиралей вторичной структуры. Нуклеотиды, консервативные у 90% последовательностей, составляли не более 43% в ITS1 и 56% в ITS2 от их общего числа.

В ITS1 перед первой спиралью находилась одноцепочечная последовательность (Рис. 14) длиной от 35 нт у *M. minima* до 48 нт для *S. trullipetalum* Hooker fil. & Thompson (в описании вторичной структуры транскриптов мы используем сокращение «нт» – нуклеотидов, обращая внимание на то, что данная структура свойственна одноцепочечной молекуле РНК). Среднее содержание ГЦ-оснований в ней было $44,6 \pm 3,8\%$. Большая часть этого участка была высококонсервативна.

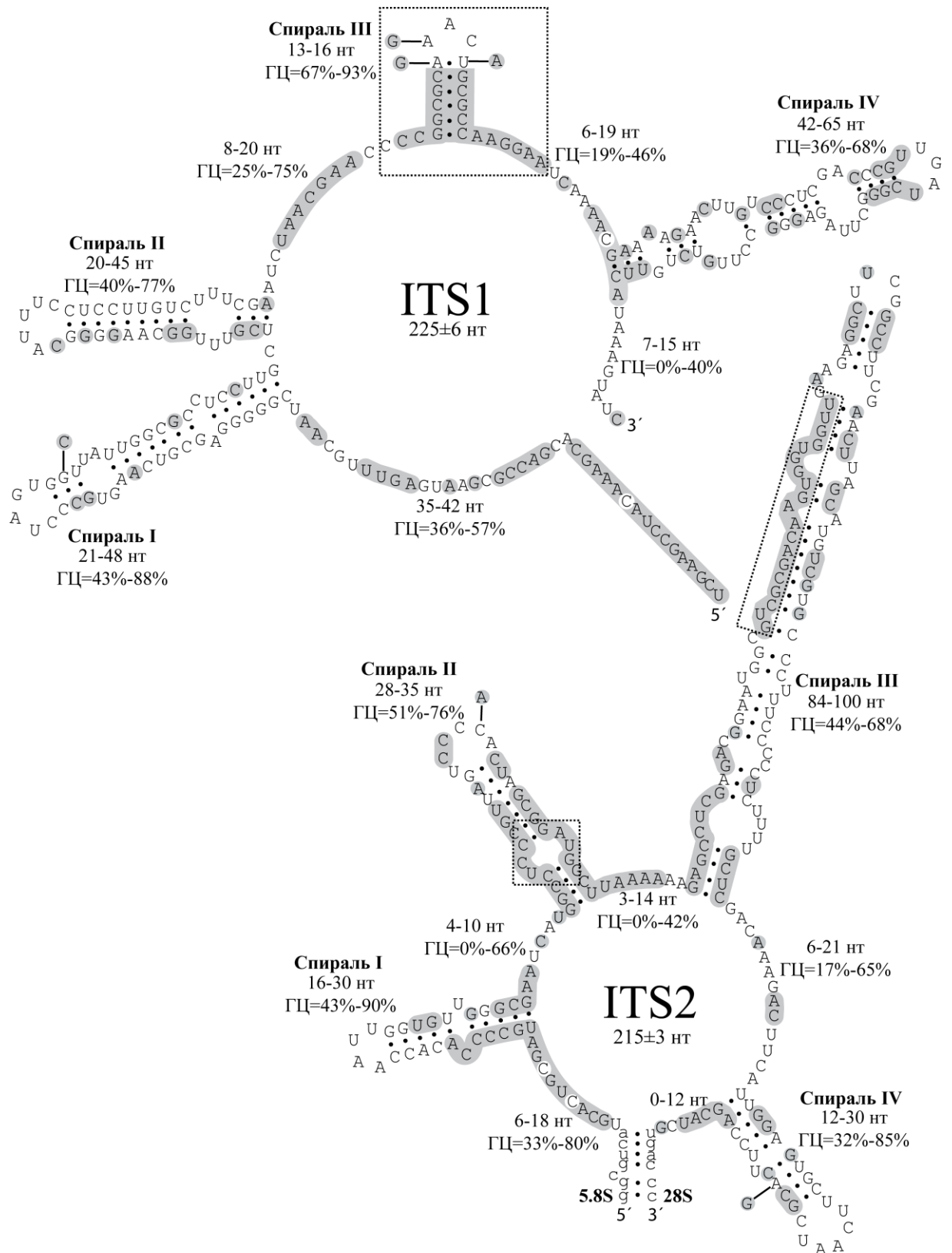


Рисунок 14 – Вторичная структура ITS1 и ITS2 *S. acre*. Серым отмечены нуклеотиды, консервативные у 90% последовательностей. В выносках находятся нуклеотиды, консервативные у 90% последовательностей, но отличные у *S. acre*. Рамками отмечены наиболее консервативные регионы вторичной структуры. Также указаны вариации в длине и содержании ГЦ-оснований для каждого домена.

Первая спираль ITS1, как правило, включала 38–48 нт и имела две-три боковых петли (1–3 нт), при этом точечные мутации и индели часто меняли их расположение даже между близкородственными видами (Рис. 15а). Похожую ситуацию можно наблюдать и в других спиральных ITS региона (Рис. 15б).

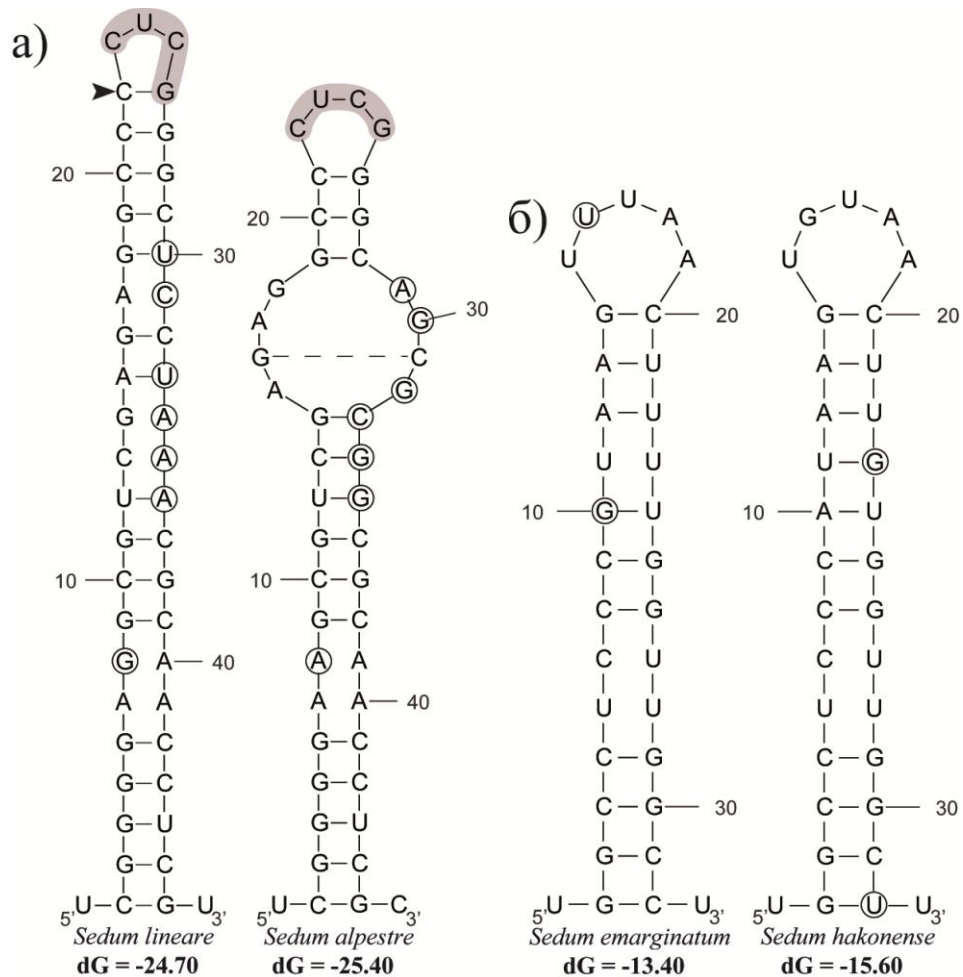


Рисунок 15 – Примеры мутаций, сохраняющих или изменяющих вторичную структуру спиралей близкородственных видов *Sedum*: а – спираль I в ITS1; б – спираль II в ITS2. Стрелкой показана вставка. Замены нуклеотидов обведены окружностями. Гомологичные нуклеотиды вершинной петли отмечены серым цветом.

Спираль I была самой вариабельной частью ITS1 и, следовательно, наиболее трудно выравниваемой. Среднее содержание ГЦ-оснований было $72,6 \pm 9,9\%$. У представителей макаронезийских родов *Aeonium*, *Aichryson*, *Monanthes* и нескольких североафриканских видов *Sedum* наблюдалось заметное укорочение данной спирали (21–25 нт против 38–48 нт у других таксонов; Рис. 16).

Анализ вторичной структуры ITS1 свидетельствует о несколько альтернативном сценарии эволюции ITS региона у данных образцов (Рис. 17а). Несмотря на результаты моделирования спирали I, гомология сегментов между укороченными и неукороченными вариантами осталась несколько сомнительной.

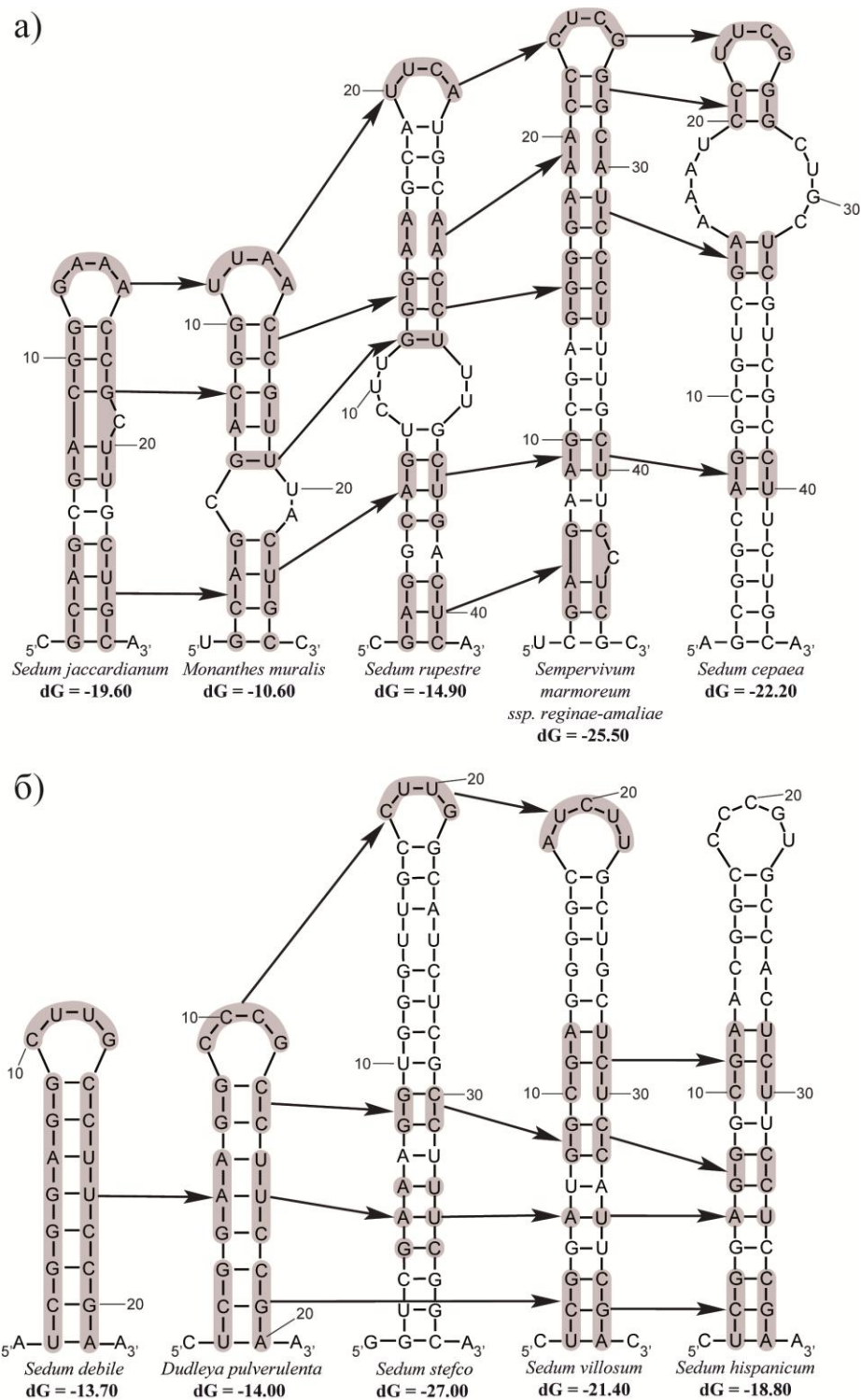


Рисунок 17 – Сравнение укороченных и неукороченных вариантов спиралей спейсера ITS1: а – спираль I; б – спираль II. Серым цветом и стрелками показаны предполагаемые гомологичные сегменты спиралей.

Участок между первой и второй спиралью включал 1–6 нт, либо вовсе отсутствовал (*S. serapea* L., *S. bergeri* Hamet). Вторая спираль у большинства последовательностей ITS1 состояла из 33–38 нт (Рис. 14), однако у видов рода *Dudleya* и нескольких американских видов *Sedum* (*S. debile*, *S. oreganum* Nuttall, *S. spathulifolium* Hooker и *S. ternatum* Michaux) она была укорочена и включала 20–23 нт (Рис. 16, 17б). Разработанные нами модели дают основания полагать, что упомянутые таксоны потеряли центральную часть спирали (от пяти до семи пар нуклеотидов), но, вероятно, сохранили вершинную петлю (Рис. 17б). Содержание ГЦ-оснований в этом участке было выше среднего $62,3 \pm 8,5\%$. Хотя эту спираль с легкостью можно было определить во всех последовательностях, её первичная структура была достаточно вариабельной. Участок между второй и третьей спиралью включал 8–20 нт и характеризовался относительно низким содержанием ГЦ ($42,7 \pm 8,6\%$) и относительно высокой консервативностью. Третья спираль ITS1 являлась самой короткой из всех в ITS1 и ITS2. Кроме того, она была практически неизменна по числу нуклеотидов в её составе (15 нт) и консервативна по первичной последовательности. Только у нескольких образцов (*Aeonium undulatum*, *S. trichromum* R.T. Clausen и *Thompsonella xochipalensis* Gual, Peralta & Pérez-Calix) гомопластическая замена G→A нарушала формирование базальной пары, поэтому спираль у них включала 13 нт. У двух видов (*S. moranense* и *S. uniflorum* ssp. *oryzifolium* (Makino) H. Ohba) вставка одного основания удлиняла вершинную петлю. Третья спираль характеризовалась высоким содержанием ГЦ-оснований ($82,6 \pm 5,2\%$). Одноцепочечный участок между третьей и четвертой спиралью был длиной от 6 нт у образцов *S. apoleipon* 't Hart, *S. subtile* Miquel, до 19 нт у *S. oreades* (Decaisne) Hamet. Он был насыщен аденином и урацилом, поэтому содержание ГЦ в нем не превышало 40%. Достаточно консервативный домен, включающий спираль III и окружающие его одноцепочечные участки, соответствует универсальному мотиву покрытосеменных растений (Angiosperm Universal Core motif; Liu, Schardl, 1994). Данный участок использовался нами в качестве ориентира для выравнивания последовательностей ITS1. Остальные участки ITS1 были

весьма переменчивы в первичной и вторичной структуре. Четвертая спираль ITS1 включала от 42 нт у *S. palmeri* S. Watson до 65 нт у образцов *S. apoleipon* и *S. subtile* при среднем содержании ГЦ-оснований $56,6 \pm 6,9\%$. Заключительный одноцепочечный участок ITS1, перед экзоном 5.8S рДНК, был длиной 7–15 нт с заметно низким содержанием ГЦ ($17 \pm 7\%$).

В ITS2 доля вовлеченных в спираль 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. После высококонсервативного экзона 5.8S рДНК, перед первой спиралью ITS2 (Рис. 14), находился небольшой одноцепочечный участок длиной 6–18 нт, большинство нуклеотидов которого были консервативны. Среднее содержание ГЦ-оснований в этом участке $53,4 \pm 9,7\%$. Первая спираль ITS2 включала от 16 (*S. treleasei*) до 30 нт (*S. rupestre* L.). Среднее содержание ГЦ-оснований здесь было выше среднего – $67,6 \pm 6,9\%$. Характерной особенностью данной спирали являлся консервативный для покрытосеменных участок в основании с высоким содержанием гуанин-цитозиновых пар (2-6 нт; Hershkovitz, Zimmer, 1996). Вершинная петля и несколько пар возле неё характеризовались большой вариативностью. Одноцепочечная последовательность нуклеотидов между первой и второй спиралью была длиной 4–10 нт, и, как правило, была насыщена аденином и урацилом. Вторая спираль ITS2 являлась относительно консервативной по длине (28–35 нт) и по вторичной структуре. Содержание ГЦ-оснований в ней составляло $67,8 \pm 4,2\%$. 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). Также как и спираль I, спираль II характеризовалась вариативностью вершинной петли. Одноцепочечный участок между второй и третьей спиралью был длиной 3–14 нт. В нём располагался консервативный аденин-насыщенный мотив. Третья спираль ITS2 была самой длинной из всех спиралей спейсера ITS региона и включала от 84 нт у образца *Semp. ciliosum* Craib до 100 нт у *S. multicaule* Wallich ex Lindley. Содержание

ГЦ-оснований в ней было невелико – $59,3 \pm 5,1\%$. 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). Участок между третьей и четвертой спиралью был длиной от 6 до 21 нт и отличался низким содержанием ГЦ ($36,3 \pm 8,8\%$). Четвертая спираль ITS2 характеризовалась высокой вариабельностью первичной последовательности (от 12 нт у *S. multiceps* Cosson & Durand до 29 нт у образца *S. brevifolium* DC.) и, отсюда, вторичной структуры, что усложняло выравнивание. Консервативными здесь являлись меньше трети нуклеотидов, и среднее содержание ГЦ-оснований составляло $66,7 \pm 11,1\%$. Одноцепочечный участок после четвертой спирали, перед экзоном 28S рДНК, имел низкий процент содержания ГЦ-оснований и был в среднем 5 нт, однако у нескольких образцов он отсутствовал вовсе (*S. sexangulare* L., *S. liebmannianum* Hemsley).

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 в последовательностях было относительно низкое – в пределах 31–38% (в среднем $34,1 \pm 1\%$), что характерно для хлоропластных генов.

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

Все матрицы данных были проанализированы с помощью программы jModelTest 2.1.1 (Darriba et al., 2012) для подбора оптимальных моделей эволюции нуклеотидных последовательностей. Характеристики и параметры эволюционных моделей, предложенных при использовании критериев BIC, AIC и DT, представлены в таблице 6. Выбранные для анализа модели выделены жирным шрифтом, и дальнейшие характеристики в таблице даны только для них.

Таблица 6 – Модели эволюции нуклеотидных последовательностей, выбранные программой jModeltest для матриц данных, и их параметры

Матрицы данных	ITS 223	<i>matK</i> 102	<i>matK</i> 75	ITS 75	ITS+ <i>matK</i> 75
Модель (AIC/BIC/DT)	TPM2uf+I+G/ GTR+I+G/ GTR+I+G	TVM+G/ TVM+G/ TVM+G	TVM+G/ TVM+G/ TVM+G	SYM+I+G/ SYM+I+G SYM+I+G	GTR+I+G/ TIM1+I+G/ TIM1+I+G
-lnL	21824.3523	7864.1356	6758.9973	11832.1803	19279.2952
Частоты A/C/G/T	0.2452/ 0.2042/ 0.2290/ 0.3216	0.2912/0.1751/ 0.1618/0.3718	0.2928/0.1733/ 0.1659/0.3680	0.25/0.25/ 0.25/0.25	0.2648/0.2094/ 0.2085/0.3172
G↔T = 1.000					
A↔C	1.2372	1.6549	1.6125	0.9082	1.2506
A↔G	2.8209	1.7559	1.6264	1.9913	1.9046
A↔T	1.6520	0.3059	0.2421	1.7151	0.8292
C↔G	0.6651	1.0611	0.9908	0.3954	0.6498
C↔T	4.1626	1.7559	1.6264	3.5201	2.7328
Пропорция инвариабельных сайтов (I)	0.2430	–	–	0.2680	0.1800
Гамма параметр (gamma shape)	1.1460	0.9580	0.9490	1.0690	0.6060
Длина, пн	590	717	717	590	1307
Консервативные нт	161	293	319	203	523
MP-информативные нт	382	316	285	341	626
MP-неинформативные нт	47	108	113	46	158

Примечание: пн – пар нуклеотидов; MP-информативные нт – информативных нуклеотидов согласно методу максимальной экономии (парсимонии); MP-неинформативные нт – неинформативных нуклеотидов согласно методу максимальной экономии (парсимонии); наименования матриц даны по названию маркера и числу последовательностей.

Ранее было показано, что макаронезийские рода *Aeonium*, *Aichyson* и *Monanthes* занимают обособленное положение и формируют в филогенетических реконструкциях (на основании анализов морфологических признаков, рестрикционных фрагментов хпДНК, последовательностей ITS региона ядерной рДНК и спейсера *trnL-trnF* хпДНК) 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 в качестве внешней группы для наших анализов.

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 18 и 19. Исследуемые таксоны вошли в состав 3 основных клад (названия клад соответствуют первой молекулярной филогении семейства; van Ham, 1995): *Aeonium*, *Sempervivum*, *Acre*, и парафилетического кластера *Leucosedum* (кластером мы называем клады, установленные в исследованиях других авторов, но не получившие поддержки в наших анализах).

Клада *Sempervivum* (17 образцов) была поддержана (и то слабо, 50%) только в анализе методом ML (Рис. 18б). В составе этой клады выделяются две высокоустойчивые подклады: первая включала представителей рода *Sempervivum* (10 видов), вторая – членов *Sedum* ser. *Rupestria* (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*; Рис. 18б).

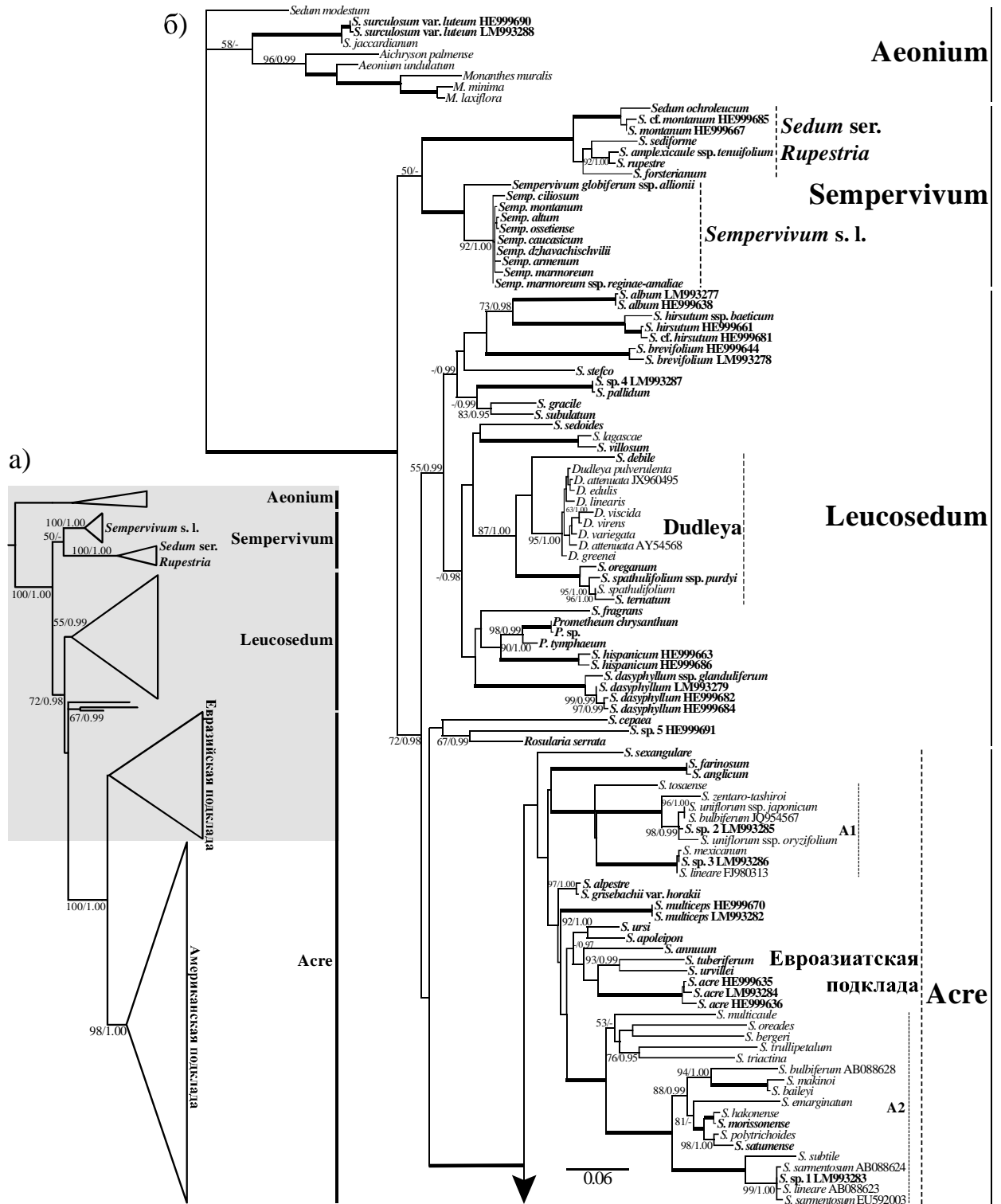


Рисунок 18 – Филогенетическое дерево триб Sedae, Semperviveae и Aeonieae основанное на сравнении 223 последовательностей ITS региона (590 пп) методом ML (модель GTR+I+G). Обозначения: а – схематичное изображение дерева; б – увеличенная часть дерева, включающая клады Aeonium, Sempervivum, кластер Leucosedum и Евроазиатскую подкладу клады Acre. 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.

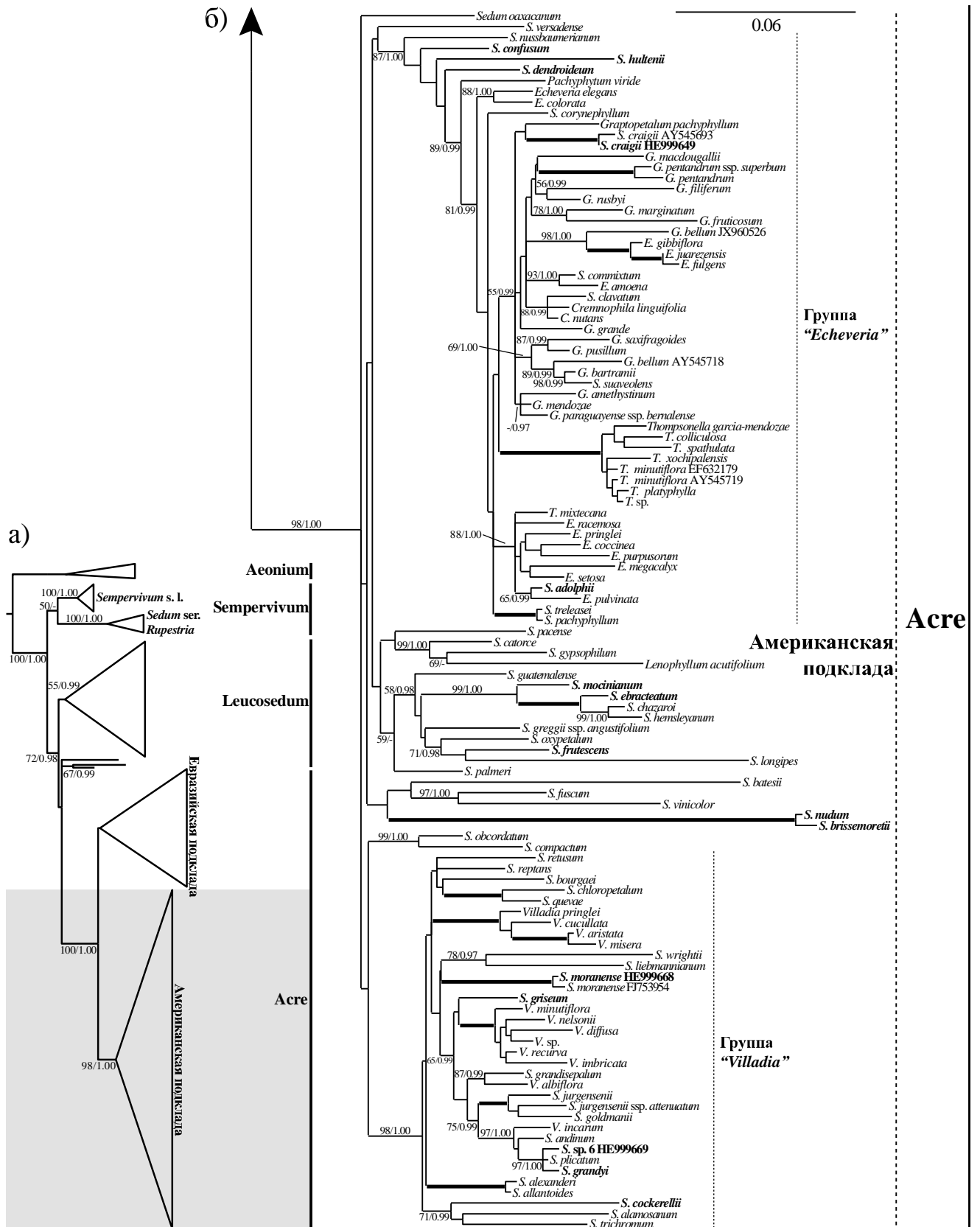


Рисунок 19 – Филогенетическое дерево триб Sedeae, Semperviveae и Aeonieae основанное на сравнении 223 последовательностей ITS региона (590 пп) методом ML (модель GTR+I+G). Обозначения: а – схематичное изображение дерева; б – увеличенная часть дерева, включающая Американскую подкладу клады Акре. Описание соответствует рисунку 18.

Порядок ветвления в *Leucosedum* был лишь частично установлен. Самая крупная клада 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. 18б). При этом *S. oreganum*, *S. spathulifolium* и *S. ternatum* образовывали устойчивую подкладу (100/1.00), в то время как *S. debile* располагался обособленно. Монофилетический род *Prometheum* (98/0.99) был близок к *S. hispanicum* (90/1.00). Выделялась также клада видов *Sedum* (12 последовательностей), поддержанная только в ВІ-анализе (0.99; Рис. 18б). 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/S. subulatum* (C.A. Meyer) Boissier соответственно. Близость к ним *S. stefco* Stefanoff была статистически недостоверна.

Клада Акре в нашем анализе включала наибольшее число видов и родов толстянковых (155 и 8 соответственно). Она получила максимальную статистическую поддержку в анализах ML и ВІ. Она 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 А1 и А2 (9 и 18 последовательностей соответственно; Рис. 18б), парафилетическая группа из 12 европейских образцов, последовательность *S. sexangulare*, а также близкие между собой *S. anglicum* Hudson и *S. farinosum*. Порядок ветвления в азиатских кладах был хорошо поддержан, в отличие от неразрешенных отношений между европейскими видами (Рис. 18б). Последние были представлены в основном серией *Alpestria* Berger (9 видов), но при этом не формировали на древе соответствующую линию.

Единственным исключением в Американской подкладе были близкие между собой последовательности *S. nudum* и *S. brissemoretii* Hamet с острова Мадейра (Рис. 19б), образующие на древе отдельную длинную ветвь. Кроме *Sedum*, в Аме-

риканскую подкладу *Acra* входили представители еще семи родов толстянковых (*Echeveria*, *Graptopetalum*, *Pachyphytum*, *Thompsonella*, *Cremnophila*, *Lenophyllum* и *Villadia*; Рис 19б). Члены этих родов, как правило, были близки между собой, хотя ни один род не образовал монофилетическую линию. В общем, порядок ветвления в Американской подкладе был плохо разрешен. Наиболее поддержанными группами были "*Villadia*" (98/1.00; Рис. 19б) и "*Echeveria*" (89/1.00), установленные ранее Carrillo-Reyes с соавторами (2009).

Для того чтобы оценить влияние высокодивергентных участков последовательностей ITS1 на статистическую поддержку ветвей нашего дерева, мы проанализировали еще две матрицы данных. Одна включала только консервативные участки из ITS1, 5.8S рДНК и ITS2 (400 пн), вторая – только участки 5.8S рДНК и ITS2 (294 пн). При удалении из анализа дивергентной части последовательностей ITS1 или целого спейсера поддержка клад *Aeonium* и *Acra* оставалась практически неизменной (99–100%), при этом для подклад в кладе *Sempervivum* наблюдалось снижение поддержки (от 100 до 85–91%), в то время как устойчивая Американская подклада клады *Acra* вовсе лишалась статистической поддержки (Табл. 7).

Учитывая существенные различия в длинах ветвей полученного нами филогенетического дерева, можно предположить неодинаковый темп эволюции последовательностей ITS региона в пределах видов и клад толстянковых.

Таблица 7 – Значения бутстреп-поддержек для основных клад/кластеров/подклад, полученные при ML анализе на основании различных матриц данных ITS региона рДНК (223 последовательности)

Клада/Кластер/Подклада	Значение бутстреп-поддержек (BP)		
	590 пн	400 пн	294 пн
Aeonium	100	100	99
Sempervivum	50	Пара	Пара
<i>Sedum ser. Rupestris</i>	100	100	91
<i>Sempervivum s. l.</i>	100	85	89
Leucosedum	Пара	<50	Пара
Dudleya	87	67	Пара
Acre	100	98	100
Евроазиатская	<50	Пара	Пара
A1	100	87	Пара
A2	100	85	<50
Американская	98	<50	Пара

Примечание: 590 пн – 590 пар нуклеотидов участка ITS1–5.8S–ITS2 (дерево, построенное на основании этой матрицы, показано на рисунках 18 и 19); 400 пн – 400 самых консервативных пар нуклеотидов участка ITS1–5.8S–ITS2; 294 пн – 294 пар нуклеотидов участка 5.8S–ITS2; пара – парафилетическая группа.

Попарные генетические дистанции (*p*-дистанции), установленные для данного маркера, в целом имели высокие значения ($0,164 \pm 0,007$). В *Sempervivum*, *Acre* и *Leucosedum* они превышали 0,12 (Рис. 20). В некоторых случаях (*Sempervivum* и *Acre*) относительно высокая дивергенция в кладе была обусловлена не общей высокой дивергенцией последовательностей, а наличием нескольких (двух, в данном случае) дивергентных подклад, слагаемых относительно близкими последовательностями. Например, дистанции между *Sempervivum ssp.* не превышали $0,018 \pm 0,002$ и были почти в четыре раза меньше, чем между видами *Sedum ser. Rupestris* ($0,068 \pm 0,006$; Рис. 20). При этом клада *Sempervivum* имеет

большее значение попарных дистанций ($0,111 \pm 0,007$). В кладе *Акре* евроазиатские виды *Sedum* характеризовались высокой дивергенцией последовательностей ($0,154 \pm 0,007$), в отличие от американских видов ($0,088 \pm 0,005$).

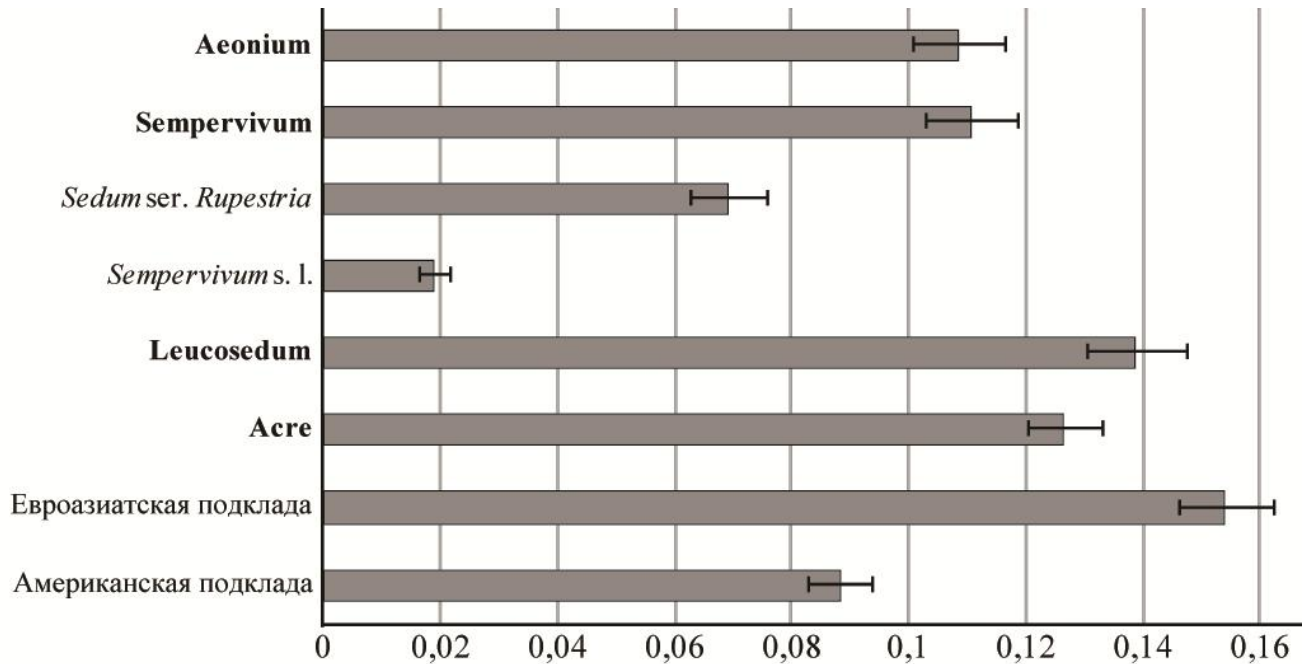


Рисунок 20 – Средние попарные генетические дистанции (*p*-дистанции) между последовательностями в основных группах филогенетического дерева, построенного по результатам анализа ITS региона рДНК.

3.5. Филогения рода *Sedum* и близких ему родов на основании участка гена *matK*

Филогенетическое древо для триб *Sedaeae*, *Semperviveae* и *Aeonieae*, построенное методом ML на основании сравнения 102 последовательностей *matK*, показано на рисунке 21. На нем последовательности распределены между тремя кладами – *Aeonium*, *Leucosedum* и *Акре*, а так же парафилетическим кластером *Sempervivum*. Последний складывается двумя устойчивыми (100/1.00) подкладами – хорошо структурированной *Sedum ser. Ruprestria* и *Sempervivum s. l.*, представленной 4 последовательностями (*Semp. altum* Turill, *Semp. caucasicum* Ruprecht ex Boissier, *Semp. marmoreum* Grisebach, *Semp. globiferum ssp. allionii* (Jordan & Fourreau) t Hart & Bleij).

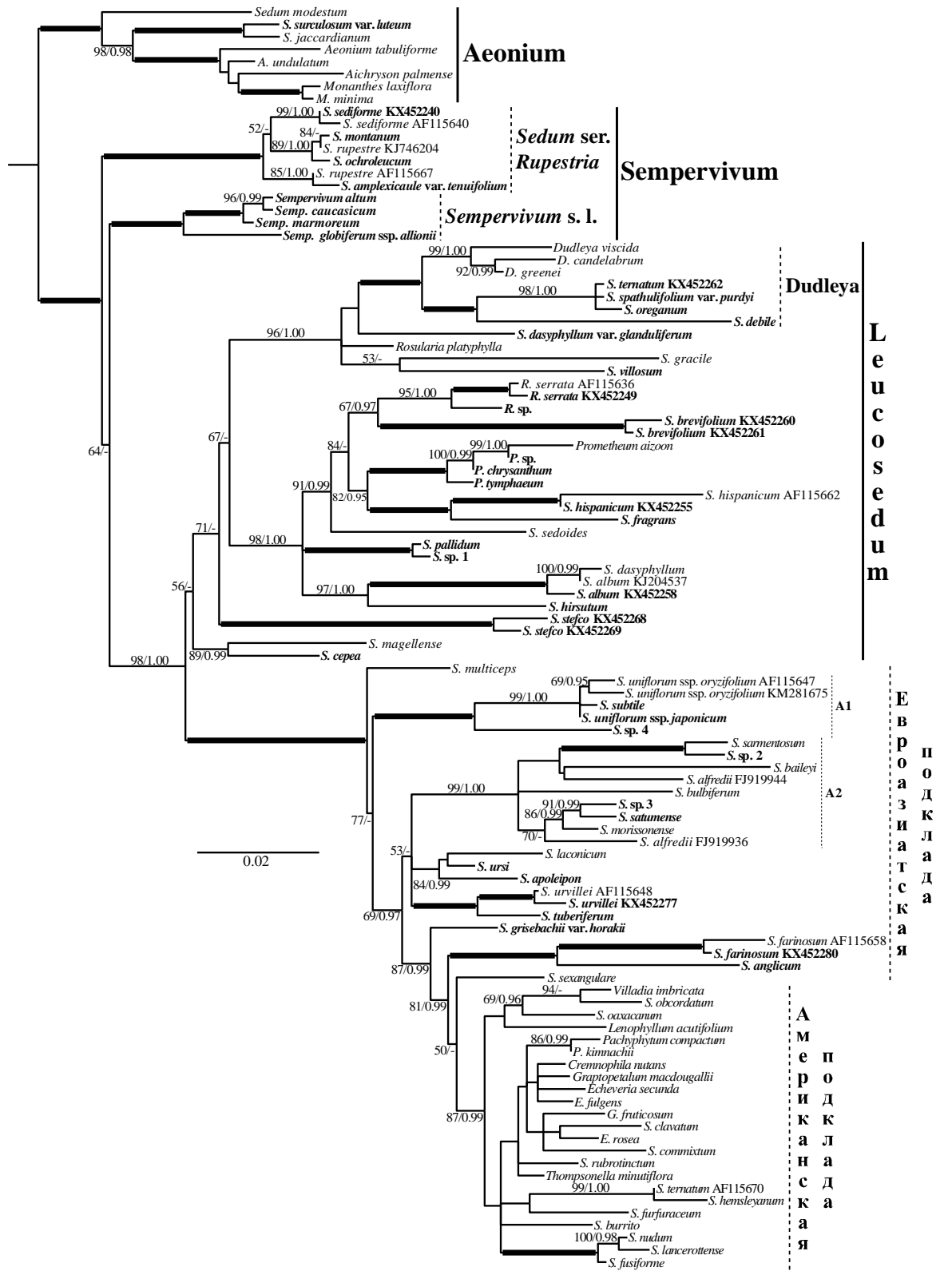


Рисунок 21 – Филогенетическое дерево триб Sedeae, Semperviveae и Aeonieae, основанное на сравнении 102 последовательностей гена *matK* (717 пн) методом ML (модель TVM+G). ВР выше 50% и РР более 0.95 даны над или под ветвями (ML/BI). Ветви со 100% ВР и 1.00 РР показаны утолщенными линиями. Жирным шрифтом обозначены виды, для которых последовательности были получены в настоящем исследовании. Номера доступа в базе данных Genbank даны для таксонов, представленных в матрице данных более чем одной последовательностью.

Поддержка *Leucosedum* была минимальной (56% методом ML), при этом большинство ее внутренних ветвей получили от слабой до высокой поддержки (Рис. 21). Базальное положение в этой кладе занимала пара *S. serapea/S. magellense* Tenore (89/0.99). Большая часть последовательностей (32) вошли в подкладу, слагаемую двумя устойчивыми группами и видом *S. stefco*. Первая группа (21 последовательность; 98/1.00) объединяла виды *Sedum*, *Rosularia* 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. 21).

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. 21). Евроазиатские же 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. 21): А1 (100/1.00) и А2 (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.

В целом, значения p -дистанций, полученные для последовательностей *matK* (Рис. 22), соответствовали таковым, установленным для последовательностей ITS региона рДНК (Рис. 20). Наибольшими дистанциями между видами характеризовалась клада *Leucosedum* ($0,081 \pm 0,008$), наименьшими – виды рода *Sempervivum* ($0,016 \pm 0,005$). Виды, слагающие *Sempervivum* и *Acre*, имели относительно высокую дивергенцию между последовательностями ($0,042 \pm 0,008$ и $0,051 \pm 0,005$ соответственно) за счет наличия подклад, слагаемых довольно близкими последовательностями (*Sedum ser. Rupestris*/*Sempervivum* s. l. и Евроазиатская/Американская подклады). Как и в анализе ITS региона, Евроазиатская подклада характеризовалась более высоким значением p -дистанций, чем Американская.

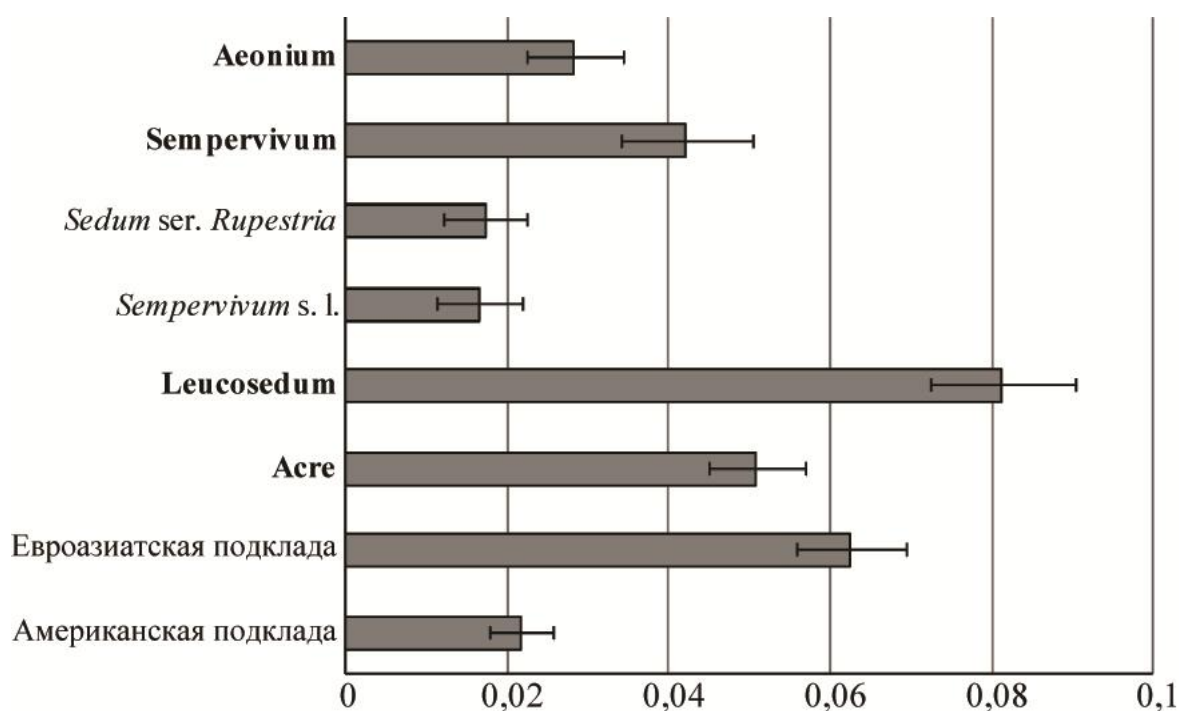


Рисунок 22 – Средние попарные генетические дистанции (p -дистанции) между последовательностями в пределах основных групп филогенетического дерева, построенного по результатам анализа участка гена *matK*.

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 (Приложение), что снижает вероятность появления противоречивого филогенетического сигнала, который иногда наблюдается при объединении последовательностей маркеров, полученных из разных организмов. Кроме того, нуклеотидные последовательности из баз данных могут содержать ошибки. Так, в анализе участка гена *matK* было отмечено, что последовательность *S. ternatum* из GenBank вошла в состав Американской подклады *Acre*, а полученная нами – в состав клады *Dudleya* в *Leucosedum*, куда и относится большинство видов подрода *Gormanina* (Рис. 21).

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 (Табл. 8). 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 23. Филогенетический анализ объединенных последовательностей двух маркеров отражал основные черты индивидуальных. На филогенетическом дереве триб *Sedeae*, *Semperviveae* и *Aeonieae* (Рис. 23) установлены следующие основные группировки: клада *Aeonium*, кластер *Sempervivum*, включающий две устойчивые (100/1.00) подклады (*Sedum* ser. *Ruprestria* и *Sempervivum* s. l.), парафилетическая группа *Leucosedum* и устойчивая клада *Acre* (100/1.00).

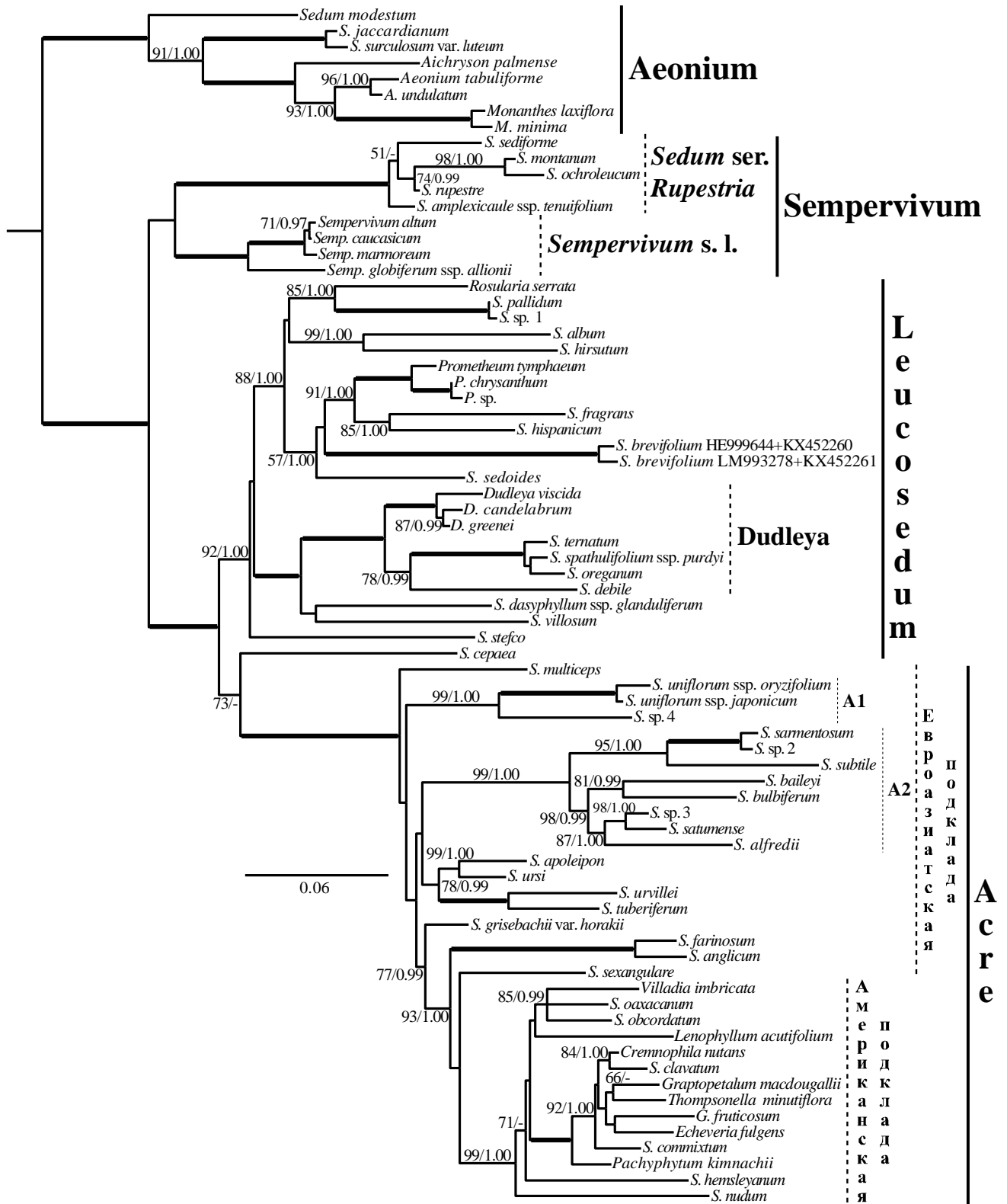


Рисунок 23 – Филогенетическое дерево триб Sedeae, Semperviveae и Aeonieae основанное на сравнении 75 последовательностей ITS+matK (1307 пн) методом ML (модель GTR+I+G). ВР выше 50% и РР более 0.95 даны над или под ветвями (ML/BI). Ветви со 100% ВР и 1.00 РР показаны утолщенными линиями. Номера доступа даны для таксонов, представленных в матрице данных более чем одной последовательностью.

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 видов рода *Dudleya* и сестринская ей клада из четырех американских видов *Sedum* (*Dudleya*; Рис. 23). Как и в предыдущих анализах каждого маркера (Рис. 18, 19, 21), клада *Acre* получила максимальную поддержку (100/1.00). Евроазиатские виды в *Acre* формировали парафилетическую группу, при этом азиатские группы видов (A1 и A2; Рис. 23) 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; Табл. 7, 8).

Таблица 8 – Значения бутстреп-поддержек и апостериорных вероятностей для основных клад/кластеров/подклад древа, полученные с разными маркерами и матрицами данных

Клада/Кластер/Подклада	Значение бутстреп-поддержек (ML) и апостериорных вероятностей (BI)			
	<i>matK</i> 102	<i>matK</i> 75	ITS 75	<i>matK</i> +ITS 75
Aeonium	100/1.00	100	100	100/1.00
Sempervivum	Пара	Пара	Пара	<50/<0.95
<i>Sedum ser. Rupestris</i>	100/1.00	100	100	100/1.00
<i>Sempervivum</i> s. l.	100/1.00	100	100	100/1.00
Leucosedum	56/<0.95	Пара	Пара	Пара
Acre	100/1.00	100	100	100/1.00
Евроазиатская	Пара	Пара	<50	Пара
A1	100/1.00	100	95	99/1.00
A2	99/1.00	100	100	99/1.00
Американская	87/0.99	73	97	99/1.00

Примечание: Пара – парафилетическая группа; наименования матриц даны по названию маркера и числу последовательностей в матрице.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Вторичная структура спейсеров ITS1 и ITS2

В ходе исследования нами была обнаружена высокая степень вариабельности последовательностей ITS региона рДНК толстянковых, заключающаяся в многочисленных нуклеотидных заменах и значительных изменениях длины, что усложняло выравнивание (Рис. 11, 12). Однако применение метода моделирования вторичной структуры транскриптов спейсеров ITS1 и ITS2 способствовало достоверному определению гомологичных участков и более достоверному выравниванию последовательностей. Полученные нами модели вторичной структуры этих спейсеров для представителей триб *Sedeae*, *Semperviveae* и *Aeonieae* (Рис. 14) согласуются с моделями, предложенными для других групп растений (Liu, Schardl, 1994; Goertzen et al., 2003; Schultz et al., 2005; Coleman, 2015). В соответствии с этими моделями, ITS2 толстянковых включал четыре спирали, из которых спираль II в основании имела внутреннюю петлю, представленную непарными пиримидинами (pyrimidine-pyrimidine mismatch), третья спираль являлась самой длинной и содержала консервативный участок с мотивом UGGU в дистальной части.

В то время как структура ITS2 эукариотических организмов весьма консервативна (Coleman, 2003; Goertzen et al., 2003; Schultz et al., 2005; Wolf et al., 2005), общая модель строения ITS1 до сих пор четко не установлена. Показано, что во многих группах растений транскрипт этого спейсера формирует четыре относительно короткие спирали и длинные одноцепочечные участки между ними. С этим общим планом согласуется и вторичная структура ITS1 толстянковых. Кроме того, в нём было обнаружено два консервативных мотива. Первый соответствовал универсальному мотиву покрытосеменных растений (GGCRY-(N)₄₋₇-GYGYCAAGGAA, где Y = C или T; R = G или A; N = любой нуклеотид; Liu, Schardl, 1994) и находился в спирали III и следующем за ним одноцепочечным участком нашей модели (Рис. 14). Второй консервативный мотив включал 5'-

конец спейсера, но имел меньшую гомологию последовательности с представителями других групп покрытосеменных.

Многочисленные компенсаторные и полукомпенсаторные замены оснований, выявленные в полученных нами структурах ITS1 и ITS2 толстянковых (Рис. 13), подтверждают реалистичность разработанных моделей. Хотя наши данные могут и переоценивать достоверность некоторых элементов вторичной структуры, мы считаем модели адекватными для осуществления однозначного выравнивания. Этот вывод подтверждается отсутствием значимых различий между филогенетическими деревьями, построенными на основании последовательностей ITS региона ядерной рДНК и участка гена *matK* хлДНК (Рис. 18, 19, 21).

После выравнивания матрица данных из 223 последовательностей ITS региона (809 позиций), включающая представителей 15 родов толстянковых, была почти на 35% длиннее, чем средняя длина последовательностей. Этот факт указывает на то, что вариации в длине (индели) играют важную роль в эволюции этого региона ДНК у толстянковых. 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 (Рис. 17а), 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 (Рис. 17б), характерная для видов рода *Dudleya* и группы американских видов *Sedum*, формирующих кладу *Dudleya* в *Leucosedum* (Рис. 18). Достоверно установить гомологию нуклеотидов между укороченными и полноразмерными спиральями было достаточно трудно, учитывая отсутствие переходных форм. Необходимо отметить, что транскрипты укороченных последовательностей, вероятно, по-прежнему способны правильно функционировать при сплайсинге, поскольку делеции не нарушили важные элементы вторичной структуры ITS1.

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. Это может говорить о важности именно общей структуры спейсеров и допустимых изменениях в ITS1 и ITS2, существенно не влияющих на процесс созревания рибосомной РНК.

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. 18, 19, 21; Табл. 7, 8). Близость топологий, базирующихся на данных из ядерного и хлоропластного геномов, имеющих собственную эволюционную динамику (Табл. 6), позволяет предположить, что филогенетические гипотезы, основанные на этих построениях, достоверно отражают родственные отношения в исследуемой группе *Crassulaceae*. Высокая устойчивость клад деревьев (Табл. 7, 8) также позволяет говорить о том, что ITS регион и ген *matK* являются хорошими маркерами для реконструкции филогении толстянковых на разных таксономических уровнях. Даже на уровне вида оба маркера позволили выявлять генетическую изменчивость. К сожалению, комбинированный

анализ двух маркеров существенно не повысил устойчивость основных клад и подклад дерева (Рис. 23; Табл. 7, 8).

В ходе анализов было показано, что виды *Sedum* вошли в состав всех клад/кластеров дерева (Рис. 18, 19, 21, 23), 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 так же 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, Eggli, 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). Родство *S. caeruleum* L. и *S. pubescens* Vahl с *Aeonium* бесспорно, однако точное положение соответствующих серий в кладе, а так же их монофилия требуют подтверждения. Mes и 't Hart (1994) установили кладу серии *Monanthoidea*, но она оказалась парафилетической в последующих анализах гена *matK* и ITS региона рДНК (Mort et al., 2001; Nikulin et al., 2016).

По результатам наших анализов клада *Sempervivum* (sensu van Ham, 1995) характеризовалась минимальной поддержкой в анализе последовательностей ITS региона (50% BP; Nikulin et al., 2016), представляла собой парафилетический кластер в анализе участка гена *matK* (Никулин, Гончаров, 2017) и была установлена без поддержки в анализе комбинированной матрицы (Рис. 23). В то же время мо-

нофилия подклад *Sempervivum* s. l. (Klein, Kadereit, 2015) и *Sedum* ser. *Rupestris*, слагающих трибу, не вызывает сомнений (Рис. 18, 21, 23).

Предполагают, что род *Sempervivum* произошел от одной из полиплоидных групп *Sedum* (Favarger et al., 1968), и один из видов серии *Rupestris* рассматривался в качестве вероятного предка *Sempervivum* (Uhl, 1961). Это родство подтвердилось при рестриктазном анализе хпДНК (van Ham, 't Hart, 1998) и при сравнении последовательностей ITS региона рДНК (Гончарова и др., 2008), хотя и с невысокими бутстреп-поддержками. Однако в филогении, основанной на сравнении последовательностей гена *matK*, это родство установить не удалось (Mort et al., 2001). Морфологическое сходство между родом *Sempervivum* и серией *Rupestris* выражено слабо, за исключением общих для них полимерных цветков – признака, вероятно, неоднократно возникавшего в семействе. Тем не менее, клада *Sempervivum* признается некоторыми авторами в качестве трибы *Semperviveae* (Thiede, Eggli, 2007; Рис. 2).

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, Eggli, 2007). В нашей матрице данных выборка *Sedum* ser. *Rupestris* была достаточна для достоверного анализа межвидовых отношений. Порядок ветвления в целом согласуется с данными анализа рестрикционных фрагментов хпДНК и фенотипических признаков (van Ham, 't Hart, 1994). Более того, наши данные подтверждают близкое родство между *S. ochroleucum* Chaix, *S. montanum* L. и обособленное положение *S. sediforme* (Jacquin) Pau (Рис. 18, 21, 23). Несмотря на относительно высокую дивергенцию между последовательностями ITS региона рДНК видов *Sedum* ser. *Rupestris* (около 7%, Рис. 20), дивергенция между последовательностями *matK* была относительно мала (1,7%, Рис. 22). Виды данной группы почти не имеют репродуктивных барьеров ('t Hart, 1978; Gallo, 2012), что может свидетельствовать о важной

роли сетчатого видообразования. Однако это утверждение требует подтверждения молекулярными данными.

Большинство видов *Sedum* принадлежат к трибе Sedeae и распределены между кластером *Leucosedum* и кладой *Acre* (Рис. 18, 19, 21, 23). Остается неясным, обусловлена ли низкая поддержка *Leucosedum* в наших анализах ускоренными темпами эволюции (дивергенция между последовательностями составляла 13,8% для ITS региона и 8,1% для гена *matK*; Nikulin et al., 2016; Никулин, Гончаров, 2017) или все еще недостаточной выборкой таксонов в трибе Sedeae. 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. serpaea*, *Sedum* sp., *Rosularia serrata* и две в *matK*: *S. serpaea*, *S. magellense*; Рис. 18, 21, 23) 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 *Gormaniana* с того же континента (*S. oreganum*, *S. spathulifolium* var. *purdyi*, *S. ternatum* и *S. debile*; Рис. 18б, 21, 23). Эта близость была поддержана не только значениями бутстреп-поддержек и апостериорных вероятностей, но и молекулярной синапоморфией в ITS регионе рДНК, а именно укороченной спиралью II в ITS1 всех американских видов *Leucosedum* (Рис. 17б). Близкий к *Dudleya* род *Sedella* (*Parvisedum* R.T. Clausen) не был представлен в нашей выборке, поэтому существование этой синапоморфии в ITS1 *Sedella* и его родство к американским представителям *Sedum* нуждается в подтверждении.

На основании сравнения последовательностей гена *matK* нами было показано, что вид *S. gracile*, распространенный в Турции и на Кавказе, является сестринским таксоном к роду *Dudleya* (поддержка ветви 96/1.00; Рис. 21), что подтверждает результаты, полученные Mort с соавторами (2001). Однако в нашем анализе ITS региона столь близкое родство не было установлено (Рис. 18).

В основном, европейские виды, близкие к американской кладе *Dudleya* (Рис. 18б, 21), 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.

В *Leucosedum* нами установлено родство *S. hispanicum* с видами рода *Prometheum* (90/1.00 для ITS и 82/0.95 для *matK*; Рис. 18б, 21). По результатам анализа гена *matK* к этим таксонам проявляет близость *S. fragrans* 't Hart (Рис. 21). Положение же этого таксона на древе ITS не имело поддержки (Рис. 18б). Данные, полученные на основании двух маркеров, подтверждают результаты рестрикционного анализа хлДНК (van Ham, 't Hart, 1998), которые установили близкие отношения между *Sedum* ser. *Alsenifolia* Berger (*S. fragrans*)/ser. *Glaucorubens* Fröd. (*S. hispanicum*) и *Prometheum*. Предыдущими исследованиями было показано близкое родство *S. inconspicuum* Hand.-Mazz, *S. ince* 't Hart & Alpınar и американского вида *S. commixtum* Moran & Hutchison к *Prometheum* (van Ham, 1994; 't Hart, Alpınar, 1999; Mort et al., 2001). Из-за ограниченной представленности таксонов в *Leucosedum*, нами допускаются альтернативные гипотезы о близких к *Prometheum* видах, однако его отдаленная связь с родом *Rosularia*, вобравшим некоторые виды, ранее относимые к *Prometheum*, очевидна. Имеющиеся молекулярные данные не подтверждают монофилию *Rosularia*. По данным ITS региона, образец *R. serrata* группировался с *S. serapea* и неопределенным видом *Sedum* (Рис. 18б),

формируя отдельную ветвь в *Leucosedum*. На дереве *matK* последовательности рода *Rosularia* вошли в состав двух групп *Leucosedum* (Рис. 21). 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, Eggli, 2007). Имеющиеся на сегодняшний день данные указывают на отсутствие близкого родства между этими секциями.

Клада *Acre* характеризуется наибольшим разнообразием родов (7), видов (>500 ssp.) и фенотипов среди линий толстянковых. В нашем исследовании она получила максимальную поддержку двумя методами (Nikulin et al., 2016; Никулин, Гончаров, 2017), при этом в предыдущих работах ряда авторов клада *Acre* имела умеренную или высокую поддержку (van Ham, 1995; Mort et al., 2001; Maуuzumi, Ohba, 2004; Гончарова и др., 2008). Наши данные установили четкое разделение *Acre* на Евроазиатскую и Американскую подклады, и только положение видов *S. nudum*, *S. bressemoretii*, *S. fusiforme* и *S. lancerotense* с островов Макаронезии в Американской подкладе (98/1.00 для ITS и 100/1.00 для *matK*; Рис. 18, 19, 21) было исключением. Расположение этих таксонов на древе позволяет предположить единичный занос предка этих видов из Америки и последующую диверсификацию в Макаронезии. Следует отметить, что близость *S. nudum* к нескольким американским видам *Sedum* была показана ранее (Mort et al., 2001) на основании анализа, включавшего небольшое число последовательностей гена *matK* толстянковых.

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 ре-

гиона рДНК и гена *matK* хпДНК (Рис. 20, 22). Хотя Американская подклада включала наибольшее число последовательностей (113 в матрице данных ITS региона), представляющих восемь родов, она характеризовалась значительно более низкой дивергенцией между последовательностями (Рис. 20), чем Евроазиатская подклада и *Leucosedum* (по 42 последовательности). Похожую картину мы видим в результатах анализа гена *matK*: Американская подклада Акре включала практически столько же последовательностей, сколько и Евроазиатская подклада и *Leucosedum* (23, 25 и 34 соответственно), и при этом характеризовалась существенно более низкой дивергенцией последовательностей (Рис. 22). Относительно низкая вариабельность последовательностей американских таксонов наблюдалась также при анализах с использованием маркеров ETS рДНК и *rpl16* хпДНК (Carrillo-Reyes et al., 2008, 2009), что может свидетельствовать о недавнем и быстром видообразовании в Американской подкладе Акре (Mort et al., 2001). Этот процесс, вероятно, сопровождался ускоренным темпом эволюции морфологических признаков и полиплоидизацией (Uhl, 1992; Thiede, Eggli, 2007). Ранее неоднократно высказывались предположения, о том, что гибридизация играет важную роль в формировании разнообразия Crassulaceae в целом и Американской линии Акре в особенности (Uhl, 1961, 1992; ВаÑаres, 1990; 't Hart et al., 1993; Mort et al., 2001).

Таким образом, филогенетические отношения в Американской подкладе Акре 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. 19б), 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 Акре, формирующая по данным ITS региона сестринскую линию Американской подкладе, включала исключительно представителей рода *Sedum* (Рис. 18б, 21). Следует отметить, что в эту подкладу входил типо-

вой вид рода – *S. acre*. В филогении на основании гена *matK* евроазиатские таксоны Акре не формировали общей подклады, а располагались парафилетически в основании Американской (Рис. 21). Вероятно, четко установить родственные отношения между азиатскими и европейскими видами не удалось из-за ограниченной выборки таксонов и высокой вариабельности нуклеотидных последовательностей. Тем не менее, результаты нашего анализа позволяют сделать некоторые выводы. Азиатские виды *Sedum* формируют по крайней мере две обособленные группы (A1 и A2; Рис. 18б, 21). 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*, *S. bergeri*, *S. trullipetalum* и *S. triactina* Berger; Рис. 18б) 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.

В отличие от азиатских *Sedum*, отношения между европейскими видами по-прежнему остаются не выясненными. Большинство неазиатских видов в Евроазиатской подкладе представлены серией *Alpestria* (*S. apoleipon*, *S. tuberiferum* Stojanov & Stefanoff, *S. ursi* 't Hart и *S. urvillei* DC.). По результатам анализа объединенной матрицы данных (ITS+*matK*) эти виды объединялись с умеренной статистической поддержкой (78/0,99; Рис. 23), однако в отдельных анализах ITS региона и гена *matK* они не формировали соответствующую кладу (Рис. 18б, 21).

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. 18, 19), в том числе и *S. acre* (типовой вид рода), к роду *Sedum*. Однако это будет означать присоединение к *Sedum* таких эндемичных североамериканских родов как *Cremnophila*, *Echeveria*, *Graptopetalum*, *Lenophyllum*, *Pachyphytum*, *Thompsonella* и *Villadia*, чаще всего четко отличающихся фенотипически. Включение этих родов в *Sedum* может быть вполне оправданно с точки зрения молекулярной филогении. При этом кладу Acre будет рассматриваться как морфологически гетерогенный, но филогенетически цельный род, объединяющий более 500 видов. Второй путь состоит в еще большем расширении *Sedum* за счет членов Leucosedum (клады Acre+Leucosedum), что будет означать присоединение к нему таких родов как *Dudleya*, *Prometheum*, *Rosularia*. Итак, первые два варианта потребуют объединения морфологически различных таксонов, и составление диагноза для рода будет еще более проблематичным. Так же 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. 't Hart (1995) рассматривал фрагментацию *Sedum* в небольшие монофилетические рода как непрактичную и несвоевременную меру, утверждая, что отношения между видами этого рода еще плохо изучены.

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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Виноградова С.В. 2016. Предсказание структурных элементов РНК с использованием экспериментальных данных: дис. ... канд. биол. наук. Москва. 2016. 103 с.
2. Ворошилов В.Н. Флора советского Дальнего Востока. М.: Наука, 1966. 475 с.
3. Гнедков П.А., Шретер А.И. Сравнительное химическое изучение некоторых видов семейства толстянковых // Растительные ресурсы. 1977. Т. 13, № 3. С. 548–559.
4. Гончарова С.Б. Очитковые (Sedoideae, Crassulaceae) флоры российского Дальнего Востока. Владивосток: Дальнаука, 2006. 223 с.
5. 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.
6. 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.
7. 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. С. 96–113.
8. Еникеев А.В. Биоинформатика в мире РНК-структур [Электронный ресурс]. 2014. – Режим доступа: <http://biomolecula.ru/content/1503> (дата обращения 20.01.2016).
9. Кожевников Ю.П. Заметки о родах *Rhodiola* и *Sedum* (Crassulaceae) // Ботанический журнал. 1988. № 3. С. 414–423.

10. Козырева Е.Е., Кугушев Е.И., Майков А.В. Методика математического моделирования процесса образования вторичной структуры РНК // Препринты Института прикладной математики им. М.В. Келдыша РАН. 2001. № 4. С. 19.
11. 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.
12. Саратиков А.С. Золотой корень (Родиола розовая). 2-е изд., перераб. и доп. Томск: Изд-во Томского ун-та, 1974. 158 с.
13. Саратиков А.С., Краснов Е.А. Родиола розовая – ценное лекарственное растение: Золотой корень. Томск: Изд-во Томского ун-та, 1987. 254 с.
14. Хлесткина Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013. Т. 17, № 4/2. С. 1044–1054.
15. Шретер А.И. Лекарственная флора советского Дальнего Востока. М., 1975. 328 с.
16. Acevedo-Rosas R., Camero K., Sosa V., Pell S. A molecular phylogenetic study of *Graptopetalum* (Crassulaceae) based on ETS, ITS, *rpl16*, and *trnL-F* nucleotide sequences // American Journal of Botany. 2004. Vol. 91, № 7. P. 1099–1104.
17. Akaike H. A new look at the statistical model identification // IEEE Transactions on Automatic Control. 1974. Vol. 19, № 6. P. 716–723.
18. Alexander E.J. A new Mexican *Sedum* // Cactus and Succulent Journal. 1942. Vol. 14, № 1. P. 76–78.
19. Álvarez I., Wendel J.F. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2003. Vol. 29, № 3. P. 417–434.
20. An S.S., Friedel T., Hegewald E. Phylogenetic relationships of *Scenedesmus* and *Scenedesmus*-like coccoid green algae as inferred from ITS-2 rDNA sequence comparison // Plant Biology. 1999. Vol. 1, № 4. P. 418–428.

21. Arnheim N. Concerted evolution of multigene families // *Evolution of Genes and Proteins* / Eds. Nei M., Koehn R. Sinauer, Sunderland, MA. 1983. P. 38–61.
22. Bailey 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.
23. Baldwin B.G. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae // *Molecular phylogenetics and evolution*. 1992. Vol. 1, № 1. P. 3–16.
24. 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, № 1. P. 247–277.
25. Banares B.A. Híbridos de la familia Crassulaceae en las Islas Canarias. Novedades y datos corológicos: 2. (Hybrids of the family Crassulaceae in the Canary Islands. New taxa and chorological notes: 2.) // *Vieraea*. 1990. Vol. 18, № 1. P. 65–85.
26. Bayly M.J., Ladiges P.A. Divergent paralogues of ribosomal DNA in eucalypts (Myrtaceae) // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2007. Vol. 44, № 1. P. 346–356.
27. Berger A. Crassulaceae // *Die Natürlichen Pflanzenfamilien*, 2nd ed., Leipzig. 1930. Vol. 18A. P. 352–483.
28. Bonfield J.K., Staden R. The application of numerical estimates of base calling accuracy to DNA sequencing projects // *Nucleic Acids Research*. 1995. Vol. 23, № 8. P. 1406–1410.
29. Bremer B., Bremer K., Heidar N., Erixon P., Olmstead R.G., Anderberg A.A., Kallersjö M., Barkhordarian E. Phylogenetics of asterids based on 3 coding and 3 noncoding chloroplast DNA markers and the utility of non-coding DNA at higher taxonomic levels // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2002. Vol. 24, № 2. P. 274–301.

30. Caisová L., Marin B., Melkonian M. A close-up view on ITS2 evolution and speciation – a case study in the Ulvophyceae (Chlorophyta, Viridiplantae) // BMC Evolutionary Biology. 2011. Vol. 11, № 1. P. 1–24.
31. Carrillo-Reyes P., Sosa V., Mort M.E. *Thompsonella* and the "Echeveria group" (Crassulaceae): Phylogenetic Relationships Based on Molecular and Morphological Characters // Taxon. 2008. Vol. 57, № 3. P. 863–874.
32. 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.
33. 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 Yin-Long, Kron K.A., Rettig J.H., Conti E., Palmer J.D., Manhart J.R., Sytsma K.J., Ichaels 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., 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, № 3. P. 528–580.
34. Chen C.A., Chang C.C., Wei N.V., Chen C.H., Lein Y.T., Lin H.E., Dai C.F., Wallace C.C. Secondary structure and phylogenetic utility of the ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) in scleractinian corals // Zoological Studies. 2004. Vol. 43, № 4. P. 759–771.
35. Clausen R.T. The section *Sedastrum* of *Sedum* // Bulletin of the Torrey Botanical Club. 1943. Vol. 70, № 3. P. 289–296.
36. Clausen R.T. *Sedum* in six areas of the Mexican Cordilleran Plateau // Bulletin of the Torrey Botanical Club. 1979. Vol. 106, № 3. P. 205–216.
37. Coleman A.W. The significance of a coincidence between evolutionary landmarks found in mating affinity and a DNA sequence // Protist. 2000. Vol. 151, № 1. P. 1–9.

38. Coleman A.W. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons // *Trends in Genetics*. 2003. Vol. 19, № 7. P. 370–375.
39. Coleman A.W. Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure // *Nucleic Acids Research*. 2007. Vol. 35, № 10. P. 3322–3329.
40. Coleman A.W. Is there a molecular key to the level of “biological species” in eukaryotes? A DNA guide // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2009. Vol. 50, № 1. P. 197–203.
41. Coleman A.W. Nuclear rRNA transcript processing versus internal transcribed spacer secondary structure // *Trends in Genetics*. 2015. Vol. 31, № 3. P. 157–163.
42. Coleman A.W., Preparata R.M., Mehrotra B., Mai J.C. Derivation of the secondary structure of the ITS-1 transcript in Volvocales and its taxonomic correlation // *Protist*. 1998. Vol. 149, № 2. P. 135–146.
43. Coppins R.L., Hall K.B., Groisman E.A. The intricate world of riboswitches // *Current Opinion in Microbiology*. 2007. Vol. 10, № 2. P. 176–181.
44. Côté C.A., Greer C.L., Peculis B.A. Dynamical conformational model for the role of the ITS2 in pre-RNA processing in yeast // *RNA*. 2002. Vol. 8, № 6. P. 786–797.
45. Cronquist A. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, 1981. 1262 p.
46. 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.
47. Ding Y., Chan C.Y., Lawrence C.E. RNA secondary structure prediction by centroids in a Boltzmann weighted ensemble // *RNA*. 2005. Vol. 11, № 8. P. 1157–1166.
48. Dover G. Molecular drive: A cohesive mode of species evolution // *Nature*. 1982. Vol. 299, № 5879. P. 111–117.
49. Dover G. Molecular drive in multigene families: how biological novelties arise, spread and are assimilated // *Trends in genetics*. 1986. Vol. 2. P. 159–165.

50. Dunning L.T., Savolainen V. Broad-scale amplification of *matK* for DNA barcoding plants, a technical note // Botanical Journal of the Linnean Society. 2010. Vol. 164, № 1. P. 1–9.
51. Eggli U. Illustrated handbook of succulent plants: Crassulaceae. Berlin Heidelberg New York. 2005. P. 5–8.
52. Elder J.F., Turner B.J. Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes // The Quarterly Review of Biology. 1995. Vol. 70, № 3. P. 297–320.
53. 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.
54. Ems S.C., Morden C.W., Dixon C.K., Wolfe K.H., dePamphilis C.W., Palmer J.D. Transcription, splicing and editing of plastid RNAs in the nonphotosynthetic plant *Epifagus virginiana* // Plant Molecular Biology. 1995. Vol. 29, № 4. P. 721–733.
55. Emshwiller E., Doyle J.J. Origins of domestication and polyploidy in oca (*Oxalis tuberosa*: Oxalidaceae): nrDNA ITS data // American Journal of Botany. 1998. Vol. 85, № 7. P. 975–985.
56. 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 // Plant Systematics and Evolution. 2002. Vol. 248, № 1. P. 71–83.
57. Favarger C., Maeder A.M., Zesiger F. Hybrides interspécifiques et intergénériques chez les *Joubarbes* // Archiv der Julius Klaus-Stiftung für Vererbungsforschung, Sozialanthropologie, und Rassenhygiene. 1968. Vol. 43. P. 18–30.
58. 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.
59. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap // Evolution. 1985. Vol. 39. P. 783–791.

60. Fishbein M., Hibsich-Jetter C., Soltis D.E., Hufford L. Phylogeny of Saxifragales (angiosperms, eudicots): analysis of a rapid, ancient radiation // *Systematic Biology*. 2001. Vol. 50, № 6. P. 817–847.
61. Fishbein M., Soltis D.E. Further resolution of the rapid radiation of Saxifragales (angiosperms, eudicots) supported by mixed-model Bayesian analysis // *Systematic Botany*. 2004. Vol. 29, № 4. P. 883–891.
62. Fröderström H. The genus *Sedum* L. A systematic essay. Part 1 // *Acta horti Gothoburgensis*. 1930. Vol. 5. P. 3–75.
63. Fröderström H. The genus *Sedum* L. A systematic essay. Part 2 // *Acta horti Gothoburgensis*. 1931. Vol. 6. P. 3–111.
64. Fu K.T. Species et combinaciones novae *Crassulacearum Sinicarum* // *Acta Phytotaxonomica Sinica*. 1965. Vol. 10. P. 111–128.
65. Fu K.T. Revision of the section *Oreades* of Chinese *Sedum* // *Acta Phytotaxonomica Sinica*. 1974. Vol. 12, № 1. P. 51–78.
66. Fu K.T., Ohba H. *Crassulaceae* // *Flora of China* / Eds. Wu Z.Y., Raven P.H. Science Press, Beijing, Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, 8. 2001. P. 202–268.
67. Gallo L. Natural hybrids in *Sedum* series *Rupestria* Berger (Crassulaceae): a review of taxonomy and nomenclature // *Forum Geobotanicum*. 2012. Vol. 6. P. 1–13.
68. 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, № 4. P. 543–548.
69. Goertzen L.R., Cannone J.J., Gutell R.R., Jansen R.K. ITS secondary structure derived from comparative analysis: implications for sequence alignment and phylogeny of the Asteraceae // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2003. Vol. 29, № 2. P. 216–234.
70. Goldman D.H., Freudenstein J.V., Kores P.J., Molvray M., Jarrell D.C., Whitten W.M., Cameron K.M., Jansen R.K., Chase M.W. Phylogenetics of Arethuseae

(Orchidaceae) based on plastid *matK* and *rbcL* sequences // Systematic Botany. 2001. Vol. 26, № 3. P. 670–695.

71. 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.

72. Gonzales I.L., Chambers C., Gorski J.L., Stambolian D., Schmickel R.D., Sylvester J.E. Sequence and structure correlation of human ribosomal transcribed spacers // Journal of Molecular Biology. 1990. Vol. 212, № 1. P. 27–35.

73. Gottschling M., Hilger H.H., Wolf M., Diane N. Secondary structure of the ITS1 transcript and its application in a reconstruction of the phylogeny of Boraginales // Plant Biology. 2001. Vol. 3, № 6. P. 629–636.

74. Gottschling M., Plötner J. Secondary structure models of the nuclear internal transcribed spacer regions and 5.8S rRNA in Calciodinelloideae (Peridiniaceae) and other dinoagellates // Nucleic Acids Research. 2004. Vol. 32, № 1. P. 307–315.

75. 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, № 90. P. 1–9.

76. Grulich V. Generic division of Sedoideae in Europe and adjacent regions // Preslia. 1984. Vol. 56, № 1. P. 29–45.

77. Guo F., Gooding A.R., Cech T.R. Structure of the Tetrahymena ribozyme: base triple sandwich and metal ion at the active site // Molecular Cell. 2004. Vol. 16, № 3. P. 351–362.

78. Gutell R.R., Larsen L., Woese C.R. Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective // Microbiological Reviews. 1994. Vol. 58, № 1. P. 10–26.

79. Hadjiolova K.V., Georgiev O.I., Nosikov V.V., Hadjiolov A.A. Localization and structure of endonuclease cleavage sites involved in the processing of the rat

32S precursor to ribosomal RNA // *Biochemical Journal*. 1984. Vol. 220, № 1. P. 105–116.

80. Hancock J., Tautz D., Dover G. Evolution of the secondary structures and compensatory mutations of the ribosomal RNAs of *Drosophila melanogaster* // *Molecular Biology and Evolution*. 1988. Vol. 5, № 4. P. 393–414.

81. Harpke D., Peterson A. Non-concerted ITS evolution in Mammillaria (Cactaceae) // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2006. Vol. 41, № 3. P. 579–593.

82. Hershkovitz M.A., Zimmer E.A. Conservation patterns in angiosperm rDNA ITS2 sequences // *Nucleic acids research*. 1996. Vol. 24, № 15. P. 2857–2867.

83. Hilu K.W., Alice L.A., Liang H. Phylogeny of Poaceae inferred from *matK* sequences // *Annals of the Missouri Botanical Gardens*. 1999. Vol. 86. P. 835–851.

84. Hilu K.W., Borsch T., Muller K., Soltis D.E., Soltis P.S., Savolainen V., Chase M.W., Powell M.P., Alice L.A., Evans R., Sauquet H., Neinhuis C., Slotta T.A.B., Jens G.R., Campbell C.S., Chatrou L.W. Angiosperm phylogeny based on *matK* sequence information // *American Journal of Botany*. 2003. Vol. 90, № 12. P. 1758–1776.

85. Hilu K.W., Liang H. The *matK* gene: sequence variation and application in plant systematics // *American Journal of Botany*. 1997. Vol. 84, № 6. P. 830–839.

86. Hofacker I.L., Fekete M., Stadler P.F. Secondary Structure Prediction for Aligned RNA Sequences // *Journal of molecular biology*. 2002. Vol. 319, № 5. P. 1059–1066.

87. Huang D., Zhang W., Huang D., Wu J. Antitumor activity of the aqueous extract from *Sedum sarmentosum* Bunge in vitro // *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*. 2010. Vol. 25, № 1. P. 81–88.

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

89. Jacobsen H., *Lexicon of Succulent Plants*. Littlehampton Book Services Ltd., London. 1974. 664 p.

90. Johnson L.A., Soltis D.E. *matK* DNA sequences and phylogenetic reconstruction in Saxifragaceae s. str. // Systematic Botany. 1994. Vol. 19. P. 143–156.
91. 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.
92. Jung H.J., Kang H.J., Song Y.S., Park E.H., Kim Y.M., Lim C.J. Anti-inflammatory, anti-angiogenic and anti-nociceptive activities of *Sedum sarmentosum* extract // Journal of ethnopharmacology. 2008. Vol. 116, № 1. P. 138–143.
93. Kay K.M., Whittall J.B., Hodges S.A. A survey of nuclear ribosomal internal transcribed spacer substitution rates across angiosperms: an approximate molecular clock with life history effects // BMC Evolutionary Biology. 2006. Vol. 6, № 1. P. 1–9.
94. Kelchner S.A. The evolution of non-coding chloroplast DNA and its application in plant systematics // Annals of the Missouri Botanical Gardens. 2000. Vol. 87. P. 482–498.
95. 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. 1–12.
96. Kim K.J., Jansen R.K. Comparisons of phylogenetic hypotheses among different data sets in dwarf dandelions (*Krigia*, Asteraceae): additional information from internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA // Plant Systematics and Evolution. 1994. Vol. 190, № 3. P. 157–185.
97. Kim W.H., Park Y.J., Park M.R., Ha T.Y., Lee S.H., Bae S.J., Kim M. Estrogenic effects of *Sedum sarmentosum* Bunge in ovariectomized rats // Journal of Nutritional Science and Vitaminology. 2004. Vol. 50, № 2. P. 100–105.
98. Kimura M. The role of compensatory neutral mutation in molecular evolution // Journal of Genetics. 1985. Vol. 64, № 1. P. 7–19.
99. Klein J.T., Kadereit J.W. Phylogeny, biogeography, and evolution of edaphic association in the European oreophytes *Sempervivum* and *Jovibarba* (Crassulaceae) // International Journal of Plant Sciences. 2015. Vol. 176, № 1. P. 44–71.

100. Kohchi T., Umesono K., Ogura Y., Komine Y., Nakahigashi K., Komano T., Yamada Y., Ozeki H., Ohyama K. A nicked group II intron and trans-splicing in liverwort, *Marchantia polymorpha* // Nucleic Acids Research. 1988. Vol. 16, № 21 P. 10025–10036.
101. Kores P.J., Weston P.H., Molvray M., Chase M.W. Phylogenetic relationships within the Diurideae (Orchidaceae): Inferences from plastid *matK* DNA sequences // Monocots: Systematics and Evolution / Eds. Wilson K.L., Morrison D.A. Australia: CSIRO Publishin. 2000. P. 449–455.
102. 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, № 5. P. 578–589.
103. Letsch H.O., Kück P., Stocsits R.R., Misof B. The impact of rRNA secondary structure consideration in alignment and tree reconstruction: simulated data and a case study on the phylogeny of hexapods // Molecular biology and evolution. 2010. Vol. 27, № 11. P. 2507–2521.
104. Liao D. Concerted evolution: molecular mechanism and biological implications // The American Journal of Human Genetics. 1999. Vol. 64, № 1. P. 24–30.
105. Liao D., Pavelitz T., Kidd J.R., Kidd K.K., Weiner A.M. Concerted evolution of the tandemly repeated genes encoding human U2 snRNA (the RNU2 locus) involves rapid intrachromosomal homogenization and rare interchromosomal gene conversion // The EMBO Journal. 1997. Vol. 16, № 3. P. 588–598.
106. Librado P., Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data // Bioinformatics. 2009. Vol. 25, № 11. P. 1451–1452.
107. Liu J.S., Schardl C.L. A conserved sequence in internal transcribed spacer 1 of plant nuclear rRNA genes // Plant Molecular Biology. 1994. Vol. 26, № 2. P. 775–778.

108. 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.
109. 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, № 1. P. 99–145.
110. Mauritzon J. Studien über die Embriologie der Familien Crassulaceae und Saxifragaceae. Lund H. Ohlssons buchdruckerei. 1933. 152 p.
111. 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.
112. Melo G.O., Malvar D.C., Vanderlinde F.A., Pires P.A., Côrtes W.S., Filho P.G., Muzitano M.F., Kaiser C.R., Costa S.S. Phytochemical and pharmacological study of *Sedum dendroideum* leaf juice // *Journal of ethnopharmacology*. 2005. Vol. 102, № 2. P. 217–220.
113. Mes T.H.M. Phylogenetic and systematic implications of chloroplast and nuclear spacer sequence variation in the Macaronesian Sempervivoideae and related Sedoideae // *Evolution and systematics of the Crassulaceae*. Leiden: Backhuys. 1995. P. 30–44.
114. Mes T.H.M., 't Hart H. *Sedum surculosum* and *S. jaccardianum* (Crassulaceae) share a unique 70 bp deletion in the chloroplast DNA *trnL* (UAA) – *trnF* (GAA) intergenic spacer // *Plant Systematics and Evolution*. 1994. Vol. 193, № 1. P. 213–221.
115. Mes T.H.M., 't Hart H. The evolution of growth-forms in the Macaronesian genus *Aeonium* (Crassulaceae) inferred from chloroplast RFLPs and morphology // *Molecular Ecology*. 1996. Vol. 5, № 3. P. 351–363.

116. Mes T.H.M., Wijers G.J., 't Hart H. Phylogenetic relationships in *Monanthes* (Crassulaceae) based on morphological, chloroplast and nuclear DNA variation // *Journal of Evolutionary Biology*. 1997. Vol. 10, № 2. P. 193–216.
117. Minin V., Abdo Z., Joyce P., Sullivan J. Performance-based selection of likelihood models for phylogeny estimation // *Systematic Biology*. 2003. Vol. 52, № 5. P. 674–683.
118. Mohr G., Perlman P.S., Lambowitz A.M. Evolutionary relationships among group II intron-encoded proteins and identification of a conserved domain that may be related to maturase function // *Nucleic Acids Research*. 1993. Vol. 21, № 22. P. 4991–4997.
119. Moon S.C., Park S.C., Yeo E.J., Kwak C.S. Water dropwort (*Ostericum sieboldii*) and sedum (*Sedum sarmentosum*) delay H₂O₂-induced senescence in human diploid fibroblasts // *Journal of medicinal food*. 2009. Vol. 12, № 3. P. 485–492.
120. Moran R. Delimitation of genera and subfamilias in the Crassulaceae // *Desert Plant Life*. 1942. Vol. 14. P. 125–128.
121. Mort M.E., O'Leary T.R., Carillo-Reyes P., Nowell T., Archibald J.K., Randle C.P. Phylogeny and Evolution of Crassulaceae: past, present, and future // *Biodiversity & Ecology*. 2010. Vol. 3. P. 69–86.
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, № 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. Neuhaus H., Link G. The chloroplast tRNA^{Lys} (UUU) gene from mustard (*Sinapsis alba*) contains a class II intron potentially coding for a maturase-related polypeptide // *Current Genetics*. 1987. Vol. 11, № 4. P. 251–257.

125. 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, № 5. P. 1441–1453.
126. 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.
127. Ochieng J.W., Henry R.J., Baverstock P.R., Steane D.A., Shepherd M. Nuclear ribosomal pseudogenes resolve a corroborated monophyly of the eucalypt genus *Corymbia* despite misleading hypotheses at functional ITS paralogs // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2007. Vol. 44, № 2. P. 752–764.
128. 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.
129. Poczai P., Hyvönen J. Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetics: problems and prospects // *Molecular Biology Reports*. 2010. Vol. 37, № 4. P. 1897–1912.
130. Porter C.H., Collins F.H. Species-diagnostic differences in the ribosomal DNA internal transcribed spacer from the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi* (Diptera: Culicidae) // *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1991. Vol. 45, № 2. P. 271–279.
131. Praeger R.L. An account of the genus *Sedum* as found in cultivation // *Journal of the Royal Horticultural Society*. 1921. Vol. 46. P. 1–314.
132. Rieseberg L.H., Beckstrom-Sternberg S., Doan K. *Helianthus annuus* ssp. *texanus* has chloroplast DNA and nuclear ribosomal RNA genes of *Helianthus debilis* ssp. *cucumerifolius* // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1990. Vol. 87, № 2. P. 593–597.
133. Rieseberg L.H., Soltis D.E. Phylogenetic consequences of cytoplasmic gene flow in plants // *Evolutionary Trends in Plants*. 1991. Vol. 5. P. 65–84.

134. Rieseberg L.H., Wendel J.F. Introgression and its consequences in plants // Hybrid Zones and the Evolutionary Process / Ed. Harrison R. Oxford University Press, Oxford, 1993. P. 70–109.
135. Ruggiero M.V., Procaccini G. The rDNA ITS region in the lessepsian marine angiosperm *Halophila stipulacea* (Forssk.) Aschers (Hydrocharitaceae): intragenomic variability and putative pseudogenic sequences // Journal of Molecular Evolution. 2004. Vol. 58, № 1. P. 115–121.
136. Saldanha R., Mohr G., Belfort M., Lambowitz A.M. Group I and group II introns // FASEB Journal. 1993. Vol. 7, № 1. P. 15–24.
137. Sande van der C.A.F.M., Kwa M., van Nues R.W., van Heerikhuizen H., Raue H.A., Planta R.J. Functional analysis of internal transcribed spacer 2 of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal DNA // Journal of Molecular Evolution. 1992. Vol. 223, № 4. P. 899–910.
138. Sato S., Nakamura Y., Kaneko T., Asamizu E., Tabata S. Complete structure of the chloroplast genome of *Arabidopsis thaliana* // DNA Research. 1999. Vol. 6, № 5. P. 283–290.
139. Savolainen V.M., Chase M.W., Hoot S.B., Morton C.M., Soltis D.E., Bayer C., Fay M.F., de Bruijn A.Y., Sullivan S., Qiu Y.L. Phylogenetics of flowering plants based on combined analysis of plastid *atpB* and *rbcL* gene sequences // Systematic biology. 2000. Vol. 49, № 2. P. 306–362.
140. Schilthuizen M., Gittenberger E., Gultyaev A.P. Phylogenetic relationships inferred from the sequence and secondary structure of ITS1 rRNA in *Albinaria* and putative *Isabellaria* species (Gastropoda, Pulmonata, Clausiliidae) // Molecular Phylogenetics and Evolution. 1995. Vol. 4, № 4. P. 457–462.
141. Schönland S. Crassulaceae // Die Natürlichen Pflanzenfamilien. 1st ed. 3(2a). 1891. P. 23–38.
142. Schultz J., Maisel S., Gerlach D., Müller T., Wolf M. A common core of secondary structure of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) throughout the Eukaryota // Rna. 2005. Vol. 11, № 4. P. 361–364.

143. Schwarz G. Estimating the dimension of a model // *The annals of statistics*. 1978. Vol. 6, № 2. P. 461–464.
144. Soltis D.E., Soltis P.S. Phylogenetic relationships in Saxifragaceae sensu lato: a comparison of topologies based on 18S rDNA and *rbcL* sequences // *American Journal of Botany*. 1997. Vol. 84, № 4. P. 504–522.
145. Soltis D.E., Soltis P.S., Chase M.W., Mort M.E., Albach D.C., Zanis M., Savolainen V., Hahn W.H., Hoot S.B., Fay M.F., Axtell M., Swensen S.M., Nixon K.C., Farris J.S. Angiosperm phylogeny inferred from a combined data set of 18S rDNA, *rbcL*, and *atpB* sequences // *Botanical Journal of the Linnean Society*. 2000. Vol. 133, № 4. P. 381–461.
146. Soltis D.E., Soltis P.S., Endress P.K., Chase M.W. *Phylogeny and evolution of the Angiosperms*. Sinauer Associates Incorporated. 2005. 370 p.
147. Spongberg S.A. The genera of Crassulaceae in the southeastern United States // *Journal of the Arnold Arboretum*. 1978. Vol. 59, № 3. P. 197–248.
148. Stamatakis A., Hoover P., Rougemont J. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers // *Systematic biology*. 2008. Vol. 57, № 5. P. 758–771.
149. Stevens J.F., 't Hart H., Bolck A., Zwaving J.H., Malingré T.M. Epicuticular wax composition of some European *Sedum* species // *Phytochemistry*. 1994. Vol. 35, № 2. P. 389–399.
150. Stevens J.F., 't Hart H., Elema E.T., Bolck A. Flavonoid variation in Eurasian *Sedum* and *Sempervivum* // *Phytochemistry*. 1996. Vol. 41, № 2. P. 503–512.
151. Sugita M., Shinozaki K., Sugiura M. Tobacco chloroplast tRNA^{Lys} (UUU) gene contains a 2.5-kilobase-pair intron: an open reading frame and a conserved boundary sequence in the intron // *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 1985. Vol. 82, № 11. P. 3557–3561.
152. Swofford D.L. *PAUP* Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods)*. Version 4.0b10. Sunderland, MA (USA): Sinauer Associates, Inc. 2002. 142 p.

153. 't Hart H. Biosystematic studies in the Acre group and the series *Rupestria* Berger of the genus *Sedum* L. (Crassulaceae). Utrecht (NL) Ph.D. thesis, University of Utrecht. 1978. 153 p.
154. 't Hart H. The white-flowered European *Sedum* species. 3. The systematic position of *S. stellatum* L // Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen: Series C: Biological and Medical Sciences. 1984. Vol. 87, № 4. P. 401–411.
155. 't Hart H. Evolution and classification of the European *Sedum* species (Crassulaceae) // Flora Mediterranea. 1991. Vol. 1. P. 31–61.
156. 't Hart H. Intrafamilial and generic classification of the Crassulaceae // Evolution and systematics of the Crassulaceae – Leiden: Backhuys Publishers. 1995. P. 159–172.
157. 't Hart H., Alpınar K. *Sedum ince* (Crassulaceae), a new species from southern Anatolia // Edinburgh Journal of Botany. 1999. Vol. 56, № 2. P. 181–194.
158. 't Hart H., Bleij B. *Sedum* // Illustrated handbook of succulent plants: Crassulaceae / Ed. Egli U. Berlin: Heidelberg. New York: Springer. 2005. P. 235–332.
159. 't Hart H., Sandbrink J.M., Csikos I., Ooyen A., van Brederode J. Natural hybrids in *Sedum* (Crassulaceae) 4. The allopolyploid origin of *Sedum rupestre* subsp. *rupestre* (Crassulaceae) // Plant systematics and evolution. 1993. Vol. 184, № 3. P. 195–206.
160. Takhtajan A.L. Diversity and classification of flowering plants. – Columbia University Press. 1997. 620 p.
161. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 // Molecular Biology and Evolution. 2013. Vol. 30, № 12. P. 2725–2729.
162. Thiede J., Egli U. Crassulaceae DC. // Flowering Plants·Eudicots. Springer Berlin Heidelberg. 2007. P. 83–118.

163. Thorne R.F. An updated phylogenetic classification of the flowering plants // *Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany*. 1992. Vol. 13, № 2. P. 365–389.
164. Thorn R.F. The Classification and geography of the flowering plants: Dicotyledons of the class Angiospermae // *The Botanical Review*. 2000. Vol. 66, № 4. P. 441–647.
165. Tinoco I., Uhlenbeck O.C., Levine M.D. Estimation of secondary structure in ribonucleic acids // *Nature*. 1971. Vol. 230, № 5293. P. 362–367.
166. Uhl C.H. Cytotaxonomic studies in the subfamilies Crassuloideae, Kalanchoideae, and Cotyledonoideae of the Crassulaceae // *American Journal of Botany*. 1948. Vol. 35. P. 695–706.
167. Uhl C.H. Some cytotaxonomic problems in the Crassulaceae // *Evolution*. 1961. Vol. 15. P. 375–377.
168. Uhl C.H. Chromosomes and phylogeny of the Crassulaceae // *Cactus and Succulent Journal*. 1963. Vol. 35. P. 80–84.
169. Uhl C.H. Chromosomes of Mexican *Sedum* II. Section *Pachysedum* // *Rhodora*. 1978. Vol. 80, № 824. P. 491–512.
170. Uhl C.H. Chromosomes of Mexican *Sedum* III. Sections *Centripetalia*, *Fruticisedum*, and other woody species // *Rhodora*. 1980. Vol. 82, № 831. P. 377–402.
171. Uhl C.H. Chromosomes of Mexican *Sedum* VI. Section *Sedastrum* // *Rhodora*. 1992. Vol. 94. P. 362–370.
172. van Ham R.C.H.J. Phylogenetic implications of chloroplast DNA variation in the Crassulaceae. Utrecht University: Ph.D. Thesis. 1994. P. 89–104.
173. van Ham R.C.H.J. Phylogenetic relationships in the Crassulaceae inferred from chloroplast DNA variation // *Evolution and Systematics of the Crassulaceae*. 1995. Vol. 85, № 1. P. 16–30.
174. van Ham R.C.H.J., 't Hart H. Evolution of *Sedum* series *Rupestria* (Crassulaceae): evidence from chloroplast DNA and biosystematic data // *Plant Systematics and Evolution*. 1994. Vol. 190, № 1. P. 1–20.

175. 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.

176. van Nues R.W., Rientjes J.M.J., Van der Sande C.A.F.M., Zerp S.F., Sluiter C., Venema J., Planta R.J., Raue H.A. Separate structural elements within internal transcribed spacer 1 of *Saccharomyces cerevisiae* precursor ribosomal RNA direct the formation of 175 and 265 rRNA // *Nucleic Acids Research*. 1994. Vol. 22, № 6. P. 912–919.

177. Vargas P., McAllister H.A., Morton C., Jury S.L., Wilkinson M.J. Polyploid speciation in *Hedera* (Araliaceae): phylogenetic and biogeographic insights based on chromosome counts and ITS sequences // *Plant Systematics and Evolution*. 1999. Vol. 219, № 3. P. 165–179.

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

179. Vitreschak A.G., Rodionov D.A., Mironov A.A., Gelfand M.S. Riboswitches: the oldest mechanism for the regulation of gene expression? // *Trends in Genetics*. 2004. Vol. 20, № 1. P. 44–50.

180. Vogel J., Hübschmann T., Börner T., Hess W.R. Splicing and intron-internal RNA editing of *trnK-matK* transcripts in barley plastids: support for *matK* as an essential splicing factor // *Journal of Molecular Biology*. 1997. Vol. 270, № 2. P. 179–187.

181. Wan Y., Kertesz M., Spitale R.C., Segal E., Chang H.Y. Understanding the transcriptome through RNA structure // *Nature Reviews Genetics*. 2011. Vol. 12, № 9. P. 641–655.

182. 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, № 2. P. 167–177.

183. Wendel J.F., Schnabel A., Seelanan T. Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*) // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1995. Vol. 92, № 1. P. 280–284.
184. Wheeler W.C., Honeycutt R.L. Paired sequence difference in ribosomal RNAs: evolutionary and phylogenetic implications // Molecular Biology and Evolution. 1988. Vol. 5, № 1. P. 90–96.
185. White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // PCR protocols: a guide to methods and applications. 1990. Vol. 18, № 1. P. 315–322.
186. Whitten W.M., Williams N.H., Chase M.W. Subtribal and generic relationships of Maxillarieae (Orchidaceae) with emphasis on Stanhopeinae: combined molecular evidence // American Journal of Botany. 2000. Vol. 87, № 12. P. 1842–1856.
187. Wicke S., Quandt D. Universal primers for the amplification of the plastid *trnK/matK* region in land plants // Anales Del Jardin Botánico De Madrid. 2009. Vol. 66, № 2. P. 285–288.
188. Wolf M., Achtziger M., Schultz J., Dandekar T., Müller T. Homology modeling revealed more than 20,000 rRNA internal transcribed spacer 2 (ITS2) secondary structures // RNA. 2005. Vol. 11, № 11. P. 1616–1623.
189. Wolf M. ITS so much more // Trends in Genetics. 2015. Vol. 31, № 4. P. 175–176.
190. Yeh L.C.C., Lee J.C. Structural analysis of the internal transcribed spacer 2 of the precursor ribosomal RNA from *Saccharomyces cerevisiae* // Journal of Molecular Biology. 1990. Vol. 211, № 4. P. 699–712.
191. Young N.D., dePamphilis C.W. Purifying selection detected in the plastid gene *matK* and flanking ribozyme regions within a group II intron of nonphotosynthetic plants // Molecular Biology and Evolution. 2000. Vol. 17, № 12. P. 1933–1941.
192. Zhang W., Yuan Y., Yang S., Huang J., Huang L. ITS2 Secondary Structure Improves Discrimination between Medicinal “Mu Tong” Species when Using DNA Barcoding // PloS one. 2015. Vol. 10, № 7. e0131185.

193. Zimmer E.A., Martin S.L., Beverley S.M., Kan Y.W., Wilson A.C. Rapid duplication and loss of genes coding for the alpha chains of hemoglobin // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1980. Vol. 77, № 4. P. 2158–2162.
194. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction // Nucleic Acids Research. 2003. Vol. 31, № 13. P. 3406–3415.
195. Zuker M., Sankoff D. RNA secondary structures and their prediction // Bulletin of mathematical biology. 1984. Vol. 46, № 4. P. 591–621.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1 – Список последовательностей, использованных в данном исследовании

Имя таксона и его автор(ы)	Номер доступа ITS	Номер доступа <i>matK</i>	Номер ваучера
<i>Aeonium tabuliforme</i> (Haworth) Webb & Berthelot	–	AF115577	–
<i>A. undulatum</i> Webb & Berthelot	AY082151	AF115580	–
<i>Aichryson palmense</i> Webb ex Bolle	AY082104	AY082156	–
<i>Cremonophila linguifolia</i> (Lemaire) Moran	AY545679	AF115603	–
<i>C. nutans</i> Rose	AY545680	–	–
<i>Dudleya attenuata</i> (S. Watson) Moran	AY54568	–	–
<i>D. attenuata</i> (S. Watson) Moran	JX960495	–	–
<i>D. candelabrum</i> Rose	–	AF115605	–
<i>D. edulis</i> (Nuttall) Moran	JX960511	–	–
<i>D. greenei</i> Rose	KC426971	AF115606	–
<i>D. linearis</i> (Greene) Britton & Rose	JX960518	–	–
<i>D. pulverulenta</i> (Nuttall) Britton & Rose	EF632171	–	–
<i>D. variegata</i> (S. Watson) Moran	JX960527	–	–
<i>D. virens</i> subsp. <i>extima</i> Moran	JX960529	–	–
<i>D. viscida</i> (S. Watson) Moran	JX960530	AF115604	–
<i>Echeveria amoena</i> De Smet	EF632172	–	–
<i>E. coccinea</i> (Cavanilles) DC.	AY545682	–	–
<i>E. colorata</i> E. Walther	AY545683	–	–
<i>E. elegans</i> Rose (<i>E. potosina</i> E. Walther)	AY545686	–	–
<i>E. fulgens</i> Lemaire	AY545684	AF115607	–
<i>E. gibbiflora</i> E. Walther	AY545685	–	–
<i>E. juarezensis</i> E. Walther	FJ753914	–	–
<i>E. megacalyx</i> E. Walther	FJ753916	–	–
<i>E. pringlei</i> (S. Watson) Rose	AY545687	–	–
<i>E. pulvinata</i> Rose	AY545688	–	–
<i>E. purpusorum</i> Berger	FJ753919	–	–
<i>E. racemosa</i> Schlechtendal & Chamisso	FJ753920	–	–
<i>E. rosea</i> Lindley	–	AF115609	–
<i>E. secunda</i> Booth (<i>E. pumila</i> Van Houtte)	–	AF115608	–
<i>E. setosa</i> Rose & Purpus	AY545689	–	–
<i>Graptopetalum amethystinum</i> (Rose) E. Walther	AY545690	–	–
<i>G. bartramii</i> Rose	AY545691	–	–
<i>G. bellum</i> (Moran & Meyrán) D.R. Hunt (<i>Tacitus bellus</i> Moran & Meyrán)	AY545718	–	–

Продолжение таблицы 1

Имя таксона и его автор(ы)	Номер доступа ITS	Номер доступа matK	Номер ваучера
<i>G. bellum</i> (Moran & Meyrán) D.R. Hunt (<i>Tacitus bellus</i> Moran & Meyrán)	JX960526	–	–
<i>G. filiferum</i> (S. Watson) J. Whitehead	AY545694	–	–
<i>G. fruticosum</i> Moran	AY545695	AF115610	–
<i>G. grande</i> Alexander	AY545697	–	–
<i>G. macdougallii</i> Alexander	AY545698	AF115611	–
<i>G. marginatum</i> Kimnach & Moran	AY545699	–	–
<i>G. mendozae</i> Glass & M. Cházaro	AY545700	–	–
<i>G. pachyphyllum</i> Rose	AY545701	–	–
<i>G. paraguayense</i> ssp. <i>bernalense</i> Kimnach & Moran	AY545692	–	–
<i>G. pentandrum</i> Moran	AY545703	–	–
<i>G. pentandrum</i> ssp. <i>superbum</i> Kimnach (<i>Graptopetalum superbum</i> (Kinnach) Acev.-Rosas)	AY545708	–	–
<i>G. pusillum</i> Rose	AY545704	–	–
<i>G. rusbyi</i> (Greene) Rose	AY545705	–	–
<i>G. saxifragoides</i> Kimnach	AY545706	–	–
<i>Lenophyllum acutifolium</i> Rose	AY545709	AF115625	–
<i>Monanthes laxiflora</i> (DC.) Bolle ex Bornmüller	AY082116	AY082266	–
<i>M. minima</i> (Bolle) Christ	AY082119	AY082160	–
<i>M. muralis</i> (Webb ex Bolle) Hooker (<i>Monanthes subcrassicaulis</i> (Kuntze) Praeger)	AY082117	–	–
<i>Pachyphytum compactum</i> Rose	–	AF115632	–
<i>P. kinnachii</i> Moran	FJ753927	AF115633	–
<i>P. viride</i> E. Walther	AY545711	–	–
<i>Prometheum aizoon</i> (Fenzl) 't Hart (<i>Rosularia pallida</i> (Schott & Kotschy) Stapf)	–	AF115635	–
<i>P. chrysanthum</i> (Boissier) 't Hart	HE999634	KX452252	Stephenson 4R022
<i>P. sp.</i>	LM993275	KX452253	Doboš P.011
<i>P. tymphaeum</i> (Quézel & Contandriopoulos) 't Hart	LM993276	KX452251	Doboš P.015
<i>Rosularia platyphylla</i> (Schrenk) Berger	–	KC988294	–

Продолжение таблицы 1

Имя таксона и его автор(ы)	Номер доступа ITS	Номер доступа <i>matK</i>	Номер ваучера
<i>R. serrata</i> (L.) Berger	HE999631	KX452249	Stephenson V038
<i>R. serrata</i> (L.) Berger	–	AF115636	–
<i>R. sp.</i>	–	KX452250	Doboš R.12
<i>Sedum acre</i> L.	LM993284	–	Doboš SED.006
<i>S. acre</i> L.	HE999635	–	Stephenson 5.01.027 tetraploid
<i>S. acre</i> L.	HE999636	–	Stephenson 5.01.011 diploid
<i>S. adolphii</i> Hamet	HE999637	–	Stephenson 0.01.002
<i>S. alamosanum</i> S. Watson	FJ753929	–	–
<i>S. album</i> L.	–	KJ204537	–
<i>S. album</i> L.	HE999638	–	Stephenson 5.33.022
<i>S. album</i> L.	LM993277	KX452258	Doboš SED.001
<i>S. alexanderi</i> Egli	EF632174	–	–
<i>S. alfredii</i> Hance	–	FJ919944	–
<i>S. alfredii</i> Hance	FJ919946	FJ919936	–
<i>S. allantoides</i> Rose	AY545712	–	–
<i>S. alpestre</i> Villars	HE999639	–	Stephenson V001
<i>S. amplexicaule</i> ssp. <i>tenuifolium</i> (Sibthorp & Smith) Greuter & Burdet	HE999640	KX452243	Stephenson 5.25.011
<i>S. andinum</i> Ball	FJ753930	–	–
<i>S. anglicum</i> Hudson	HE999641	KX452281	Stephenson 5.13.009
<i>S. annuum</i> L.	HE999642	–	Stephenson V002
<i>S. apoleipon</i> 't Hart	HE999643	KX452276	Stephenson 5.04.001
<i>S. baileyi</i> Praeger	FJ919935	FJ919945	–
<i>S. batesii</i> Hemsley	FJ753931	–	–
<i>S. bergeri</i> Hamet	AY352897	–	–
<i>S. bourgaei</i> Hemsley	FJ753932	–	–

Продолжение таблицы 1

Имя таксона и его автор(ы)	Номер доступа ITS	Номер доступа matK	Номер ваучера
<i>S. brevifolium</i> DC.	HE999644	KX452260	Stephenson 5.35.001
<i>S. brevifolium</i> DC.	LM993278	KX452261	Hornát S5
<i>S. brissemoretii</i> Hamet	HE999645	–	Stephenson V003
<i>S. burrito</i> Moran	–	AF115655	–
<i>S. bulbiferum</i> Makino	AB088628	AF115652	–
<i>S. bulbiferum</i> Makino	JQ954567	–	–
<i>S. catorce</i> G.L. Nesom	FJ753935	–	–
<i>S. cepaea</i> L.	HE999646	KX452248	Stephenson V022
<i>S. chazaroi</i> P. Carrillo & J.A. Lomelí	FJ753936	–	–
<i>S. chloropetalum</i> R.T. Clausen	FJ753937	–	–
<i>S. clavatum</i> R.T. Clausen	AY545713	AF115660	–
<i>S. cockerellii</i> Britton	HE999647	–	Stephenson 223
<i>S. commixtum</i> Moran & Hutchison	FJ753938	AF115656	–
<i>S. compactum</i> Rose	EF632175	–	–
<i>S. confusum</i> Hemsley	HE999648	–	Stephenson 0.06.001
<i>S. corynephyllum</i> Fröderström	AY545715	–	–
<i>S. craigii</i> R.T. Clausen	HE999649	–	Stephenson 0.08.001
<i>S. craigii</i> R.T. Clausen (<i>Graptopetalum craigii</i> (R.T.Clausen) R.T.Clausen)	AY545693	–	–
<i>S. dasyphyllum</i> L.	–	AF115657	–
<i>S. dasyphyllum</i> L.	HE999682	–	Gontcharov ESP_Asturia _070725
<i>S. dasyphyllum</i> L.	HE999684	–	Gontcharov ITA_Toskana _070518
<i>S. dasyphyllum</i> L.	LM993279	–	Hornát S35
<i>S. dasyphyllum</i> ssp. <i>glanduliferum</i> (Gussone) Moris	HE999650	KX452266	Stephenson 5.38.006
<i>S. debile</i> S. Watson	HE999651	KX452265	Stephenson V030
<i>S. dendroideum</i> DC.	HE999652	–	Stephenson ISI1681
<i>S. ebracteatum</i> DC.	HE999653	–	Stephenson 0.47.004

Продолжение таблицы 1

Имя таксона и его автор(ы)	Номер доступа ITS	Номер доступа matK	Номер ваучера
<i>S. emarginatum</i> Migo	EU592006	–	–
<i>S. farinosum</i> Lowe	–	AF115658	–
<i>S. farinosum</i> Lowe	HE999654	KX452280	Stephenson V023
<i>S. forsterianum</i> Smith	HE999655	–	Stephenson 5.26.013
<i>S. fragrans</i> 't Hart	HE999656	KX452254	Stephenson 5.39.001
<i>S. frutescens</i> Rose	HE999657	–	Stephenson 0.29.0026
<i>S. furfuraceum</i> Moran	–	AF115659	–
<i>S. fuscum</i> Hemsley	FJ753941	–	–
<i>S. fusiforme</i> Lowe	–	AF115638	–
<i>S. goldmanii</i> (Rose) Moran (<i>Villadia batesii</i> (Hemsley) Baehni & Macbride)	EF632186	–	–
<i>S. gracile</i> C.A. Meyer	–	AF115650	
<i>S. gracile</i> C.A. Meyer	HE999658	–	Stephenson V024
<i>S. grandisepalum</i> R.T. Clausen	FJ753942	–	–
<i>S. grandyi</i> Hamet	HE999659	–	Stephenson 0.87.001
<i>S. greggii</i> ssp. <i>angustifolium</i> R.T. Clausen	FJ753944	–	–
<i>S. grisebachii</i> var. <i>horakii</i> (Rohlena) 't Hart	LM993280	KX452282	Hornát S4
<i>S. griseum</i> Praeger	HE999660	–	Stephenson 0.30.002
<i>S. guatemalense</i> Hemsley	FJ753945	–	–
<i>S. gypsophilum</i> B.L. Turner	FJ753946	–	–
<i>S. hakonense</i> Makino	AB088625	–	–
<i>S. hemsleyanum</i> Rose	FJ753947	AF115661	–
<i>S. hirsutum</i> Allioni	HE999661	KX452259	Stephenson 229
<i>S. cf. hirsutum</i> Allioni	HE999681	–	Gontcharov ESP_Asturia _070725
<i>S. hirsutum</i> ssp. <i>baeticum</i> Rouy	HE999662	–	Stephenson V025
<i>S. hispanicum</i> L.	–	AF115662	–

Продолжение таблицы 1

Имя таксона и его автор(ы)	Номер доступа ITS	Номер доступа <i>matK</i>	Номер ваучера
<i>S. hispanicum</i> L.	HE999686	KX452255	Gontcharov POL_hort_00 60528
<i>S. hispanicum</i> L.	HE999663	–	Stephenson V026
<i>S. hultenii</i> Fröderström	HE999664	–	Stephenson 0.13.001
<i>S. jaccardianum</i> Maire & Wilczek	AY082100	AF115637	–
<i>S. jurgensenii</i> (Hemsley) Moran	FJ753949	–	–
<i>S. jurgensenii</i> ssp. <i>attenuatum</i> Moran	FJ753950	–	–
<i>S. laconicum</i> Boissier & Heldreich	–	AF115642	–
<i>S. lagascae</i> Pau (<i>Sedum campanulatum</i> (Willkomm) Fernández González & Cantó)	FJ897739	–	–
<i>S. lancerottense</i> Murray	–	AF115641	–
<i>S. liebmannianum</i> Hemsley	FJ753952	–	–
<i>S. lineare</i> Thunberg	FJ980313	–	–
<i>S. lineare</i> Thunberg	AB088623	–	–
<i>S. longipes</i> Rose	FJ753953	–	–
<i>S. magellense</i> Tenore	–	AF115644	–
<i>S. makinoi</i> Maximowicz	AB088627	–	–
<i>S. mexicanum</i> Britton	AB088621	–	–
<i>S. mocinianum</i> Pérez-Calix	HE999666	–	Stephenson 0.52.001
<i>S. modestum</i> Ball	AY082101	AF115639	–
<i>S. montanum</i> Songeon & E. P. Perrier	HE999667	KX452241	Stephenson 5.27.15
<i>S. cf. montanum</i> Songeon & E. P. Perrier	HE999685	–	Gontcharov ITA_Toscana _070519
<i>S. moranense</i> Kunth	FJ753954	–	–
<i>S. moranense</i> Kunth	HE999668	–	Stephenson 0.58.005
<i>S. morissonense</i> Hayata	–	AF115651	–
<i>S. morissonense</i> Hayata	LM993281	KX452271	Hornát S1
<i>S. multicaule</i> Wallich ex Lindley	AB088631	–	–
<i>S. multiceps</i> Cosson & Durand	–	AF115645	–
<i>S. multiceps</i> Cosson & Durand	HE999670	–	Stephenson 8.05.003

Продолжение таблицы 1

Имя таксона и его автор(ы)	Номер доступа ITS	Номер доступа <i>matK</i>	Номер ваучера
<i>S. multiceps</i> Cosson & Durand	LM993282	–	Hornát S49
<i>S. nudum</i> Aiton	–	AF115646	–
<i>S. nudum</i> Aiton	HE999671	–	Stephenson V004
<i>S. nussbaumerianum</i> Bitter	FJ753956	–	–
<i>S. oaxacanum</i> Rose	AY545716	AF115664	–
<i>S. obcordatum</i> R.T. Clausen	FJ753957	AF115665	–
<i>S. ochroleucum</i> Chaix	HE999672	KX452242	Stephenson 5.28.043
<i>S. oreades</i> (Decaisne) Hamet	AB088632	–	–
<i>S. oreganum</i> Nuttall	HE999673	KX452264	Stephenson 9.12.006
<i>S. oxypetalum</i> Kunth	FJ753958	–	–
<i>S. pacense</i> J. Meyran	FJ753959	–	–
<i>S. pachyphyllum</i> Rose	FJ753960	–	–
<i>S. pallidum</i> M. von Bieberstein	HE999674	KX452256	Stephenson 5.19.005
<i>S. palmeri</i> S. Watson	AY545717	–	–
<i>S. plicatum</i> Thiede & 't Hart	FJ753961	–	–
<i>S. polytrichoides</i> Hemsley (<i>Sedum yabeanum</i> Makino)	AB088626	–	–
<i>S. quevae</i> Hamet	FJ753962	–	–
<i>S. reptans</i> R.T. Clausen (<i>Sedum carinatifolium</i> (R.T.Clausen) Pérez-Calix)	FJ753934	–	–
<i>S. retusum</i> Hemsley	FJ753964	–	–
<i>S. rubrotinctum</i> R.T. Clausen	–	AF115666	–
<i>S. rupestre</i> L.	–	AF115667	–
<i>S. rupestre</i> L.	–	KJ746204	–
<i>S. rupestre</i> L.	HE999675	–	Stephenson 275
<i>S. sarmentosum</i> Bunge	AB088624	–	–
<i>S. sarmentosum</i> Bunge	EU592003	AF115649	–
<i>S. satumense</i> Hatusima	HE999676	KX452272	Stephenson V017
<i>S. sediforme</i> (Jacquin) Pau	–	AF115640	–
<i>S. sediforme</i> (Jacquin) Pau	HE999683	KX452240	Gontcharov ESP_Astur_0 70724
<i>S. sedoides</i> (Decaisne) Pau ex Vidal y Lopez (<i>Sempervivella alba</i> (Edgeworth) Stapf)	–	AF115677	–

Продолжение таблицы 1

Имя таксона и его автор(ы)	Номер доступа ITS	Номер доступа matK	Номер ваучера
<i>S. sedoides</i> (Decaisne) Pau ex Vidal y Lopez	HE999677	–	Stephenson V036
<i>S. sexangulare</i> L.	–	AF115668	–
<i>S. sexangulare</i> L.	HE999679	–	Stephenson 5.09.005
<i>Sedum</i> sp. 1	LM993283	KX452270	Gontcharov JPN _hort_090215
<i>Sedum</i> sp. 2	LM993285	–	Gontcharov KOR_hort_1 121024
<i>Sedum</i> sp. 3	LM993286	KX452275	Gontcharov JPN _hort_090215
<i>Sedum</i> sp. 4	LM993287	KX452257	Gontcharov JPN_hort_09 0215
<i>Sedum</i> sp. 5	HE999691	–	Stephenson 9.18.004
<i>Sedum</i> sp. 6	HE999669	–	Stephenson V010
<i>S. spathulifolium</i> Hooker	JX960524	–	–
<i>S. spathulifolium</i> ssp. <i>purdyi</i> (Jepson) R.T. Clausen	HE999687	KX452263	Stephenson 9.15.001
<i>S. stefco</i> Stefanoff	–	KX452268	Doboš SED.007
<i>S. stefco</i> Stefanoff	HE999688	KX452269	Stephenson 5.12.002
<i>S. suaveolens</i> Kimnach (<i>Graptopetalum suaveolens</i> (Kimmach) R.T.Clausen)	AY545707	–	–
<i>S. subtile</i> Miquel	AB088622	–	–
<i>S. subtile</i> Miquel	–	KX452273	Stephenson 273
<i>S. subulatum</i> (C.A. Meyer) Boissier	HE999689	–	Stephenson V027
<i>S. surculosum</i> var. <i>luteum</i> (Emberger) Maire	HE999690	–	Stephenson 8.08.001
<i>S. surculosum</i> var. <i>luteum</i> (Emberger) Maire	LM993288	KX452239	Hornát S2
<i>S. ternatum</i> Michaux	–	AF115670	–

Продолжение таблицы 1

Имя таксона и его автор(ы)	Номер доступа ITS	Номер доступа matK	Номер ваучера
<i>S. ternatum</i> Michaux	HE999633	KX452262	Stephenson 277
<i>S. tosaense</i> Makino	AB088620	–	–
<i>S. treleasei</i> Rose	FJ753966	–	–
<i>S. triactina</i> Berger	AB088629	–	–
<i>S. trichromum</i> R.T. Clausen	FJ753967	–	–
<i>S. trullipetalum</i> Hooker fil. & Thomson	AB088630	–	–
<i>S. tuberiferum</i> Stojanov & Stefanoff	HE999692	KX452278	Stephenson 5.00.004
<i>S. uniflorum</i> ssp. <i>japonicum</i> (Siebold ex Miquel) H. Ohba (<i>S. japonicum</i> Siebold ex Miq.)	AB088617	–	–
<i>S. uniflorum</i> ssp. <i>japonicum</i> (Siebold ex Miquel) H. Ohba	–	KX452274	Stephenson V018
<i>S. uniflorum</i> ssp. <i>oryzifolium</i> (Makino) H. Ohba (<i>S. oryzifolium</i> Makino)	AB088618	AF115647	–
<i>S. uniflorum</i> ssp. <i>oryzifolium</i> (Makino) H. Ohba (<i>S. oryzifolium</i> Makino)	–	KM281675	–
<i>S. ursi</i> 't Hart	HE999693	KX452279	Stephenson 5.11.003
<i>S. urvillei</i> DC.	–	AF115648	–
<i>S. urvillei</i> DC.	HE999694	KX452277	Stephenson 5.12.020
<i>S. versadense</i> C.H. Thompson	FJ753968	–	–
<i>S. villosum</i> L.	HE999695	KX452267	Stephenson 5.48.001
<i>S. vinicolor</i> S. Watson	FJ753969	–	–
<i>S. wrightii</i> A. Gray	FJ753970	–	–
<i>S. zentaro-tashiroi</i> Makino	AB088619	–	–
<i>Sempervivum ciliosum</i> Craib	HE999696	–	Stephenson 277
<i>Semp. globiferum</i> ssp. <i>allionii</i> (Jordan & Fourreau) 't Hart & Bleij	HE999697	KX452246	Stephenson 261
<i>Semp. montanum</i> L.	HE999698	–	Stephenson 5.27.15
<i>Semp. altum</i> Turrill	LM993289	KX452244	Hornát S22
<i>Semp. armenum</i> Boissier & Huet	LM993290	–	Hornát S33
<i>Semp. caucasicum</i> Ruprecht ex Boissier	LM993291	KX452247	Hornát S8
<i>Semp. dzhavachischvilii</i> Gurgenzidze	LM993292	–	Hornát S21
<i>Semp. marmoreum</i> Grisebach	LM993294	KX452245	Hornát S9

Окончание таблицы 1

Имя таксона и его автор(ы)	Номер доступа ITS	Номер доступа <i>matK</i>	Номер ваучера
<i>Semp. marmoreum</i> ssp. <i>reginae-amaliae</i> Heldreich & Sartori ex Boissier	HE999699	–	Stephenson LJUBOTIH
<i>Semp. ossetiense</i> Wale	LM993293	–	Hornát S11
<i>Thompsonella colliculosa</i> Moran	EF632177	–	–
<i>T. minutiflora</i> (Rose) Britton & Rose	EF632179	AF115681	–
<i>T. minutiflora</i> (Rose) Britton & Rose	AY545719	–	–
<i>T. mixtecana</i> Reyes & L. López	EF632180	–	–
<i>T. platyphylla</i> Rose	EF632182	–	–
<i>T. spathulata</i> Kimmach	AY545720	–	–
<i>T. xochipalensis</i> Gual, Peralta & Pérez-Calix	EF632184	–	–
<i>T. garcia-mendozae</i> P. Carrillo & Pérez-Calix	EF632178	–	–
<i>Thompsonella</i> sp.	EF632181	–	–
<i>Villadia albiflora</i> (Hemsley) Rose	FJ753971	–	–
<i>V. aristata</i> Moran	EF632185	–	–
<i>V. cucullata</i> Rose	FJ753972	–	–
<i>V. diffusa</i> Rose	FJ753973	–	–
<i>V. imbricata</i> Rose	EF632187	AF115686	–
<i>V. incarum</i> (Ball) Baehni & Macbride	FJ753974	–	–
<i>V. minutiflora</i> Rose	FJ753975	–	–
<i>V. misera</i> (Lindley) R.T. Clausen	FJ753976	–	–
<i>V. nelsonii</i> Rose	FJ753977	–	–
<i>V. pringlei</i> Rose	FJ753978	–	–
<i>V. recurva</i> Moran & al.	FJ753979	–	–
<i>Villadia</i> sp.	FJ753980	–	–

Примечание: Номера ваучеров представлены только для последовательностей, полученных в настоящей работе (обозначены жирным шрифтом). Имена таксонов соответствуют 't Hart и Bleij (2005). В скобках указаны имена, использованные исследователями в GenBank.