

МОЛЕКУЛЯРНО-ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА *RANUNCULACEAE* НА ОСНОВЕ ДНК-БАРКОДИРОВАНИЯ ВО ФЛОРЕ КАРАГАНДИНСКОЙ ОБЛАСТИЖұмабай Н.Б.¹ , Сутула М.Ю.¹ , Ишмуратова М.Ю.² , Беккужина С.С.¹ , Манабаева Ш.А.¹ * ¹ТОО «Национальный центр биотехнологии», Кургальжинское шоссе 13/5, Астана, 010000, Казахстан²НАО «Карагандинский университет имени академика Е.А. Букетова», Казахстан, Караганда, ул. Университетская, 28

* Автор для корреспонденции: manabayeva@biocenter.kz

АБСТРАКТ

Семейство *Ranunculaceae* представляет собой одну из наиболее разнообразных групп покрытосеменных растений, включающую виды с высокой экологической и фармакологической значимостью. В данной работе проведен молекулярно-филогенетический анализ 19 видов *Ranunculaceae* флоры Карагандинской области, включая редкие и охраняемые виды *Anemone patens*, *Adonis volgensis* и *Adonis vernalis*. Для исследования использованы маркеры *rbcL*, *matK*, *trnH-psbA* и *ITS*, а филогенетические деревья построены методом максимального правдоподобия (ML) с бутстрап-поддержкой.

Результаты показали, что маркер *ITS* обладает наибольшей дискриминационной способностью на видовом уровне (17,64%), тогда как *rbcL*, *matK* и *trnH-psbA* обеспечивают надежную классификацию на уровне триб и родов. Филогенетический анализ подтвердил четкое разделение подсемейства *Thalictrioideae* и *Ranunculoideae* с высокой бутстрап-поддержкой (0.87 и 0.90 соответственно). Внутри *Ranunculoideae* трибы *Ranunculeae*, *Anemoneae*, *Delphinieae* и *Adonideae* сформировали стабильные клады (>0.84). *Anemone patens* был четко выделен на видовом уровне (0.97).

Полученные данные уточняют таксономические взаимоотношения *Ranunculaceae* в регионе и подчеркивают необходимость комбинированного использования нескольких маркеров ДНК. Настоящее исследование впервые предоставляет молекулярные данные по редким видам *Ranunculaceae* Казахстана, что имеет важное для их мониторинга и сохранения.

Ключевые слова: *Ranunculaceae*, *rbcL*, *trnH-psbA*, *matK*, *ITS*, ДНК-баркодирование, молекулярная филогенетика.

ВВЕДЕНИЕ

Семейство *Ranunculaceae* Juss. включает 59 родов и около 2500 видов растений [1]. Примерно 20 родов и 1200 видов являются уникальными для определенных регионов. На сегодняшний день было идентифицировано пять регионов, содержащих по крайней мере один уникальный род: Восточная Азия, атлантические регионы Северной Америки, Анды, Чили-Патагония и Иран-Туран [2]. К наиболее распространенным родам семейства лютиковых относятся *Aconitum* L., *Anemone* L., *Clematis* L., *Delphinium* Tourn. ex L. и *Ranunculus* L., на долю которых приходится примерно 90% всех видов семейства [3]. Во флоре Казахстана зарегистрировано 181 вид из 27 различных родов *Ranunculaceae*, при этом наибольшее видовое разнообразие отмечено в Алтайском крае (85 видов), а также в Джунгарском (79 видов) и Заилийском Алатау (83 вида) [4]. Девять видов семейства являются эндемиками Казахстана [5].

Растения семейства *Ranunculaceae* издавна известны своими лечебными свойствами, благодаря содержанию множества различных биологически активных соединений. Наиболее распространенные классы соединений включают бензилизохинолины, бисбензилизохинолины, апорфиноиды (например, магнофлорин) и протоберберины [6]. В традиционной китайской медицине представители рода *Aconitum* использовались в качестве обезболивающего средства при лечении таких заболеваний, как ревматоидный артрит [7]. Одним из наиболее изученных дитерпеноидных алкалоидов из рода *Aconitum* является аконитин. Сообщалось, что аконитин и его производные

проявляют обезболивающее, противовоспалительное и антиаритмическое действие [8]. Для рода *Ranunculus* на данный момент известно 116 биологически активных соединений, включая флавоноиды, тритерпеноиды, сапонины и алкалоиды [9]. Виды рода *Consolida* содержат около 143 различных соединений, среди которых 126 алкалоидов, 17 флавоноидов, а также фенольные кислоты и фитостеролы. Эти соединения обладают инсектицидными, антипаразитарными, противогрибковыми, противовирусными, противоопухолевыми и антиоксидантными свойствами [10]. Сообщалось, что в пределах трибы *Delphinieae* (включающей роды *Aconitum*, *Delphinium* и *Consolida*) идентифицировано 104 флавоноида, из которых 85 представлены флавонолами (в основном кемпферолом или кверцетином) и 13 – антоцианами [11].

Долгое время естественность семейства *Ranunculaceae*, его подсемейств и отдельных родов оставалась предметом дискуссий, так как филогенетические связи между родами и внутри семейства были изучены недостаточно. Классификация основывалась преимущественно на морфологических признаках, таких как строение цветка, число тычинок и особенности плодов, что не всегда отражало истинные эволюционные взаимоотношения. Данное семейство тесно связано с семейством *Berberidaceae* Juss. семейство и входит в порядок *Ranunculales* Juss., наряду с *Menispermaceae* Juss., *Circaeasteraceae* Hutch., *Lardizabalaceae* R.Br., *Papaveraceae* Juss. и *Eupteleaceae* K.Wilh. [12]. В 1968 году Tamura M. на основе числа хромосом и морфологических особенностей цветка, выделил шесть подсемейств: *Hydrastidoideae* Engl., *Thalictrioideae*

Raf., *Ranunculoideae* Arn., *Helleboroideae* DC., *Coptidoideae* Langlet. и *Isopyroideae* Tamura [13]. Однако в 1997 году Ro и соавторы, изучая ядерную ДНК 26S рибосом, предложил альтернативную классификацию, в которой выделено только четыре подсемейства: *Hydrastidoideae*, *Coptidoideae*, *Thalicthroideae* и *Ranunculoideae* [14]. Дальнейшие молекулярно-филогенетические исследования, проведенные с использованием маркеров хлоропластной и ядерной ДНК, внесли значительные коррективы в систематику семейства. В 2009 году Wang и соавторы представили обновленную классификацию, основанную на анализе четырех молекулярных локусов (трех пластидных и одного ядерного) и 65 морфологических признаков, цитологических данных и четырех хемотаксономических маркеров. Согласно их результатам, семейство *Ranunculaceae* было разделено на пять подсемейств: *Glaucidoideae*, *Hydrastidoideae*, *Thalicthroideae*, *Coptidoideae* и *Ranunculoideae* [15]. Первый молекулярный анализ филогенетического родства этого семейства был проведен в 1991 году Йоханссоном и Янсенем [16]. С тех пор было опубликовано несколько филогенетических исследований, основанных на картировании сайтов рестрикции [17-19], ядерных маркеров [14], пластидных локусов [20, 21]. Однако большинство работ включают комплексное изучение, комбинируя данные хлоропластного и ядерного геномов

[12, 22, 23].

Баркодирование ДНК используется с 2003 года как эффективный метод для идентификации видов и анализа их экологических и эволюционных взаимосвязей. Этот подход также помогло ускорить таксономические открытия. Стандартизированный ДНК-баркод представляет собой короткий (менее 1000 пар оснований) и высоковариабельный участок генома, обладающий достаточной степенью изменчивости для различения видов [24]. В 2009 году рабочая группа CBOL (Consortium for the Barcode of Life) провела масштабное исследование растительного мира, в ходе которого было изучено 907 образцов, относящихся к 445 видам покрытосеменных, 38 видам голосеменных и 67 видов криптогам. В рамках исследования были секвенированы семь участков пластидной ДНК, рассматриваемых в качестве потенциальных кандидатов на роль штрих-кодов: межгенный спейсер *atpF-atpH*, гены *matK*, *rbcL*, *rpoB*, *rpoC1*, межгенные спейсеры *psbK-psbI* и *trnH-psbA*. Впоследствии было установлено, что четыре маркерных участка (*rbcL*, *matK*, *trnH-psbA* и *ITS*) обладают наибольшей дискриминационной способностью и приняты в качестве универсальных стандартов для ДНК-баркодирования всех видов растений. Эти исследования способствовали внедрению платформы для создания централизованной базы данных ДНК-баркодов [25].

Таблица 1. Список исследуемых видов семейства *Ranunculaceae*

№	Ваучер	Название вида	<i>rbcL</i>	<i>psbA</i>	<i>matK</i>	<i>ITS</i>
1	KG23-0004	<i>Aconitum leucostomum</i> Vorosch.	PP255372	PP255376	PP255370	PP230925
2	KG23-0006	<i>Adonis parviflora</i> Fisch. ex DC.	OR568450	OR614064	OR575904	-
3	KG23-0414	<i>Adonis vernalis</i>	OR640468	-	OR508851	OR676323
4	KG23-0418	<i>Adonis vologensis</i>	OR508929	OR515596	OR508927	OR507075
5	KG23-0020	<i>Anemone sylvestris</i> (L.) Galasso, Banfi & Soldano	PP869839	-	PP855889	PP750371
6	KG23-0090	<i>Clematis alpina</i> subsp. <i>sibirica</i> (L.) Kuntze	PP869836	-	PP855887	PP750369
7	KG23-0108	<i>Delphinium elatum</i> L.	PP255375	PP255378	-	PP230928
8	KG23-0174	<i>Halerpestes salsuginosa</i> Greene	PP255374	PP255377	-	PP230927
9	KG23-0415	<i>Anemone patens</i>	OR640469	OR700212	-	OR676324
10	KG23-0297	<i>Anemone patens</i> subsp. <i>multifida</i> (Pritz.) Zämelis	OR508835	OR508834	OR505056	OR502003
11	KG23-0300	<i>Ranunculus auricomus</i> L.	OR557604	OR614065	-	OR574288
12	KG23-0301	<i>Ceratocephala falcata</i> L.	PP869840	PP836048	-	PP750372
13	KG24-0052	<i>Ranunculus grandiflorus</i>	PQ247191	PQ247216	-	PQ236540
14	KG24-0028	<i>Ranunculus platyspermus</i> Fisch. ex DC	PQ118035	PQ112616	-	PQ111469
15	KG23-0302	<i>Ranunculus polyrhizos</i> Stephan ex Willd.	OR508928 OR660063	OR685120	-	OR502004 OR661874
16	KG24-0032	<i>Ranunculus testiculatus</i> Crantz	PQ118036	PQ112617	-	PQ111470
17	KG23-0303	<i>Ranunculus trichophyllus</i> Chaix	PP869837	PP836047	-	PP750370
18	KG23-0363	<i>Thalictrum flavum</i> L.	PP869838	-	PP855888	-
19	KG24-0024	<i>Thalictrum foetidum</i> L.	PQ118034	-	PQ093898	PQ111468
20	KG23-0364	<i>Thalictrum minus</i> L.	PP255373	-	PP255371	PP230926

Изучение молекулярно-филогенетических характеристик редких и охраняемых видов семейства *Ranunculaceae* имеет важное значение для их сохранения и рационального использования. В данной работе особое внимание уделено видам *Anemone patens*, *Adonis vologensis* и *Adonis vernalis*, включенным в списки редких и исчезающих растений. *Anemone patens* классифицируется как редкий охраняемый вид [26], а *Adonis vernalis* включен в международную Красную книгу как исчезающий [27]. Молекулярно-генетический анализ этих видов позволяет не только уточнить их филогенетическое положение, но и разработать более точные подходы к их идентификации, мониторингу популяций и разработке стратегий по сохранению биоразнообразия. В условиях усиливающегося антропогенного воздействия и изменения климата такие исследования становятся особенно актуальными.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы исследования. В данной работе были использованы гербарные образцы 19 видов растений семейства *Ranunculaceae*, собранные в Карагандинской области коллективом ботаников КарУ им. академика Е.А. Букетова под руководством Ишмуратовой М.Ю. (Таблица 1).

Амплификация и секвенирование. Растительный материал хранили при температуре -80°C до выделения ДНК. Экстракцию ДНК проводили из гербарного материала с использованием метода СТАВ с модификацией [28]. Качество выделенной ДНК проверяли с помощью электрофореза в 1 %-ном агарозном геле при напряжении 120В в течение 30 минут. ДНК хранили в морозильной камере (-20°C) до последующего использования. Выбор универсальных праймеров для маркеров ДНК-баркодирования основывался на литературных данных, подробная информация о которой представлена в Таблице 2. Праймеры были синтезированы в лаборатории органического синтеза Национального центра биотехнологии (НЦБ) (Астана, Казахстан). Эксперименты по амплификации, секвенированию и анализу данных проведены в Лаборатории генетической инженерии растений НЦБ в соответствии со стандартным протоколом данной лаборатории [29].

Филогенетический анализ. Полученные нуклеотидные

последовательности маркеров *rbcL*, *matK*, *trnH-psbA* и *ITS* были использованы для филогенетического анализа. Последовательности исследуемых видов семейства *Ranunculaceae* были сопоставлены с последовательностями других видов семейства, доступными в международной базе данных GenBank (NCBI), а также с видами внешней группы из семейства *Berberidaceae*. Нуклеотидные последовательности четырех маркеров были выравнены с помощью программного обеспечения MEGA12 [34], алгоритмом MUSCLE [35]. Филогенетические деревья были конструированы с использованием метода максимального правдоподобия (ML) с адаптивной поддержкой Bootstrap, используя следующие модели: T92+G+I для *rbcL*, T92+I для *matK*, T92+G+I для *psbA-trnH*, K2+G+I для *ITS*. Визуализация филогенетических деревьев проводилась с помощью iTOL [36]. Результаты филогенетического анализа коррелируют с исследованием по систематике семейства Лютиковых Cossard G. с соавт. [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Амплификация и секвенирование. Из 19 видов семейства *Ranunculaceae*, изучаемых в статье, получены 64 нуклеотидные последовательности, из них 21 по маркеру *rbcL*, 14 по маркеру *trnH-psbA*, 10 по маркеру *matK* и 19 *ITS*. Полученные последовательности ДНК видов семейства *Ranunculaceae* из Карагандинской области были загружены в базу данных NCBI и получены уникальные инвентарные номера (Таблица 1). Длина полученных нуклеотидных последовательностей варьировалась в следующих диапазонах: от 403 п.н. до 583 п.н. у *rbcL*, *matK* от 657 п.н. до 783 п.н., *psbA-trnH* от 273 п.н. до 418 п.н., *ITS* от 431 п.н. до 722 п.н. По степени амплифицируемости наиболее высокий результат показал участок *rbcL* (100%), далее следуют *ITS* (90%), *psbA-trnH* (70%), *matK* (50%). Все полученные ампликоны были успешно отсекуены.

Идентификация с использованием инструмента BLAST NCBI. Анализ полученных нуклеотидных последовательностей с помощью инструмента BLAST (NCBI) показал, что все исследуемые маркеры баркодирования обеспечивают надежную идентификацию на уровне семейства и рода. Однако их различительная способность на видовом уровне оказалось низкой (0-

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности праймеров, использованные для ДНК-баркодирования

Название праймера	Нуклеотидные последовательности праймеров	Локус баркодирования	Т отжига ($^{\circ}\text{C}$)	Источник
3F_KIMf	5' – CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG – 3'	matK	50	[30]
1R_KIMr	5' – ACCCCATTCTATCTGGAAATCTTGTTTC – 3'	matK	50	[30]
rbcLa_F	5' – ATGTCACCAACAAACAGAGACTAAAGC – 3'	rbcL	58	[31]
rbcLa_R	5' – GTAAAATCAAGTCCACCRCG – 3'	rbcL	58	[31]
ITS4	5' – TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3'	ITS1 и ITS2	55	[32]
ITS5	5' – GGAAGTAAAAGTCGTAACAAG – 3'	ITS1 и ITS2	55	[32]
psbA3f	5' - GTTATGCATGGTGGATTCAACAATCC - 3'	trnH-psbA	53	[33]
trnHf_05	5' - CGCGCATGGTGGATTCAACAATCC - 3'	trnH-psbA	53	[33]

Таблица 3. Идентификация видов с BLAST

Локус	Идентификация на уровне вида	Идентификация на уровне рода	Идентификация на уровне семейства
rbcL	5.26%	89.47%	100%
psbA-trnH	0%	100%	100%
matK	10%	100%	100%
ITS	17.64%	94.11%	100%

17.64%). Наиболее эффективным маркером оказался *ITS* – 3 вида (*Anemone sylvestris*, *Clematis alpina*, *Anemone patens*) были идентифицированы на видовом уровне. Исключительным примером является вид *Anemone patens*, который удалось идентифицировать на видовом уровне с помощью маркеров *rbcL*, *matK*, *ITS*.

В результате анализа видов *Ceratocephala falcata* и *Ranunculus testiculatus* диапазон совпадений составил 98-100%, были виды родов как *Ceratocephala*, так и *Ranunculus*, что было посчитано как неопределенная идентификация рода (Таблица 3).

Филогенетический анализ.

Длины выравниваний последовательностей для *rbcL*, *matK*, *psbA-trnH*, *ITS* составили 501, 710, 394 и 453 пар оснований (п.о.) соответственно. Наибольшую степень консервативности показал маркер *rbcL*, в котором около 85,4% консервативных участков, далее следует *matK* с 76,9%. Наибольшее число информативных Pi участков обнаружено в регионе *ITS*, несмотря на относительно короткую длину выравнивания в отличие от других маркеров. Этот маркер также показал самую высокую степень дивергенции с количеством переменных участков – 42,1% и самое высокое соотношение гуанина и цитозина (G+C) – 56,9%. Филогенетические деревья были сгенерированы для каждого маркерного участка генома отдельно с использованием адаптивного анализа Bootstrap с пороговым значением Threshold 5.0. Основные характеристики анализа различных локусов ДНК-баркодирования представлены в Таблице 4.

Филогенетическое дерево на основе *rbcL*. Для реконструкции филогенетического дерева был использован набор данных последовательностей *rbcL*, состоящий из 21 последовательности видов, исследуемых в статье. 30 референтных последовательностей и 3 последовательности контрольной внешней группы были добавлены из базы данных NCBI (Рисунок 1).

Результаты анализа показали четкое разделение всех видов на две основные клады, соответствующие разным подсемействам. Виды подсемейств *Thalictroideae* и *Ranunculoideae* разделились с высокой статистической поддержкой (Bootstrap 0,87 и 0,90 соответственно). В первую кладу вошли восемь видов подсемейства *Thalictroideae*, все виды являются представителями рода *Thalictrum*. Вторая клада была сформирована из видов подсемейства *Ranunculoideae* и разделена еще на две ветви с поддержкой 0,67 и 0,76, содержащие 4 клады, представляющие трибы *Adonideae*, *Delphinieae*, *Anemoneae*, *Ranunculeae*. Все клады были образованы с высокой поддержкой (>0,85). Наиболее близкими к представителям подсемейства *Thalictroideae* оказались представители трибы *Adonideae*. Несмотря на высокие показатели поддержки разделения триб и родов, маркер *rbcL* продемонстрировал низкое разрешение внутри родов, в особенности у видов подсемейства *Thalictroideae*. Тем не менее, некоторые растения удалось идентифицировать на видовом уровне. В частности, нуклеотидные последовательности вида *Anemone patens* сформировали отдельный кластер внутри рода с поддержкой 0,97, что можно считать успешной идентификацией. Также исследуемые нами последовательности видов *Ranunculus trichophyllus* и *Ranunculus polyrhizos* показали высокую степень совпадения с референсными последовательностями из NCBI, с высокой поддержкой 0,9 и 0,86 соответственно.

Филогенетическое дерево на основе *matK*. Для реконструкции филогенетического дерева использовали набор данных последовательностей маркера *matK* из 10 последовательностей видов, исследуемых в данной работе. В анализ также были добавлены еще 30 последовательностей, взятых из базы данных NCBI и 3 последовательности внешней группы (Рисунок 2).

Результаты анализа показали, что все виды разделились на четыре основные клады с максимальной

Таблица 4. Основные характеристики анализа различных локусов баркодирования.

Параметры	Маркер			
	rbcL	matK	psbA-trnH	ITS
Количество последовательностей	51	40	48	60
Длина выравнивания п.н.	501	710	394	453
G+C (%)	42,7	31,2	32,1	56,9
Консервативные участки (C)	428	546	112	239
Переменные участки (V)	73	163	265	191
Pi участки	61	130	218	173
Singleton (S)	12	33	46	17

поддержкой (1.00). Первая клада сформирована из видов группы (Рисунок 3). В результате анализа были

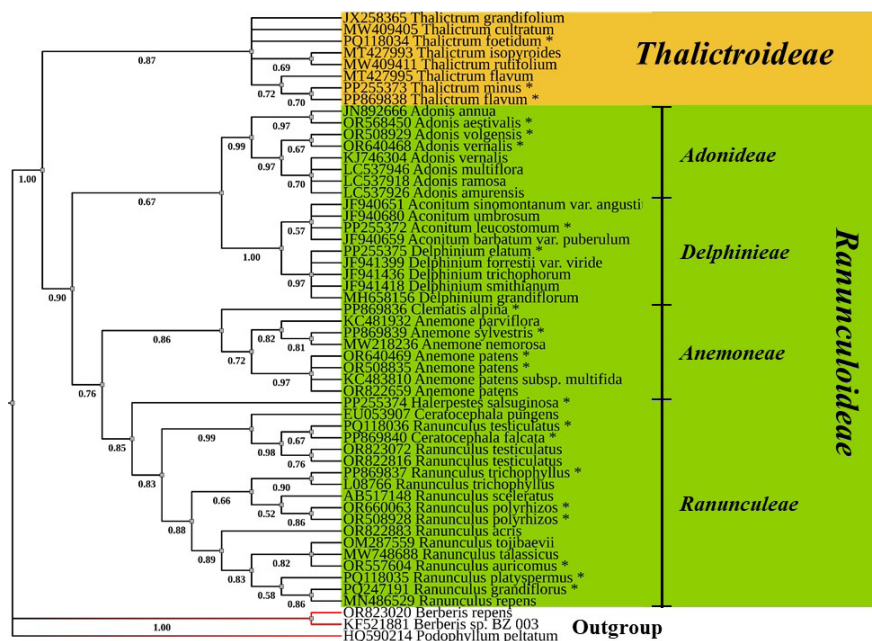


Рисунок 1. Филогенетическое дерево, построенное методом Maximum Likelihood (ML) на основе набора последовательностей маркера *rbcL*. Звездочкой* отмечены исследуемые виды.

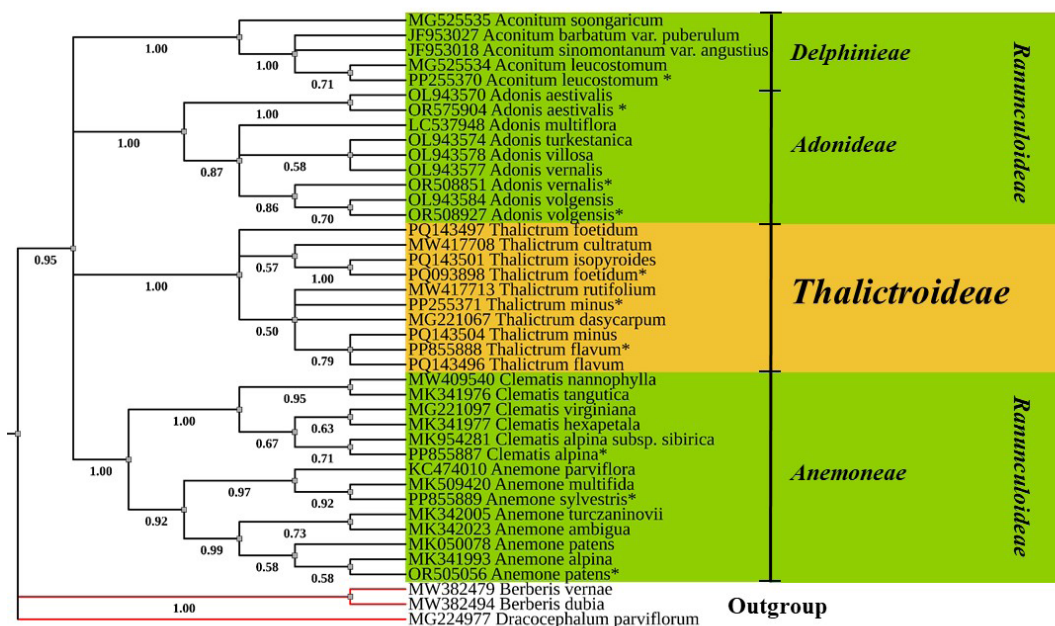


Рисунок 2. Филогенетическое дерево, построенное методом Maximum Likelihood (ML) на основе набора последовательностей маркера *matK*. Звездочкой* отмечены исследуемые виды.

трибы *Delphinieae*, далее расположилась триба *Adonideae*. Виды рода *Thalictrum* из подсемейства *Thalictroideae* расположились между трибами *Adonideae* и *Anemoneae*, что подтверждает их филогенетическое положение в пределах семейства.

Филогенетическое дерево на основе *ITS*. Реконструкция дерева была выполнена на основе набора данных *ITS* состоящих из 19 последовательностей, исследуемых в данной работе, 41 последовательность из базы данных NCBI, 3 последовательности внешней

сформированы 4 основные клады с высокой поддержкой *Ranunculeae* – 0.84, *Delphinieae* – 0.84, *Adonideae* – 1.00 и *Anemoneae* – 0.61. Первую кладу составляли виды трибы *Anemoneae* из подсемейства *Ranunculoideae* и представители рода *Thalictrum* из подсемейства *Thalictroideae*. Далее данная клада разделилась на 4 отдельных друг от друга кластера с высокой поддержкой Bootstrap >0.96. Вторая клада представлена родами *Halerpestes* и *Ranunculus* трибы *Ranunculeae*. В третью кладу вошли виды родов *Aconitum* и *Delphinium*, а четвертую кладу

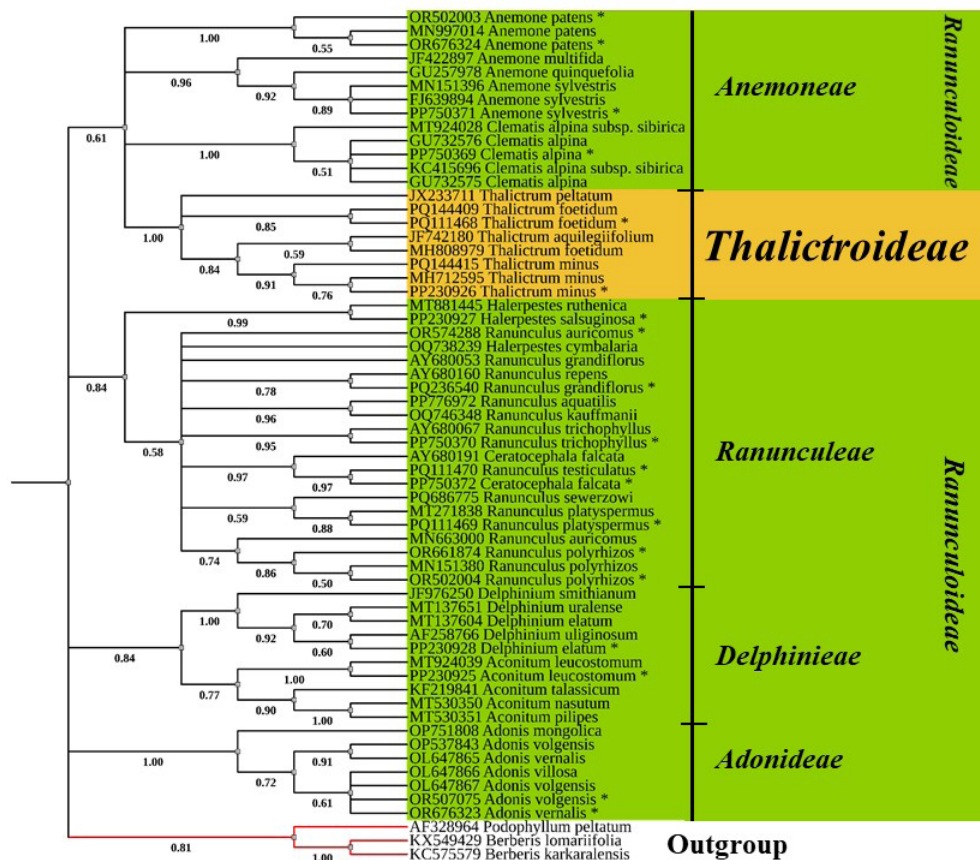


Рисунок 3. Филогенетическое дерево, построенное методом Maximum Likelihood (ML) на основе набора последовательностей маркера *ITS*. Звездочкой* отмечены исследуемые виды

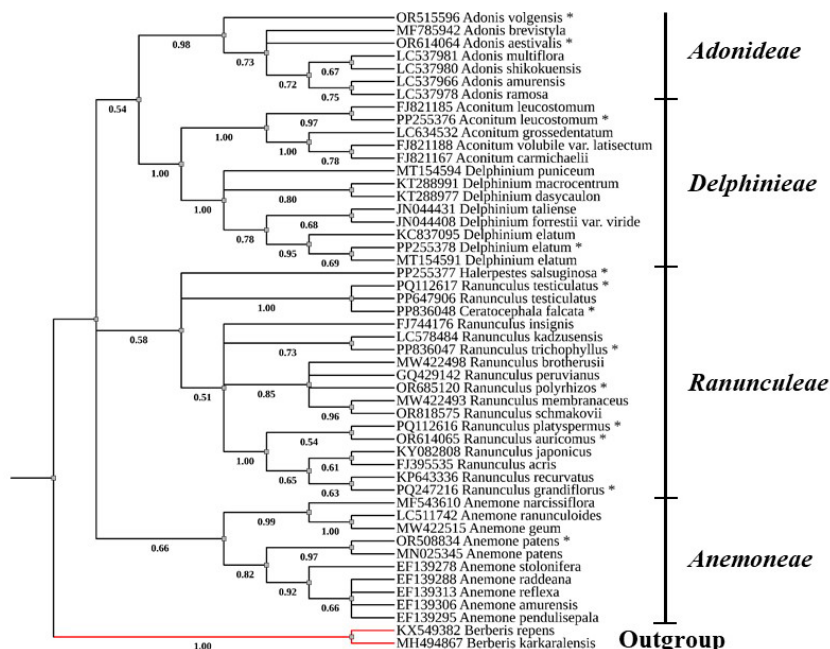


Рисунок 4. Филогенетическое дерево, построенное методом Maximum Likelihood (ML) на основе набора последовательностей маркера *psbA-trnH*. Звездочкой* отмечены исследуемые виды

составил представители рода *Adonis*.

Филогенетическое дерево на основе *psbA-trnH*. Для реконструкции филогенетического дерева был использован набор данных 13 нуклеотидных последовательностей, полученных в ходе настоящего исследования, 35 последовательностей, взятых из базы данных GenBank, 2 последовательности внешней

группы (Рисунок 4). Дерево объединило представителей триб из подсемейства *Ranunculoideae*. Все виды были классифицированы в четыре основные клады. Первую кладу с поддержкой 0.98 составляли виды рода *Adonis*, вторую – *Delphinium* и *Aconitum* (1.00), третью – *Halerpestes*, *Ranunculus*, *Ceratophala* (0.58), четвертую – *Anemone* (0.66).

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты молекулярно-филогенетического анализа растений семейства *Ranunculaceae*, проведенного с использованием ДНК-баркодирования, позволили уточнить таксономические взаимоотношения внутри семейства и оценить эффективность различных маркерных локусов для идентификации видов.

Сравнение филогенетических деревьев, построенных на основе маркеров *rbcL*, *matK*, *ITS* и *psbA-trnH*, показало различия в разрешающей способности этих участков. Маркер *ITS* продемонстрировал наибольшую вариабельность и высокую точность идентификации на видовом уровне (17,64%), тогда как *rbcL*, *matK* и *psbA-trnH* преимущественно обеспечивали надежную классификацию на уровне триб и родов (Таблица 3) [37]. В частности, использование *ITS* позволило успешно идентифицировать *Anemone sylvestris*, *Clematis alpina* и *Anemone patens* на видовом уровне (Рисунок 3). Однако для других видов точность определения оказалась недостаточной, что согласуется с данными предыдущих исследований, указывающих на ограниченную дискриминационную способность отдельных маркеров при изучении филогенетических связей внутри *Ranunculaceae* [38].

Филогенетический анализ показал, что маркер *rbcL*, будучи консервативным, обеспечил надежное разделение представителей подсемейств *Thalictrioideae* и *Ranunculoideae*, однако его разрешающая способность на уровне родов и видов оставалась низкой (Рисунок 1). В частности, внутри *Thalictrioideae* наблюдалась недостаточная дифференциация видов рода *Thalictrum*, что может быть обусловлено высокой степенью консервативности последовательностей *rbcL* в данной группе [39].

Маркер *matK* показал относительно высокую разрешающую способность на уровне триб и родов, формируя четкие филогенетические клады для *Delphinieae*, *Adonideae* и *Anemoneae*, но не позволил достоверно идентифицировать большинство видов (Рисунок 2). Это указывает на необходимость использования дополнительного набора маркеров для уточнения внутривидовых отношений [12].

Анализ на основе *psbA-trnH* выявил схожие ограничения. Несмотря на четкое разделение триб *Ranunculoideae*, разрешающая способность на уровне отдельных видов оказалась недостаточной (Рисунок 4). Кроме того, нехватка данных по этому маркеру в международных базах данных требует расширения референсных последовательностей для повышения точности идентификации [40].

Особую значимость проведенное исследование имеет для редких и охраняемых видов *Ranunculaceae*, таких как *Anemone patens* и *Adonis vernalis*. Полученные молекулярные данные позволяют уточнить их таксономическое положение и филогенетические связи, что важно для мониторинга популяций и разработки природоохранных мер. Современные методы ДНК-идентификации могут существенно повысить точность определения видов, что особенно актуально для оценки

состояния популяций редких растений [41]. В дальнейшем расширение базы молекулярных данных по этим видам будет способствовать более эффективному контролю за их распространением, выявлению потенциальных генетических угроз и разработке программ по их сохранению.

Таким образом, результаты исследования подтверждают, что для молекулярной идентификации и филогенетического анализа *Ranunculaceae* наиболее эффективным подходом является использование комбинации нескольких маркеров, включая *ITS* в качестве основного локуса для видового уровня, а *rbcL* и *matK* – для родового и трибового уровней. Дальнейшие исследования должны быть направлены на расширение выборки, а также на тестирование дополнительных маркерных участков, что позволит уточнить таксономические взаимоотношения внутри семейства и повысить точность молекулярной идентификации редких и охраняемых видов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе проведен молекулярно-филогенетический анализ 19 видов *Ranunculaceae* флоры Карагандинской области, включая редкие и охраняемые виды *Anemone patens*, *Adonis volgensis* и *Adonis vernalis*. По результатам наших исследований, маркер *ITS* показал наивысшую дискриминационную способность на видовом уровне, в то время как консервативные маркеры *rbcL*, *matK* отличились более надежной идентификацией на уровне триб и родов. Полученные данные уточняют таксономические взаимоотношения *Ranunculaceae* в регионе и подчеркивают необходимость комбинированного использования нескольких маркеров ДНК. Настоящее исследование впервые предоставляет молекулярные данные по редким видам *Ranunculaceae* Казахстана, что имеет важное для их мониторинга и сохранения.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование было выполнено при финансовой поддержке Комитета науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан в рамках НТП BR28713087 «Фундаментальные и прикладные аспекты получения и целенаправленного синтеза биологически активных веществ лекарственных растений в культуре *in vitro*».

ЛИТЕРАТУРА

1. Tamura M. Phylogeny and classification of the *Ranunculaceae*: Systematics and Evolution of the Ranunculiflorae – Vienna: Springer Vienna, 1995. – С. 201-206.
2. Ziman S. N., Keener C. S. A geographical analysis of the family *Ranunculaceae* // Annals of the Missouri Botanical Garden. – 1989. – С. 1012-1049.
3. Kelemen C. D., Borsai O., Szabo K., Clapa D., Hârta M., Pamfil D. Preliminary testing of SRAP primers in four *Ranunculaceae* species from Romania // Scientific Papers. Series B, Horticulture. – 2018 – T. LXII. – С. 629-634.
4. N.V. Shchegoleva A. A. Z. Distribution of the family

Ranunculaceae Juss. within Kazakhstan // Book Distribution of the family *Ranunculaceae* Juss. within Kazakhstan / Editor, 2017.

5. Щёголева Н. В. Эндемичные виды лютиковых во флоре Казахстана // Ботанические исследования Сибири и Казахстана. – 2019. – №25. – С. 11-15.

6. Hao D. C., Xiao P. G., Ma H. Y., Peng Y., He C. N. Mining chemodiversity from biodiversity: pharmacophylogeny of medicinal plants of *Ranunculaceae* // Chin J Nat Med. – 2015. – Т. 13, № 7. – С. 507-20.

7. Chan Y.-T., Wang N., Feng Y. The toxicology and detoxification of *Aconitum*: traditional and modern views // Chinese Medicine. – 2021. – Т. 16, № 1. – С. 61.

8. Salehi A., Ghanadian M., Zolfaghari B., Jassbi A. R., Fattahian M., Reisi P., Csupor D., Khan I. A., Ali Z. Neuropharmacological Potential of Diterpenoid Alkaloids // Pharmaceuticals (Basel). – 2023. – Т. 16, № 5.

9. Hao D.-C. Chapter 9 - Biodiversity, Chemodiversity, and Pharmacotherapy of *Ranunculus* Medicinal Plants // *Ranunculales* Medicinal Plants / Hao D.-C. Academic Press, 2019. – С. 357-386.

10. Yin T., Cai L., Ding Z. A systematic review on the chemical constituents of the genus *Consolida* (*Ranunculaceae*) and their biological activities // RSC Advances. – 2020. – Т. 10, № 58. – С. 35072-35089.

11. Yin T., Yan Y., Yang X., Li W. Flavonoids from tribe *Delphineae* (*Ranunculaceae*): Phytochemical review and chemotaxonomic value // Biochemical Systematics and Ecology. – 2021. – Т. 97. – С. 104300.

12. Cossard G., Sannier J., Sauquet H., Damerval C., de Craene L. R., Jabbour F., Nadot S. Subfamilial and tribal relationships of *Ranunculaceae*: evidence from eight molecular markers // Plant Systematics and Evolution. – 2016. – Т. 302, № 4. – С. 419-431.

13. Tamura M. *Ranunculaceae* // Flowering Plants · Dicotyledons: Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid Families / Kubitzki K. и др. – Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1993. – С. 563-583.

14. Ro K.-E., Keener C. S., McPherson B. A. Molecular phylogenetic study of the *Ranunculaceae*: utility of the nuclear 26S ribosomal DNA in inferring intrafamilial relationships // Molecular phylogenetics and evolution. – 1997. – Т. 8, № 2. – С. 117-127.

15. Wang W., Lu A.-M., Ren Y., Endress M. E., Chen Z.-D. Phylogeny and classification of *Ranunculales*: Evidence from four molecular loci and morphological data // Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics. – 2009. – Т. 11, № 2. – С. 81-110.

16. Johansson J. T., Jansen R. K. Chloroplast DNA variation among five species of *Ranunculaceae*: structure, sequence divergence, and phylogenetic relationships // Plant systematics and evolution. – 1991. – Т. 178. – С. 9-25.

17. Johansson J. T., Jansen R. Chloroplast DNA variation and phylogeny of the *Ranunculaceae* // Plant Systematics and Evolution. – 1993. – Т. 187. – С. 29-49.

18. Johansson J. T. A revised chloroplast DNA phylogeny of the *Ranunculaceae* // Systematics and Evolution of the *Ranunculiflorae* –Springer, 1995. – С. 253-261.

19. Johansson J. T. Chloroplast DNA restriction site mapping and the phylogeny of *Ranunculus* (*Ranunculaceae*) // Plant Systematics and Evolution. – 1998. – Т. 213. – С. 1-19.

20. Schuettpelz E., Hoot S. B., Samuel R., Ehrendorfer F. Multiple origins of Southern Hemisphere *Anemone* (*Ranunculaceae*) based on plastid and nuclear sequence data // Plant Systematics and Evolution. – 2002. – Т. 231. – С. 143-151.

21. Cai Y.-f., Li S.-w., Chen M., Jiang M.-f., Liu Y., Xie Y.-f., Sun Q., Jiang H.-z., Yin N.-w., Wang L., Zhang R., Huang C.-l., Lei K. Molecular phylogeny of *Ranunculaceae* based on *rbcL* sequences // Biologia. – 2010. – Т. 65, № 6. – С. 997-1003.

22. An Q., Chen J., Tan G., Ren Y., Zhou J., Liao H., Tan R. Predicting medicinal resources in *Ranunculaceae* family by a combined approach using DNA barcodes and chemical metabolites // Phytochemistry Letters. – 2022. – Т. 50. – С. 67-76.

23. Li Q. J., Wang X., Wang J. R., Su N., Zhang L., Ma Y. P., Chang Z. Y., Zhao L., Potter D. Efficient Identification of *Pulsatilla* (*Ranunculaceae*) Using DNA Barcodes and Micro-Morphological Characters // Front Plant Sci. – 2019. – Т. 10. – С. 1196.

24. Kress W. J., Erickson D. L. DNA barcodes: genes, genomics, and bioinformatics // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2008. – Т. 105, № 8. – С. 2761-2762.

25. Group C. P. W. A DNA barcode for land plants // Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America. – 2009. – С. 12794-12797.

26. Алибеков Д. Т., Кубентаев С. А., Идрисова Ж. Т., Хапилина О. Н. Изучение редких и исчезающих растений Акмолинской области // Eurasian Journal of Applied Biotechnology / Symposium.2. – 2024. - № 3S. – С. 10.

27. European red list of vascular plants. / Bilz M., Maxted N., Kell S. P., Lansdown R. V.: Publications Office of the European Union Luxembourg. – 2011.

28. Doyle J. J., Doyle J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochemical bulletin. – 1987.

29. Sutula M., Kakanay A., Tussipkan D., Dzhumanov S., Manabayeva S. Phylogenetic analysis of rare and endangered *Tulipa* Species (*Liliaceae*) of Kazakhstan based on universal barcoding markers // Biology. – 2024. – Т. 13, № 6. – С. 365.

30. Zhang C. Y., Wang F. Y., Yan H. F., Hao G., Hu C. M., Ge X. J. Testing DNA barcoding in closely related groups of *Lysimachia* L. (*Myrsinaceae*) // Molecular Ecology Resources. – 2012. – Т. 12, № 1. – С. 98-108.

31. Kuzmina M. L., Johnson K. L., Barron H. R., Hebert P. D. Identification of the vascular plants of Churchill, Manitoba, using a DNA barcode library // BMC ecology. – 2012. – Т. 12. – С. 1-11.

32. Khan A. M., Bhadauria S. Molecular characterization of keratin degrading fungi isolated from semi-arid soil by PCR using ITS4 and ITS5 primers // Journal of King Saud University-Science. – 2019. – Т. 31, № 4. – С. 1418-1423.

33. Parmentier I., Duminil J. m., Kuzmina M., Philippe M., Thomas D. W., Kenfack D., Chuyong G. B., Cruaud C., Hardy O. J. How effective are DNA barcodes in the identification of African rainforest trees? // PLoS one. – 2013. – Т.

8, № 4. – C. e54921.

34. Kumar S., Stecher G., Suleski M., Sanderford M., Sharma S., Tamura K. MEGA12: Molecular Evolutionary Genetic Analysis version 12 for adaptive and green computing // Molecular Biology and Evolution. – 2024. – T. 41, № 12. – C. msae263.

35. Edgar R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput // Nucleic acids research. – 2004. – T. 32, № 5. – C. 1792-1797.

36. Letunic I., Bork P. Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool // Nucleic acids research. – 2024. – T. 52, № W1. – C. W78-W82.

37. Letsiou S., Madesis P., Vasdekis E., Montemurro C., Grigoriou M. E., Skavdis G., Moussis V., Koutelidakis A. E., Tzakos A. G. DNA barcoding as a plant identification method // Applied Sciences. – 2024. – T. 14, № 4. – C. 1415.

38. Yu J., Wu X., Liu C., Newmaster S., Ragupathy S., Kress W. J. Progress in the use of DNA barcodes in the identification and classification of medicinal plants // Ecotoxicology and environmental safety. – 2021. – T. 208. – C. 111691.

39. Kress W. J., Erickson D. L. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region // PLoS one. – 2007. – T. 2, № 6. – C. e508.

40. Kim K.-R., Park S. Y., Kim H., Hong J. M., Kim S.-Y., Yu J.-N. Complete chloroplast genome determination of *Ranunculus sceleratus* from Republic of Korea (*Ranunculaceae*) and comparative chloroplast genomes of the members of the *Ranunculus* Genus // Genes. – 2023. – T. 14, № 6. – C. 1149.

41. Ahmed S. S. DNA barcoding in plants and animals: A critical review // Preprints. – 2022. – T. 2022010310. – C. 1-28.

REFERENCES

1. Tamura M. Phylogeny and classification of the *Ranunculaceae*: Systematics and Evolution of the Ranunculiflorae // Vienna: Springer Vienna. – 1995. – P. 201-206.

2. Ziman S. N., Keener C. S. A geographical analysis of the family *Ranunculaceae* // Annals of the Missouri Botanical Garden. – 1989. – P. 1012-1049.

3. Kelemen C. D., Borsai O., Szabo K., Clapa D., Hârta M., Pamfil D. Preliminary testing of SRAP primers in four *Ranunculaceae* species from Romania // Scientific Papers. Series B, Horticulture. – 2018 – Vol. LXII. – P. 629-634.

4. N.V. Shchegoleva A. A. Z. Distribution of the family *Ranunculaceae* Juss. within Kazakhstan // Book Distribution of the family *Ranunculaceae* Juss. within Kazakhstan / Editor, 2017.

5. Shchegoleva N. V. Endemichnye vidy lyutikovyh vo flore Kazakhstana // Botanicheskie issledovaniya Sibiri i Kazakhstana. – 2019. – №25. – C. 11-15.

6. Hao D. C., Xiao P. G., Ma H. Y., Peng Y., He C. N. Mining chemodiversity from biodiversity: pharmacophylogeny of medicinal plants of *Ranunculaceae* // Chin J Nat Med. – 2015. – Vol. 13, № 7. – P. 507-20.

7. Chan Y.-T., Wang N., Feng Y. The toxicology and de-

toxification of *Aconitum*: traditional and modern views // Chinese Medicine. – 2021. – Vol. 16, № 1. – P. 61.

8. Salehi A., Ghanadian M., Zolfaghari B., Jassbi A. R., Fattahian M., Reisi P., Csopor D., Khan I. A., Ali Z. Neuropharmacological Potential of Diterpenoid Alkaloids // Pharmaceuticals (Basel). – 2023. – Vol. 16, № 5.

9. Hao D.-C. Chapter 9 - Biodiversity, Chemodiversity, and Pharmacotherapy of *Ranunculus* Medicinal Plants // *Ranunculales* Medicinal Plants / Hao D.-C. Academic Press, 2019. – C. 357-386.

10. Yin T., Cai L., Ding Z. A systematic review on the chemical constituents of the genus *Consolida* (*Ranunculaceae*) and their biological activities // RSC Advances. – 2020. – Vol. 10, № 58. – P. 35072-35089.

11. Yin T., Yan Y., Yang X., Li W. Flavonoids from tribe *Delphineae* (*Ranunculaceae*): Phytochemical review and chemotaxonomic value // Biochemical Systematics and Ecology. – 2021. – Vol. 97. – P. 104300.

12. Cossard G., Sannier J., Sauquet H., Damerval C., de Craene L. R., Jabbour F., Nadot S. Subfamilial and tribal relationships of *Ranunculaceae*: evidence from eight molecular markers // Plant Systematics and Evolution. – 2016. – Vol. 302, № 4. – P. 419-431.

13. Tamura M. *Ranunculaceae* // Flowering Plants · Dicotyledons: Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid Families / Kubitzki K. et al. – Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. – 1993. – P. 563-583.

14. Ro K.-E., Keener C. S., McPherson B. A. Molecular phylogenetic study of the *Ranunculaceae*: utility of the nuclear 26S ribosomal DNA in inferring intrafamilial relationships // Molecular phylogenetics and evolution. – 1997. – Vol. 8, № 2. – P. 117-127.

15. Wang W., Lu A.-M., Ren Y., Endress M. E., Chen Z.-D. Phylogeny and classification of *Ranunculales*: Evidence from four molecular loci and morphological data // Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics. – 2009. – Vol. 11, № 2. – P. 81-110.

16. Johansson J. T., Jansen R. K. Chloroplast DNA variation among five species of *Ranunculaceae*: structure, sequence divergence, and phylogenetic relationships // Plant systematics and evolution. – 1991. – Vol. 178. – P. 9-25.

17. Johansson J. T., Jansen R. Chloroplast DNA variation and phylogeny of the *Ranunculaceae* // Plant Systematics and Evolution. – 1993. – Vol. 187. – P. 29-49.

18. Johansson J. T. A revised chloroplast DNA phylogeny of the *Ranunculaceae* // Systematics and Evolution of the *Ranunculiflorae* –Springer, 1995. – P. 253-261.

19. Johansson J. T. Chloroplast DNA restriction site mapping and the phylogeny of *Ranunculus* (*Ranunculaceae*) // Plant Systematics and Evolution. – 1998. – Vol. 213. – P. 1-19.

20. Schuettpelz E., Hoot S. B., Samuel R., Ehrendorfer F. Multiple origins of Southern Hemisphere *Anemone* (*Ranunculaceae*) based on plastid and nuclear sequence data // Plant Systematics and Evolution. – 2002. – Vol. 231. – P. 143-151.

21. Cai Y., Li S., Chen M., Jiang M., Liu Y., Xie Y., Sun Q., Jiang H.-z., Yin N., Wang L., Zhang R., Huang C., Lei K. Molecular phylogeny of *Ranunculaceae* based on *rbcL* sequences // Biologia. – 2010. – Vol. 65, № 6. – P. 997-1003.

22. An Q., Chen J., Tan G., Ren Y., Zhou J., Liao H., Tan R. Predicting medicinal resources in *Ranunculaceae* family by a combined approach using DNA barcodes and chemical metabolites // *Phytochemistry Letters*. – 2022. – Vol. 50. – P. 67-76.
23. Li Q. J., Wang X., Wang J. R., Su N., Zhang L., Ma Y. P., Chang Z. Y., Zhao L., Potter D. Efficient Identification of *Pulsatilla* (*Ranunculaceae*) Using DNA Barcodes and Micro-Morphological Characters // *Front Plant Sci*. – 2019. – Vol. 10. – P. 1196.
24. Kress W. J., Erickson D. L. DNA barcodes: genes, genomics, and bioinformatics // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2008. – Vol. 105, № 8. – P. 2761-2762.
25. Group C. P. W. A DNA barcode for land plants // *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America*. – 2009. – P. 12794-12797.
26. Alibekov D. T., Kubentaev S. A., Idrisova Zh. T., Hapilina O. N. Izuchenie redkih i ischezayushchih rastenij Akmolinskoy oblasti // *Eurasian Journal of Applied Biotechnology / Symposium.2*. – 2024. - № 3S. – P. 10.
27. European red list of vascular plants. / Bilz M., Maxted N., Kell S. P., Lansdown R. V.: Publications Office of the European Union Luxembourg. – 2011.
28. Doyle J. J., Doyle J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // *Phytochemical bulletin*. – 1987.
29. Sutula M., Kakanay A., Tussipkan D., Dzhumanov S., Manabayeva S. Phylogenetic analysis of rare and endangered *Tulipa* Species (*Liliaceae*) of Kazakhstan based on universal barcoding markers // *Biology*. – 2024. – Vol. 13, № 6. – P. 365.
30. Zhang C. Y., Wang F. Y., Yan H. F., Hao G., Hu C. M., Ge X. J. Testing DNA barcoding in closely related groups of *Lysimachia* L. (*Myrsinaceae*) // *Molecular Ecology Resources*. – 2012. – Vol. 12, № 1. – P. 98-108.
31. Kuzmina M. L., Johnson K. L., Barron H. R., Hebert P. D. Identification of the vascular plants of Churchill, Manitoba, using a DNA barcode library // *BMC ecology*. – 2012. – Vol. 12. – P. 1-11.
32. Khan A. M., Bhadauria S. Molecular characterization of keratin degrading fungi isolated from semi-arid soil by PCR using ITS4 and ITS5 primers // *Journal of King Saud University-Science*. – 2019. – Vol. 31, № 4. – P. 1418-1423.
33. Parmentier I., Duminil J. m., Kuzmina M., Philippe M., Thomas D. W., Kenfack D., Chuyong G. B., Cruaud C., Hardy O. J. How effective are DNA barcodes in the identification of African rainforest trees? // *PLoS one*. – 2013. – Vol. 8, № 4. – P. e54921.
34. Kumar S., Stecher G., Suleski M., Sanderford M., Sharma S., Tamura K. MEGA12: Molecular Evolutionary Genetic Analysis version 12 for adaptive and green computing // *Molecular Biology and Evolution*. – 2024. – Vol. 41, № 12. – P. msae263.
35. Edgar R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput // *Nucleic acids research*. – 2004. – Vol. 32, № 5. – P. 1792-1797.
36. Letunic I., Bork P. Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool // *Nucleic acids research*. – 2024. – Vol. 52, № W1. – P. W78-W82.
37. Letsiou S., Madesis P., Vasdekis E., Montemurro C., Grigoriou M. E., Skavdis G., Moussis V., Koutelidakis A. E., Tzakos A. G. DNA barcoding as a plant identification method // *Applied Sciences*. – 2024. – Vol. 14, № 4. – P. 1415.
38. Yu J., Wu X., Liu C., Newmaster S., Ragupathy S., Kress W. J. Progress in the use of DNA barcodes in the identification and classification of medicinal plants // *Ecotoxicology and environmental safety*. – 2021. – Vol. 208. – P. 111691.
39. Kress W. J., Erickson D. L. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region // *PLoS one*. – 2007. – Vol. 2, № 6. – P. e508.
40. Kim K.-R., Park S. Y., Kim H., Hong J. M., Kim S.-Y., Yu J.-N. Complete chloroplast genome determination of *Ranunculus sceleratus* from Republic of Korea (*Ranunculaceae*) and comparative chloroplast genomes of the members of the *Ranunculus* Genus // *Genes*. – 2023. – Vol. 14, № 6. – P. 1149.
41. Ahmed S. S. DNA barcoding in plants and animals: A critical review // *Preprints*. – 2022. – Vol. 2022010310. – P. 1-28.

UDC: 582.94

MOLECULAR PHYLOGENETIC ANALYSIS OF THE RANUNCULACEAE FAMILY PLANTS BASED ON DNA BARCODING IN THE KARAGANDA REGION FLORA

Zhumabay N.B.¹, Sutula M.Y.¹, Ishmuratova M. Y.², Bekkuzhina S.S.¹, Manabayeva S.A.^{1*}¹LLP «National center for biotechnology», Qorgalzhyn highway 13/5, Astana, 010000, Kazakhstan²Non-Commercial JSC “E.A. Buketov Karaganda University”, Kazakhstan, Karaganda, University street, 28

* Corresponding author: manabayeva@biocenter.kz

ABSTRACT

The *Ranunculaceae* family is one of the most diverse groups of angiosperms, including species of high ecological and pharmacological significance. In this work, a molecular phylogenetic analysis of 19 *Ranunculaceae* species from the flora of the Karaganda region, including the rare and protected species *Anemone patens*, *Adonis volgensis* and *Adonis vernalis*, was carried out. The *rbcL*, *matK*, *trnH-psbA*, and *ITS* markers were used for the study, and phylogenetic trees were constructed using the maximum likelihood (ML) method with bootstrap support.

The results showed that the *ITS* marker had the highest discriminatory ability at the species level (17.64%), while *rbcL*, *matK*, and *trnH-psbA* provided reliable classification at the tribe and genus level. Phylogenetic analysis confirmed a clear separation of the subfamilies *Thalictroideae* and *Ranunculoideae* with high bootstrap support (0.87 and 0.90, respectively). Within the *Ranunculoideae*, the tribes *Ranunculeae*, *Anemoneae*, *Delphinieae*, and *Adonideae* formed stable clades (>0.84). *Anemone patens* was clearly distinguished at the species level (0.97).

The data obtained clarify the taxonomic relationships of *Ranunculaceae* in the region and emphasize the need for the combined use of multiple DNA markers. For the first time, this study provides molecular data on rare species of *Ranunculaceae* in Kazakhstan, which is important for their monitoring and conservation.

Keywords: *Ranunculaceae*, *rbcL*, *trnH-psbA*, *matK*, *ITS*, DNA barcoding, molecular phylogenetics.

ӘОЖ: 582.94

ҚАРАҒАНДЫ ОБЛЫСЫ ФЛОРАСЫНДАҒЫ RANUNCULACEAE ТҰҚЫМДАС ӨСІМДІКТЕРІНІҢ ДНҚ-БАРКОДИНГ НЕГІЗІНДЕГІ МОЛЕКУЛАЛЫҚ-ФИЛОГЕНЕТИКАЛЫҚ ТАЛДАУЫ

Жұмабай Н.Б.¹, Сутула М.Ю.¹, Ишмуратова М.Ю.², Беккүжина С.С.¹, Манабаева Ш.А.^{1*}¹ЖШС «Ұлттық биотехнология орталығы», Қорғалжын тас жолы 13/5, Астана, 010000, Қазақстан²КеАҚ «Академик Е. А. Бөкетов атындағы Қарағанды университеті», Қазақстан, Қарағанды, Университетская көшесі, 28

* Корреспондент автор: manabayeva@biocenter.kz

ТҮЙІН

Ranunculaceae тұқымдасы экологиялық және фармакологиялық маңызы жоғары түрлерді қамтитын жабықтұқымды өсімдіктердің алуантүрлі топтарының бірі болып табылады. Бұл жұмыста сирек кездесетін және қорғауға алынған *Anemone patens*, *Adonis volgensis* және *Adonis Vernalis* түрлерін қоса алғанда, Қарағанды облысы флорасының *Ranunculaceae* тұқымдасының 19 түріне молекулалық-филогенетикалық талдау жүргізілді. Зерттеулер үшін *rbcL*, *matK*, *trnH-psbA* және *ITS* маркерлері пайдаланылды, ал филогенетикалық ағаштар бутстрап-қолдауымен максималды ықтималдық (ML) әдісімен салынды.

Нәтижелер *ITS* маркерінің түр деңгейінде ең үлкен айырмашылық қабілеті бар екенін көрсетті (17,64%), ал *rbcL*, *matK* және *trnH-psbA* триба мен тұқымдастар деңгейінде сенімді жіктеуді қамтамасыз етеді. Филогенетикалық талдау *Thalictroideae* және *Ranunculoideae* субфамилиясының нақты бөлінуін жоғары бутстрап-қолдауымен растады (сәйкесінше 0.87 және 0.90). *Ranunculoideae* ішінде *Ranunculeae*, *Anemoneae*, *Delphinieae* және *Adonideae* трибалары тұрақты кладалар құрды (>0.84). *Anemone patens* түр деңгейінде нақты идентификацияланды (0.97).

Нәтижелер аймақтағы *Ranunculaceae* тұқымдасының өсімдіктерінің таксономиялық қатынастарын нақтылайды және бірнеше ДНҚ маркерлерін біріктіру қажеттілігін көрсетеді. Бұл зерттеу алғаш рет Қазақстанның сирек кездесетін *Ranunculaceae* тұқымдасының түрлері бойынша молекулалық деректерді ұсынады, бұл олардың мониторингі мен сақталуы үшін маңызды.

Кілт сөздер: *Ranunculaceae*, *rbcL*, *trnH-psbA*, *matK*, *ITS*, ДНҚ-баркодинг, молекулалық филогенетика.