

На правах рукописи

**Райко
Михаил Петрович**

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ СИСТЕМАТИКА И ФИЛОГЕНИЯ ТРИБЫ
PHALARIDEAE СЕМЕЙСТВА *POACEAE* ФЛОРЫ РОССИИ**

03.02.01. – «Ботаника»

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Санкт-Петербург – 2011

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Ботанический институт
им. В. Л. Комарова РАН

Научный руководитель доктор биологических наук
профессор
Родионов
Александр Викентьевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
член-корреспондент РАН
Цвелёв
Николай Николаевич

доктор биологических наук,
профессор
Яковлев
Геннадий Павлович

Ведущая организация: Всероссийский научно-исследовательский
институт растениеводства
им. Н.И.Вавилова РАСХН

Защита диссертации состоится 8 июня 2011 года в 14⁰⁰ часов на заседании диссертационного
совета Д 002.211.01 при Учреждении Российской академии наук Ботанический институт им.
В. Л. Комарова РАН по адресу: 197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 2. Тел.:
(812) 346-47-06, факс: (812)346-36-43.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук
Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН

Автореферат разослан «__» _____ 2011 года.

Учёный секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

О. Ю. СИЗОНЕНКО

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования: Положение трибы *Phalarideae* Kunth на филогенетическом древе злаков и спектр родов, ее составляющих – предмет многолетних дискуссий. Автор трибы C.S. Kunth (1819) и многие его последователи понимали ее очень широко, включая в нее наряду с *Phalaris* такие рода как *Lygeum*, *Zea*, *Coix*, *Alopecurus*, *Beckmania*, *Phleum*, *Holcus*, *Hierochloë*, *Anthoxanthum* и некоторые другие (Kunth, 1819, 1835; Endlicher, 1836-1840; Ledebour, 1853 и др.). С начала 1840-х годов устанавливается более узкое понимание трибы, в нее включают *Phalaris*, *Anthoxanthum*, *Hierochloë*, *Ataxia* и иногда некоторые рода Южного полушария (van der Hoeven, de Vriese, 1841; Wimmer, 1841; Moritzi, 1844; Patze et al., 1850 и др.). Вскоре трибу разделяют на две подтрибы: *Anthoxanthinae* (*Anthoxanteae*) Miq. и *Phalaridinae* (*Phalarideae*) Griseb. (Miquel, 1855).

Представления о положении трибы в системе злаков также неоднократно менялись. G. Bentham (1881) считал очевидной связь *Phalarideae* с *Oryzeae* и, в еще большей степени, с *Ehrharteae*, рода которой он включал в *Phalarideae*. Н.Н. Цвелев (1974) первоначально относил *Phalaris*, *Anthoxanthum* и *Hierochloë* к трибе *Phleaeae*, затем рассматривал их как представителей трибы *Phalarideae* с подтрибами *Anthoxanthinae* и *Phalaridinae* (Цвелев, 1976б), затем стал рассматривать *Phalaris* как представителя трибы *Phleaeae*, а *Anthoxanthum* и *Hierochloë* отнес к обширной трибе *Poeae* (включающей в этом случае *Aveneae*, *Agrostideae*, *Cinneae* и др.) (Цвелев, 1987; Tzvelev, 1989). Некоторые систематики предлагают не выделять трибу *Phalarideae*, включая ее в *Aveneae* (Clayton, Renvoize, 1986; Watson, Dalwitz, 1992; Цвелев, 2000), *Poeae* (Grass Phylogeny Working Group, 2001), *Agrostaeae* (Рожевиц, 1946).

Таксономический статус отдельных представителей *Phalarideae* требует уточнения. Так после работы Schouten и Veldkamp (1985), показавших, что признаки, обычно используемые для разделения *Hierochloë* и *Anthoxanthum* (тип развития двух нижних цветков), у ряда видов Ю.-Восточной Азии имеют промежуточные состояния, распространилось мнение о необходимости объединения *Hierochloë* и *Anthoxanthum* в один род, принятое, в частности, Р. Соренгом (Soreng, 2003), составителями «Флоры Китая», «Флоры Северной Америки» и модераторами базы данных нуклеотидных последовательностей Genbank NCBI. Кариологические данные также свидетельствуют скорее в пользу такого объединения, так как обнаружены виды (*Anthoxanthum davidsei* (R.W.Pohl) G.C.Tucker, 2n=56, Pohl, 1972), морфологически относящиеся к *Anthoxanthum*, но имеющие основное хромосомное число 7, как *Hierochloë*.

Актуальность предпринятого исследования связана и с тем обстоятельством, что входящие в состав трибы *Phalarideae* sensu stricto виды имеют большое ресурсное значение. Они – неперенные элементы северных травяных биомов, важный компонент фуражных трав на культивируемых и некультивируемых лугах. *Anthoxanthum* и *Hierochloë* – источники кумарина для фармакологической и парфюмерной промышленности (Petersen et al., 1988), объекты народной медицины (Лавренов, 2004), компоненты ряда ароматизированных вин и настоек в пищевой промышленности. Изучение таксономии и филогенетических взаимоотношений дикорастущих и культивируемых видов *Phalarideae* может иметь значение для разработки правильной стратегии работ по сохранения биоразнообразия флоры России.

Цель работы: используя методы молекулярной систематики, исследовать высокоизменчивые последовательности транскрибируемых спейсеров ITS1 и ITS2 в рДНК, сравнительно медленно эволюционирующие гены 5.8S рРНК, гены лейциновой тРНК (*trnL*) и спейсеры *trnL-trnF* генома хлоропластов для выяснения филогенетических отношений и статуса видов трибы *Phalarideae* флоры России и уточнения положения трибы в семействе *Poaceae* относительно других представителей *Aveneae* и *Poeae*.

Задачи работы:

1. Амплифицировать и секвенировать последовательности ITS1-5.8SpДНК-ITS2, гена *trnL* и спейсеров *trnL-trnF* видов трибы *Phalarideae* флоры России, определить степень родства исследуемых видов.

2. Исследовать частоты замен в последовательности ITS у растений из нескольких удаленных популяций *Anthoxanthum alpinum* Á.Löve et D.Löve и *A. odoratum* L., сравнить наблюдаемую изменчивость с изменчивостью ITS на межвидовом и межродовом уровне.

3. Картировать нуклеотидные замены, инсерции и делеции относительно элементов вторичной структуры кодируемых ITS, генов 5.8S рРНК, интрона и экзона гена транспортной РНК *trnL*.

4. Проанализировать полученные данные различными молекулярно-филогенетическими методами, построить филогенетические деревья, определить, монофилетична ли триба *Phalarideae*, и установить положение входящих в неё родов относительно представителей крупных родственных триб Мятликовых и Овсовых.

Научная новизна работы и положения, выносимые на защиту: В ходе исследования впервые был секвенирован район ITS1-5.8SpРНК-ITS2 ядерных генов 45S рРНК у 39 представителей родов *Anthoxanthum*, *Hierochloë*, *Phalaris*, объединяемых ранее в трибу

Phalarideae Kunth. Также были впервые секвенированы участки хлоропластного генома – экзоны и интрон гена транспортной РНК лейцина *trnL* и спейсер *trnL-trnF* у 25 видов *Phalarideae*. Кроме того, впервые секвенированы и охарактеризованы районы ITS-последовательностей 23 видов и подвидов злаков, представителей внешних групп (*Catabrosa capusii*, *Zingeria biebersteiniana* subsp. *trichopoda*, *Catabrosella araratica*, *Hyalopoa pontica*, *Cinna latifolia*, *Triticum aestivum* var. *albirubrinflatum* и др.).

Впервые путем сравнительного анализа ядерных и хлоропластных генов с использованием методов молекулярной филогении реконструированы филогенетические деревья, показывающие наиболее вероятные пути дивергенции видов трибы *Phalarideae* и положение родов *Anthoxanthum*, *Hierochloë*, *Phalaris* в системе злаков.

Впервые с использованием методов молекулярной филогении показано, что в подтрибе *Anthoxanthinae* виды *Anthoxanthum*, ранее относимые к выделенному Р. Брауном роду *Ataxia*, формируют отдельную кладу, что говорит в пользу восстановления *Ataxia* в ранге рода. Впервые обнаружены молекулярные маркеры (в том числе крупные вставки и делеции в хлоропластной ДНК), специфические для *Anthoxanthum*, *Hierochloë* и *Ataxia*. На основании обнаруженных синапоморфий в последовательностях хлоропластного генома предложена схема дивергенции родов и видов в подтрибе *Anthoxanthinae*. Впервые в последовательности 5.8S рРНК обнаружены 2 замены, специфичные для рода *Anthoxanthum* (включая *Ataxia*) и отличающие *Anthoxanthum* от *Hierochloë*. Впервые с помощью методов молекулярной филогении показано базальное положение первичного диплоида *Hierochloë australis* Roem. et Schult. в филогенетической ветви *Anthoxanthum* и *Hierochloë*.

Практическая значимость работы: Результаты изучения таксономии и филогенетических взаимоотношений дикорастущих и культивируемых видов *Phalarideae* могут иметь значение для уточнения стратегии сохранения биоразнообразия флоры России. Выявленные видоспецифичные последовательности ITS *Phalarideae* могут быть использованы в качестве ДНК-штрихкодов для определения видовой принадлежности неидентифицируемого морфологически материала растительного происхождения. Результаты работы могут быть использованы при чтении курсов лекций на кафедрах ботаники, цитологии и гистологии, генетики и селекции Санкт-Петербургского государственного университета.

Объём и структура диссертации: Диссертация представлена на 108 страницах, содержит 8 таблиц и 31 рисунок.

Апробация работы: Материалы диссертации были представлены на 5-м Международном совещании по кариологии, кариосистематике и молекулярной филогении растений (Санкт-

Петербург, 2005), на Конференции по морфологии и систематике растений, посвященной 300-летию со дня рождения Карла Линнея (Москва, 2007), 12-м Съезде Русского Ботанического общества (Петрозаводск, 2008), Конференции «Молодежь и наука на Севере» (Сыктывкар, 2008), 6-м Международном совещании по кариологии, кариосистематике и молекулярной филогении растений (Санкт-Петербург, 2009).

Публикации: По материалам диссертации опубликовано 6 печатных работ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал для исследования собран в ходе экспедиций нашей лаборатории на территории Ленинградской и Архангельской областей, Тебердинского государственного заповедника (Карачаево-Черкессия), Республики Алтай, а также получен из гербария БИН РАН и гербария Центрального Сибирского Ботанического Сада. Гербарные образцы видов *Anthoxanthum* из Испании были любезно предоставлены М.П.Перейра, Университет Каруньи, Испания. Образцы *Anthoxanthum* и *Hierochloë* из Новой Зеландии любезно предоставили Г. Коннор (Университет Кентербери) и Э. Кэмерон (Музей естественной истории, Окленд). Образцы из гербария парижского Музея естественной истории были предоставлены В.С. Шнеер, образцы из гербария Главного Ботанического Сада РАН – И.А. Шанцером.

Выделение геномной ДНК проводилось согласно методике Дойла и Дойла (Doyle, Doyle, 1987), с модификациями. Для амплификации района ITS в качестве прямого праймера использовались ITS-1P 5'-aaccttatcatttagaggaagg-3' (Ridgway et al., 2003) и ITS-5 5'-ggaagtaaaagtcgtaacaagg-3' (White et al. 1990). Обратный праймер во всех случаях ITS-4 5'-tcctccgcttattgatatgc-3' – 20 н. (White et al. 1990). Протокол амплификации: 1 цикл: 10 мин 94⁰С; 35 циклов: 1 мин 94⁰С; 1 мин 30 сек 48⁰С; 2 мин 72⁰С; 1 цикл: 1 мин 72⁰С. **Секвенирование ДНК** выполнялось по методу Сэнджера на базе НПФ «Хеликс» и ЦКП БИН РАН. Секвенирование выполнялось в обоих направлениях. **Первичная обработка и анализ последовательностей** производились с помощью пакетов программ MEGA 4 (Kumar et al., 2003) и DAMBE (Xia, 2000; Xia, Xie, 2001), первичное выравнивание последовательностей с помощью алгоритмов ClustalW и Muscle. Затем данные переводились в формат FASTA, и выполнялось множественное выравнивание с помощью программы MAFFT (<http://align.genome.jp/mafft/>). **Построение филогенетических деревьев** выполнялось тремя типами методов – методом расстояний (NJ), методом максимальной парсимонии (MP) и байесовским методом. В качестве показателя устойчивости дерева использовался бутстрэп-индекс (500 репликаций), в качестве модели замен использовалась модель Кимура-2 с попарным

удалением гэпов. При расчетах методом МР и байесовском анализе использовали программу ModelTest 3.7 (Posada, Crondall, 1998), предварительно определяя модель, согласно которой эволюционируют последовательности. Использовалась модель с наименьшим значением Akaike Information Criterion, в нашем случае это была модель GTR+I+G (General Time Reversible, с гамма-распределением). Для построения дерева методом МР применялась программа PAUP 4.0b10. (Swofford, 2003), для построения деревьев байесовским методом - программа Mr.Bayes 3.1 (Ronquist, Huelsenbeck, 2003). Данные предварительно переводились в формат NEXUS, и выполнялся анализ с использованием модели GTR+I+G в течение 500 тысяч генераций. **Модели вторичных структур РНК** строили с помощью программы RNAstructure 4.6 (Zuker, 2003).

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Внутривидовая и межвидовая изменчивость последовательностей района ITS1-5.8S rDNA-ITS2 в трибе *Phalarideae*

Anthoxanthum. Как правило, для характеристики вида по последовательностям ITS1 и ITS2 исследуют всего один образец, предполагая, что внутривидовая изменчивость ITS не превышает 2-4%, а межвидовая обычно больше 4% (Шнеер, 2007). Для того, чтобы проверить соответствие этих представлений реальности, мы секвенировали *A. odoratum* из нескольких удалённых популяций. Были проанализированы два образца из республики Алтай, образец из Красноярского края, образец из Тверской области и образец из Канады. Аналогичное исследование было проведено с *A. alpinum*. Были исследованы растения из Горного Алтая, из Тебердинского заповедника, из Хакасии и с Полярного Урала. Также мы проанализировали образец с о-ва Итуруп, определённый как *A. nipponicum* Honda. Внутривидовая изменчивость ITS *Anthoxanthum* из удалённых популяций не превышала 2%. При этом генетические расстояния между популяциями *A. odoratum* и *A. alpinum* из географически удалённых регионов оказались больше межвидовых расстояний. Это согласуется с выводами работы М. Pimentel (2008), в которой для *A. odoratum* и *A. alpinum* методом RAPD было показано превышение изменчивости по географическому положению над межвидовой. Мы показали, что район ITS1-5.8S-ITS2 не содержит замен, позволяющих чётко разделить *A. odoratum* и *A. alpinum*. Образец с о-ва Итуруп – вид, описанный Honda как *A. nipponicum*, но позднее переведённый Löve и Löve в синоним *A. alpinum*, по ITS также принципиально не отличается от *A. alpinum* из других географических районов. Для него отмечен внутригеномный полиморфизм. Так, в позициях 61, 72 и 477 у этого образца стоят и С, и Т, у большинства

образцов *A. odoratum* и *A. alpinum* в этом положении С, у образцов из Тверской обл. и из Канады, а также у европейских видов *A. aristatum* Boiss. и *A. amarum* Brot. – Т.

Особый интерес вызывает сильное отличие по ITS видов *A. hookeri* Rendle и *A. siamense* Vog от всех остальных *Anthoxanthum*. Эти виды относятся к группе *Ataxia* sensu R.Brown, и имеют промежуточное между *Anthoxanthum* и *Hierochloë* строение колоска – нижний цветок мужской, второй стерильный без верхней цветковой чешуи и с остистой нижней. Большое число замен позволяет предполагать особый таксономический статус этой группы.

***Hierochloë*.** Внутривидовая изменчивость района ITS1-5.8SpДНК-ITS2 у видов рода *Hierochloë* оказалась существенно ниже, чем у *Anthoxanthum*, эволюционные расстояния между видами составили от 0,0 до 6,3%. Секвенированные нами образцы *H. alpina* Roem. et Schult., *H. equisetata* Zotov и *H. fusca* Zotov полностью совпали с размещенными в базе данных GenBank последовательностями каждого из этих видов. Также добуквенно совпали между собой секвенированные нами последовательности образцов *H. repens* P.Beauv. из Жигулёвского заповедника и из Волгоградской обл. и последовательности 2-х образцов *H. australis* из Ленинградской обл. и из Финляндии. Последовательности ITS видов *Hierochloë*, которые относятся к агрегату видов *H. aggr. odorata*, оказались идентичными. Эти виды, представляющие собой полиплоидные ряды, могут рассматриваться в качестве эколого-географических рас одного вида *H. odorata* (L.)P.Beauv. Точно такая же последовательность ITS была обнаружена у *H. repens*, который в своё время рассматривался в качестве подвида *H. odorata* (Chrtek, Jirasek, 1964; Цвелёв, 1973).

***Phalaris*.** При анализе полученных нами последовательностей рода *Phalaris* для разных образцов одних и тех же видов (два образца *P. canariensis* L. и два образца *P. truncata* Guss.) не было отмечено внутривидовой изменчивости. Расстояния между разными видами были существенно выше, чем у *Anthoxanthum* и *Hierochloë*, и варьировали от 3,2% до 9,1%, что косвенно указывает на более раннюю дивергенцию видов этого рода по сравнению с другими *Phalarideae*. Было показано, что фрагменты ITS1-5,8S-ITS2 *P. canariensis* и *P. brachystachys* Link добуквенно совпадают, что может указывать на идентичность этих видов.

Реконструкция филогенетического дерева по результатам анализа ITS1 и ITS2

В анализ взяты 100 последовательностей ITS1-5.8S rDNA-ITS2, включая секвенированные нами виды *Phalarideae* и взятые из базы GenBank последовательности родственных видов *Aveneae* и *Poaeae* (рис. 1.). В качестве внешней группы были использованы

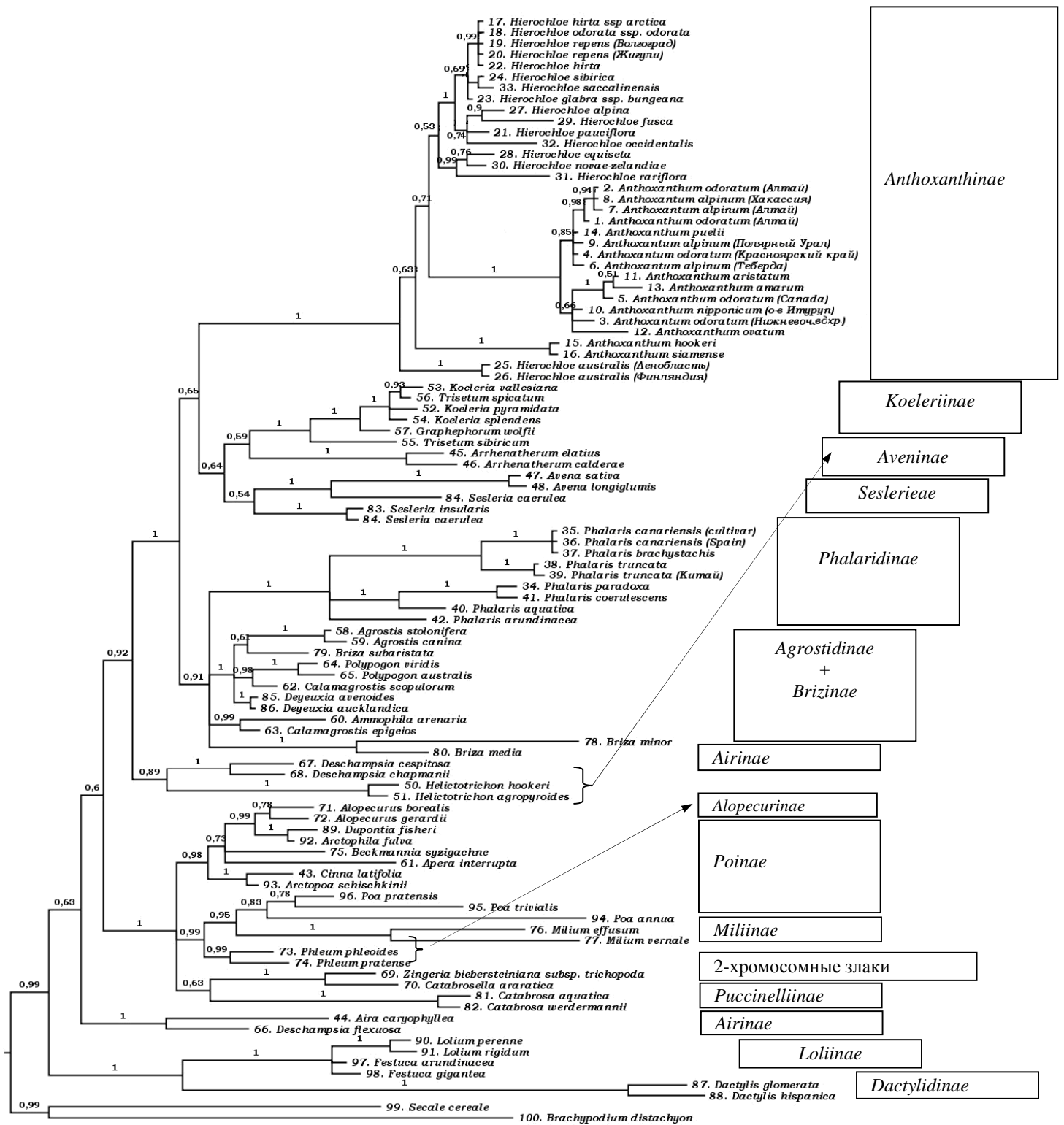


Рисунок 1. Филогенетическое древо, построенное на основании сравнительного анализа района ITS1-5.8S рДНК-ITS2 байесовским методом. Указаны значения posterior probability, модель GTR+I+Г, standard deviation 0,018237

виды *Secale cereale* и *Brachypodium distachyon*. На всех полученных деревьях триба *Phalarideae* разделяется на две удалённые группы, каждая из которых демонстрирует строгую монофилетичность. В одну из них входят представители рода *Phalaris*, в другую – все *Hierochloë* и *Anthoxanthum*. Обе эти группы входят в базовые *Aveneae*, при этом *Phalaridinae* оказывается сестринской к *Agrostidinae*, но более эволюционно удалённой. Группа *Anthoxanthinae* также выделяется со 100% достоверностью. В ней можно выделить две крупных клады, соответствующих родам *Hierochloë* и *Anthoxanthum*. На всех построенных нами деревьях с высокой бутстреп-поддержкой анцестральное положение для обеих групп занимает диплоидный вид *Hierochloë* – *Hierochloë australis*.

Как было отмечено выше, последовательности ITS видов *Hierochloë aggr. odorata* оказались идентичными – на древе они образуют одну кладу. Сестринскими к ней оказываются подвиды вида *H. glabra*, распространённого в восточноазиатском регионе и отличающегося от *H. odorata* густым опушением влагалищ листьев – это *H. glabra* Trin. ssp. *bungeana* (Trin) Peschkova, *H. glabra* Trin. ssp. *sibirica* (Tzvelev) Tzvelev и *H. glabra* Trin. ssp. *sachalinensis* (Prinz) Tzvelev. Виды *H. fusca*, *H. alpina* и *H. pauciflora* R.Br. эволюционно более удалены, но их положение на древе имеет слабую поддержку (BS 29%). В отдельную группу с BS 69% выделяются зубровки из Южного полушария – *H. equisetata*, *H. rariflora* Hook f. и *H. novae-zelandiae* Gand. Также отдельно располагается калифорнийский вид *H. occidentalis* Buckley.

В основании *Anthoxanthinae* находятся две группы – вид *H. australis* и южно-азиатские виды *A. hookeri* и *A. siamense*. Взаимное расположение этих групп на деревьях, построенных байесовским методом и методом NJ, различается, но бутстреп-поддержка соответствующих узлов невелика (60% и 53%). Обсуждение достоверной филогении этих групп см. в разделе «Обсуждение».

Сравнительный анализ первичной и вторичной структуры гена *trnL* и спейсера *trnL-trnF* *Phalarideae*

Для проверки филогенетических гипотез, выдвинутых при анализе ядерных генов, мы проанализировали участки хлоропластного генома – экзоны и интрон гена тРНК лейцина *trnL* и спейсер *trnL-trnF*. Мы секвенировали эти участки у 25 видов *Phalarideae*, и сравнивали их с последовательностями других видов *Aveneae* и *Poeae* из базы GenBank. Следует отметить, что характер замен в хлоропластном геноме у растений отличается от ядерного, для них характерны крупные вставки и дубликации участков генома, специфичные для различных

клад. Поэтому, наряду с обычными методами построения филогенетических деревьев, можно рассматривать крупные вставки и делеции в качестве синапоморфий.

Ген *trnL* - однокопийный ген, состоящий из одного интрона и двух экзонов. Экзоны *trnL* короткие (около 80 н.п.) и консервативные, они не несут серьёзной филогенетической информации. Интрон, напротив, эволюционирует достаточно быстро и он активно используется в филогенетических исследованиях (Taberlet et al. 2006; Шнеер 2007). Интрон гена *trnL* является единственным интроном I группы в геноме хлоропластов (Haugen et al. 2005). Для таких интронов характерная вторичная структура из девяти спаренных областей (P1-P9). При этом образуются три пространственных домена – один образуется спиралями P1 и P2, другой – P4, P5, P6 и P6а, третий – P3, P7, P8 и P9 (рис. 2).

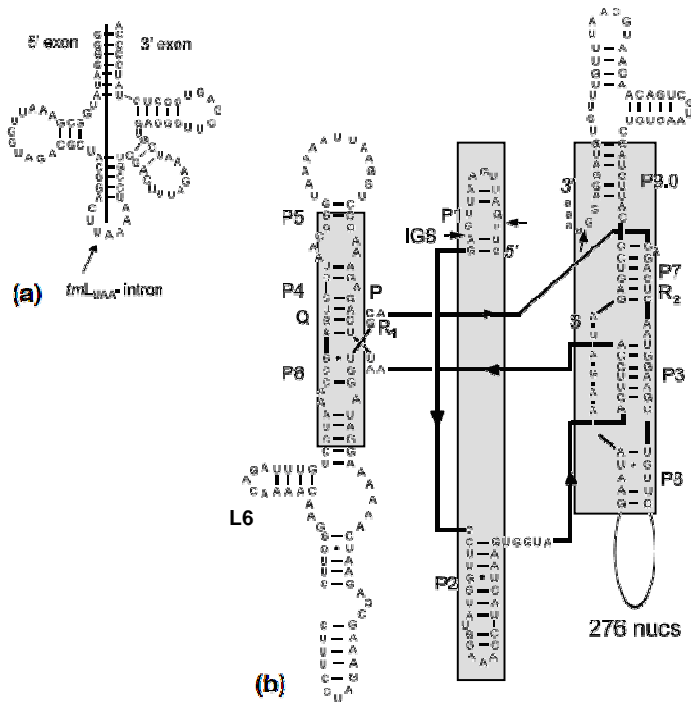


Рисунок 2. Общая вторичная структура интрона I группы (Borsch et al., 2003).

(a) – экзон, (b) – вторичная структура интрона. Серым выделены консервативные участки, необходимые для правильного сплайсинга интрона.

Изменения первичной последовательности ДНК в гене *trnL* и спейсера *trnL-trnF* и вторичной структуры РНК-продукта в ходе дивергенции таксонов у злаков

В рассматриваемом участке у исследованных видов¹ были обнаружены структурные изменения – относительно крупные вставки и делеции, влияющие на вторичную структуру молекулы. Для правильного сплайсинга этого интрона (путём автокатализа или за счёт взаимодействия с *srRNP*) существенно важна именно вторичная структура образующихся

¹ Были рассмотрены представители всех подтриб *Aveneae* и *Poaeae*.

пространственных доменов. Мы обнаружили, что в анализируемых нами последовательностях структурные изменения (крупные вставки и делеции) происходят только в петлях L1-L9, не затрагивая спаренные области P1-P9. Три таких мутации находятся в петле L6 интрона, при этом они не меняют принципиально её вторичную структуру (рис. 3). Сразу скажем, что этих трех мутаций у *Anthoxanthum*, *Hierochloë* и *Phalaris* нет, наши объекты сохранили ancestrальную структуру шпильки (рис. 3 б).

1) 5-нуклеотидная делеция -AAAAC- в петле L6 (сравни рис. 3 а и б). Мы обнаружили её в интроне гена *trnL* у родов *Alopecurus* и *Phleum*. Сравнение последовательностей из базы данных GenBank показало, что она также характерна для всех видов *Puccinellia* и *Hordeum*, и отсутствует у видов овсов с С-геномами (*Avena macrostachya*, *A. eriantha*, *A. ventricosa* и *A. clauda*), в то время как у представителей этого рода с А-геномами делеция в наличии.

2) 4-нуклеотидная вставка AAAG у видов рода *Dactylus* (рис. 3 в).

3) 5-нуклеотидная вставка TCGAA, характерная для родов *Calamagrostis*, *Briza*, *Ammophila*, *Polypogon*. Поиск этого участка в GenBank показал, что она также характерна для всех видов *Gymnachne* и *Agrostis* (рис. 3 г).

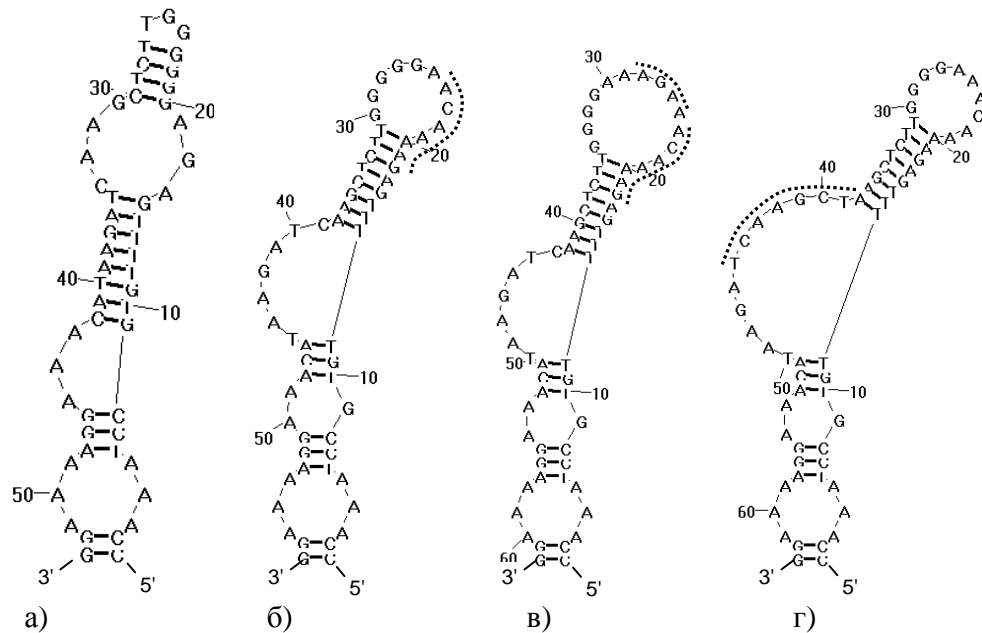


Рисунок 3. Шпилька L6. а) *Avena sativa* б) *Hierochloë alpina* в) *Dactylis glomerata* г) *Calamagrostis villosa*. Отмечены вставки, характерные для некоторых видов.

Все остальные крупные индели в гене *trnL* исследованных видов расположены в шпильке L8, самой крупной, изменчивой и богатой повторами. У видов *Hierochloë* её длина

составляет 297 нуклеотидов. У родов *Agrostis*, *Avenula*, *Ammophila*, *Briza*, *Calamagrostis*, *Polypogon* в этой шпильке присутствует большая делеция, и длина шпильки составляет всего 174 нуклеотида. В том же участке для родов *Avena*, *Arrhenatherum*, *Grappheporum*, *Koeleria* и *Trisetum* характерна ещё более крупная делеция, и длина шпильки составляет всего 97 нуклеотидов. Анализ данных GenBank показал, что такая делеция также характерна для всех видов *Rostraria*. Таким образом, эти делеции характерны для «типичных» *Aveneae*, у *Anthoxanthum*, *Hierochloë* и *Phalaris*, равно как у всех исследованных к настоящему времени *Poeae* этой делеции нет- наши объекты сохранили анцестральную структуру шпильки L8.

У видов трибы *Phalarideae* в гене *trnL* присутствуют следующие индели: вставка АСАТ у рода *Phalaris*, делеция GAAATTA у *Hierochloë* (кроме *H.australis*), перекрывающаяся с ней делеция TTGAAA у *Phalaris aquatica* L. и *P.minor* Retz., а также у самого основания стебля тРНК дупликация CCCCA у всех видов *Anthoxanthum* и *H.australis* (рис. 4).

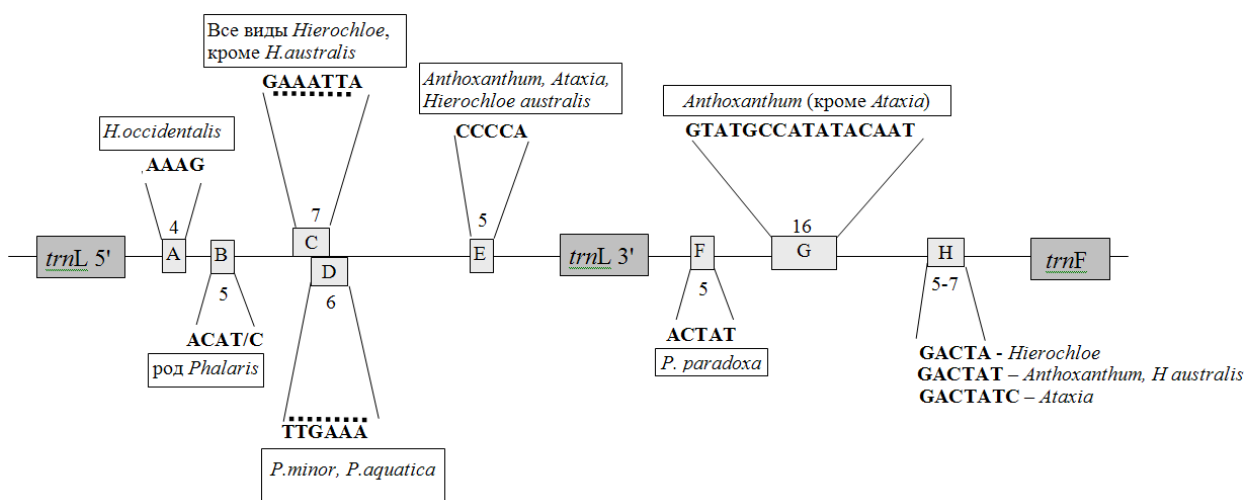


Рисунок 4. Структурные изменения в интроне гена *trnL* и спейсере *trnL-trnF*, характерные для видов трибы *Phalarideae*. Пунктиром обозначены делеции. Цифры указывают длину вставок и делеций в районах А-Н. Отмечены синапоморфные индели.

В спейсере *trnL-trnF* обнаружено гораздо меньше структурных замен, характерных для групп видов. Вероятно, это связано с меньшей важностью его вторичной структуры по сравнению с интроном *trnL*, так как у него нет необходимости поддерживать строгую пространственную организацию, обеспечивающую автокатализ. У части видов рода *Anthoxanthum* (кроме видов *A. hookeri*, *A. siamense* и *A. mexicanum* Mez) в этом спейсере наблюдается крупная 16-нуклеотидная дупликация GTATGCCATATACAAT. Интересно, что дублицированный участок у всех видов *Anthoxanthum* и *Hierochloë*, в сравнении с

анцестральной последовательностью, содержит замену А→Т. Подчеркнём, что эта замена отсутствует у всех остальных исследованных видов *Aveneae* и *Poeae*, включая род *Phalaris*.

В том же районе у *Grapphorum wolfii* наблюдается сходная дупликация, но на два нуклеотида длиннее и смещённая к 3'-концу. Это позволяет делать предположения об истории структурных изменений этого участка (рис. 5). Вероятно, замена А→Т произошла у общего предка всех *Anthoxanthinae*, а затем после обособления «продвинутых» видов *Anthoxanthum* сначала от *Hierochloë*, а затем от видов группы *Ataxia* у *Anthoxanthum* произошла наблюдаемая дупликация. Наличие замены А→Т только у *Anthoxanthinae* и разный размер вставки у *Anthoxanthum* и *Grapphorum* показывают, что это две независимо возникшие дупликации в одной из «горячих точек» хлоропластного генома.

Ближе к 5'-концу спейсера находится ещё одна вставка, специфичная для *Anthoxanthineae*: GACTA у большинства *Hierochloë* (GACTATC у *H. occidentalis*), GACTAT у *Anthoxanthum* и *H. australis* и GACTATC у *A. amarum*, *A. mexicanum* и *A. siamense*.

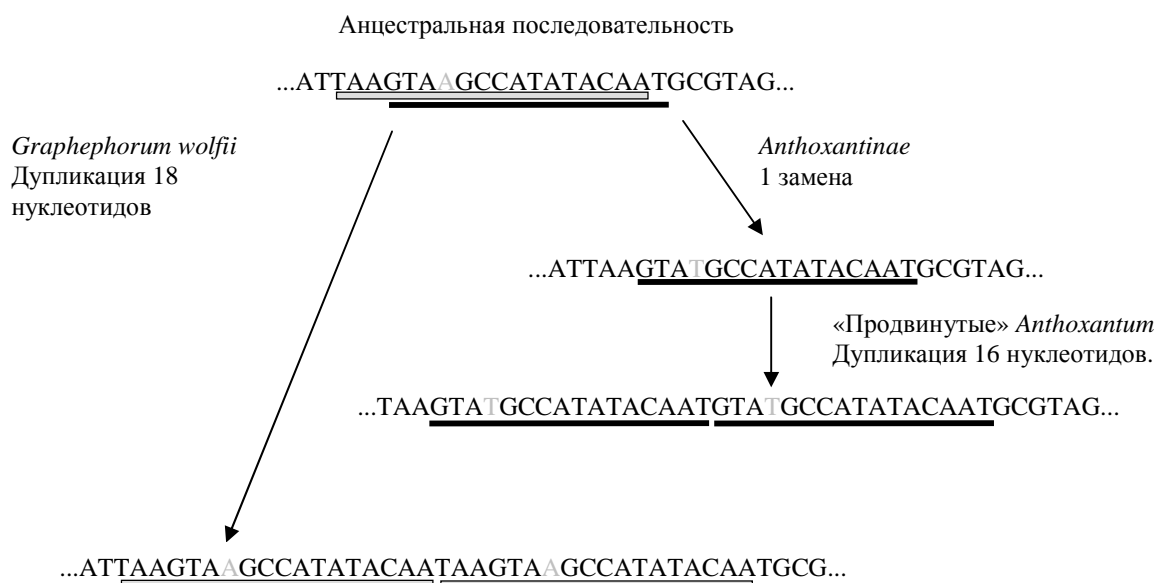


Рисунок 5. Дупликации, произошедшие в разных эволюционных ветвях *Pooideae* в участке спейсера *trnL-trnF*.

Реконструкция филогенетического дерева по результатам анализа хлоропластного гена *trnL* и спейсера *trnL-trnF*

Мы проанализировали участок *trnL-trnF* (длина исследуемого участка гена *trnL* вместе с интроном составила 644 нуклеотида (после выравнивания), длина спейсера *trnL-trnF*– 494 нуклеотида) у 27 видов *Phalarideae* и родственных таксонов (всего 80 последовательностей) и построили филогенетические деревья методами MP, NJ и методом

Байеса. Полученные деревья не имели принципиальных различий в топологии. Дерево, построенное методом NJ, представлено на рис. 6.

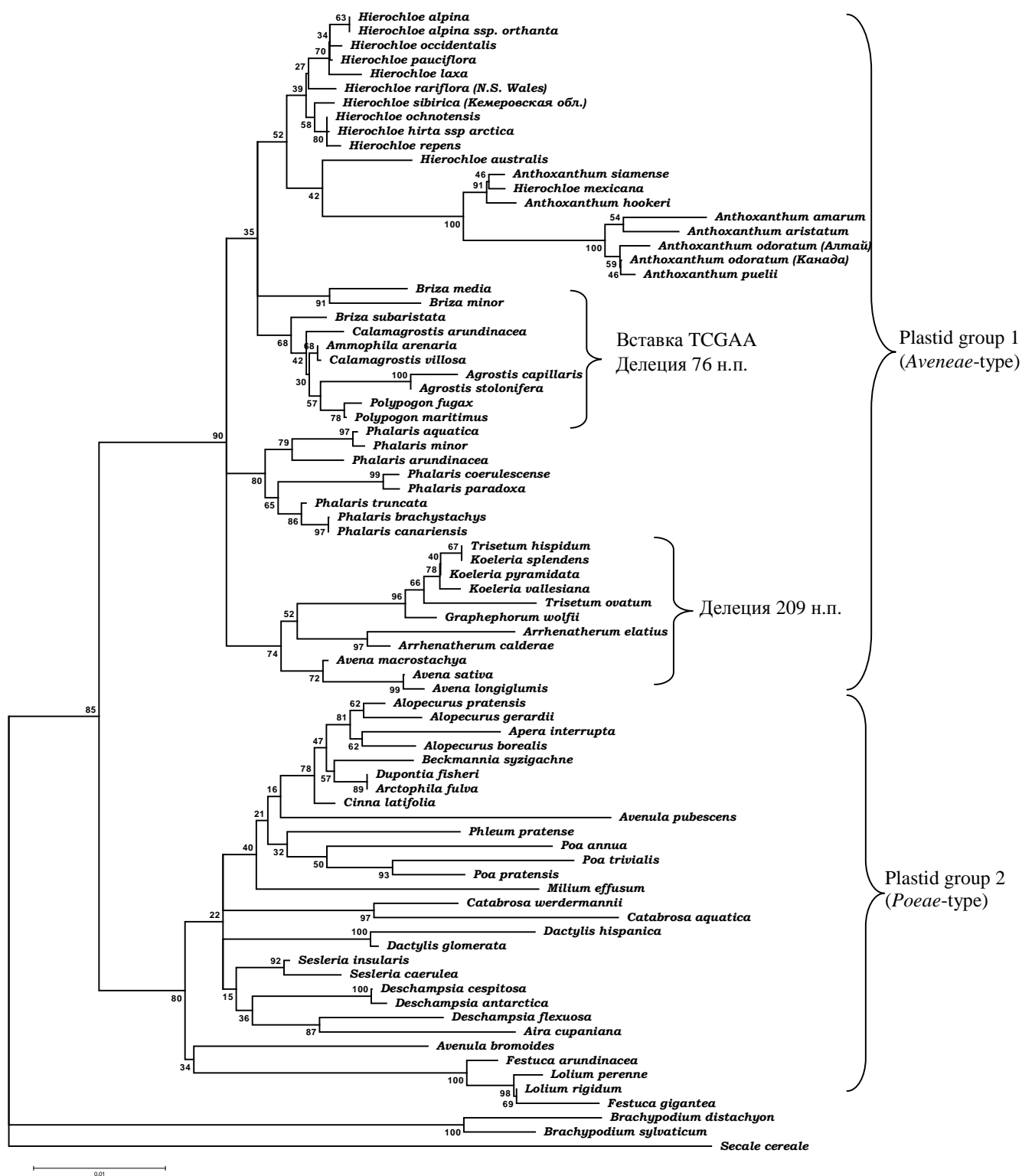


Рисунок 6. Филогенетическое дерево, построенное на основании сравнительного анализа района *trnL-trnF* методом Neighbor-Joining. Указаны значения бутстреп-поддержки (500 репликаций).

На древе все исследуемые виды (кроме внешней группы *Secale-Brachypodium*) делятся на две крупные клады. Такое деление отмечается во многих работах при анализе хлоропластных генов *Aveneae* и *Poeae* (Soreng et al. 2007, Quintanar et al. 2007). Соренг обозначает их как Plastid group 1 (*Aveneae*-type), и Plastid group 2 (*Poeae*-type), они в целом соответствуют *Aveneae* и *Poeae* sensu Clayton et Renvoize (1986), но при этом некоторые виды, традиционно относимые к *Poeae*, попадают в первую группу (например, *Briza*), и, наоборот, традиционно относимые к *Aveneae* *Aira*, *Avenula* и *Deshampsia* попадают во вторую группу. *Anthoxanthum*, *Hierochloë* и *Phalaris* относятся к первой группе. Как и при анализе ITS, триба *Phalarideae* разделилась на две удалённые монофилетичные группы, соответствующие подтрибам *Anthoxanthinae* и *Phalaridinae*, причём последняя также оказалась близкой к *Agrostidinae* + *Brizinae*.

Оказалось, что крупные делеции в интроне гена *trnL* маркируют чётко выделяемые группы видов – группу *Agrostidinae*+*Brizinae* с делецией в 76 н.п. в шпильке L8 и вставкой TCGAA в шпильке L6, и группу *Aveninae*+*Koeleriinae* с делецией в 209 н.п. в шпильке L6. На деревьях, построенных по последовательностям ITS, эти группы также хорошо выделяются. При этом видно, что эти делеции происходили независимо в разных ветвях.

ОБСУЖДЕНИЕ

Положение исследуемых видов относительно других представителей *Aveneae* и *Poeae*.
Классическое разделение триб *Aveneae* и *Poeae* (Clayton, Renvoize, 1986) не нашло полного подтверждения при анализе молекулярных маркеров (Soreng, Davis, 2000, Soreng, 2003, Quintanar et al., 2007). Во всех этих работах виды, относимые к *Aveneae* и *Poeae*, были в той или иной степени перемешаны. Но во всех случаях при анализе хлоропластных генов выделялись две крупные группы, в первую из которых входили преимущественно представители *Aveneae*, а во вторую – *Poeae*. На построенных нами деревьях наблюдается сходная картина (рис. 6). Во всех случаях виды *Phalarideae* относятся к первой группе, базовым *Aveneae* (core *Aveneae* sensu Quintanar), включающим наиболее типичных представителей классических *Aveneae*. Мы везде наблюдаем две отдельные клады с высокими поддержками – в одну из них входят *Anthoxanthum* и *Hierochloë* (подтриба *Anthoxanthinae*), в другую – *Phalaris* (подтриба *Phalaridinae*). Взаимное расположение подтриб внутри группы базовых *Aveneae* при анализе ядерных и хлоропластных маркеров было различным (ср. рис 1 и 6). Так, при сравнении хлоропластных ДНК подтрибы *Brizinae*

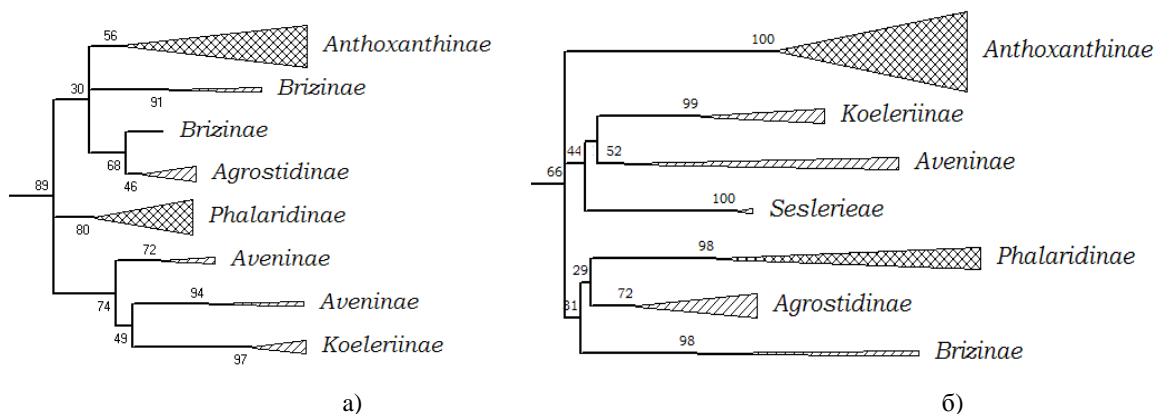


Рисунок 7. Положение *Phalaridinae* и *Anthoxanthinae* относительно других базовых *Aveneae* а) по данным анализа ITS1-5,8S-ITS2 б) по данным анализа гена *trnL* и спейсера *trnL-trnF*. Приведены фрагменты деревьев, построенных методом NJ, указаны значения бутстреп-поддержки (500 репликаций).

и *Aveninae* оказались парафилетическими, при этом по ITS они формируют отдельные клады. В пользу топологии, построенной по хлоропластным маркерам, свидетельствуют две крупные делеции в интроне *trnL* – одна из них является общей для *Agrostidinae* и *Brizinae* (76 н.п.), другая объединяет *Aveninae* и *Koeleriinae* (209 н.п.). Согласно этому варианту, подтрибу *Anthoxanthinae* следует относить к базовым *Aveneae*, а *Phalaridinae* в этом случае занимает сестринское положение ко всем остальным подтрибам этой группы.

Филогенетический анализ рода *Phalaris*

Среди видов рода *Phalaris* наиболее удаленной от корня является группа *P. canariensis* и *P. brachystachys* (рис. 8). Недавно методом скрещивания было показано, что *P. canariensis* является одомашненной формой *P. brachystachys* (Oram, 2004). При сравнении полученных нами последовательностей этих видов оказалось, что фрагменты ITS1-5.8S-ITS2 добуквенно совпадают, а спейсеры *trnL-trnF* отличаются всего по двум нуклеотидам. Это также указывает если не на идентичность, то на большую близость этих видов. Виды *P. canariensis*, *P. brachystachys* вместе с *P. truncata* образуют отдельную группу с числом хромосом $2n=12$, соответствующую секции *Phalaris*, выделяемой Н.Н. Цвелёвым (1976,).

Другую группу образуют виды *Phalaris* с ОХЧ 7. В ней обособляется *P. arundinacea* с $n=14$, но р-расстояние между ним и другими видами *Phalaris* не превышает 0,094, что даёт основания сомневаться в целесообразности выделения его в отдельный род *Phalaroides*. Другая ветвь этой группы – виды *P. paradoxa* L. и *P. coerulescens* Desf. На территории России встречается только первый из них (в Европейской части и на Кавказе), оба вида распространены в Средиземноморье. Они соответствуют *sect. Anomophalaris* Tzvel. У них

число хромосом $n=7$, один развитый и 4-7 недоразвитых колоска в метёлках. Сравнение ITS и хлоропластных последовательностей как по заменам, так и по инделям не показывает какой-либо особой близости между *P. aquatica* и *P. coerulescens* (в отличие от *P. paradoxa*) и наоборот, *P. paradoxa* и *P. coerulescens* ближе друг другу, чем каждый из них с *P. aquatica*.

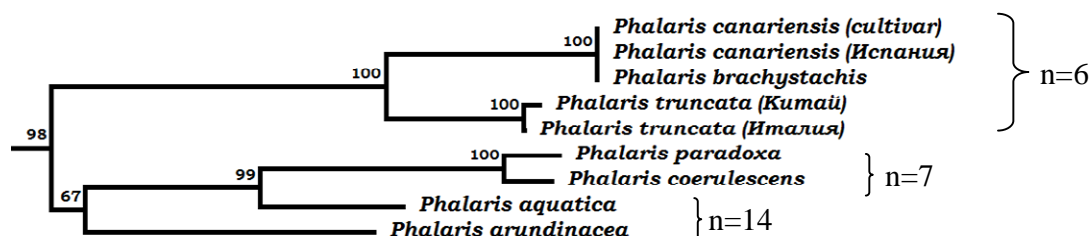


Рисунок 8. Виды *Phalaris* по результатам анализа района ITS1-5.8S рДНК-ITS2 методом Neighbor-Joining, Указаны значения бутстреп-поддержки (500 репликаций).

При анализе ДНК хлоропластов (рис. 9) также выделяется группа *P. truncata*, *P. brachystachys* и *P. canariensis*, для которой характерна редукция числа хромосом.

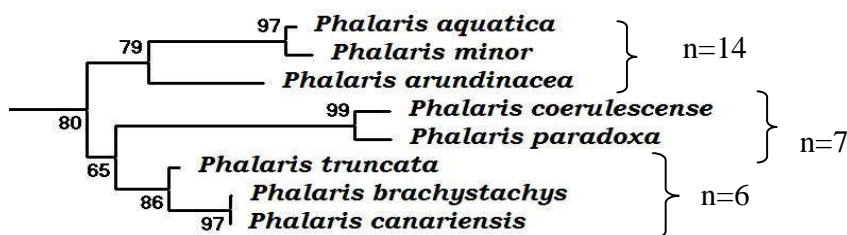


Рисунок 9. Виды *Phalaris* по данным анализа района *trnL-trnF* методом Neighbor-Joining, Указаны значения бутстреп-поддержки (500 репликаций).

Филогенетический анализ родов *Anthoxanthum* и *Hierochloë*

Группа *Anthoxanthinae* выделяется со 100% достоверностью. В ней можно чётко выделить две крупных клады, соответствующие родам *Hierochloë* и *Anthoxanthum*. На всех построенных нами деревьях с высокой бутстреп-поддержкой анцестральное положение для обеих групп занимает единственный диплоидный вид *Hierochloë* – *Hierochloë australis*. Он, впрочем, является наиболее древним. Род *Anthoxanthum* эволюционно более продвинут в сравнении с *Hierochloë*, как по строению цветка, так и по кариотипу (редуцированное основное число хромосом $x=5$) (Авдулов, 1931; Шохина, 1977).

Все виды *Hierochloë aggr. odorata* имеют идентичные ITS, на древе они образуют одну кладу (рис. 10). При этом *H. odorata*, *H. hirta* Hayek, *H. hirta ssp. arctica* (Presl) G.Weim. представляют собой полиплоидный ряд (Шохина 1977; Пробатова 2007) и морфологически отличаются только количественными признаками. Возможно, имеет смысл не выделять

H. hirta и *H. repens* в качестве отдельных видов и включить их в агрегат *odorata* в качестве подвидов.

Межвидовая изменчивость последовательностей спейсера *trnL-trnF* у *Hierochloë* оказалась крайне низка, она сводится к нескольким единичным заменам, поэтому соответствующие узлы на филогенетическом дереве имеют крайне низкие бутстреп-индексы (рис. 11). Виды, относящиеся к агрегатам *odorata* и *glabra* (включая *H. hirta* и *H. repens*), на этом дереве объединяются в одну группу.

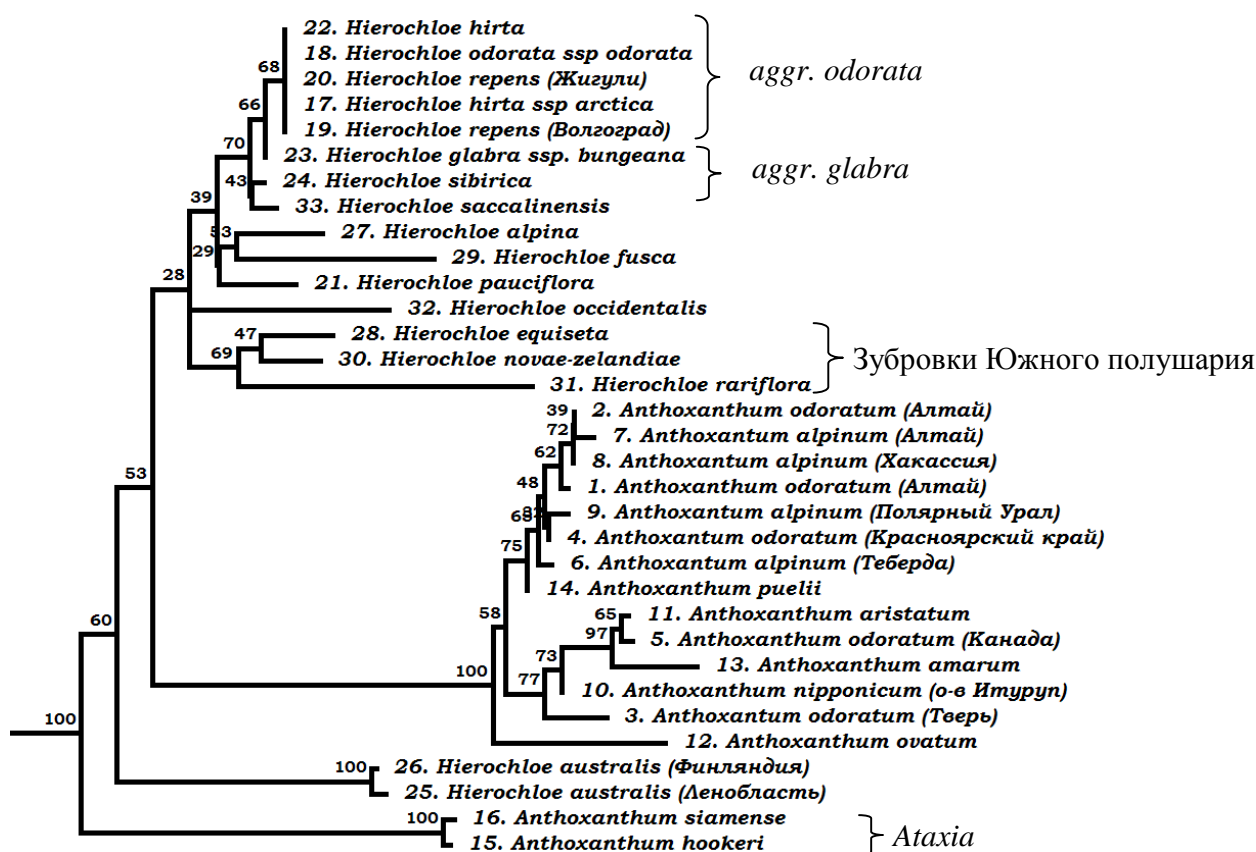


Рисунок 10. Виды *Anthoxanthum* и *Hierochloë* по данным анализа района ITS1-5.8S рДНК-ITS2 методом Neighbor-Joining, Указаны значения бутстреп-поддержки (500 репликаций).

На филогенетическом дереве, построенном по ITS, видно разделение *Hierochloë* на две группы, соответствующие двум ареалам рода – большего по площади в Северном полушарии и меньшего в Южном (Австралия и Новая Зеландия). Калифорнийский вид *H. occidentalis* на дереве удалён от других видов северной части ареала, но, тем не менее, относится к группе «северных» видов. На его эволюционную удалённость также указывает вставка AAAG в спейсере *trnL*. Виды *H. equisetata*, *H. rariflora* и *H. novae-zelandiae* образуют группу, соответствующую южной части ареала. Исключением является новозеландский вид

H. fusca, который оказался наиболее близок не к другим видам Южного полушария, а к виду *H. alpina*, который встречается преимущественно на северной границе северной части ареала рода – на каменных россыпях побережий Арктики.

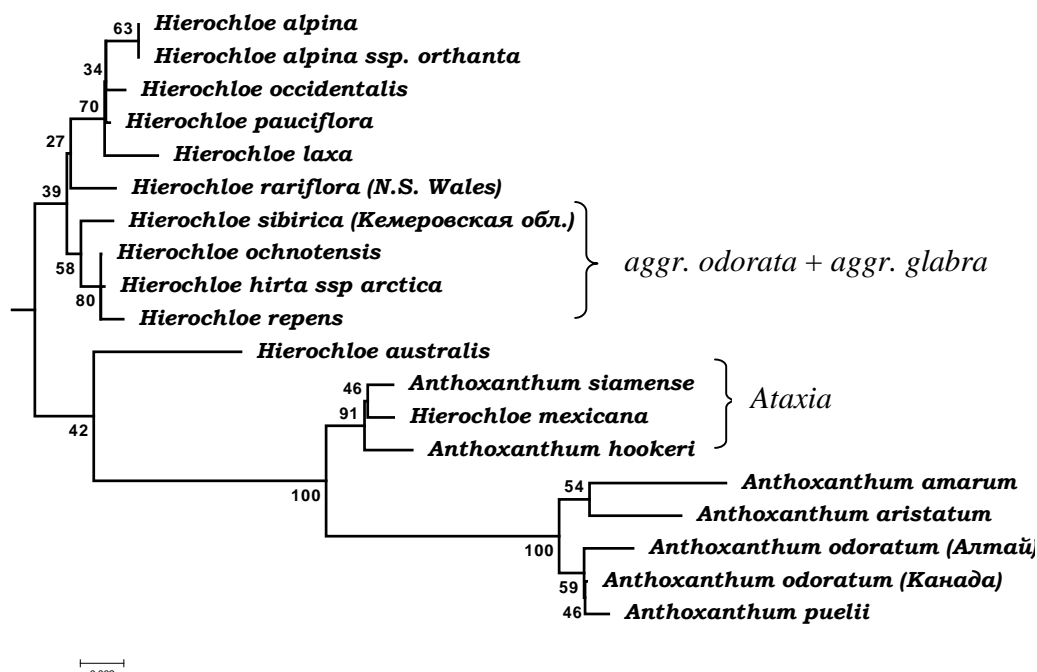


Рисунок 11. Виды *Anthoxanthum* и *Hierochloë* по результатам анализа района *trnL-trnF* методом Neighbor-Joining, Указаны значения бутстреп-поддержки (500 репликаций).

В отдельную группу с высокой поддержкой выделяются южно-азиатские образцы *A. hookeri*, *A. siamense*, а также вид *A. mexicanum*. Все этих виды по морфологии отличаются как от *Anthoxanthum*, так и от *Hierochloë*, занимая промежуточное положение. Нижний цветок в колоске мужской, второй редуцирован (у *Anthoxanthum* оба нижних цветка редуцированы, у *Hierochloë* оба мужские), с длинноостными цветковыми чешуями и без лодикул. Эти признаки соответствуют описанию рода *Ataxia* R.Br., впоследствии упразднённого.

Мы видим, что на деревьях, построенных по ядерным и хлоропластным маркерам, наблюдаются четыре основных таксономических группы в пределах *Anthoxantinae* – это вид *H. australis*, основная группа видов *Hierochloë*, виды секции *Ataxia* R.Br. и «продвинутые» *Anthoxanthum*. Но порядок их ветвления при этом различен, и все соответствующие узлы имеют невысокую бутстреп-поддержку (40-60). Топология, полученная на основании анализа последовательностей ITS, представляется нам ошибочной. Если, согласно ей, секция *Ataxia* отделилась до разделения *Anthoxanthum* и *Hierochloë*, то в разных ветвях должна были независимо произойти два события – редукция второго цветка у видов секции *Ataxia* и

редукция обоих нижних цветков у видов *Anthoxanthum*. Это представляется маловероятным, гораздо более вероятен сценарий последовательной редукции цветков, что мы и наблюдаем в топологии, полученной на основе хлоропластных маркеров.

Единственный существующий диплоидный вид *Hierochloë H. australis* согласно топологии дерева, построенного по ядерным маркерам, обособился до разделения *Anthoxanthum* и *Hierochloë*. Согласно хлоропластным данным, сначала произошло отделение общего предка *H. australis* и *Anthoxanthum*, обособление последнего и образование секции *Ataxia*. По первому сценарию можно было бы предложить выделить *H. australis* в отдельный род, по второму – объединить его с *Anthoxanthum*. Но *H. australis* по морфологии представляет собой типичную *Hierochloë*, с трёхцветковым колоском с двумя нижними тычиночными цветками, с небольшими остями и перепончатыми колосковыми чешуями. Поэтому остаётся предположить парафилетичность рода *Hierochloë*.

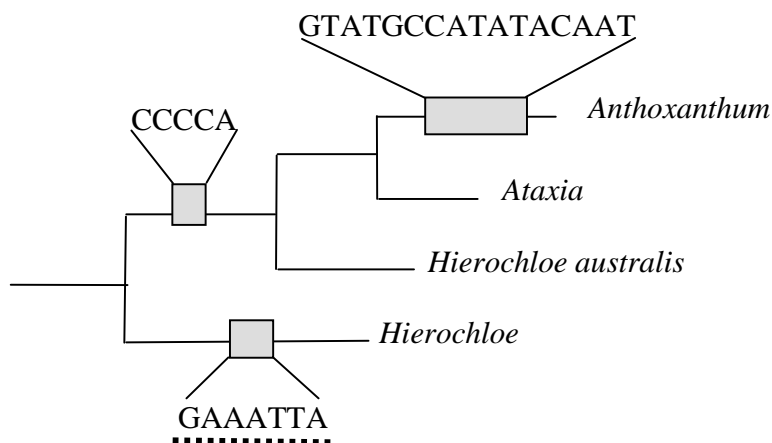


Рисунок 12. Изменения района *trnL-trnF* генома хлоропластов в ходе дивергенции таксонов *Anthoxanthinae*.

В пользу филогенетического сценария, представленного на древе, построенном по хлоропластным последовательностям, также свидетельствуют общие для *H. australis* и *Anthoxanthum* вставки и делеции, которые можно рассматривать как синапоморфии. Проанализировав изменения в хлоропластных и ядерных последовательностях, мы можем предложить представленный на рис. 12 сценарий эволюционных событий, происходивших в ходе дивергенции таксонов *Anthoxanthinae*.

Таким образом, молекулярно-филогенетический анализ свидетельствует в пользу мнения Р. Брауна (Brown, 1838) о целесообразности выделении отдельного рода *Ataxia*, который, по Брауну, «...занимает промежуточное положение между *Hierochloë* и *Anthoxanthum*, и вместе с ними образует естественную и хорошо характеризующую секцию».

ВЫВОДЫ

1. Секвенированы районы ITS1-5,8SpРНК-ITS2 генов 45S рРНК у 39 представителей родов *Anthoxanthum*, *Hierochloë*, *Phalaris*, объединяемых ранее в трибу *Phalarideae* Kunth. Проведён сравнительный анализ этих последовательностей, частоты и спектра мутаций в районах ITS1 и ITS2, а также в эволюционно консервативном гене 5,8 S рРНК.

2. Секвенированы экзоны и интрон гена транспортной РНК лейцина *trnL* и спейсер *trnL-trnF* у 25 видов Пахучеколосниковых. Обнаружены характерные крупные инсерции, дубликации и делеции, специфичные для различных клад *Phalarideae* и некоторых подтриб *Aveneae*, которые можно рассматривать в качестве синапоморфий при верификации филогенетических гипотез.

3. С помощью методов молекулярной филогении реконструированы возможные филогенетические деревья, показывающие наиболее вероятные пути дивергенции видов трибы *Phalarideae* и положение родов *Anthoxanthum*, *Hierochloë*, *Phalaris* в системе злаков. Показано, что триба *Phalarideae* не является монофилетической. На всех полученных филограммах *Phalarideae* чётко разделяется на две удалённые группы, каждая из которых демонстрирует строгую монофилетичность. В одну из них входят представители рода *Phalaris*, в другую – все *Hierochloë* и *Anthoxanthum*. Обе эти группы входят в базовые *Aveneae*, при этом *Phalaridinae* оказывается сестринской к *Agrostidinae*, но более эволюционно продвинутой. Полученные данные подтверждают справедливость деления трибы *Phalarideae* Kunth на две подтрибы, *Anthoxanthinae* и *Phalaridinae*, рассматриваемые в рамках трибы *Aveneae*.

4. Генетические расстояния между разными видами рода *Phalaris* существенно выше, чем между видами *Anthoxanthum* и *Hierochloë*, что может указывать на более раннюю дивергенцию видов рода *Phalaris* по сравнению с другими пахучеколосниковыми.

5. В подтрибе *Anthoxanthinae* виды *Anthoxanthum*, ранее относимые Р.Брауном к роду *Ataxia*, формируют отдельную кладу, что говорит в пользу восстановления *Ataxia* в ранге рода. Обнаружены молекулярные маркеры (в том числе и крупные вставки и делеции), специфические для *Anthoxanthum*, *Hierochloë* и *Ataxia*. На основании обнаруженных синапоморфий в последовательностях хлоропластного генома предложена схема дивергенции родов и видов в подтрибе *Anthoxanthinae*.

6. Межвидовая изменчивость ITS у видов *A. odoratum* (2n=20) и *A. alpinum* (2n=10), *A. nipponicum* Honda (2n=10) не превышает внутривидовой, что свидетельствует о целесообразности присвоения *A. alpinum* статуса подвида *A. odoratum*.

7. Показано, что род *Hierochloë* является парафилетическим. Первичный диплоид *H. australis* занимает сестринское положение к *Anthoxanthum* и *Ataxia*.

8. Последовательности ITS и района *trnL-trnF* генома хлоропластов видов *Hierochloë aggr. odorata* абсолютно идентичны. Точно такие же последовательности были обнаружены у *H. repens*, который ранее рассматривался в качестве подвида *H. odorata*. Это подтверждает возможность рассматривать таксоны в пределах этого агрегата в качестве единственного вида *H. odorata*.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Родионов А.В., Ким Е.С., Носов Н.Н., Райко М.П., Мачс Э.М., Пунина Е.О. Молекулярно-филогенетическое исследование видов рода *Colpodium sensu lato* (Poae, Poaceae) // Экологическая генетика. 2008. Т. 6. №. 4. С. 34-46
2. Родионов А.В., Мачс Э.М., Пунина Е.О., Красильников Е.М., Михайлова Ю.В., Носов Н.Н., Гельтман Д.В., Ким Е.С., Коцербуба В.В., Крюков А.А., Райко М.П., Чупов В.С., Шнеер В.С. Уровни внутривидовой и межвидовой изменчивости ITS в природных популяциях цветковых растений: ДНК-штрихкодирование как инструмент исследования и рационального использования биоразнообразия флоры России // Динамика генофондов - Москва – 2008 – С. 63 – 66.
3. Ким Е.С., Райко М.П., Доброрадова М.А., Пунина Е.О., Носов Н.Н., Родионов А.В. Полифилетическое происхождение злаков с редуцированным основным числом из группы *Zingieria-Colpodium* // Материалы конференции по морфологии и систематике растений, посвященной 300-летию со дня рождения Карла Линнея. М., 2007. С. 66-67.
4. Райко М.П., Доброрадова М.А., Ким Е.С., Родионов А.В. Сравнительный анализ последовательностей ITS и генов 5.8S рРНК *Anthoxanthum*, *Hierochloë* и *Phalaris* // Материалы конференции по морфологии и систематике растений, посвященной 300-летию со дня рождения Карла Линнея. М., 2007. С. 77-79.
5. Райко М.П., Глускер Г.М. О филогенетических отношениях *Anthoxanthum* и *Hierochloë* // Молодежь и наука на Севере. Т. 3. Сыктывкар, 2008. С. 246-247
6. Райко М.П., Глускер Г.М., Родионов А.В. О филогенетических отношениях в трибе *Phalarideae* // Фундаментальные и прикладные проблемы в ботанике XXI века. Ч. 3. Петрозаводск, 2008. С. 71-72.