

Філогенетичне дерево австралійських видів роду *Nicotiana* на основі ампліфікації випадково поліморфної ДНК

С. І. Комарницький, І. К. Комарницький

Інститут клітинної біології і генетичної інженерії НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 148, Київ, 03143, Україна

*З метою застосування випадково ампліфікованої поліморфної ДНК для вивчення родинних зв'язків серед австралійських видів роду *Nicotiana* використано 20 олігонуклеотидів. Останні використовували як праймери для аналізу міжвидової мінливості серед 22 видів роду. Виходячи з даних дендрограми, побудованої методом максимальної економії (Wagner), досліджені види секції розподілено на три кластери, в основі двох із них знаходяться базові види секції, що добре узгоджується з висновками класичної таксономії.*

Вступ. Природне поширення видів роду *Nicotiana*, родина пасльонових, обмежене територією Північної та Південної Америки (74 %), а також Австралії та декількох островів Океанії (25 %), [1]. *N. africana* [2] є єдиним представником роду, описаного на африканському континенті. Близько 70 визнаних на сьогодні видів роду систематизовано в 14 секцій переважно на основі морфологічних та цитогенетичних параметрів [1, 3]. Проте попри численні переваги класичної таксономії такі характеристики, як вплив оточуючого середовища, мультигенне успадкування, часткове чи повне домінування, які суттєво впливають на прояв генетично детермінованих ознак, залишаються непроаналізованими [4]. Адаптація до різних, часто екстремальних умов середовища, особливо яскраво виражена у австралійських представників роду (21 вид), описаних як в помірній вологій зоні континенту, так і в межах посушливих напівпустель та зрошуваних океанічною водою піщаних ділянок тихоокеанських островів [5]. Проникнення роду *Nicotiana* в Австралію відбулося близько 10 мільйонів років тому, ймовірно, шляхом інтродукції попередників трьох базових представників (*N. suaveolentes*, *N. debneyi*, *N. fragrans*), тоді

як решта видів виникла шляхом повторних гібридизацій та інтрогресій між базовими видами [1]. Ця гіпотеза добре узгоджується з тим, що всі сучасні австралійські тютюни належать до єдиного анеуплоїдного ряду (хромосомні числа $n = 16-24$ за винятком $n = 17$).

Останні 10 років відомості щодо первинної структури окремих локусів широко використовувалися для реконструкції еволюційної історії численних таксонів, зокрема, на основі первинної структури внутрішнього транскрибованого спейсера (ВТС) ядерної рибосомної ДНК [6, 7]. У такий спосіб вивчено й філогенетичні зв'язки в роді *Nicotiana* [8-10]. У свою чергу, метод полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) з короткими олігонуклеотидними праймерами дозволяє провести швидкий та ефективний аналіз великого числа генетичних маркерів серед багатьох локусів [11, 12]. Іншими перевагами даного методу є: 1) попередня інформація стосовно досліджуваної послідовності ДНК не потрібна; 2) простий до виконання протокол; 3) потрібно лише малу кількість (нг) ДНК; 4) велике число зразків може бути проаналізовано одночасно в короткий термін; 5) метод можна застосовувати для широкого кола видів [13]. Отриманий поліморфізм є, як правило, результатом заміни окремих нуклеотидів, вставок та/або делецій. Зважаючи на це, метою цієї роботи було

дослідити філогенетичні зв'язки серед австралійських видів роду та порівняти їх з даними класичної таксономії [1, 3] та ВТС рДНК [10].

Матеріали і методи. Загальну ДНК виділяли з рослинного матеріалу (табл. 1), культивованого в стерильних умовах, згідно з раніше описаною методикою [14]. ПЛР проводили на ампліфікаторі Gene ATAQ Controller фірми «Pharmacia-LKB» (Швеція) за такого температурного режиму: початковий цикл, 96 °С, 1 хв; 36 °С, 5 хв — 72 °С, 2 хв; наступні 40 циклів, 94 °С, 1 хв — 36 °С, 1 хв — 72 °С, 2 хв; заключний цикл, 94 °С, 1 хв — 36 °С, 1 хв — 72 °С, 10 хв. Реакційна суміш (20 мкл) містила 10 мМ трис-НСІ, рН 9,0 (при 25 °С), 50 мМ КСІ, 2 мМ MgCl₂, 0,1 % тритону X-100, 0,5 мкмоль/л відповідного праймера, 200 мкмоль/л

кожного з чотирьох дезокситрифосфатів, 40 нг ДНК і 0,5 од. Таq-полімерази («Promega», США). Після завершення реакції суміш швидко охолоджували і фракціонували в 3 %-й агарозі (1,5 % NA фірми «Pharmacia» і 1,5 % SepRate-SDF фірми «Amersham», Велика Британія) в однократному ТАЕ буфері.

Двадцять праймерів (від OPA-01 до OPA-20) отримано від фірми «Oregon Technologies» (США). Кожну реакцію проводили щонайменше двічі. Розміри ампліфікованих фрагментів визначали, як описано раніше [15]. Драмбінчастий молекулярний маркер розміром 1 тис. п. н. отримано від фірми «Gibco» (США). Контрольні проби не містили ампліфікованих продуктів. Фрагменти, знайдені не у всіх проаналізованих видів, вважалися полімор-

Таблиця 1
Характеристика видів *Nicotiana* [1, 5]

Підрід Секція	Вид	Походження	Кількість хромосом
<i>Petunioides</i>			
<i>Suaveolentes</i>	<i>N. africana</i>	Африка	23
	<i>N. amplexicaulis</i>	Австралія	18
	<i>N. benthamiana</i>	«	19
	<i>N. cavicola</i>	«	23
	<i>N. debneyi</i>	Австралія/Океанія	24
	<i>N. eastii</i>	Австралія	32
	<i>N. excelsior</i>	«	19
	<i>N. exigua</i>	«	16
	<i>N. fragrans</i>	Океанія	24
	<i>N. goodspeedii</i>	Австралія	20
	<i>N. gossei</i>	«	18
	<i>N. hesperis</i>	«	21
	<i>N. ingulba</i>	«	20
	<i>N. maritima</i>	«	16
	<i>N. megalosiphon</i>	«	20
	<i>N. occidentalis</i>	«	21
	<i>N. rosulata</i>	«	20
	<i>N. rotundifolia</i>	«	22
	<i>N. simulans</i>	«	20
	<i>N. suaveolens</i>	«	16
	<i>N. velutina</i>	«	16
	<i>N. umbratica</i>		23

фними. Наявність та відсутність фрагмента позначалася символами 1 та 0 відповідно. Отриману матрицю поліморфних фрагментів було проаналізовано методом максимальної економії (Wagner) за допомогою прикладного пакету філогенетичних програм PHYLIP, версія 3.5.

Результати і обговорення. Серед 20 проаналізованих праймерів лише чотири (OPA-11, OPA-13, OPA-18, OPA-20) показали 100 %-й рівень поліморфізму серед австралійських видів роду. Решта праймерів давала переважно однотипні ампліфіковані фрагменти. Такий результат не є несподіваним, оскільки види, які вивчалися, належать до спільної секції роду, походять від спільного попередника(ків) та географічно ізольовані від решти видів роду протягом досить тривалого часу [1]. Профілі ампліфікованих з праймерами OPA-11 та OPA-13 фрагментів наведено на рис. 1 (а та б відповідно). У *N. ingulba* ампліфікується унікальний фрагмент OPA-11 розміром 1570 п. н. (рис. 1, а, лінія 1). Унікальні фрагменти виявлені також у *N. suaveolens* (OPA-11, 1250 п. н.), *N. eastii* (OPA-11, 1200 п. н.), *N. rotundifolia* (OPA-20, 2530 п. н.), *N. ingulba* (OPA-18, 1860 п. н.), *N. hesperis* (OPA-20, 180 п. н.). У підсумку отримано 156 фрагментів розміром від 180 до 2530 п. н. (табл. 2). Записані у вигляді матриці фрагменти (1/0) проаналізовано

методом максимальної економії (Wagner) для оцінки рівня поліморфізму та аналізу родинних зв'язків у межах секції. Коли *N. africana* була використана як поляризатор, проведений аналіз виявив п'ять можливих філогенетичних схем. Додатково задіяна програма CONSENSE з цього ж пакету вказала на єдине узгоджене дерево родинних зв'язків серед видів *Suaveolentes*, яке наведено на рис. 2. Розподіл видів на групи, отриманий на основі даної роботи, загалом підтримує раніше запропоновані філогенетичні схеми [8,10]. *N. occidentalis* різко вирізняється з-поміж інших видів секції і має монофілетичне походження. *N. fragrans* розташована в основі кластеру з шести видів, до якого віднесена і *N. eastii*. Згідно з даними одних авторів, даний вид є автополіплоїдом *N. suaveolens* [1], тоді як Костов [3] вважає його гібридом між *N. velutina* і *N. maritima*. Два інших базових види секції (*N. suaveolentes* і *N. debneyi*) вважаються сестринськими видами і віднесені до невеликого кластеру разом з *N. excelsior*, *N. simulans* і *N. megalosiphon*. Тим часом решта дев'ять видів виділені в окремий кластер, що містить три парафілогенетичні гілки, складені видами 1) *N. amplexicaulis* і *N. bethamiana*; 2) *N. cavicola*, *N. gossei*, *N. ingulba* і *N. hesperis* та 3) *N. velutina*, *N. goodspeedii* і *N. exigua*. Таке розташування свідчить про складне еволюційне

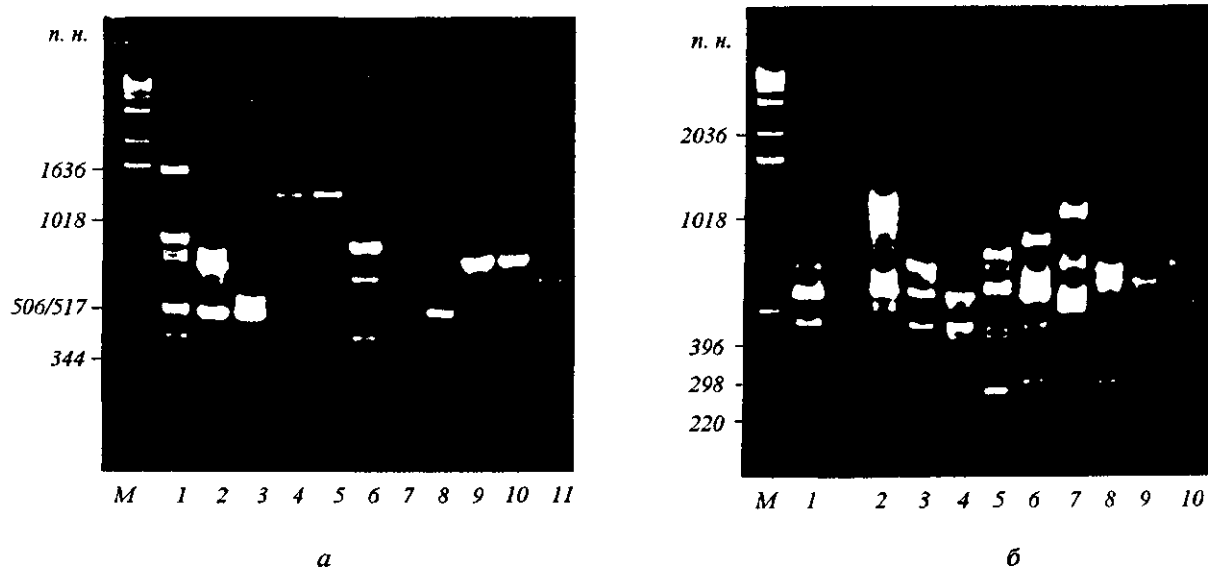


Рис. 1. Профілі ампліфікації випадково поліморфної ДНК, генерований праймером OPA-11 (а) та OPA-13 (б): М — маркер; 1 — *N. ingulba*; 2 — *N. umbratica*; 3 — *N. gossei*; 4 — *N. cavicola*; 5 — *N. benthamiana*; 6 — *N. hesperis*; 7 — *N. simulans*; 8 — *N. maritima*; 9 — *N. goodspeedii*; 10 — *N. velutina*; 11 — *N. exigua*

Таблиця 2
Нуклеотидна послідовність використаних праймерів

Назва праймера	Послідовність 5' ... 3'	Кількість ампліфкованих фрагментів	Розмір фрагментів, п. н.
OPA-11	CAATCGCCGT	36	270—1570
OPA-13	CAGCACCCAC	43	260—1640
OPA-18	AGGTGACCGT	37	180—1860
OPA-20	GTTGCGATCC	40	230—2530

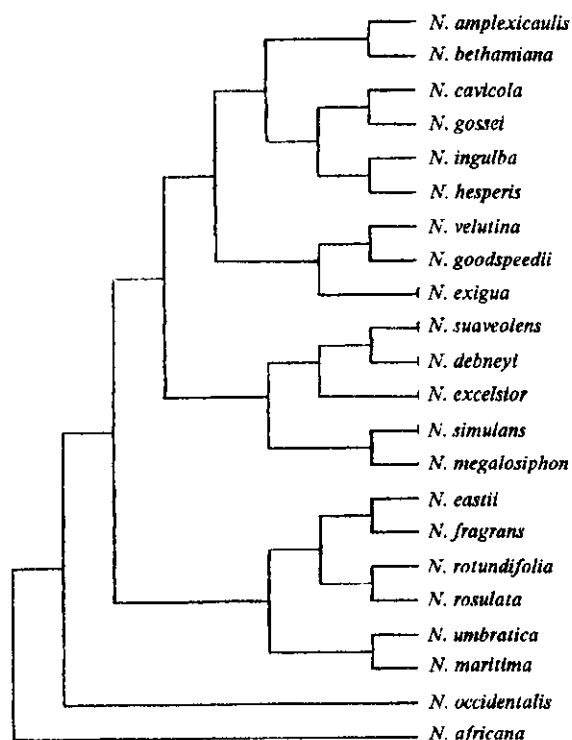


Рис. 2. Безкореневе консенсусне дерево видів секції *Suaveolentes*, реконструйоване методом максимальної економії

минуле видів секції, коли три базових види дали початок усій решті представників. Отримана схема добре узгоджується з запропонованою раніше філогенією видів секції на основі морфології та

цитогенетики [1, 3], на 56 % узгоджується з філогенією секції на основі морфологічних параметрів будови насіння [16] та на 68 % — з молекулярною філогенією секції на основі первинної структури ВТС [10].

S. I. Komarnytsky, I. K. Komarnytsky

Phylogenetic tree of the Australian species of *Nicotiana* based on the random amplified polymorphic DNA

Summary

To apply random amplified polymorphic DNA for analysis of phylogenetic relationships among Australian species of the genus *Nicotiana*, we used 20 synthetic oligonucleotides as primers to examine intraspecific variation among 22 species of the genus. On the basis of the dendrogram constructed with maximal parsimony (Wagner) method, investigated species were subdivided into three major clusters, with basic species of the section localized in two of them, in a strict agreement with classical taxonomy of the section.

С. И. Комарницкий, И. К. Комарницкий

Филогенетическое дерево австралийских видов рода *Nicotiana* на основе амплификации случайно полиморфной ДНК

Резюме

С целью применения случайно амплифицированной полиморфной ДНК для изучения родовых связей среди австралийских видов рода *Nicotiana* использованы 20 олигонуклеотидов. Последние использовали как праймеры для анализа межвидовой изменчивости среди 22 видов рода. Исходя из данных дендрограммы, построенной методом максимальной экономии (Wagner), исследованные виды секции разделены на три кластера, в двух из них находятся базовые виды секции, что хорошо согласовывается с выводами классической таксономии.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Goodspeed T. H. The genus *Nicotiana*.—Massachusetts: Wal-tham, 1954.—536 p.
2. Merxmuller H., Buttler K. P. *Nicotiana* in der Afrikanischen Namibien Pflanzengeographisches and Phylogenetisches Ratsel // Mitt. Bot. Munchen.—1975.—12.—S. 91—104.
3. Kostoff D. Cytogenetics of the genus *Nicotiana*.—Sofia: State Printed House, 1941—1943.—1071 p.

4. Tingey S. V., del Tufo J. P. Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA markers // *Plant Physiol.*—1993.—101.—P. 349—352.
5. Burbidge N. T. The australian species of *Nicotiana* L. (*Solanaceae*) // *Aust. J. Bot.*—1960.—8.—P. 342—395.
6. Hsiao C., Chatterton N. J., Asay K. H., Jensen K. B. Molecular phylogeny of the *Pooideae* (*Poaceae*) based on nuclear rDNA (ITS) sequences // *Theor. and Appl. Genet.*—1995.—90.—P. 389—398.
7. Baldwin B. G. Molecular phylogenetics of *Calicadenia* (*Compositae*) based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA: chromosomal and morphological evolution reexamined // *Amer. J. Bot.*—1993.—80.—P. 222—238.
8. Комарницький С. І., Комарницький І. К., Кокс А., Пароконний А. С. Молекулярна філогенія ядерних генів 5.8S рибосомальної ДНК 37 видів роду *Nicotiana* // *Генетика.*—1998.—34, № 7.—С. 883—889.
9. Комарницький С. І., Комарницький І. К., Кокс Ф., Пароконний О. С. Еволюція послідовностей внутрішнього транскрибуючого спейсера ядерної рибосомальної ДНК американських видів роду *Nicotiana* // *Цитологія і генетика.*—1998.—32, № 3.—С. 69—76.
10. Комарницький С. І. Спроба поєднати морфологічні ознаки та послідовності ядерної рибосомної ДНК (ВТС) у філогенетичних дослідженнях в роді *Nicotiana* // *Біополімери і клітина.*—1999.—15, № 5.—С. 383—389.
11. Yu Y.-L., Lin T.-Y. Construction of phylogenetic tree for *Nicotiana* species based on RAPD markers // *J. Plant Res.*—1997.—110.—P. 187—193.
12. Сиволап Ю. М., Солоденко А. Е., Бурлов В. В. RAPD-анализ молекулярно-генетического полиморфизма подсолнечника // *Генетика.*—1998.—34, № 2.—С. 266—271.
13. Welsh J., McClland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers // *Nucl. Acids Res.*—1990.—18.—P. 7213—7218.
14. Murray M. G., Thompson W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // *Nucl. Acids Res.*—1980.—8.—P. 4321—4325.
15. Комарницький І. К., Комарницький С. І. Поліморфізм довжин рестриктних фрагментів міжгенного спейсера рибосомальної ДНК деяких видів тютюну // *Цитологія і генетика.*—1996.—30, № 1.—С. 65—71.
16. Bahadur B., Farooqui S. M. Seed and seed coat characters in australian *Nicotiana* // *Solanaceae. Biology and systematics* / Ed. W. G. D'Arcy.—New York: Columbia Univ. press, 1986.—P. 114—137.

УДК 577.113:633.71
Надійшла до редакції 08.02.2000