

Спроба поєднати морфологічні ознаки та послідовності ядерної рибосомної ДНК (внутрішнього транскрибованого спейсера) в філогенетичних дослідженнях у роді *Nicotiana*

С. І. Комарницький

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 148, Київ, 252650, Україна

Досліджено родинні зв'язки 24 видів роду *Nicotiana* на основі первинної структури внутрішнього транскрибованого спейсера ядерної рибосомної ДНК згідно з методом «максимальної економії». Здійснено їхнє порівняння з даними повного морфологічного аналізу, морфології насіннєвих оболонок та поліпептидного складу рубіско цих видів. Зроблено висновок стосовно того, що недостатньо покладатися лише на морфологічні або молекулярні дані при реконструкції філогенії будь-якого таксону.

Вступ. Поновлення інтересу до філогенетичних досліджень протягом останніх років пояснюється як теоретичним обґрунтуванням можливості отримання дійсної еволюційної історії таксону [1], так і наявністю комп'ютерних програм, здатних оперувати великими базами даних, та нового джерела філогенетичної інформації — нуклеотидних послідовностей. На сьогодні досить слабо вивченим залишається питання узгодження кластерних аналізів на основі морфологічних та молекулярних даних. Як це не дивно, головним лімітуючим фактором такого дослідження є невелика кількість повних морфологічних аналізів. З цієї точки зору рід *Nicotiana* вигідно відрізняється від інших рослин. Він складається з 69 видів, поширених у Південній та Північній Америці, Австралії, Африці та деяких островах Тихого океану [2—4]. В цьому дослідженні використані види секції *Suaveolentes*, більшість з яких [5] притаманна австралійському континентові, два — африканському (*N. africana*) та п'яти тихоокеанським островам (*N. fragrans*). Секція *Suaveolentes* належить до підроду *Petunioides*. Вважається [3], що види цієї секції споріднені з південно-американськими видами секцій *Alatae*, *Acuminatae* і *Noctiflorae*. Ознаки, що свід-

чать про такі зв'язки, зустрічаються в різноманітних сполученнях серед видів цієї секції. Гудспід [3] постулював, що попередники сучасних австралійських тютюнів потрапили до Австралії з Південної Америки (географічного центру виникнення роду) по *транс*-антарктичному мосту близько 60 млн років тому і що *N. suaveolens* ($n = 16$), *N. debneyi* ($n = 24$) і *N. fragrans* ($n = 24$) є прямими їхніми нащадками. Ці види вважаються базовими. В результаті гібридизацій і наступних інтрогресій між ними виникла решта австралійських тютюнів. Їхні хромосомні числа формують чіткий анеуплоїдний ряд ($n = 16—24$, за одним винятком $n = 17$) з діапазоном значень $2C$ від 4,86 до 12,74 пг [6].

Для порівняння філогенетичних висновків, зроблених на основі морфологічних та цитогенетичних ознак, було вирішено використати дані первинної структури внутрішнього транскрибованого спейсера (ВТС) ядерної рибосомної ДНК. Як добре відомо, кожен гаплоїдний геном вищих рослин містить в середньому від 1000 до 10000 копій рибосомної ДНК (рДНК) [7]. Повтори рДНК організовані в довгі тандеми в одному чи декількох хромосомних локусах. Фізична структура рДНК вищих рослин подібна [8] до такої інших еукаріот (рис. 1). Три ділянки, що кодують рибосомні ДНК,

розташовані в порядку 5'—18S—5.8S—26S—3' і транскрибуються у вигляді єдиного великого попередника, що надалі перетворюється на зрілі молекули рРНК. Ділянка, що розмежовує такі транскрипційні одиниці, називається міжгенним спейсером (MГС). У свою чергу, декілька сотень нуклеотидів відділяють кодуєчі ділянки 18S, 5.8S і 26S рРНК. Ці міжцистронні послідовності носять назву ВТС 1 та 2. Послідовності ВТС виявилися дуже зручними для філогенетичних порівнянь між видами, оскільки вони задовольняють цілу низку необхідних для цього вимог [9]: вони є а) еволюційно-консервативними, тобто еволюціонують переважно шляхом точкових мутацій; б) філогенетично-інтерпретабельними — спосіб їхньої еволюції дозволяє відокремлення дискретних актів видоутворення; в) легко досліджуються в лабораторних умовах; г) є достатньо великими для накопичення відповідного числа потенційно філогенетично-інформативних сайтів. Тому ці послідовності набули широкого застосування у філогенетичних дослідженнях серед рослин [9—14]. Ще одною перевагою послідовностей рДНК є їхня узгоджена еволюція, що дозволяє досліднику не витрачати час на аналіз молекул з різними послідовностями [15]. Баланс між процесами регуляції як узгодженої еволюції, так і акумуляції змін у мультигенній родині [16] та їхня взаємодія з феноменами популяційного рівня (дрейф генів, добір на рівні організму і популяції) є комплексними і потребують значних додаткових досліджень. Оскільки на сьогодні відомо мало морфологічних і молекулярних досліджень на тих самих групах рослин [17, 18], можливо зробити лише декілька узагальнень. Головною метою даної роботи було дослідження відповідності філогенетичних висновків, основаних на морфологічному та молекулярному аналізах серед видів секції *Suaveolentes* роду *Nicotiana*.

Матеріали і методи. Насіння 25 видів роду *Nicotiana* було люб'язно надано О. П. Гребьонкіним (НПО «Табак», Росія), Г. Геде (Інститут

генетики рослин та дослідження культурних рослин, Німеччина), В. Шулаєвим (Університет Нью-Джерсі, США) (таблиця). Насіння висаджували в асептичних умовах на безгормональне поживне середовище Мурасіге і Скуга [5]. Окремі види тютюнів також вирощували в тепличних умовах, згідно з рекомендаціями Чапліна та Бурка [19]. Загальну ДНК виділяли за дещо модифікованою методикою Муррея і Томпсона [20]. Полімеразно-ланцюгову реакцію (ПЛР) та встановлення первинної структури послідовностей ВТС проводили, як описано [9, 21].

Статистичну обробку отриманих послідовностей (підрахунок довжини та GC-вмісту) здійснювали за допомогою власної програми SEQAN (версія 2.0). Послідовності вирівнювали вручну та з використанням програми ClustalV [22]. Дані первинної структури ВТС подані до Genbank. Філогенетичний аналіз проводили методом «максимальної економії» [23] за допомогою пакета програм для реконструкції філогенії PHYLIP (версія 3.5) [24]. Послідовності ВТС *N. plumbaginifolia*, *N. acaulis* і *N. corymbosa* були використані як поліризатори згідно з аргументами [3]. Оцінки достовірності дендрограм отримані при застосуванні програми SEQBOOT після генерації 100 jackknife-повторів [25—27] та побудови консенсусної діаграми за допомогою програми CONSENSE.

Результати та обговорення. Послідовності ВТС всіх досліджених видів роду *Nicotiana* легко вирівнювалися як на ділянці ВТС-1, так і на ділянці ВТС-2. Довжини цих ділянок становили відповідно від 239 до 256 та від 212 до 226 нуклеотидів. Більшість змін по довжині спостерігалася за рахунок варіабельних ділянок 1—50, 112—119, 240—260 у послідовності ВТС-1 та 127—137, 176—247 у послідовності ВТС-2. Переважаюча частина варіабельності послідовностей ВТС-1 і ВТС-2 за довжиною спричинялася незначними (1—2 нуклеотиди) інсерціями чи делеціями. Не відмічено жодного доказу присутності різних за первинною структурою ВТС класів рДНК у цих видів. Всі отримані дивоткові продукти ПЛР виявлялися на агарозному гелі як чітка одинична смуга. Всередині секції відмінності в послідовності для комбінованої матриці даних ВТС-1/ВТС-2 змінювалися в межах від 0.06 до 0.13. Невелике число розривів, необхідних для вирівнювання у цих близькородних видів, свідчить про досить низькі рівні фіксації варіантів ВТС за довжиною з часу їхнього розходження, що ні в якому разі не є підтвердженням консервативності їхньої первинної послідовності. В цьому дослідженні виявлено відмінність первинної структури ВТС в межах родин

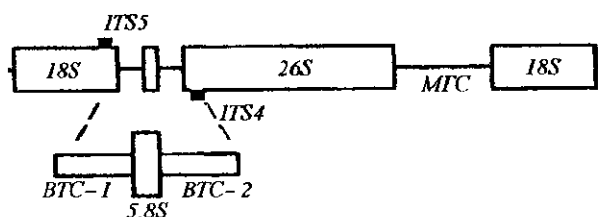


Рис. 1. Організація повтору тандемно розташованих генів рРНК. Пояснення в тексті

Види роду *Nicotiana*, їхня систематика згідно з [4, 10, 18] та характеристики їхніх ВТС

Секція Вид	n	So	В-1, п. н.	GC, %	58S, п. н.	GC, %	В-2, п. н.	GC, %	ВТС, п. н.
<i>Alatae</i>									
<i>N. plumbaginifolia Viviani</i>	10	N	255	60,0	164	56,1	225	63,6	644
<i>Noctiflorae</i>									
<i>N. acaulis Spegazzinii</i>	12	S	254	60,6	164	56,1	224	63,8	642
<i>Acuminatae</i>									
<i>N. corymbosa Remy</i>	12	N	253	64,0	163	52,8	226	66,4	642
<i>Suaveolentes</i>									
<i>N. africana Merxmuller</i>	23	I	251	62,6	164	54,9	222	64,0	637
<i>N. amplexicaulis Burbidge</i>	18	N	251	61,0	164	55,5	222	62,6	637
<i>N. benthamiana Domin</i>	19	N	252	57,1	164	55,5	223	62,3	639
<i>N. cavicola Burbidge</i>	23	N	251	60,2	164	55,5	223	61,4	638
<i>N. debneyi Domin</i>	24	N	252	60,3	164	54,9	223	63,2	639
<i>N. eastii Kos toff</i>	32	N	252	59,9	164	55,5	223	61,0	639
<i>N. exelsior (Black) Black</i>	19	N	256	60,6	165	55,2	225	62,7	646
<i>N. exigua Wheeler</i>	16	N	256	60,9	164	55,5	225	61,8	645
<i>N. fragrans Hooker</i>	24	I	254	59,1	164	55,5	221	62,0	639
<i>N. goodspeedii Wheeler</i>	20	N	239	60,7	164	55,5	223	62,8	626
<i>N. gossei Domin</i>	18	N	252	60,7	164	55,5	223	62,3	639
<i>N. hesperis Burbidge</i>	21	N	254	60,0	164	55,5	222	62,2	640
<i>N. ingulba Black</i>	20	N	252	60,7	164	55,5	222	61,3	638
<i>N. maritima Wheeler</i>	16	N	254	58,7	164	54,9	223	63,7	641
<i>N. megalosiphon Heurk</i>	20	I	256	60,9	164	55,5	224	60,7	644
<i>N. occidentalis Wheeler</i>	21	N	252	61,1	164	55,5	224	62,5	640
<i>N. rosulata (Moore) Domin</i>	20	S	252	61,1	164	55,5	223	61,0	639
<i>N. rotundifolia Lindley</i>	22	N	251	61,4	164	55,5	222	64,4	637
<i>N. simulans Burbidge</i>	20	N	251	61,4	164	55,5	221	61,1	636
<i>N. suaveolens Lehmann</i>	16	N	256	60,2	164	55,5	219	61,6	639
<i>N. umbratica Burbidge</i>	23	N	255	59,4	164	54,9	211	62,1	630
<i>N. velutina Wheeler</i>	16	N	253	60,9	164	55,5	224	61,6	641

Примітка. Умовні позначення: n — гапліоїдне число хромосом; So — джерело насіння (N — Росія; I — Німеччина; S — США); В-1 — довжина ВТС-1 та GC-вміст; 58S — довжина гена 5.8S рДНК та GC-вміст; В-2 — довжина ВТС-2 та GC-вміст; ВТС — загальна довжина внутрішнього транскрибованого спейсера

ни, яка становила 51,4 %. Приблизне числове значення було одержано і для бобових [28]. Розміри ВТС-1 та ВТС-2 проаналізованих видів роду *Nicotiana* узгоджуються з такими, відомими для інших покритонасінних (ВТС-1: 194—265 п. н.; ВТС-2: 188—237 п. н. [11, 29]).

На основі морфологічних та цитогенетичних досліджень [2, 3] сучасні види секції *Suaveolentes*

розподілено на декілька дискретних кластерів, в основі кожного з них лежить один з трьох базових видів, виділених з [3]: *N. suaveolens*, *N. debneyi* чи *N. fragrans* (рис. 2, a). Останній з них має монофілетичне походження. Підтвердження цього висновку можна побачити і в топології ВТС дерева (рис. 4), проте це не стосується дерев, побудованих на основі поліпептидного складу рубіско (рис. 3),

та насінневих характеристик (рис. 2, б). Згідно з дослідженням [3], *N. amplexicaulis* близький до *N. debneyi* (рис., 2, а), однак дані стосовно насінневих оболонок (рис. 2, б) заперечують це, і свідчать на

користь його раннього монофілетичного походження. Загалом результати мікроскопічного дослідження насінневих оболонок австралійських тютюнів [30] не збігаються з жодною наведеною в цій

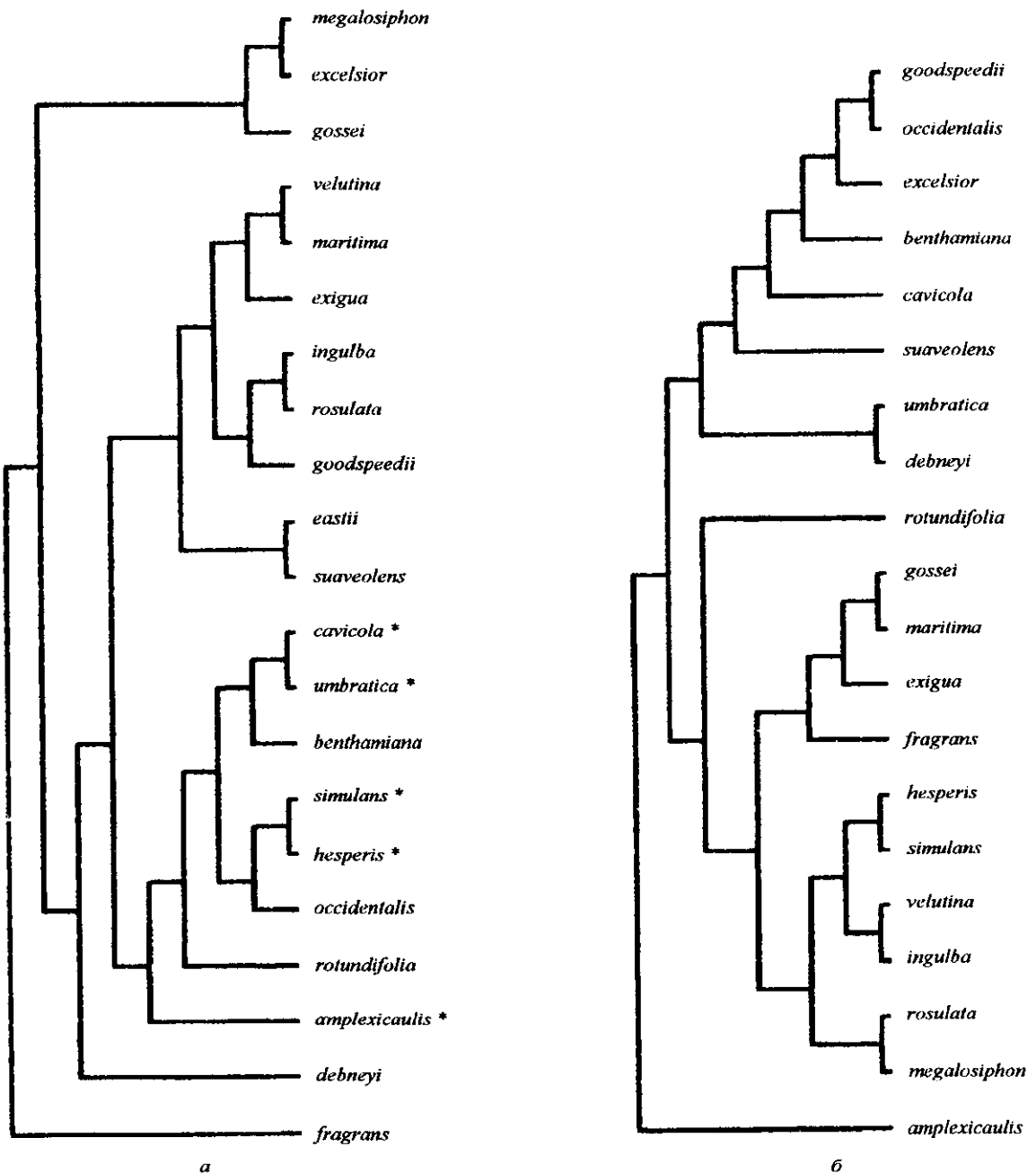


Рис. 2. Схематичне дерево еволюції видів секції *Suaveolentes*, побудоване на основі морфологічних та цитогенетичних досліджень [10] (види, позначені зірочкою, взяті з [4]) (а) та це ж дерево, запропоноване [2] на основі морфологічних ознак насінневих оболонок (б)

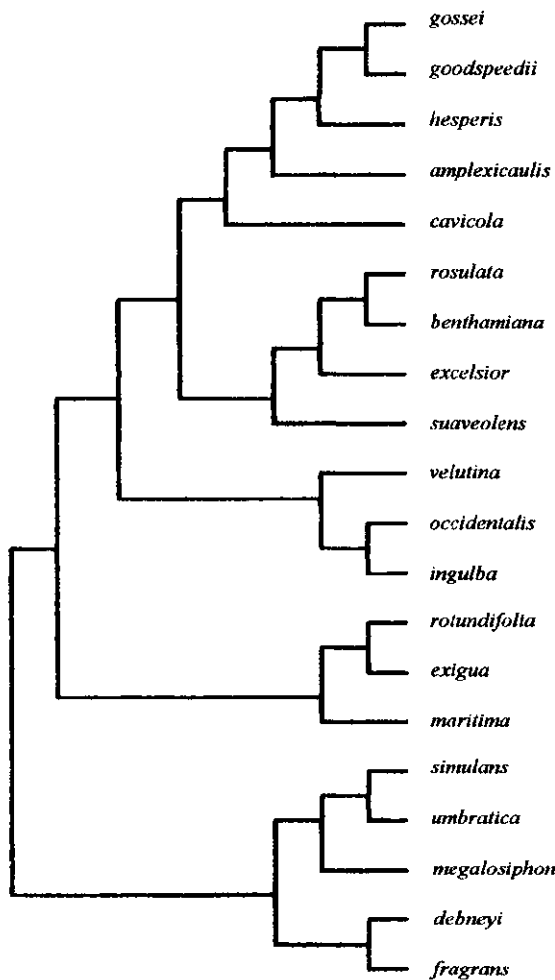


Рис. 3. Філогенетичне дерево видів секції *Suaveolentes*, побудоване на основі поліморфізму поліпептидів малої субодиниці рубіско [6]

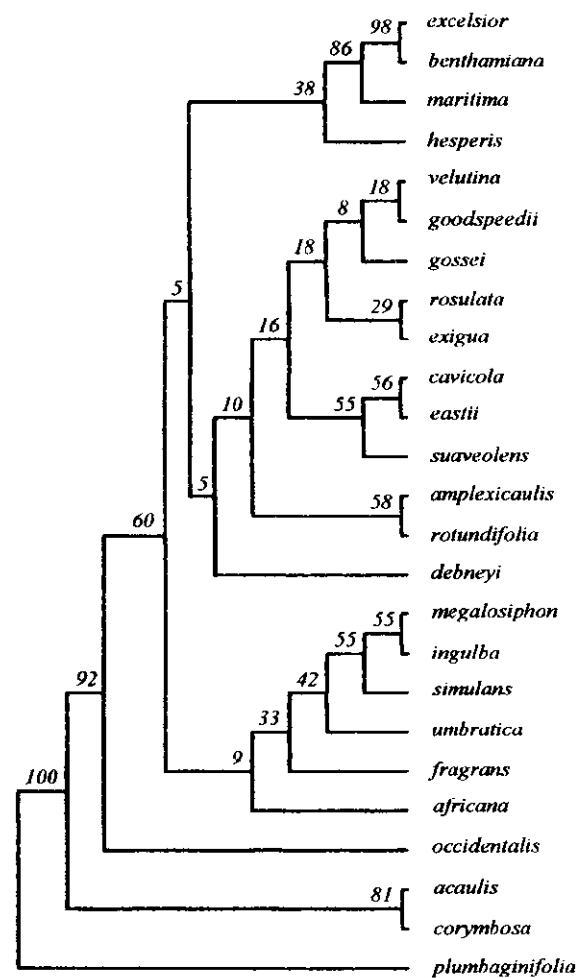


Рис. 4. Філогенетичне дерево видів секції *Suaveolentes*, побудоване на основі первинної структури ВТС ядерної рДНК (значення достовірності вказані над кожним вузлом дерева; *N. plumbaginifolia* використано як поляризатор)

роботі філогенетичною схемою. Залишається незрозумілим походження кластера *N. hesperis*, *N. simulans*, *N. velutina*, *N. ingulba*, *N. rosulata*, *N. megalosiphon* (рис. 2, б). За даними морфологічних досліджень (рис. 2, а, б), види *N. simulans* та *N. hesperis* є сестринськими, тоді як з аналізу ВТС та поліпептидного складу рубіско впливає їхня належність до окремих кластерів. Поряд з цим в обох молекулярних дослідженнях виокремлюється кластер видів *N. simulans*, *N. umbratica* і *N. megalosiphon* (рис. 3, 4). Ці дослідження також поєднують *N. gossei* і *N. goodspeedii* та *N. benthamiana* і *N. excelsior*, чого не спостерігається в філогенії,

виведеній на основі комплексних морфологічних даних (рис. 2, а), хоча друга пара видів і виділяється на основі морфології насінневих оболонок (рис. 2, б).

Відомості про первинну структуру ВТС охоплюють досить велику кількість видів [12], і коефіцієнт відношення кількості проаналізованих позицій (651) до кількості видів є досить значним (26,04). Хоча не всі вершини отриманого дерева є статистично вірогідними, 11 з них мають достовірність 55 % і вище. Серед них зустрічається спільне розташування видів *N. amplexicaulis* і *N. rotundifolia* (як і на рис. 2, а), *N. excelsior*, *N.*

benthamiana і *N. maritima* (перші два види поєднані за характеристиками насінневих оболонки, рис. 2, б), *N. cavicola*, *N. suaveolens* і *N. eastii* (*N. eastii* вважається автотетраплоїдом *N. suaveolens* [25]), також статистично достовірними є монофілія *N. occidentalis* та вузол, який розмежує головні кластери в топології дерева (60 %, рис. 4). Загалом на основі вищенаведеного порівняння можна зробити висновок, що покладання тільки на морфологічні чи молекулярні дані при реконструкції філогенії будь-якого таксону є недостатнім. Зрозуміло, що у молекулярних даних є важлива перевага — їхня чисельність. Проте це не є причиною для відмови від морфологічних даних, які поки що доступні для більшої частини організмів, а також для викопних решток. Найкращим у цьому випадку було б використання морфологічних даних для розділення окремих актів видоутворення в далекі геологічні епохи, тоді як молекулярних — для реконструкції більш недавніх явищ швидкої адаптивної радіації, оскільки в цьому разі такі види вказують широкі межі варіабельності, що в першу чергу може бути пов'язане з різними умовами їхнього існування.

С. І. Комарницький

Попытка объединить морфологические признаки и последовательности ядерной рибосомной ДНК (внутреннего транскрибируемого спейсера) в филогенетических исследованиях в роде *Nicotiana*

Резюме

Исследованы родственные связи среди 24 видов рода *Nicotiana* на основе первичной структуры внутреннего транскрибируемого спейсера ядерной рибосомной ДНК согласно методу «максимальной экономии». Проведено их сравнение с данными полного морфологического анализа, морфологии семенных оболочек и полипептидного состава рибиско этих видов. Сделан вывод, о том, что недостаточно полагаться только на морфологические или на молекулярные данные при реконструкции филогенетики какого-либо таксона.

S. I. Komarnytsky

An attempt to combine morphological characters and nuclear ribosomal DNA (internal transcribed spacer) sequences in phylogenetic studies in the genus *Nicotiana*

Summary

Relationships based on the ITS sequences of nuclear ribosomal DNA of 24 *Nicotiana* species were studied using parsimony method. Their comparison with the conclusions of entire morphological, seed coat characters and polypeptide composition of rubisco of these species studies was carried out. It was shown that only morphological or only molecular data are insufficient to reconstruct phylogeny of any taxon analysed.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Henning W. Phylogenetic systematics.—Urbana: Univ. of Illinois press, 1966.—435 p.
2. Burbidge N. T. The Australian species of *Nicotiana* L. (*Solanaceae*) // Aust. J. Bot.—1960.—8.—P. 342—395.
3. Goodspeed T. H. The genus *Nicotiana*.—Massachusetts: Waltham, 1954.—536 p.
4. Merxmuller J., Buttler K. P. *Nicotiana* in Africanischen Namiberi Pflanzengeographischen und Phylogenetischen Ratsel // Mitt. Bot. Munchen.—1975.—12.—P. 91—104.
5. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant.—1962.—15.—P. 473—497.
6. Narajan R. K. L. Nuclear DNA changes, genome differentiation and evolution in *Nicotiana* // Plant Syst. Evol.—1987.—157.—P. 161—180.
7. Ingle J., Timmis J. N., Sinclair J. The relationship between satellite DNA, ribosomal RNA gene redundancy, and genome size in plants // Plant Physiol.—1975.—55.—P. 496—501.
8. Long E. O., Dawid I. B. Repeated genes in eucaryotes // Annu. Rev. Biochem.—1980.—43.—P. 727—764.
9. Baldwin B. G. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the *Compositae* // Mol. Phyl. Evol.—1992.—1, N 1.—P. 3—16.
10. 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.—1995b.—90.—P. 389—398.
11. Soltis D. E., Kuzoff R. K. Discordance between nuclear and chloroplast phylogenies in the *Heuchera* group (*Saxifragaceae*) // Evolution.—1995.—49, N 4.—P. 727—742.
12. Suh Y., Thien L. B., Raeve H. E., Zimmer E. A. Molecular evolution and phylogenetic implications of internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA in *Winteraceae* // Amer. J. Bot.—1993.—80.—P. 1042—1055.
13. Sun Y., Skinner D. Z., Liang G. H., Hulbert S. H. Phylogenetic analysis of *Sorgum* and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA // Theor. and Appl. Genet.—1994.—89.—P. 26—32.
14. Wojciechowski M. F., Sanderson M. J., Baldwin B. G., Donoghue M. J. Monophyly of aneuploid astragalus (*Fabaceae*): evidence from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences // Amer. J. Bot.—1993.—80.—P. 711—722.
15. Arnheim N. Concerted evolution of multigene families // Evolution of genes and proteins / Eds R. Koehn, M. Nei.—Sinauer: Sanderland, 1983.—P. 38—61.
16. Dover G. A. Molecular drive: a cohesive model of species evolution // Nature.—1982.—299.—P. 111—117.
17. Palmer J. D., Jensen R. K., Michaels H. J., Chase M. W., Manhart J. R. Chloroplast DNA variation and plant phylogeny // Annu. Mo. Bot. Gard.—1988.—75.—P. 1180—1206.
18. Systma K. J., Smith J. F., Gottlieb L. D. Phylogenetics in *Clarkia* (*Onagraceae*): restriction site mapping of chloroplast DNA // Syst. Biol.—1990.—15.—P. 280—295.
19. Chaplin J. F., Burk L. G. Plant propagation. *Nicotiana*: procedures for experimental use // Technical bulletin 1586, US Department of Agriculture.—New York, 1979.—P. 28—32.
20. Murray M. G., Thompson W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // Nucl. Acids Res.—1980.—8.—P. 4321—4325.
21. White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // PCR protocols: a guide to methods and applications.—San Diego: Acad. press, 1990.—P. 315—322.

22. *Higgins D. G., Bleasby A. J., Fuchs R.* CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment // *CABIOS*.—1992.—8.—P. 189—191.
23. *Kluge A. G., Farris J. S.* Quantitative phyletics and the evolution of anurans // *Systematic Zool.*—1969.—18.—P. 1—32.
24. *Felsenstein J.* PHYLIP—Phylogeny Inference Package, Version 3.5.—1993.
25. *Felsenstein J.* Confidence limits on phylogenies: An approach using bootstrap // *Evolution*.—1985.—39.—P. 783—791.
26. *Sanderson M. J.* Confidence limits on phylogenies: the bootstrap revised // *Cladistics*.—1989.—5.—P. 113—129.
27. *Wu C. F. J.* Jackknife, bootstrap and other resampling plans in regression analysis // *Ann. of Statistics*.—1986.—14.—P. 1261—1295.
28. *Jorgensen R. A., Cluster P. D.* Models and tempos in the evolution of nuclear ribosomal DNA: new characters for evolutionary studies and new markers for genetic and population studies // *Amer. Missour. Bot. Gard.*—1988.—75.—P. 1238—1247.
29. *Takaiwa F., Oono K., Sugiura M.* Nucleotide sequence of the 17—25S spacer region from rice rDNA // *Plant. Mol. Biol.*—1985.—4.—P. 355—364.
30. *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.
31. *Chen K., Johal S., Wildman S. G.* Role of chloroplast and nuclear DNA genes during evolution of fraction I protein // *Genetic and biogenesis of chloroplast and mitochondria*.—Amsterdam: Elsevier, 1976.—P. 3—11.

УДК 577.113:633.71
Надійшла до редакції 27.05.98