

МОЛЕКУЛЯРНА ФІЛОГЕНІЯ ХЛОРОПЛАСТНОЇ ДНК ВИДІВ РОДУ *NICOTIANA*



Досліджено родинні зв'язки серед видів роду *Nicotiana* на основі рестриктивного аналізу ампліфікованих ділянок хлоропластної ДНК. Філогенетичне дерево, збудоване за методом UPGMA, показало результат, аналогічний до попередніх висновків, що зроблені як на основі морфологічних і цитогенетичних досліджень, так і первинної структури внутрішнього транскрибуючого спейсера ядерної рибосомальної ДНК цих видів.

© С.І. КОМАРНИЦЬКИЙ, 2005

ISSN 0564–3783. Цитология и генетика. 2005. № 4

Вступ. *Nicotiana* — обширний рід родини пасльонових (*Solanaceae*), в який входить близько 70 видів. Згідно з даними Goodspeed [1], рід *Nicotiana* має південно-американське походження, і початкові етапи його еволюції відносяться до плейстоцену, після чого попередники *Nicotiana* разом з попередниками родів *Cestrum* і *Petunia* утворили єдиний пре-*Nicotiana*, пре-*Cestrum* и пре-*Petunia* генетичний резервуар в нижньому еоцені близько 65 млн років тому. Рано диференційовані раси цих родів створили два анцестральні комплекси *Nicotiana* — цестроїдний і петуніюїдний. Базовим хромосомним числом роду *Nicotiana* названо $x = 6$ [1], і хоч серед сучасних *Solanaceae* види з $n = 6$ хромосомами відсутні, вони були знайдені в спорідненій родині *Scrofullariaceae* [1]. Проникнення видів *Nicotiana* в Австралію постулюється шляхом трансантарктичного мосту, що з'єднав її і Південну Америку на початкових етапах дивергенції *Nicotiana* [1]. Проте представники цього роду відсутні на Тасманії і в Новій Зеландії. З іншого боку, трансокеанічне поширення насіння також можливе з допомогою течій [2]. В усякому випадку можна вважати точкою вступу *Nicotiana* в Австралію її південно-східну частину, де перекриваються ареали двох базових видів — *N. suaveolens* і *N. debneyi* [3]. Два з трьох підродів *Nicotiana* — *Rustica* і *Tabacum* згруповані у високогірних тропічних ділянках заходу Південної Америки. Вони примітивніші на відміну від підроду *Petunioides*, який більш еволюційно просунутий і охоплює обидві Америки, Австралію, Африку (*N. africana*) [4] і деякі острови Полінезії (*N. fragrans*).

Підрід *Petunioides* складається з дев'яти секцій [1]. Деякі з них (*Undulatae*, *Trigonophyllae*), згідно з морфологічними характеристиками, близькі до представників не тільки всіх секцій підроду *Petunioides*, але й до двох інших підродів роду *Nicotiana*. Види секцій *Alatae* і *Noctiflorae* виникли з пре-*Petunioides* комплексу, проте подальший процес їх видоутворення супроводжувався повторною гібридизацією з попередниками підроду *Rustica* [1]. Види секції *Acuminatae* несуть морфологічні ознаки тільки пре-*Petunioides* комплексу. Секції *Repandae* і *Nudicaules* виникли шляхом гібридизації попередників

секцій *Alatae* і *Trigonophyllae*, а секція *Bigeloviana* — секцій *Alatae* і *Acuminatae*. Австралійські тютюни (секція *Suaveolentes*) виникли в результаті численних міжвидових гібридизацій, в яких брали участь попередники секцій *Alatae*, *Acuminatae* і *Noctiflorae* [1].

Найчастіше для вивчення молекулярної філогенії хлДНК серед тютюнів користувалися рестриктивним аналізом нативної хлоропластної ДНК (хлДНК) [5—8], ампліфікованих фрагментів хлДНК [9, 10], ПДРФ [11] чи послідовностями її окремих ділянок [12]. Рестриктивний гідроліз хлДНК обмеженої кількості видів роду *Nicotiana* показав, що на границі правого інвертованого повтору і великої унікальної копії знаходиться одна з найбільш варіабельних ділянок [5—8]. В зв'язку з цим в даній роботі за допомогою

рестриктивного аналізу досліджено ампліфіковану ділянку (*rpl2-matK*) тютюнів. До підведення підсумків порівняльного аналізу хлДНК, крім зазначеної ділянки *rpl2-matK*, залучені також результати рестриктивного аналізу 10 інших ділянок хлДНК тютюнів [9, 10]. Наслідком цього аналізу було безкоренево філогенетичне дерево, реконструйоване на основі філогенетично інформативних рестриктивних фрагментів-ампліконів хлДНК.

Матеріали і методи. Загальну ДНК виділяли із листя тютюнів (таблиця) [13]. Ділянку *rpl2-matK* (3358 п.н.) ампліфікували парою праймерів 5'-AGCACACGCAATGGAACC GT-3', 5'-ССААСТАГТТСССГГГТТССГА-3' (позиції на хлДНК *N. tabacum* 154426-154445 і 1825-1844) [14]. Полімеразно-ланцюгову реакцію проводили, як описано раніше [9]. В

Види роду *Nicotiana*

Підрід, секція, вид	Кількість хромосом, <i>n</i>	Секція, вид	Кількість хромосом, <i>n</i>	Секція, вид	Кількість хромосом, <i>n</i>
<i>Rustica</i>		<i>Alatae</i>		<i>Nudicaules</i>	
<i>Paniculatae</i>		<i>N. alata</i>	9	<i>N. nudicaulis</i>	24
<i>N. benavidesii</i>	12	<i>N. bonariensis</i>	9	<i>Suaveolentes</i>	
<i>N. cordifolia</i>	12	<i>N. forgetiana</i>	9	<i>N. africana</i>	23
<i>N. glauca</i>	12	<i>N. langsdorffii</i>	9	<i>N. amplexicaulis</i>	18
<i>N. paniculata</i>	12	<i>N. longiflora</i>	10	<i>N. benthamiana</i>	19
<i>N. knightiana</i>	12	<i>N. plumbaginifolia</i>	10	<i>N. cavicola</i>	23
<i>N. raimondii</i>	12	<i>N. sanderae</i>	9	<i>N. debneyi</i>	24
<i>N. solanifolia</i>	12	<i>N. sylvestris</i>	12	<i>N. eastii</i>	32
<i>Rusticae</i>		<i>Repandae</i>		<i>N. excelsior</i>	19
<i>N. rustica</i>	24	<i>N. nesophila</i>	24	<i>N. exigua</i>	16
<i>Tabacum</i>		<i>N. repanda</i>	24	<i>N. fragrans</i>	24
<i>Tomentosae</i>		<i>N. stocktonii</i>	24	<i>N. goodspeedii</i>	20
<i>N. glutinosa</i>	12	<i>Noctiflorae</i>		<i>N. gossei</i>	18
<i>N. kawakamii</i>	12	<i>N. acaulis</i>	12	<i>N. hesperis</i>	21
<i>N. otophora</i>	12	<i>N. noctiflora</i>	12	<i>N. ingulba</i>	20
<i>N. setchellii</i>	12	<i>N. petunioides</i>	12	<i>N. maritima</i>	16
<i>N. tomentosa</i>	12	<i>Acuminatae</i>		<i>N. megalosiphon</i>	20
<i>N. tomentosiformis</i>	12	<i>N. attenuata</i>	12	<i>N. occidentalis</i>	21
<i>Genuinae</i>		<i>N. corymbosa</i>	12	<i>N. rosulata</i>	20
<i>N. tabacum</i>	24	<i>N. linearis</i>	12	<i>N. rotundifolia</i>	22
<i>Petunioides</i>		<i>N. miersii</i>	12	<i>N. simulans</i>	20
<i>Undulatae</i>		<i>N. pauciflora</i>	12	<i>N. suaveolens</i>	16
<i>N. undulata</i>	12	<i>N. spegazzinii</i>	12	<i>N. umbratica</i>	23
<i>N. wigandoides</i>	12	<i>Bigeloviana</i>		<i>N. velutina</i>	16
<i>N. arensii</i>	24	<i>N. bigelovii</i>	24		
<i>Trigonophyllae</i>		<i>N. clevelandii</i>	24		
<i>N. trigonophylla</i>	12				
<i>N. palmeri</i>	12				

окремих випадках, крім основного фрагменту, ампліфікуються мінорні фрагменти меншого розміру, тому дану ділянку було препаративно виділено з агарозного гелю з використанням GENECLEAN II згідно з рекомендаціями фірми-виробника (BIO 101 Inc.). Фрагмент гідролізували рестриктазами (*Clal*, *DraI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *Eco47I*, *HaeIII*, *HindIII*, *MspI*, *PstI*, *SspI*, *StyI*, *XbaI*) в загальному обсязі 15 мкл. Рестриктні фрагменти фракціонували в агарозному гелі в однократній трис-ацетатній буферній системі. Для генетичного аналізу були також залучені результати рестриктного аналізу інших ампліфікованих ділянок хлДНК тютюнів [9, 10]. Електрофоретичні профілі кожного виду оцінювали візуально і кодували бінарно: наявність або відсутність фрагменту позначали відповідним записом «1» чи «0». Матрицю відмінностей формували за допомогою програми RESTDIST з подальшим її використанням у програмі побудови філогенетичного дерева UPGMA. Філогенетичне дерево підготували до друку за допомогою програми DRAWGRAM. Всі програми були взяті з пакету програм PHYLIP (версія 3.6) [15].

Результати досліджень та їх обговорення. Електрофоретичний аналіз ампліфікованої ділянки *rpl2-matK* серед різних видів тютюнів показав, що її розмір практично однаковий, за виключенням *N. acuminata*. Рестриктним аналізом не виявлено значних відмінностей в організації даної ділянки між видами роду. В основному зустрічаються точкові мутації в тих чи інших сайтах рестрикції.

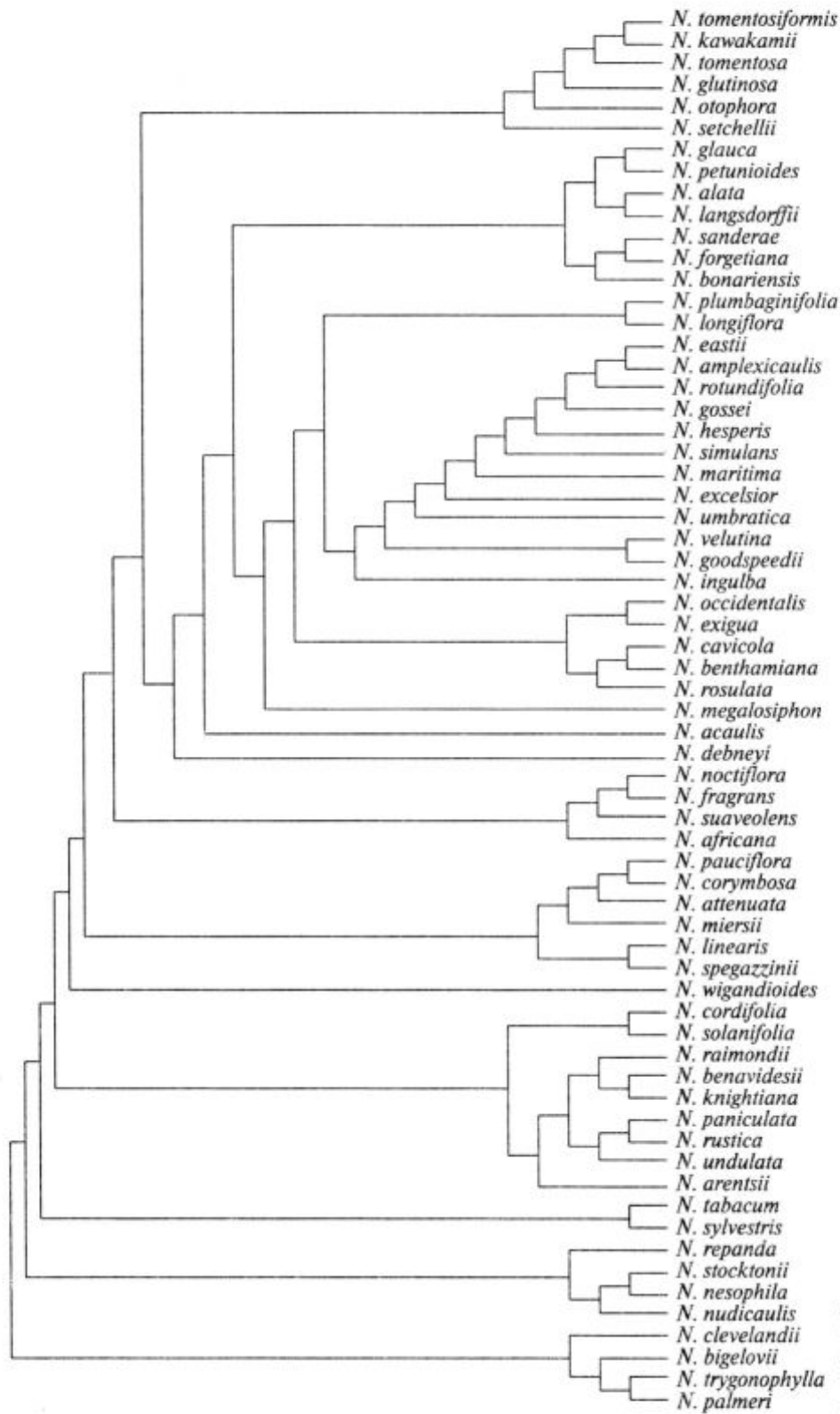
Незважаючи на незначні зміни в будові ампліфікованої ділянки тютюнів, ми підтвердили зроблений нами раніше висновок про спільність походження пластоми природних диплоїдів з секції *Trigonophyllae* і амфіплоїдів з секції *Nudicaules* і *Repandae* [10]. У представників даних секцій аналізована ділянка не містила сайтів для *DraI*, тоді як для більшості видів характерним є присутність одного сайту (1627+1731). У *N. tabacum* і *N. sylvestris* дана ділянка має такий складний вигляд (1627+196+11635). Рестриктази *Clal* і *Eco47I* також відрізняють

аналізовану ділянку у видів з названих секцій від решти тютюнів. Гідроліз ділянки рестриктазами *XbaI*, *MspI* і *EcoRI* вказує на те, що донором цитоплазми єдиного представника секції *Nudicaules* (*N. nudicaulis*) могли б бути *N. stocktonii* або *N. nesophilla*, але не *N. repanda*. В іншому випадку за допомогою рестриктаз *DraI* і *HindIII* можна ідентифікувати цитоплазму *N. occidentalis* і *N. exigua* з-поміж австралійських видів.

При рестриктному гідролізі ділянки *rpl2-matK* десяти раніше ампліфікованих ділянок хлДНК тютюнів [9, 10] загалом ідентифіковано 436 фрагментів. Для побудови дерева використали тільки ті фрагменти, які були спільними для двох або більше видів. Даній вимозі відповідав 191 фрагмент. Сформовану матрицю відмінностей програмою RESTDIST використали для побудови філогенетичного дерева UPGMA з метою аналізу родинних зв'язків в межах роду *Nicotiana*. Порівнюючи отримані результати з висновками класичної систематики [1, 3], можна стверджувати, що молекулярна філогенія хлДНК досліджених видів у повній мірі корелює з сучасним уявленням про класифікацію роду (рисунки).

Проведений аналіз розділив види роду *Nicotiana* на кілька кластерів. До першого кластеру віднесені представники секції *Tomentosae*. Вказані види також групуються в єдиний кластер на основі первинної структури внутрішнього транскрибуючого спейсера (ВТС) ядерної рибосомальної ДНК (рДНК) [16].

Найбільшої уваги заслуговує наступний кластер, в якому зібрані представники чотирьох секцій: *Noctiflorae* (*N. petunioides*, *N. noctiflora*, *N. acaulis*), *Paniculatae* (*N. glauca*), *Alatae* (за виключенням *N. sylvestris*) і *Suaveolentes*. В першому підкластері зібрані анеуплоїдні види секції *Alatae*, *N. glauca* та *N. petunioides*. Спорідненість між *N. glauca* і *N. petunioides* можна пояснити тим, що *N. glauca* виникла в результаті гібридизації між попередниками роду *Cestrum* і секції *Noctiflorae* [1]. Разом з тим зв'язок між *N. glauca*, *N. petunioides* і видами секції *Alatae* полягає в тому, що види секції *Alatae* виникли в результаті гібридизації між шістьма хромосомними по-



Дендрограма родинних зв'язків серед тютюнів, встановлена рестриктивним аналізом ампліфікованих фрагментів хлДНК та методом UPGMA

передниками петуноїдного і панікулятоїдного комплексів [1]. ХлДНК *N. sanderae*, статевого гібрида між *N. forgetiana* і *N. alata* [1], групується разом з *N. forgetiana*, тому потрібно вважати, що хлДНК *N. sanderae* походить від *N. forgetiana*, а не *N. alata*. Два інших види секції *Alatae* — *N. plumbaginifolia* і *N. longiflora* більш споріднені з видами секції *Suaveolentes*.

Згідно з [1], види секцій *Acuminatae*, *Alatae* і *Noctiflorae* були попередниками сучасних австралійських тютюнів (секція *Suaveolentes*). Раніше нами показано, що один з класів рДНК *N. suaveolens* має зменшену кількість субповторів, гомологічних до таких *N. tabacum*, які він міг успадкувати від *N. plumbaginifolia* чи *N. longiflora* (секція *Alatae*) [17]. Парафілогенетично до даного підкласу розташувались базові австралійські види (*N. suaveolens*, *N. debneyi*, *N. fragrans*), а також *N. africana* і *N. noctiflora*. Два 24-парні види секції *Suaveolentes*, *N. fragrans* і *N. debneyi*, вважаються похідними від американських видів тютюну. Незважаючи на те, що жоден з сучасних видів не був ідентифікований як їх попередник, декілька морфологічних доказів вказують на попередників секції *Alatae*.

Другим предковим елементом *N. debneyi* вважають невідомого попередника секції *Acuminatae*, тоді як попередник секції *Noctiflorae* ймовірно міг виступати донором геному для *N. fragrans* [1]. Решта анеуплоїдних видів секції *Suaveolentes* в значній мірі інтегровані морфологічно і в той же час ізольовані географічно. Цитогенетичні докази свідчать про сильну спорідненість даних видів: для всіх внутрісекційних F_1 гібридів спостерігають майже повне спарювання хромосом [1].

Наступний кластер займають види секції *Acuminatae*, який в свою чергу можна розділити на два підкластери. До першого віднесені *N. spagazzinii* і *N. linearis*, до другого — решта проаналізованих видів секції. Види секції *Acuminatae* виникли від пре-*Petunioideis* комплексу. Всі види секції сильно споріднені за морфологічними ознаками, а також за майже повним спарюванням хромосом при внутрісекційних F_1 гібридах. Вза-

галі *N. linearis* і *N. spagazzinii* найбільше еволюційно просунуті серед видів даної секції, а також високоспеціалізовані [1]. Це підтвержує як їх каріотип (1m + 2sm + 8st), так і зменшена кількість ДНК в їх геномі внаслідок реорганізації [18]. У них також відсутні трихоми зі спеціалізованою стовбуровою клітиною, які характерні для решти видів *Acuminatae* [1].

У наступний кластер входять види, що належать до трьох секцій: *Undulatae* (*N. undulata*, *N. arentsii*), *Paniculatae* (за виключенням *N. glauca*) та *Rusticae* (*N. rustica*). Монофілетичне положення по відношенню до них займає *N. wigandioides* (*Undulatae*). Всі аналізовані види, що належать до секції *Paniculatae*, є похідними від пре-*Rustica*. Серед них розрізняють як базові (*N. raimondii*, *N. benavidesii*, *N. paniculata* і *N. knightiana*), так і маргінальні види (*N. cordifolia* і *N. solanifolia*) [1]. *N. rustica* — природний гібрид, що виник в результаті гібридизації *N. paniculata* і *N. undulata* [1]. На кладограмі пластом *N. rustica* групується з таким *N. paniculata* і повинен походити від нього, а не від *N. undulata*. З іншого боку *N. undulata* разом з *N. wigandioides* брали участь у виникненні амфідиплоїда *N. arentsii* [1]. Враховуючи результати кластерного аналізу, слід вважати, що материнською особою в цій гібридизації виступала *N. undulata*, а не *N. wigandioides*.

До передостаннього кластеру віднесені *N. tabacum* (секція *Genuinae*), *N. sylvestris* (секція *Alatae*), всі види секції *Repandae* та єдиний представник секції *Nudicaules* (*N. nudicaulis*). Подібну дендрограму ми отримали раніше на основі послідовностей ВТС рДНК [16]. Спільне групування *N. tabacum* з *N. sylvestris* зумовлено тим, що культурний тютюн виник в результаті природної гібридизації *N. sylvestris* з *N. tomentosiformis* [1], в якій *N. sylvestris* був материнською особою [19]. Останній вид має спільні морфологічні ознаки з видами всіх трьох підродів [1].

Разом з тим саме попередники секції *Alatae* і *Trigonophylae* брали участь у виникненні видів секції *Repandae* [1], тому не виключено, що останні види успадкували цитоплазму від попередника *N. sylvestris*. Що стосується природного амфідиплоїду *N.*

nudicaulis, який походить від попередників сучасних видів *Acuminatae* і *Trigonophyllae* [1], то його пластом також походить від попередників, близьких до *N. sylvestris*, а не видів секції *Acuminatae*.

У нижній частині дерева формується кластер, в якому знаходяться чотири види: *N. palmeri*, *N. trigonophylla* (секція *Trigonophyllae*) і *N. bigelovii*, *N. clevelandii* (секція *Bigelovianae*). Ідентичність пластому видів *N. palmeri* і *N. bigelovii* підтверджена послідовністю *matK* [12]. Вважається, що види секції *Acuminatae* і *Alatae* дали початок секції *Bigelovianae* [1].

Враховуючи наші результати, ми пов'язуємо походження пластому видів секції *Bigelovianae* від попередників сучасних *N. palmere* і *N. trigonophylla*, тоді ж як їх послідовності ВТС рДНК успадковані від різних попередників. У *N. bigelovii* ВТС фіксується від видів, близьких до секції *Trigonophyllae*, тоді як *N. clevelandii* — від видів секції *Acuminatae* [16]. Отже, види секції *Bigelovianae* походять від попередників сучасних видів секції *Trigonophyllae* і *Acuminatae*, а не *Alatae* і *Acuminatae*.

Висновки. Родинні зв'язки таксонів *Nicotiana*, реконструйовані на основі рестриктного аналізу ампліфікованих фрагментів хлДНК, загалом узгоджуються з висновками по систематиці і філогенії роду, сформульованими на основі класичної таксономії, за винятком таких видів, як *N. bigelovii* і *N. clevelandii*, еволюційне минуле яких уточнено.

SUMMARY. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of chloroplast DNA was used to study the relationships within the genus *Nicotiana*. Resulting phylogenetic tree, reconstructed using the UPGMA method, generally agreed with the existing taxonomic classification based on morphological and cytogenetic data, as well as sequence comparison of the internal transcribed spacer of the nuclear ribosomal DNA.

РЕЗЮМЕ. Исследованы родственные связи среди видов рода *Nicotiana* на основании рестриктного анализа амплифицированных участков хлоропластной ДНК. Филогенетическое древо, построенное методом UPGMA, показало результат, в основном аналогичный выводам, сделанным на основании морфологи-

ческих и цитогенетических исследований, а также первичной структуры внутреннего транскрибируемого спейсера ядерной рибосомальной ДНК.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Goodspeed T.H.* The genus *Nicotiana*. — Massachusetts: Waltham, 1954. — 536 p.
2. *Wildman S.G.* Polypeptide composition of rubisco as an aid in studies of plant phylogeny // *Proteins and nucleic acids in plant systematics* / Eds U. Jensen, D.E. Fairbrothers. — Berlin : Springer-Verlag, 1983. — P. 182—190.
3. *Burbidge N.T.* The Australian species of *Nicotiana* L. (Solanaceae) // *Aust. J. Bot.* — 1960. — 8. — P. 342—395.
4. *Merxmuller J., Buttler K.P.* *Nicotiana* in Africanischen Namiberi Pflanzengeographischen and Phylogenetischen Ratsel // *Mitt. Bot. Munchen.* — 1975. — 12. — P. 91—104.
5. *Kung S.D., Zhu Y.S., Shen G.F.* *Nicotiana* chloroplast genome. 3. Chloroplast DNA evolution // *Theor. Appl. Genet.* — 1982. — 61. — P. 73—79.
6. *Salts Y., Herrmann R.G., Peleg N., Lavi U., Frankel R., Beckmann J.S.* Physical mapping of plastid DNA variation among eleven *Nicotiana* species // *Theor. Appl. Genet.* — 1984. — 69. — P. 1—14.
7. *Комарницький І.К., Самойлов А.М., Глеба Ю.Ю.* Рестриктное картирование хлоропластной ДНК пяти видов *Nicotiana* // *Биополимеры и клетка.* — 1989. — 5. — С. 66—72.
8. *Yang D.-I., Feng T.-Y., Chen C., Lai Y.-K.* Physical maps of *Nicotiana* chloroplast DNA constructed by an efficient procedure // *Theor. Appl. Genet.* — 1992. — 83. — P. 515—527.
9. *Комарницький С.І., Комарницький І.К.* Рестриктний поліморфізм ампліфікованих послідовностей хлоропластної ДНК роду *Nicotiana* // *Биополимеры и клетка.* — 2002. — 18. — С. 485—488.
10. *Комарницький С.І., Комарницький І.К.* Рестриктні варіації ампліфікованих послідовностей хлоропластної ДНК роду *Nicotiana* // *Цитология и генетика.* — 2003. — 37, № 1. — P. 18—23.
11. *Olmstead R., Palmer J.* Chloroplast DNA and systematic of the Solanaceae // *Solanaceae III: Taxonomy, Chemistry, Evolution.* — Hawkes etc.: Royal Botanic Garden Kew, 1991. — P. 161—168.
12. *Aoki S., Ito M.* Molecular phylogeny of *Nicotiana* (Solanaceae) based on the nucleotide sequence of the *matK* gene // *Plant Biol.* — 2000. — 2. — P. 316—334.

13. Cheung W.Y., Hubert N., Landry B.S. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal and insect suitable for RAPD and other PCR analysis // PCR Meths. Appl. — 1993. — 3. — P. 69—70.
14. Felsenstein J. PHYLIP — Phylogeny Inference Package. Version 3.6—2000.
15. Shinozaki K., Ohme M., Tanaka M., Wakasugi T., Hayshida N., Matsubayasha T., Zaita N., Chunwongse J., Obokata J., Yamaguchi-Shinozaki K., Ohto C., Torazawa K., Meng B.Y., Sugita M., Deno H., Kamogashira T., Yamada K., Kusuda J., Takaiwa F., Kata A., Tohdoh N., Shimada H., Sugiura M. The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome // Plant Mol. Biol. Rep. — 1986. — 4. — P. 111—147.
16. Комарницький І.С., Комарницький І.К., Коке А., Пароконний О.С. Еволюція послідовностей внутрішнього спейсера ядерної рибосомальної ДНК американських видів роду *Nicotiana* // Цитология и генетика. — 1998. — 32, № 3. — С. 69—76.
17. Комарницький С.І. Субповтори міжгенного спейсера рибосомальної ДНК *Nicotiana* // Біополімери і клітина. — 2000. — 16, № 2. — С. 108—114.
18. Narajan R.K.L. Nuclear DNA changes, genome differentiation and evolution in *Nicotiana* // Plant Syst. Evol. — 1987. — 157. — P. 161—180.19.
19. Gray J.G., Kung S.D., Wildman S.G., Sheen S.J. Origin of *Nicotiana tabacum* detected by polypeptide composition of Fraction I protein // Nature. — 1974. — 252. — P. 226—227.

Надійшла 04.05.05