

ОБЩАЯ
БИОЛОГИЯ

УДК 582.579:575.22

**САМОСТОЯТЕЛЬНОСТЬ ВИДОВ *IRIS VOROBIEVII* N.S. PAVLOVA,
I. MANDSHURICA MAXIM. И *I. HUMILIS* GEORGI (IRIDACEAE):
ДОКАЗАТЕЛЬСТВО ИЗ ХЛОРОПЛАСТНОГО ГЕНОМА**

© 2009 г. М. М. Козыренко, Е. В. Артюкова, Е. В. Болтенков,
Л. Н. Миронова, академик Ю. Н. Журавлев

Поступило 11.01.2009 г.

Род *Iris* L. – самый крупный и сложный в семействе Iridaceae. Во флоре российского Дальнего Востока род *Iris* представлен одиннадцатью видами [1, 2]. До сих пор нет единого мнения о приоритетных научных названиях и видовом разнообразии ирисов. В первую очередь это касается близкородственных видов секции *Psammiris* (Spach) Taylor, которые во флоре Приморского края представлены двумя видами: *I. vorobievii* N.S. Pavlova и *I. humilis* Georgi (синоним *I. mandshurica* Maxim.). Однако, сравнение хлоропластных геномов, проведенное нами впервые, убедительно показало самостоятельность видов *I. vorobievii*, *I. humilis* и *I. mandshurica* и что *I. humilis* отсутствует во флоре Приморья.

Ранее *I. vorobievii* ошибочно принимали то за *I. bloudowii* Ledeb., то за *I. flavissima* Pall. или *I. mandshurica* Maxim. [2], и в настоящее время не все ботаники признают этот вид. Причиной такой таксономической неопределенности ирисов является отсутствие надежных морфологических диагностических признаков, что связано с высоким уровнем гомоплазии, чрезвычайным разнообразием морфоэкологических характеристик и многочисленными хромосомными вариациями. Недавно [3] при исследовании микроструктуры поверхности семенной кожуры *I. vorobievii*, *I. mandshurica* и *I. humilis* обнаружены новые признаки, которые снова поднимают вопрос о самостоятельности этих таксонов. В последние десятилетия для уточнения спорных вопросов систематики, популяционной и видовой идентификации, изучения филогении таксонов растений широко применяют анализ хлоропластной ДНК (хпДНК) [4–8]. Целью настоящей работы было найти хпДНК-маркеры,

позволяющие оценить видовую самостоятельность *I. vorobievii*, *I. mandshurica* и *I. humilis*. Для этого нами впервые проведено сравнение нуклеотидных последовательностей межгенных спейсеров *trnH-psbA* и *atpB-rpcL*, гена *rps4*, некодирующих регионов *trnL-trnF* и *trnS-trnG* хлоропластной ДНК этих видов. Во всех, кроме *trnL-trnF*, регионах выявлены различия, подтверждающие самостоятельность изученных таксонов. Использование мультигенного подхода, продемонстрированного нами на примере птиц [9], способствует уточнению статуса ряда принятых ботаниками видов и улучшению системы видов.

Индивидуальные препараты тотальной ДНК выделены по методике [10] из листовой ткани: *I. vorobievii* N.S. Pavlova (17 образцов), Приморский край, Хасанский р-н, окрестности пос. Краскино; *I. mandshurica* Maxim. (16 образцов), Приморский край, Шкотовский р-н, окрестности г. Находка; *I. humilis* Georgi (13 образцов), Западный Алтай, устье р. Чуя, прибрежные луга. Амплификацию регионов хпДНК и секвенирование проводили с использованием универсальных праймеров, реакционных условий и температурных режимов, рекомендованных для этих участков [11–13]. Нуклеотидные последовательности определяли на генетическом анализаторе ДНК “ABI PRISM” 310 на базе БПИ ДВО РАН. Полученные последовательности депонированы в базу данных GenBank/NCBI под номерами доступа FM253385–FM253430, FM253702–FM253747, FM863831–FM863922, FM864152–FM864197. Для анализа данных использовали пакеты статистических прикладных программ (Arlequin, DnaSP, MEGA3, TCS).

Эволюция спейсеров, как правило, включает два события – замена основания и инсерция/делеция (индель). Длина межгенных спейсеров *trnH-psbA* и *atpB-rpcL* у исследуемых видов была неодинаковой вследствие присутствия инделей, которые четко дифференцировали виды. У *I. vorobievii* и *I. mandshurica* длина последовательностей *trnH-psbA* составила 550 п.н., а у *I. humilis* – 555 п.н.

Биолого-почвенный институт
Дальневосточного отделения
Российской Академии наук, Владивосток
Ботанический сад-институт
Дальневосточного отделения
Российской Академии наук, Владивосток

Таблица 1. Индели и полиморфные сайты в *trnH-psbA*, *atpB-rpcL* и *rps4* регионах хпДНК *I. vorobievii*, *I. mandshurica* и *I. humilis*

Образец	<i>trnH-psbA</i>		<i>atpB-rpcL</i>		<i>rps4</i>					
	346	433–437	243–245	496–500	32	46	56	64	415	810
I. vorobievii										
1	T	*****	TCC	*****	A	A	A	A	G	T
2	G	*****	TCC	*****	.	.	.	.	.	.
3	.	*****	TCC	*****	.	.	.	.	.	.
4	.	*****	TCC	*****	.	.	.	.	.	.
5	.	*****	TCC	*****	.	.	.	.	.	.
6	.	*****	TCC	*****	.	.	.	.	.	.
7	.	*****	TCC	*****	.	.	.	.	.	.
8	.	*****	TCC	*****	.	.	.	.	.	A
9	.	*****	TCC	*****	.	.	.	.	.	.
10	.	*****	TCC	*****	G	.	.	.	.	.
11	.	*****	TCC	*****	.	.	.	T	.	.
12	.	*****	TCC	*****	.	.	.	.	.	.
13	.	*****	TCC	*****	.	.	.	.	.	.
14	.	*****	TCC	*****	.	.	.	.	.	.
15	.	*****	TCC	*****	.	.	.	.	.	.
16	.	*****	TCC	*****	.	.	.	.	.	.
17	.	*****	TCC	*****	.	.	.	.	.	.
I. mandshurica										
1	.	*****	***	AACCA	.	T	G	.	T	.
2	.	*****	***	AACCA	.	T	G	.	T	.
3	.	*****	***	AACCA	.	T	G	.	T	.
4	.	*****	***	AACCA	.	T	G	.	T	.
5	.	*****	***	AACCA	.	T	G	.	T	.
6	.	*****	***	AACCA	.	.	G	.	T	.
7	.	*****	***	AACCA	.	.	G	.	T	.
8	.	*****	***	AACCA	.	T	G	.	T	.
9	.	*****	***	AACCA	.	T	G	.	T	.
10	.	*****	***	AACCA	.	.	G	.	T	.
11	.	*****	***	AACCA	.	T	G	.	T	.
12	.	*****	***	AACCA	.	T	G	.	T	.
13	.	*****	***	AACCA	.	.	G	.	T	.
14	.	*****	***	AACCA	.	T	G	.	T	.
15	.	*****	***	AACCA	.	.	G	.	T	.
16	.	*****	***	AACCA	.	T	G	.	T	.
I. humilis										
1	.	ATTTT	***	AACCA	.	.	.	.	T	.
2	.	ATTTT	***	AACCA	.	.	.	.	T	.
3	.	ATTTT	***	AACCA	.	.	.	.	T	.
4	.	ATTTT	***	AACCA	.	.	.	.	T	.
5	.	ATTTT	***	AACCA	.	.	.	.	T	.
6	.	ATTTT	***	AACCA	.	.	.	.	T	.
7	.	ATTTT	***	AACCA	.	.	.	.	T	.
8	.	ATTTT	***	AACCA	.	.	.	.	T	.
9	.	ATTTT	***	AACCA	.	.	.	.	T	.
10	.	ATTTT	***	AACCA	.	.	.	.	T	.
11	.	ATTTT	***	AACCA	.	.	.	.	T	.
12	.	ATTTT	***	AACCA	.	.	.	.	T	.
13	.	ATTTT	***	AACCA	.	.	.	.	T	.

Примечание. Точкой обозначены одинаковые нуклеотиды, звездочкой – делеции.

Таблица 2. Полиморфные сайты в *trnS-trnG* регионе хпДНК *I. vorobievii*, *I. mandshurica* и *I. humilis*

Обра- зец	<i>trnS-trnG</i>														
	63	141	142	143	144	145	183	238	343	348	463	464	482	650	1076
<i>I. vorobievii</i>															
1	A	A	T	A	T	A	A	A	T	T	A	T	C	T	A
2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	A	.	T
3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	A	.	.
4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.
5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	T	A	.	.	.
6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	A	.	.
8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.
9	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.
10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.
11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
12	.	.	.	.	.	.	T	.	.	G	.	.	A	.	.
13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	A	.	.
14	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	.	.
15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	A	.	.
16	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	.	.
17	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	A	.	.
<i>I. mandshurica</i>															
1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	A	.	.
2	G	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	A	.	.
3	G	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	A	.	.
4	G	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
5	G	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
6	G	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
7	G	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	A	.	.
8	G	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	A	.	.
9	G	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	A	.	.
10	G	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	A	.	.
11	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.
12	G	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	A	.	.
13	G	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	A	.	.
14	G	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	A	.	.
15	G	.	.	.	.	.	.	T	.	G	.	.	A	.	.
16	G	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	A	.	.
<i>I. humilis</i>															
1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	A	.	.
2	G	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	A	.	.
3	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.
4	G	T	A	T	A	T	.	.	.	.	.	.	A	.	.
5	G	T	A	T	A	T	.	.	.	G	.	.	A	.	.
6	G	T	A	T	A	T	.	.	.	.	.	.	A	.	.
7	G	T	A	T	A	T	.	.	.	.	.	.	A	.	.
8	G	T	A	T	A	T	.	.	.	.	.	.	A	G	.
9	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.
10	G	T	A	T	A	T	.	.	.	G	.	.	A	.	.
11	G	T	A	T	A	T	.	.	.	G	.	.	A	.	.
12	G	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	A	.	.
13	G	T	A	T	A	T	.	.	.	G	.	.	A	G	.

Примечание. Точкой обозначены одинаковые нуклеотиды.

вследствие присутствия инсерции, которая маркирует этот вид (табл. 1). В 46 последовательностях выявлен один полиморфный сайт. Длина *atpB-rpcL* у *I. vorobievii* составила 666 п.н., а у двух других видов – 668 п.н. Разница обусловлена присутствием двух инделей, маркирующих *I. vorobievii* (табл. 1). Полиморфных сайтов нет.

Последовательности *rps4* у трех видов одинаковой длины (838 п.н.). Обнаружено шесть нуклеотидных замен (табл. 1). Две замены являются маркерными для видов *I. vorobievii* (G в позиции 415, несинонимичная) и *I. mandshurica* (G в позиции 56, синонимичная). У всех тестированных растений последовательности *trnL-trnF* (831 п.н.) оказались практически идентичными, только у одного образца *I. vorobievii* обнаружена одна точечная мутация, в связи с чем этот регион был исключен из дальнейшего анализа. Регион *trnS-trnG* из всех исследованных не только самый длинный (1576 п.н.), но и самый изменчивый. Обнаруженные в анализе нуклеотидных последовательностей различия определялись точечными мутациями в 15 сайтах, из них одна нуклеотидная замена маркирует все последовательности *I. vorobievii* (табл. 2).

Полученные для каждого образца последовательности *trnH-psbA*, *atpB-rpcL*, *rps4* и *trnS-trnG* регионов хпДНК были объединены, общая длина, включая индели, составила 3640 п.н. Изменчивость этих регионов, составляющих 2.3–2.8% пластидного генома, низкая. Обнаружено 22 вариабельных сайта (0.63%), из них 13 информативны согласно методу максимальной парсимонии и 9 – неинформативны. Наименьшие генетические дистанции (0.001) определены между *I. vorobievii* и *I. mandshurica*, а между каждым из этих видов и *I. humilis* дистанции были в 2 раза больше. Анализ 46 последовательностей выявил 23 гаплотипа, из них 13 (56.5%) были уникальны. Общих гаплотипов исследуемые таксоны не имеют.

Филогенетическая сеть, построенная с учетом инделей на основе метода статистической парсимонии, между отдельными гаплотипами хпДНК (рис. 1) содержит три дивергентные клады, каждая из которых включает гаплотипы только одного вида. Центрального гаплотипа не наблюдали (гипотетический гаплотип в случае недавнего общего предка). Наличие в каждой группе возможных альтернативных связей между гаплотипами (петлевые структуры в сети) указывает на высокий уровень рекомбинации или гомоплазии, т.е. вероятную высокую частоту повторных и обратных мутаций в хпДНК [14, 15]. Анализ распределения суммарной генетической изменчивости (АМОВА) показал высокий уровень дифференциации хлоропластного генома между исследуемыми видами ирисов ($F_{ST} = 0.854$, $p < 0.0001$).

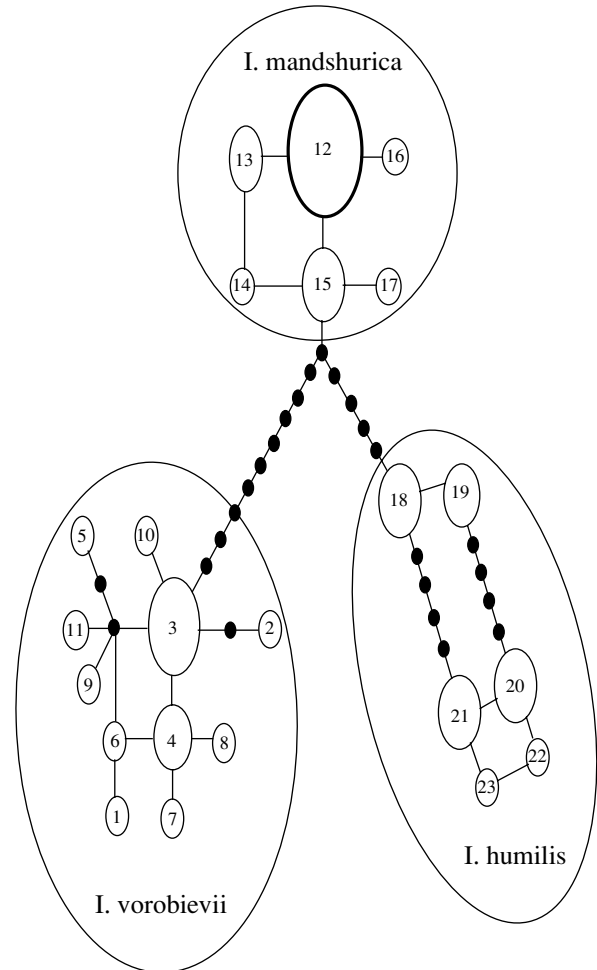


Рис. 1. Филогенетическая сеть хпДНК-гаплотипов *I. vorobievii*, *I. mandshurica* и *I. humilis*. В окружностях, размер которых отражает примерную частоту встречаемости гаплотипов, указаны их номера. Черные кружки – гипотетические гаплотипы.

Таким образом, выявленные в четырех регионах хпДНК различия подтверждают самостоятельность таксонов *I. humilis*, *I. mandshurica*, *I. vorobievii*. С учетом полученных результатов представляется очевидным отсутствие *I. humilis* во флоре Приморского края и наличие видов *I. vorobievii* и *I. mandshurica*.

Работа поддержана грантом НШ-1635-2008.4 Президента Российской Федерации и Фондом содействия отечественной науке.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сосудистые растения советского Дальнего Востока / Под ред. С.С. Харкевича. Л.: Наука, 1987. Т. 2. 446 с.
2. Флора российского Дальнего Востока: Дополнения и изменения к изданию "Сосудистые растения советского Дальнего Востока". Т. 1–8 (1985–1996) / Под ред. А.Е. Кожевникова, Н.С. Пробатовой. Владивосток: Дальнаука, 2006. 456 с.

3. Алексеева Н.Б., Миронова Л.Н. // Бот. журн. 2007. Т. 92. № 6. С. 916–925.
4. Souza-Chies T.T., Bittar G., Nadot S. et al. // Plant Systematics and Evolut. 1997. V. 204. P. 109–123.
5. Reeves G., Chase M.W., Goldblatt P. et al. // Amer. J. Bot. 2001. 88. V. 11. P. 2074–2087.
6. Goldblatt P., Savolainen V., Porteous O. et al. // Mol. Phylogen. Evolut. 2002. V. 25. P. 341–360.
7. Makarevich I., Golovnina K., Scherbik S., Blinov A. // Intern. J. Plant Sci. 2003. V. 164. P. 229–237.
8. Cornman R.S., Arnold M.L. // Mol. Ecol. 2007. V. 16. P. 4585–4598.
9. Peters J.L., McCracken K.G., Zhuravlev Y.N. et al. // Mol. Phylogen. Evolut. 2005. V. 35. № 1. P. 209–224.
10. Козыренко М.М., Артиюкова Е.В., Болтенков Е.В., Лауве Л.С. // Биотехнология. 2004. № 2. С. 13–23.
11. Azuma H., Thien L.B., Kawano S. // J. Plant Res. 1999. V. 112. P. 291–306.
12. Shaw J., Lickey E.B., Beck J.T. et al. // Amer. J. Bot. 2005. V. 92. № 1. P. 142–166.
13. Nadot S., Bajon R., Lejeune B. // Plant Systematics and Evolut. 1994. V. 191. P. 27–38.
14. Hamilton M.B., Braverman J.M., Soria-Hernanz D.F. // Mol. Biol. and Evolut. 2003. V. 20. № 10. P. 1710–1721.
15. Hale M.L., Borland A.M., Gustafsson M.H.G., Wolff K. // J. Mol. Evolut. 2004. V. 58. P. 182–190.