

УДК 575.22:582.675.1

**Взаимоотношение видов *Paeonia anomala*, *P. intermedia* и *P. hybrida* (Paeoniaceae) по данным о последовательностях ITS ядерной рибосомной ДНК и *ycf1* хлоропластной ДНК**

**Phylogenetic relationships of the *Paeonia anomala*, *P. intermedia* and *P. hybrida* (Paeoniaceae) inferred from nuclear ITS rDNA and plastid *ycf1* gene**

С. В. Ефимов<sup>1</sup>, Г. В. Дегтярева<sup>1</sup>, Е. И. Терентьева<sup>1</sup>, Т. Х. Самигуллин<sup>2</sup>, К. М. Вальехо-Роман<sup>2</sup>

S. V. Efimov, G. V. Degtjareva, E. I. Terenteva, T. Kh. Samigullin, C. M. Valiejo-Roman

<sup>1</sup> Ботанический сад биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, 119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, e-mail: efimov-msu@yandex.ru, degavi@mail.ru, el.terenteva@mail.ru

<sup>2</sup> НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, 119992, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40, e-mail: samigul@belozersky.msu.ru, vallejo@genebee.msu.ru

**Реферат.** Изучено взаимоотношение трех травянистых видов рода *Paeonia* – *P. anomala*, *P. intermedia* и *P. hybrida*, распространенных в Сибири, Средней Азии и прилегающих регионах, основываясь на данных по полиморфизму нуклеотидных последовательностей ITS яд-рДНК и фрагмента гена *ycf1* хлоропластной ДНК. По сравнению с морфологическими данными, молекулярные данные позволяют более четко разграничить виды, в частности, отличить *P. anomala* от *P. intermedia* и *P. hybrida*. Показана перспективность использования участка *ycf1* в молекулярно-филогенетическом анализе на низком таксономическом уровне в роде *Paeonia*, а также при уточнении видовой принадлежности.

**Summary.** Variability of nuclear ITS rDNA and plastid *ycf1* gene was studied to elucidate relationships between three *Paeonia* species, *P. anomala*, *P. intermedia* and *P. hybrida*, distributed in Siberia, Middle Asia and adjacent regions. In comparison to morphological data, molecular data allow to differentiate more accurately these species, especially to distinguish *P. anomala* from *P. intermedia* and *P. hybrida*. *Ycf1* is shown to be suitable for a molecular phylogenetic analysis in *Paeonia*, as well as for barcoding.

### Введение

Род *Paeonia* L. насчитывает около 35 видов кустарниковых и многолетних травянистых растений, распространенных в северном полушарии. Род хорошо выделяется филогенетически, являясь единственным представителем семейства Раеониасеае. Однако взаимоотношения между видами внутри рода достаточно запутаны. Отчасти ситуация осложняется тем, что в формировании видовых комплексов имели и имеют место гибридизационные процессы, которые были подтверждены также и молекулярными методами (Sang et al., 1995; Punina et al., 2012). Одним из таксономически сложных комплексов представляется группа травянистых видов родства *Paeonia anomala* L., распространенных в Сибири, Средней Азии и прилегающих регионах. Комплекс включает виды *P. anomala*, *P. intermedia* С. А. Мей., *P. hybrida* Pall., *P. sinjagensis* К. У. Пан, *P. altaica* К. М. Dai & Т. Н. Ying и *P. veitchii* Lynch и характеризуется дважды тройчатосложными сильно сегментированными листьями, сверху по жилкам покрытыми щетинками. Все виды комплекса – диплоиды (Верещагина, 2003; Hong, Pan, 2004; Wang, 2014).

Изучение биоморфологических особенностей *P. anomala* и *P. hybrida* на территории Алтайского края показало высокую внутривидовую изменчивость в пределах обоих видов по целому ряду признаков: высоте куста; размеру, форме сегментов и степени рассечения листовой пластинки; степени развития листовых придатков чашелистиков; окраске и размеру цветка, форме и числу лепестков; степени опушения и углу отклонения листовок (Верещагина, 2003). Наиболее четкие различия между видами наблюдаются в подземной части, а также экологии. Так, *P. anomala* в отличие от *P. hybrida* характеризуется более крупными и высокими кустами, более крупными и менее рассеченными сегментами листьев, слабым или отсутствующим (но не войлочным) опушением листовок, наличием короткого, толстого, с хорошо заметными годичными кольца-

ми корневища с цилиндрическими, равномерно утолщенными по всей длине корнеклубнями. У *P. hybrida* корневище представлено шнуровидным корневищеподобным образованием, не имеющим годичных колец, с корнеклубнями, утолщенными неравномерно, иногда почти шаровидными. *P. intermedia* по ряду признаков занимает промежуточное положение между *P. anomala* и *P. hybrida*, характеризуясь густым, но не плотным опушением листовок, наличием утолщенного, с хорошо заметными годичными кольцами, корневища с утолщенными корнеклубнями. Все виды различаются по местам обитания: *P. anomala* – мезофит, произрастающий по лесам, опушкам, полянам; *P. hybrida* – ксерофит, распространенный в степной области; *P. intermedia* обитает в горах, предгорьях, горно-степных лесах.

Высокая морфологическая изменчивость создавала большие трудности при установлении границ между видами. В последней таксономической ревизии (Hong, Pan, 2004) было признано только два вида *P. anomala* и *P. intermedia*, остальные предложено перенести в ранг подвидов (*P. anomala* subsp. *veitchii*) или синонимов.

Для изучения взаимоотношений видов рода *Paeonia* привлекают нуклеотидные последовательности различных участков ДНК, среди которых малокопийные гены ядерной ДНК (Adh, GPAT), гены хлоропластной ДНК (*rbcL*, *matK*), межгенные спейсеры хлоропластной ДНК (*trnL-trnF*, *psbA-trnH*, *trnK-matK*), а также спейсеры ядерной рибосомной ДНК (ITS) (Sang et al., 1995; Sang et al., 1997; Tank, Sang, 2001; Sang et al., 2004; Pan et al., 2007; Punina et al., 2012). Проводились молекулярно-филогенетические исследования и для прояснения взаимоотношений группы видов *P. anomala*. Так, основываясь на различиях в топологиях филогенетических деревьев, построенных по ядерным и хлоропластным участкам, сделан вывод о гибридном происхождении вида *P. anomala*, возникшим от скрещивания между *P. veitchii* и *P. lactiflora* (Pan et al., 2007). Также было показано, что *P. hybrida* и *P. intermedia* не близки по молекулярным данным к *P. anomala* и представляют собой разные линии развития. Однако надо отметить, что одновременно все три вида не были вовлечены в филогенетический анализ.

Целью нашего исследования было изучение взаимоотношений видов *P. anomala*, *P. intermedia* и *P. hybrida*, основываясь на данных по нуклеотидным последовательностям двух молекулярных маркеров, ITS ядерной рибосомной ДНК и гена *ycf1* хлоропластной ДНК. Первый маркер широко применяется в молекулярно-филогенетических исследованиях на низком таксономическом уровне. Ген *ycf1* хлоропластной ДНК был предложен в настоящее время в качестве универсального ДНК-штрихкода для растений (Dong et al., 2015). В хлоропластном геноме часть гена *ycf1* входит в состав обращенного повтора и является достаточно консервативной, в то время как оставшаяся часть, расположенная в малой однокопийной области, характеризуется высокой вариабельностью.

### Материалы и методы

Для выделения ДНК были использованы образцы растений из коллекций гербариев ALTB, LE, MW, МНА, а также собранные в ходе экспедиционных поездок по Алтайскому краю и Республике Алтай. Для изучения внутривидовой изменчивости использованы образцы из разных точек ареала: 11 образцов *P. anomala* (Красноярский край, Коми, Алтай, Тыва, Монголия), 3 образца *P. hybrida* (Алтайский край), 4 образца *P. intermedia* (Алтайский край, Узбекистан, Казахстан, Таджикистан).

Для филогенетического анализа по гену *ycf1* число видов было увеличено. Поскольку этот участок был использован впервые для изучения взаимоотношения травянистых видов рода *Paeonia*, в анализ были включены также виды *P. arietina* G. Anderson, *P. daurica* Andrews, *P. japonica* (Makino) Miyabe & Takeda, *P. lactiflora* Pall., *P. mascula* (L.) Mill., *P. mlokosewitschii* Lomakin, *P. obovata* Maxim., *P. officinalis* L., *P. oreogeton* S. Moore, *P. peregrina* Mill., *P. tenuifolia* L., *P. wittmanniana* Hartwiss ex Lindl. В качестве внешней группы использован кустарниковый вид *P. delavayi* Franch.

Препараты ДНК получали с помощью набора для экстракции растительной ДНК – NucleoSpin Plant II. Для амплификации внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS) яд-рДНК использовали пару праймеров L и 4 (White et al., 1990). Для амплификации фрагмента хлоропластного гена *ycf1* были использованы праймеры *ycf1bF* и *ycf1bR* (Dong et al., 2015). Определение нуклеотидных последовательностей ДНК проводили методом циклического секвенирования с использованием набора реагентов ABI Prism BigDye Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI Prism 3100-Avant. Последовательности были выровнены и отредактированы с помощью программы BioEdit (Hall, 1999). Филогенетический анализ проводили с помощью метода Байеса, используя программу MrBayes 3.2.5 (Ronquist et al., 2012).

**Результаты и обсуждение**

Длина выравнивания последовательностей ITS яд-рДНК у 18 образцов комплекса *P. anomala* составила 646 п.н. Сравнение последовательностей ITS у видов *P. anomala*, *P. hybrida* и *P. intermedia*, для которых были взяты образцы из разных частей ареала, показало наличие варибельности, которая была меньше, чем при сравнении последовательностей на межвидовом уровне. Данные о варьирующих позициях последовательностей ITS приведены в Таблице. Нуклеотидных замен, которые были бы синапоморфными для группы *P. anomala*, *P. hybrida* и *P. intermedia*, не обнаружено. *P. anomala* представляет собой обособленную от *P. hybrida* и *P. intermedia* линию развития. Для *P. anomala* характерно несколько полиморфных позиций в последовательностях ITS, часть из которых (226, 529, 620) свидетельствуют о гибридном происхождении вида. Доказательства гибридного происхождения вида *P. anomala* были получены ранее (Pan et al., 2007), однако интересно отметить, что полиморфизм по позициям проявляется не у всех образцов. Полиморфизм, наблюдаемый в позиции 612, не имеет гибридного происхождения и не встречается у других видов рода *Paeonia*, что, возможно, связано с возникновением мутаций в последовательностях некоторых аллелей, апоморфных для вида *P. anomala*.

Таблица

Варьирующие позиции нуклеотидных последовательностей ITS яд-рДНК *Paeonia anomala*, *P. hybrida* и *P. intermedia*

Вид, место сбора	ITS1									ITS2				
	0	0	0	1	1	2	2	2	2	4	5	6	6	6
	7	8	8	0	0	2	2	3	4	0	2	1	2	3
	4	1	3	5	8	6	7	1	2	3	9	2	0	7
<i>P. anomala</i> Коми	С	А	Г	А	Т	Г	Т	Т	Г	Т	Т	А/Г	Т	Т
<i>P. anomala</i> Монголия (1)	С	А	Г	А	Т	Г	Т	Т	Г	Т	Т	А/Г	Т	Т
<i>P. anomala</i> Монголия (2)	С	А	Г	А	Т	Г	Т	Т	Г	Т	Т	А/Г	Т	Т
<i>P. anomala</i> Красн. край	С	А	Г	А	Т	Г	Т	Т	Г	Т	Т	А/Г	Т	Т
<i>P. anomala</i> Тыва	С	А	Г	А	Т	Г	Т	Т	Г	Т	Т	А/Г	Т	Т
<i>P. anomala</i> Алтай (1)	С	А	Г	А	Т	Г	Т	Т	Г	Т	Т	А/Г	Т	Т
<i>P. anomala</i> Алтай (2)	С	А	Г	А	Т	Г/А	Т	Т	Г	Т/С	Т/С	А/Г	А/Т	Т/С
<i>P. anomala</i> Алтай (3)	С	А	Г	А	Т	Г	Т	Т	Г	Т	Т	А/Г	Т	Т
<i>P. anomala</i> Алтай (4)	С	А	Г	А	Т	Г/А	Т	Т	Г	Т/С	Т/С	А/Г	А/Т	Т/С
<i>P. anomala</i> Алтай (5)	С	А	Г	А	Т	Г/А	Т	Т	Г	Т/С	Т/С	А/Г	А/Т	Т/С
<i>P. anomala</i> Алтай (6)	С	А	Г	А	Т	Г/А	Т	Т	Г	Т/С	Т/С	А/Г	А/Т	Т/С
<i>P. hybrida</i> Алт. край (1)	Т	А/Г	Г/Т	Г	Г	Г	А	С	А/Г	С	С	Г/Т	А	С
<i>P. hybrida</i> Алт. край (2)	Т	А/Г	Г/Т	Г	Г	Г	А	С	А/Г	С	С	Г	А	С
<i>P. hybrida</i> Алт. край (3)	Т	А/Г	Г/Т	Г	Г	Г	А	С	А/Г	С	С	Г	А	С
<i>P. intermedia</i> Алт. край	Т	А/Г	Г/Т	Г	Г	Г	А	С	А/Г	С	С	Г	А	С
<i>P. intermedia</i> Казахстан	Т	А/Г	Г/Т	Г/С	Г	Г	А	С	Г	С	С	Г	А	С
<i>P. intermedia</i> Узбекистан	Т	А/Г	Г/Т	Г/С	Г	Г	А	С	Г	С	С	Г	А	С
<i>P. intermedia</i> Таджикистан	Т	А/Г	Г/Т	Г/С	Г	Г	А	С	Г	С	С	Г	А	С

Виды *P. hybrida* и *P. intermedia* оказываются достаточно близки между собой, при этом они отличаются от *P. anomala* семью нуклеотидными заменами. Несмотря на то, что *P. hybrida* и *P. intermedia* довольно хорошо обособлены, различия между видами не так сильно выражены. В пределах группы выделяются две подгруппы, одна включает образцы, идентифицированные как *P. hybrida* и собранные в Алтайском крае, другая включает образцы, идентифицированные как *P. intermedia* и собранные в Средней Азии и Казахстане. Различия между подгруппами обусловлены мутациями в последовательностях ITS. Интересно отметить наличие четырех полиморфных позиций, две из которых характеризуют группы *P. hybrida* + *P. intermedia* в целом (позиции 81 и 83), две другие – каждый из этих видов в отдельности (позиции 105 и 242). Полиморфизм по этим позициям обусловлен появлением дополнительных нуклеотидов, не отмеченных у других видов, и не вызван гибридным происхождением.

В дополнение к последовательностям ITS яд-рДНК, были получены последовательности фрагмента гена *ycf1* хлоропластной ДНК. Всего получено 37 последовательностей. Длина выравнивания анализируемого фрагмента составила 813 п.н., при этом длина самого фрагмента варьирует от 786 до 810 п.н. Различия

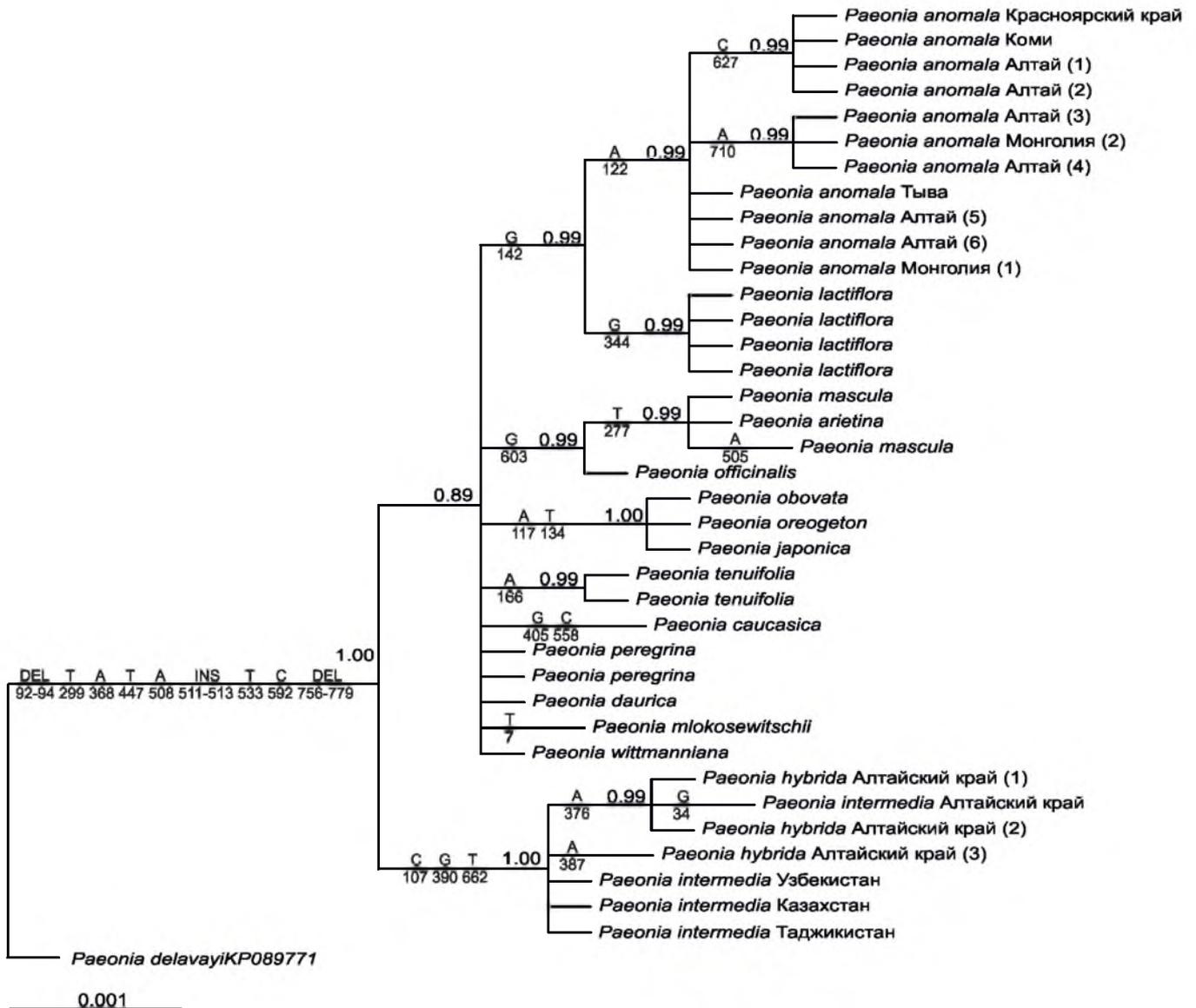


Рис. 1. Консенсусное дерево, полученное по нуклеотидным последовательностям гена *ycf1* хлоропластной ДНК методом Байеса на основании 20000000 деревьев с использованием модели GTR. Числа около узлов представляют значения апостериорной вероятности. Узлы с поддержкой менее 0,5 не показаны. Отмечены варьирующие позиции выравнивания.

по длине вызваны инделями, наблюдаемыми у группы травянистых видов (вставка в 3 п.н. и две делеции в 3 и 24 п.н.). В пределах группы травянистых пионов различия по длине не отмечены так же, как не отмечено присутствие инверсий. Вариабельность фрагмента обусловлена мононуклеотидными заменами. Филогенетическое дерево, отражающее взаимоотношения между видами, представлено на рис. 1. В целом, дерево достаточно хорошо разрешенное, клады, представленные группами видов или несколькими образцами одного вида, поддержаны 1–3 заменами.

Как и по данным ITS, по данным *ycf1* вид *P. anomala* далек от *P. hybrida* и *P. intermedia*. В пределах *P. anomala* выявляется три гаплотипа гена *ycf1*, не скоррелированные с географическим распространением. Существование трех подгрупп, соответствующих разным гаплотипам, не выявляется при анализе последовательностей ITS.

Виды *P. hybrida* и *P. intermedia* формируют высоко поддержанную кладу, в пределах которой выделяется подклада, соответствующая образцам *P. hybrida* и *P. intermedia* из Алтайского края, которая выделялась и по данным ITS. Имеющейся выборки таксонов по видам *P. hybrida* и *P. intermedia* пока недостаточно, чтобы точно установить, связан ли наблюдаемый полиморфизм в последовательностях ITS и мононуклео-

тидные замены в последовательностях *ycf1* с географическим распространением видов или является видо-специфичным. Расширение выборки анализируемых таксонов из разных регионов поможет в дальнейшем установить, проникает ли *P. hybrida* в Среднюю Азию или ареал этого вида ограничивается Алтайским краем и Республикой Алтай.

По сравнению с последовательностями ITS, фрагмент гена *ycf1* обладает меньшей вариабельностью. Однако её достаточно, чтобы различать виды в роде *Paeonia* в целом и в группе родства *P. anomala* в частности. Оба молекулярных маркера обладают значительно более выраженной дискретностью по сравнению с морфологическими признаками в группе родства *Paeonia anomala* и достаточным уровнем изменчивости, чтобы служить в качестве инструмента при идентификации видов в этом комплексе.

Изучение последовательностей ядерной ДНК поддержано грантом РФФИ № 14-04-01486, молекулярно-филогенетический анализ последовательностей хлоропластной ДНК выполнен при поддержке гранта РНФ № 14-50-00029 «Научные основы создания национального банка-депозитария живых систем».

#### ЛИТЕРАТУРА

- Верещагина И. В.** Дикорастущие пионы Алтая. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2003. – 230 с.
- Dong W, Xu C., Li C., Sun J., Zuo Y., Shi S., Cheng T., Guo J., Zhou S.** *Ycf1*, the most promising plastid DNA barcode of land plants // Sci. Rep., 2015. – Vol. 5. – P. 8348.
- Hall T. A.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // Nucl. Acids Symp., 1999. – Vol. 41. – P. 95–98.
- Hong D. Y., Pan K. Y.** A taxonomic revision of the *Paeonia anomala* complex (Paeoniaceae) // Ann. Missouri Bot. Gard., 2004. – Vol. 91. – P. 87–98.
- Pan J., Zhang D., Sang T.** Molecular phylogenetic evidence for the origin of a diploid hybrid of *Paeonia* (Paeoniaceae) // Amer. J. Bot., 2007. – Vol. 94. – P. 400–408.
- Punina E. O., Machs E. M., Krapivskaya E. E., Kim E. S., Mordak E. V., Myakoshina Yu. A., Rodionov A. V.** Interspecific hybridization in the genus *Paeonia* (Paeoniaceae): polymorphic sites in transcribed spacers of the 45S rRNA genes as indicator of natural and artificial peony hybrids // Russ. J. Genet., 2012. – Vol. 48. – P. 684–697.
- Ronquist F., Teslenko M., van der Mark P., Ayres D., Darling A., Höhna S., Larget B., Liu L., Suchard M. A., Huelsenbeck J. P.** MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space // Syst. Biol., 2012. – Vol. 61. – P. 539–542.
- Sang T., Crawford D. J., Stuessy T. F.** Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: implications for biogeography and concerted evolution // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995. – Vol. 92. P. 6813–6817.
- Sang T., Crawford D. J., Stuessy T. F.** Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae) // Am. J. Bot., 1997. – Vol. 89. – P. 1120–1136.
- Sang T., Pan J., Zhang D., Ferguson D., Wang C., Pan K. Y., Hong D. Y.** Origins of polyploids: as example from peonies (*Paeonia*) and a model for angiosperms // Biol. J. Linn. Soc., 2004. – Vol. 82. – P. 561–571.
- Tank D. C., Sang T.** Phylogenetic utility of the glycerol-3-phosphate acyltransferase gene: evolution and implications in *Paeonia* (Paeoniaceae) // Mol. Phyl. Evol., 2001. – Vol. 19. – P. 421–429.
- Wang S. Q.** Karyotype in *Paeonia intermedia* C. A. Mey // Bangladesh J. Bot., 2014. – Vol. 43. – P. 101–105.
- 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 / Eds Innis M. A., Geifand D. H., Snisky J. J., White T. J. – New York: Academic Press, 1990. – P. 315–322.