

УДК 582.669.2:577.21

## Исследование ДНК для решения вопросов систематики *Sileneae* DC. (Caryophyllaceae Juss.)

### DNA study for *Sileneae* DC. (Caryophyllaceae Juss.) systematics

Ю. В. Михайлова

Yu. V. Mikhaylova

Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН. E-mail: YMikhaylova@binran.ru

**Реферат.** В систематике трибы *Sileneae* много сложных и дискуссионных вопросов. Существующие системы очень разнятся по числу и объёмам принимаемых родов и внутривидовой классификации самого большого рода *Silene* (Цвелёв, 2001; Лазьков, 2003; Greuter, 1995 и др.). Был проведён мета-анализ последовательностей ITS *Sileneae* из 30 публикаций. Реконструированы филогенетические деревья и оценено содержание нуклеотидов GC. Рассмотрено, какое положение на филогенетическом дереве занимают роды из наиболее «робной» системы Н.Н. Цвелёва. Показано, что содержание GC может служить дополнительным признаком для оценки таксономических решений.

**Summary.** The *Sileneae* tribe systematics is difficult and full of vexed questions. Current taxonomy systems are extremely different in the number and boundaries of accepted genera and *Silene* classification (Greuter, 1995; Tzvelev, 2001; Lazkov, 2003 etc.). A meta-analysis of *Sileneae* DNA sequences from 30 researches has been performed. Phylogenetic trees were constructed and GC content was calculated. Genera according to the most “splited” Tzvelev’s classification were placed on the phylogenetic tree. GC content could be a useful additional feature for the evaluation of taxonomy decisions.

Триба *Sileneae* DC. содержит более 700 видов мировой флоры (Greuter, 1995). Вопросы о границах и объёме трибы решены, но классификация трибы и число принимаемых родов остаются дискуссионными темами. В настоящее время используют несколько таксономических систем. Например, во «Флоре Восточной Европы» (2004) данные изложены согласно обработке Н. Н. Цвелёва (2001), которая представляет собой наиболее «дробную» классификацию. Цвелёв принимает не менее 26 родов в составе трибы *Sileneae*. В «Конспекте панарктической флоры» (<http://nhm2.uio.no/paf/>) используют систему В. Oxelman’a et al. (2001), созданную с учётом данных молекулярной систематики. При составлении «Флоры Северной Америки» (Flora of North America, 2005) опирались на систему W. Greuter’a (1995), согласно которой в трибе *Sileneae* только два рода: монотипная *Agrostemma* L. и гигантский род *Silene* L., включающий в себя все остальные виды. Промежуточной по числу принимаемых родов в трибе является система Г. А. Лазькова (2003, 2006). Этой классификации придерживается Д. Л. Белкин (2009) в обзоре смолёвок Алтайской горной страны. Таким образом, и на территории РФ нет единого понимания таксонов трибы.

Сложности систематики связаны с различиями во взглядах на вес тех или иных морфологических признаков, гетеробатмией и гибридизацией. В таких сложных группах именно исследования ДНК могут помочь ответить на вопросы систематики. Первые же исследования показали серьёзное расхождение между существовавшими на тот момент классификациями трибы (среди них Chowdhuri, 1957 и Greuter, 1995) и молекулярной филогенией (Oxelman, Liden, 1995; Oxelman et al., 1997). С помощью молекулярных методов было показано, что в эволюции трибы неоднократно происходила гибридизация, в том числе интрогрессивная, без изменения ploidy. Так, исследование рода *Heliosperma* (Rchb.) Rchb. nom. cons. (= *Ixoca* Raf.) с привлечением ядерных низкокопийных генов показало гибридное происхождение этого рода, один из предков которого был из линии *Viscaria* Bernh. / *Atocion* Adans, другой – из *Eudianthe* Rchb. / *Petrocoptis* A. Braun ex Endl. (Frajman et al., 2009). Среди прочего, было показано, что *Xamilenis* Raf. из системы Н. Н. Цвелёва (2001) является полифилетичным таксоном и не может быть принят в качестве самостоятельного рода (Михайлова и др., 2014).

Хотя ДНК-систематика значительно продвинула ботаников в исследовании эволюции трибы *Sileneae*, она породила и новые сложности, которые обусловлены политоимией ветвей на филогенетических деревьях. Политоимия может быть связана с недостаточным количеством исходных данных. Было показано, что для построения полностью разрешенного филогенетического дерева 24 видов необходимо секвенировать не

менее 16000 п.о. хпДНК (Erixon, Oxelman, 2008). Кроме того, политомия может быть обусловлена тем, что между событиями дивергенции предковых линий проходило мало времени, и нуклеотидных различий между ними накопилось недостаточно.

К настоящему времени накопилось много исследований по молекулярной филогении представителей *Sileneae*. Объектами большинства молекулярно-филогенетических исследований трибы *Sileneae* являются отдельные, небольшие роды, секции рода *Silene* s. l. и представители трибы с определённой территории. В тоже время молекулярно-филогенетическому изучению системы и границ всей трибы посвящено всего три статьи. В. Oxelman и M. Liden (1995) в своей пионерной работе реконструировали филогению трибы по последовательностям ITS для 65 представителей трибы. Позже В. Oxelman et al. (1997) исследовали хлоропластный интрон *trnL* у 44 представителей трибы. В 2001 г. группа авторов объединила результаты по предыдущим деревьям, добавив в выборку ещё три вида, и представила свою родовую классификацию трибы (Oxelman et al., 2001). Однако из-за большого числа видов в трибе (около 700) и широкого географического распространения задача по реконструкции молекулярной филогении всей трибы очень сложна и трудоёмка.

Мы решили сделать мета-анализ данных по ДНК-систематике *Sileneae* чтобы реконструировать наиболее полную филогению трибы.

Для этого был составлен список видов трибы на основе монографических обработок (Цвелёв, 2001; Лазьков, 2003, 2006; Белкин, 2009) и крупнейших флористических сводок: «Флора Восточной Европы» (2004), «Арктическая Флора СССР» (1971), «Флора Сибири» (1993), «Сосудистые растения Советского Дальнего Востока» (1996), "Flora of North America" (2005). На основе этого списка с учётом синонимии производился поиск в базе данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) нуклеотидных последовательностей ядерного происхождения — района внутренних транскрибируемых сейсеров (ITS1-5.8S-ITS2) кластера рибосомальных генов. Первичный набор данных составил 448 нуклеотидных последовательностей. После выбраковки идентичных последовательностей одного вида, последовательностей с большими нерасшифрованными участками и предположительно ошибочно определённых видов итоговый набор составил 288 последовательностей ITS, полученных от для 171 вида из 26 родов согласно системе Н. Н. Цвелёва (2001). Все взятые последовательности из базы данных были опубликованы в 30 статьях, вышедших в свет с 1995 по 2015 годы. Большая часть этих работ (18) посвящена систематике семейства *Caryophyllaceae*, трибы *Sileneae*, отдельных родов и секций *Silene*, остальные — ДНК-штрихкодированию (6), коэволюции смолёвок и паразитических грибов (3) и особенностям молекулярной эволюции (3).

Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с помощью алгоритма MAFFT (Katoh, Toh, 2008) на сайте Европейского Института Биоинформатики ([www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft)). Расчёт р-расстояний, содержание нуклеотидов гуанина (G) и цитозина (C), подбор эволюционных моделей и построение филогенетических деревьев некоторыми методами осуществляли в программе MEGA 5 (Tamura et al., 2011). Содержание нуклеотидов GC визуализировали с помощью диаграмм размаха в среде R (R Core Team, 2013). Построение филогенетических деревьев в MEGA осуществляли методами объединения соседей (NJ) и максимального правдоподобия (ML) с использованием всех сайтов выравнивания. Статистическую достоверность филогенетических деревьев оценивали с помощью бутстреп-анализа («bootstrap») с использованием 500 случайных выборок. Реконструкцию филогении с помощью байесовского подхода осуществляли в программе MrBayes 3.2.2 (Huelsenbeck, Ronquist, 2001), использовали 1000000 генераций.

Оптимальной эволюционной моделью по информационным критериям Байеса и Акаике для ITS 1 и ITS 2 были модели General Time Reversible (GTR) с Гамма-распределением или двухпараметрическая модель Кимуры (K2) с Гамма-распределением. Для последовательности гена 5,8S рРНК оптимальной эволюционной моделью была GTR с Гамма-распределением и долей инвариантных сайтов. Таким образом, при анализе эволюции последовательностей ITS важно учитывать неравномерность частот замен в разных сайтах. Это может быть связано с ролью ITS в процессинге рРНК: для корректного вырезания генов рРНК спейсеры должны принять определённую пространственную форму, поэтому части ITS могут эволюционировать с разной скоростью, в зависимости от того, какой элемент вторичной структуры они образуют.

На филогенетических деревьях трибы *Sileneae* выделяются пять крупных клад: *Heliosperma* (Rchb.) Rchb. nom. cons. (= *Ixoca* Raf.), *Eudianthe*, смолковую (*Viscaria* и *Atocion* s. l.), лихнисовую (*Lychnis* s. l.) и смолёвковую (*Silene* s. l.). При этом каждая из этих крупных клад имеет высокую статистическую поддержку, но отношения между ними не полностью разрешены. Крупные клады филогенетического дерева перекликаются с группами родства, которые выделяют при обработке морфолого-географическими метода-

ми. Так, Н. Н. Цвелёв (2001) писал о трёх группах родства: лихнисовой, меландриевой и силеноидной. На филогенетическом дереве лихнисовой группе в обработке Цвелёва соответствуют базальные клады (эудиантовая и смолёвковая) вместе с собственно лихнисовой. Смолёвковая клада включает в себя меландриевую и силеноидную группы в обработке Цвелёва, которым соответствуют субклада спорных родов и субклада *Silene s. str.*, соответственно. Г. А. Лазыков (2003) писал о двух группах, на которые можно разделить трибу *Sileneae*: *Lychnidinae* и *Sileninae*. Группа *Lychnidinae* соответствует лихнисовой и меландриевой группам Н. Н. Цвелёва.

Смолёвковая клада филогенетического дерева района ITS распадается на две субклады: коровые смолёвки и вторую сборную субкладу, включающую в себя ряд спорных родов, принимаемых не всеми систематиками (*Melandrium* Röhl., *Gastrolychnis* Fenzl ex Rechb., *Oberna* Adans., *Elisanthe* Rechb. и др.). На основе дихотомии смолёвковой клады ранее предложено было разделить род *Silene* на два подрода: *Silene* и *Behenantha* (Otth) Endl. (Popp, Oxelman, 2004). Много политомичных узлов на дереве расположено ближе к листьям.

Мы рассмотрели положение дискуссионных родов на филогенетическом дереве последовательностей ITS. Роды *Coronaria* Guett., *Oberna*, *Pleconax* и *Melandrium* занимают монофилетичное положение. В смолёвковой кладе полифилетичны оказываются таксоны *Xamilenis*, *Ebraxis* Raf., *Charesia* E.A.Busch, *Silenanthe* Griseb. & Schenk. С нашей точки зрения, эти роды не следует выделять в качестве самостоятельных. Парафилетичными таксонами оказались *Gastrolychnis*, *Sophianthe* Tzvelev, *Ussuria* Tzvelev и *Elisanthe*. Признать или нет парафилетичные таксоны – дискуссионный вопрос. Возникновение парафилетичных групп – один из этапов эволюционного процесса (Hörandl, Stuessy, 2010), поэтому каждый случай следует рассматривать индивидуально с учётом комплекса признаков.

Кроме реконструкции филогенетического дерева, мы провели сравнительный анализ GC-богатства в таксонах трибы *Sileneae*. Содержание GC в ITS 1 (рис. 1) варьирует от 53,9 % до 65,2 % с медианным значением 59,2 %. Самое низкое содержание нуклеотидов GC отмечено у *Eudianthe* (53,9 % и 54,3 %). Также невысокое содержание GC наблюдается у многих североамериканских *Silene*. Максимальное содержание GC отмечено у *S. cariensis* (65,2 %). Содержание GC в гене 5,8S рРНК варьирует незначительно, от 52,3 % до 55,5 % с медианным значением 54,2%. Содержание нуклеотидов GC в ITS 2 варьирует от 56,2 % до 65,2 % с медианным значением 61,7 % (рис. 2). Самое низкое содержание GC отмечено у *Eudianthe* (56,2 %, 56,4 %), также невысокое содержание GC наблюдается у представителей лихнисовой клады (*Lychnis* (57,4 %, 58,2 %), *Coccyganthe* (58 %), *Coronaria* (58,5 %)) и многих североамериканских *Silene*. У большинства последовательностей (более трёх четвертей) содержание GC находится в районе 60–64 %. Более высокие значения были характерны для представителей *Melandrium*, *Sophianthe*, *Pleconax*, а также нескольких видов *Silene* (*S. pygmaea*, *S. brevistaminea* и *S. amoena*). Информацию о GC-богатстве можно использовать в как дополнительный признак в систематике, так и как и источник новых таксономических гипотез. Напри-

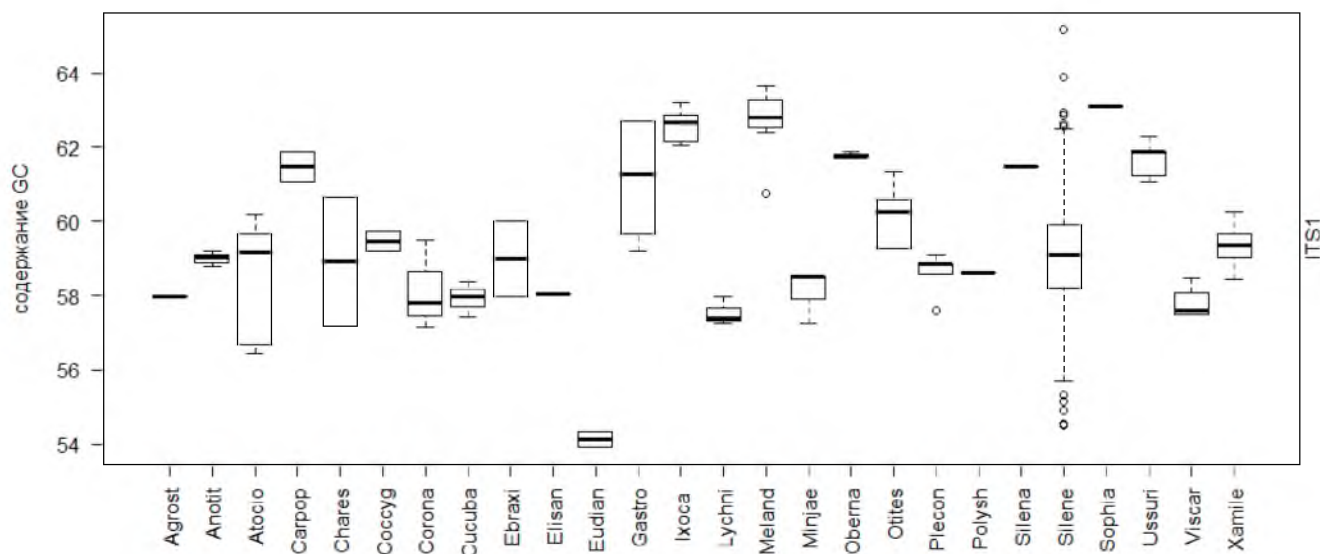


Рис. 1. Процентное содержание нуклеотидов GC в последовательности ITS 1 у представителей родов трибы *Sileneae*. Названия родов указаны согласно системе Н. Н. Цвелёва (2001), обозначены по первым шести буквам.

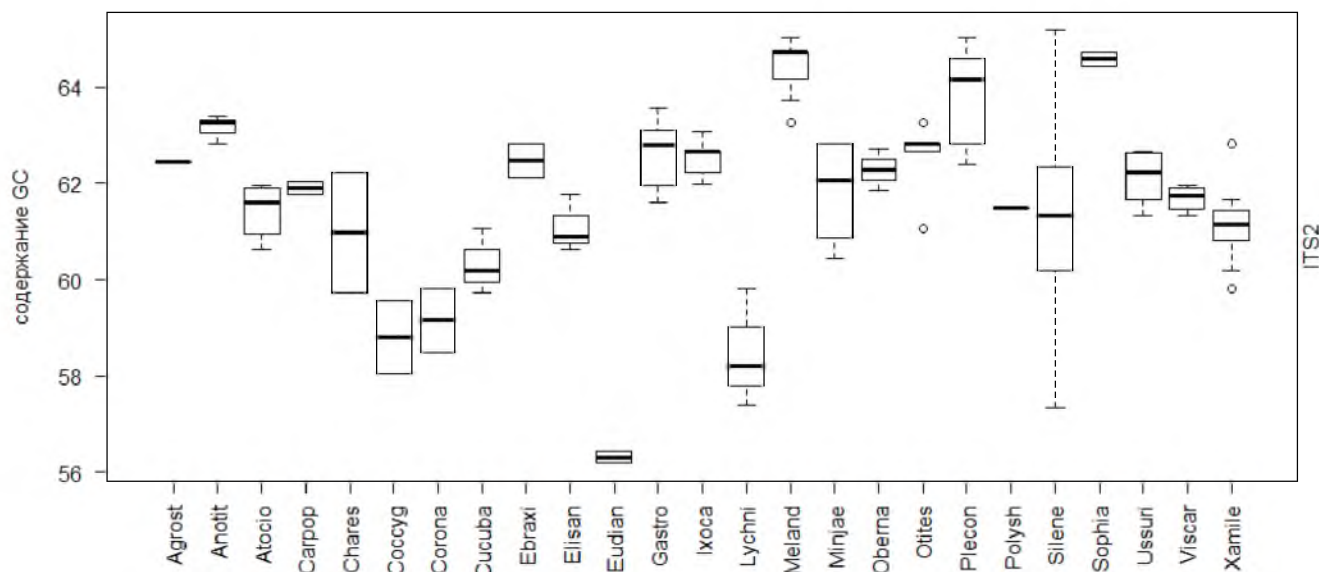


Рис. 2. Процентное содержание нуклеотидов GC в последовательности ITS 2 у представителей родов трибы *Sileneae*. Названия родов указаны согласно системе Н. Н. Цвелёва (2001), обозначены по первым шести буквам.

мер, *Eudianthe* характеризуется очень низким содержанием GC и в ITS 1, и в ITS 2. На филогенетическом дереве этот род занимает базальное положение (Oxelman et al., 2001). Кроме того, у его представителей обнаружен особый тип ультраструктуры перикарпия (Кравцова, Романова, 2015). Значительные различия в содержании CG у видов одного рода маркируют таксоны, на которые следует обратить внимание и, возможно, подвергнуть ревизии. Например, два вида *Charesia* сильно друг от друга по содержанию GC в обоих спейсерах, и на филогенетическом дереве они не образуют монофилетичную группу. Ряд североамериканских смолёвок характеризуется низким содержанием GC, а на дереве они были близки к сибирским *Gastrolychnis* и *Ussuria*. Высокое содержание GC отмечается у *Sophianthe*, на дереве положение этого рода в подкладе спорных родов смолёвковой клады неопределённо.

Изучение ДНК приближает систематиков к построению естественной системы трибы *Sileneae*, но не может ответить на все ряд вопросы систематики и таксономии трибы. На деревьях можно выделить монофилетичные группы, соответствующие секциям или родам, но отношения внутри секций зачастую остаётся неясными из-за политомии. Поэтому важно привлекать новые признаки. Это могут быть и дополнительные признаки на основе изучения ДНК, например, GC-богатство маркерных последовательностей или особенности вторичной структуры в случае РНК-кодирующих участков. Не так давно стали появляться геномные исследования. Например, у представителей родов *Pleconax* и *Elisanthe* обнаружены митохондриальные геномы огромного для эукариот размера (Sloan et al., 2012; Wu et al., 2015). Это можно считать аргументом в пользу их выделения из рода *Silene*. Также важную информацию об эволюции трибы можно почерпнуть из работ по микроанатомическим исследованиям, таких как, например, работа Т. И. Кравцовой и, В. О. Романовой (2015).

### Благодарности

Данное исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 16-34-01024 (мол-а) и подпрограммы РАН «Динамика генофондов».

### ЛИТЕРАТУРА

- Арктическая флора СССР. Выпуск VI: семейства Caryophyllaceae – Ranunculaceae – Л.: Наука, 1971. – 247 с.  
 Белкин Д. Л. Род *Silene* L. (смолёвка) в Алтайской горной стране // *Turczaninowia*, 2009. – Т. 12, вып. 3–4. – С. 5–16.  
 Кравцова Т. И., Романова В. О. Ультраскульптура поверхности перикарпия у видов трибы *Sileneae* (Caryophyllaceae) в связи с её систематикой // *Бот. журн.*, 2015. – Т. 100, № 3. – С. 209–225.  
 Лазьков Г. А. Род *Silene* L. (Caryophyllaceae) во флоре Евразии // флора Евразии: систематика, распространение, история: автореф. дисс. ... д-ра биол. наук: 03.00.05. – СПб., 2003. – 38 с.



**Лазьков Г. А.** Семейство Гвоздичные (Caryophyllaceae) во флоре Кыргызстана. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2006. – 272 с.

**Михайлова Ю. В., Крапивская Е. Е., Родионов А. В.** Молекулярно-филогенетическое исследование самостоятельности рода *Hamilenis* Raf. в составе трибы *Sileneae* // Экол. генет., 2014. – Т. 12, № 4. – С. 52–60.

Сосудистые растения Советского Дальнего Востока. – СПб.: Наука, 1996. – Т. 8. – 370 с.

Флора Восточной Европы. Т. XI. Покрытосеменные. Двудольные. – М.–СПб.: Товарищество научных изданий КМК, 2004. – 536 с.

Флора Сибири. Том 6: Portulacaceae – Ranunculaceae. – Новосибирск: Наука, 1993. – 310 с.

**Цвелёв Н. Н.** О родах трибы смолёвковых (*Sileneae* DC., Caryophyllaceae) в Восточной Европе // Новости систематики высших растений. – 2001. – Т. 33. – С. 90–113.

**Burleigh J. G., Holtsford T. P.** Molecular Systematics of the Eastern North American *Silene* (Caryophyllaceae): evidence from nuclear ITS and chloroplast *trnL* intron sequences // Rhodora, 2003. – Vol. 105. – P. 76–90.

**Erixon P., Oxelman B.** Reticulate or tree-like chloroplast DNA evolution in *Sileneae* (Caryophyllaceae)? // Mol. Phylogenet. Evol., 2008. – Vol. 48. – P. 313–325.

Flora of North America. North of Mexico. Volume 5. Magnoliophyta: Caryophyllidae, part 2. – New York, Oxford: Oxford University Press, 2005. – 690 p.

**Frajman B., Eggens F., Oxelman B.** Hybrid origin and homoploid reticulate evolution within *Heliosperma* (*Sileneae*, Caryophyllaceae) – a multigene phylogenetic approach with relative dating // Syst. Biol., 2009. – Vol. 58. – P. 328–345.

**Hörandl E., Stuessy T. F.** Paraphyletic groups as natural units of biological classification // Taxon, 2010. – Vol. 59, No. 6. – P. 1641–1653.

**Oxelman B., Liden M.** Generic boundaries in the tribe *Sileneae* (Caryophyllaceae) as inferred from nuclear rDNA sequences // Taxon, 1995. – Vol. 44. – P. 525–542.

**Oxelman B., Liden M., Berglund D.** Chloroplast *rps16* intron phylogeny of the tribe *Sileneae* (Caryophyllaceae) // Plant Syst. Evol., 1997. – Vol. 206. – P. 393–410.

**Oxelman B., Liden M., Rabeler R.K., Popp M.** A revised generic classification of the tribe *Sileneae* (Caryophyllaceae) // Nord. J. Bot., 2001. – Vol. 20, No. 6. – P. 743–748.

**Wu Z., Cuthbert J. M., Taylor D. R., Sloan D. B.** The massive mitochondrial genome of the angiosperm *Silene noctiflora* is evolving by gain or loss of entire chromosomes // PNAS, 2015. – Vol. 112. – P. 10185–10191.