

## Хлоропластные ДНК-маркеры и филогения некоторых систематически сложных групп гиацинтовых (Hyacinthaceae)

### Plastome DNA markers and phylogeny of certain poorly resolved groups of Hyacinthaceae

Антипин М. И.

Antipin M. I.

Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Россия, Москва. E-mail: sagefool@yandex.ru  
Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

**Реферат.** Систематика нескольких родов Hyacinthaceae Старого Света остается недостаточно изученной по настоящее время. Наиболее сложным представляется род *Scilla* s.l., относительно состава рода *Hyacinthus* также нет единого мнения. Мы получили последовательности участка *trnL-F* хлоропластного генома для *Hyacinthus transcaspicus* и *Hyacinthella atropatana*. Полученные методом наибольшего сходства деревья показывают, что оба среднеазиатских вида рода *Hyacinthus* оказываются внутри пределов клады рода *Fessia* в понимании F. Speta (1998) и связаны только отдаленным родством с *H. orientalis*. Наши данные показывают, что *Hyacinthella atropatana* на дереве находится далеко от большинства видов рода *Hyacinthella* и оказывается близким по отношению к *Nectaroscilla hyacinthoides*. Габитуально эти два вида имеют очень мало общего, поэтому для рассмотрения обоснованности их объединения в один род требуется детальное изучение всего комплекса признаков этих и родственных им таксонов.

**Ключевые слова.** Молекулярная филогения, участок *trnL-F*, хлоропластный геном, *Fessia*, *Hyacinthella*, *Hyacinthus*, *Nectaroscilla*, *Scilla*.

**Summary.** Several genera of Old World Hyacinthaceae are still not fully resolved, with *Scilla* s.l. being the most controversial, and there is no consensus about the content of *Hyacinthus* as well. We have obtained sequences of *trnL-F* plastome region for *Hyacinthus transcaspicus* and *Hyacinthella (Scilla) atropatana*. ML phylogeny trees confirm that both Central Asian species of *Hyacinthus* are nested within *Fessia* sensu F. Speta and only distantly related to *H. orientalis*. Our data place *Hyacinthella atropatana* away from most *Hyacinthella* species, in a sister clade with *Nectaroscilla (Scilla) hyacinthoides*. These two species have very little in common regarding habit, so a detailed investigation of characteristic traits of these two and closely related taxons is needed to evaluate the reasonableness of merging the two into one genus.

**Key words.** *Fessia*, *Hyacinthella*, *Hyacinthus*, molecular phylogeny, *Nectaroscilla*, plastome, *Scilla*, *trnL-F* region.

**Введение.** Названия *Scilla* и *Hyacinthus* известны с античности и использовались европейскими ботаниками в качестве родовых эпитетов еще до Линнея. Однако систематика гиацинтовых всегда представляла значительную сложность, и полного научного консенсуса в отношении систематики и родственных связей внутри этой группы нет и сейчас. Морфологические, анатомические, кариологические и эмбриологические признаки последовательно предлагались разными авторами в качестве основных критериев для разграничения таксонов, однако новые данные вынуждают пересматривать сложившиеся представления. Наибольшие затруднения для систематики вызывает род *Scilla* в широком смысле, объем которого неоднократно принципиально изменялся за последние триста лет.

Одной из лучших работ, посвященных истории систематики рода *Scilla* sensu lato, остается монография Франца Шпеты (Speta, 1998). Детально рассматривая изменения представлений об этом роде в ходе развития ботаники, Ф. Шпета подчеркивает полифилетичность рода и предлагает разделение его на монофилетичные в его представлении группы. Работа над изучением родства таксонов внутри *Scilla* s.l. велась им долгое время. Большая часть им выделенных из *Scilla* родов обосновывалась совокупностью морфологических, анатомических, онтогенетических и кариологических признаков. В конце 20-го века появляются и первые молекулярные данные, характеризующие эту группу однодольных.

На момент выхода монографии Ф. Шпеты его совместная с М. Ф. Пфоссером работа по молекулярной филогении гиацинтовых (Pfosser, Speta, 1999) только готовилась к печати. Полученные деревья в основном подтверждали предложенное дробление *Scilla* s.l., что вызвало закономерный оптимизм автора: «... Последовательности хлоропластной ДНК или определенных ядерных генов могут послужить надежной точкой опоры в слишком зыбком море морфологических и кариологических данных. Несомненно, далеко не все еще стало ясно, но, по крайней мере, состояние откровенного гадания на кофейной гуще уже преодолено» (Speta, 1998). М. Пфоссер и Ф. Шпета выбрали в качестве молекулярного маркера два участка хлоропластной ДНК – *trnL*-интрон и межгенный спейсер между *trnL*-интроном и геном *trnF*. Эти две идущие подряд последовательности теперь часто используются в молекулярной филогении и обычно обозначаются как один регион – *trnL-F*.

В работе S. Vuerki с соавт. (2012), посвящённой реконструкции глобальной истории эволюции и биогеографии Hyacinthaceae в целом, были получены молекулярные данные по трем хлоропластным маркерам (*trnL-F*, *rbcL*, *matK*) для более чем 250 видов семейства, представляющих все его основные систематические группы (все признанные на тот момент роды). Авторы не подвергали в этой работе пересмотру систематику отдельных подгрупп, однако полученное ими консенсусное дерево ещё более явно продемонстрировало полифилетичность рода *Scilla* s.l., подтвердив при этом монофилию многих родов, предложенных Ф. Шпетой ещё на основе морфологических и кариологических данных.

В недавней работе турецких исследователей (Özüdoğru et al., 2022) была предпринята попытка построения молекулярной филогении для рода *Scilla* s.l. с особым вниманием к группам, представленным на территории Турции. Использовались те же три хлоропластных маркера, что и в работе S. Vuerki с соавт. (2012), но для маркера *rbcL* была взята только частичная последовательность, т.н. *rbcLa*. Новые данные для произрастающих на территории Турции таксонов, не вошедших в работу S. Vuerki с соавт. (2012), позволили более детально представить филогению некоторых групп гиацинтовых Северного полушария.

В данной работе мы получили последовательности для участка *trnL-F* хлоропластного генома для пяти таксонов *Scilloideae*, для четырёх из них молекулярные данные получены впервые. Мы предполагали, что наши данные помогут уточнить как систематическое положение этих таксонов, так и некоторые моменты филогении *Scilloideae* в целом.

**Материалы и методы.** Для построения филогенетических деревьев были использованы как последовательности участка *trnL-F* хлоропластного генома, полученные нами впервые, так и данные из ГенБанка (GenBank. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). При подборе видов для сравнения из ГенБанка мы ориентировались на работу S. Vuerki с соавт. (2012), стараясь, чтобы в итоговом дереве были представлены все основные клады Hyacinthaceae. Для более подробного представительства видов *Scilla* s.l. к анализу были добавлены также данные из работы В. Özüdoğru с соавт. (2022). Виды рода *Scilla* s.l. приведены нами здесь в системе, предложенной Ф. Шпетой (Speta, 1998). В качестве внешней группы были выбраны представители других подсемейств Asparagaceae s. l., и в качестве наиболее отдаленного таксона – *Iris lycotis* Woronow (Iridaceae, Asparagales), для которого был взят участок *trnL-F* из полного аннотированного пластома.

В качестве материала для выделения нативной ДНК для образцов *Hyacinthella atropatana* (Grossh.) Mordak et Zakhar., *H. glabrescens*, *Muscari szovitsianum* Baker были взяты части листовой пластинки вегетирующих растений, содержащихся в живой коллекции НОЦ БС МГУ: для *Hyacinthus transcaspicus* Litv. и *Fessia raevskiana* (Regel) Speta использовался гербарный материал из Гербария МГУ (MW0815930 и MW0815881 соответственно). Выделение ДНК из образцов проводилось согласно двукратному СТАВ-протоколу (Doyle, Doyle, 1990) с небольшими модификациями. Для полимеразной цепной реакции региона *trnL-F* использовались праймеры *tabC(f)* и *tabF(r)* (Taberlet et al., 1991), реакция проводилась в пробирках объёмом 25 микролитров с температурой крышки 105°C согласно следующему протоколу: начальный отжиг при 94°C 2:00.; 29 циклов 94°C 1:00, 50°C 1:00, 72°C 1:50; финальный 72°C 4:00. Наличие в реакционной смеси искомым ПЦР-продуктов тестировали электрофорезом в агарозном геле с бромистым этидием. Очистка ампликонов проводилась с помощью магнитных частиц CleanMag DNA PCR согласно протоколу, предложенному производителем. Секвенирование по Сэнгеру осуществлялось на оборудовании Applied Biosystems ABI 3900 (ThermoFisher Scientific) в компании evrogen.ru (Евроген. URL: <https://evrogen.ru/>). Полученные риды вручную проверялись и редактировались с помощью программы BioEdit (BioEdit. URL: <https://bioedit.software.informer.com/>). Выравнивания стро-

ились с помощью алгоритма MUSCLE в программе MEGA (MEGA. URL: <https://www.megasoftware.net/>), затем корректировались вручную.

Для полученного конкатената данных с помощью теста, входящего в пакет программы MEGA, была определена наилучшая модель метода максимального сходства (T92+G). Для полученных деревьев в программе MEGA рассчитывалось консенсусное дерево, которое укоренялось на наиболее отдаленный таксон аутгруппы (*Iris lycotis*).

**Результаты исследований.** Укорененное консенсусное дерево, полученное методом максимального сходства, приведено на рисунке 1.

Оба среднеазиатских вида рода *Hyacinthus*, *H. litwinowii* Czerniak и *H. transcaspicus* Litw., оказываются внутри клады, объединяющей виды рода *Fessia*. Два вида *Fessia* с более западным ареалом при этом оказываются в одной кладе, расположенной более базально, чем остальные виды. *F. raewskiana* (Regel) Speta оказывается в одной группе с двумя другими видами *Fessia* с географически близкими ареалами на востоке Средней Азии (*F. puschkinioides* (Regel) Speta, *F. vvedenskyi* (Pazij) Speta). Близким ко всей этой ветви гиацинтовых оказывается также *Alrawia bellii* (Baker) Perss. et Wendelbo.

Типовой вид рода – *H. orientalis* L. оказывается при этом в соседней группе, окруженный видами *Scilla* s.l. со свободным околоцветником (виды родов *Othocallis*, *Pfosseria* и *Zagrosia* в системе Ф. Шпеты (Speta, 1998). Образец таксона *Muscari* из Южной Армении, принимаемого А. С. Шхиян и А. А. Нерсисян – авторами монографии рода во «Флоре Армении» в качестве отдельного вида, *Muscari szovitsianum*, оказывается очень близок к *M. armeniacum* Leichtlin ex Baker.

*Hyacinthella atropatana* по нашим данным оказывается одним из базальных таксонов в другой большой группе гиацинтовых, краун-группы в которой представлены монофилетическими родами *Muscari*, *Bellevalia* и *Scilla* s.str.

*Nectaroscilla hyacinthoides* (L.) Parl. оказывается при этом сестринским таксоном по отношению к *H. atropatana*. Близко к этой кладе из двух видов оказывается также *Chouardia litardierei* (Breistr.) Speta.

**Обсуждение.** Пластомный регион *trnL-F*, включающий *trnL*-интрон и межгенный спейсер *trnL-trnF*, хорошо зарекомендовал себя в качестве баркода для молекулярной филогении. Однако к систематике, построенной на основании данных только по одному маркеру, следует относиться с

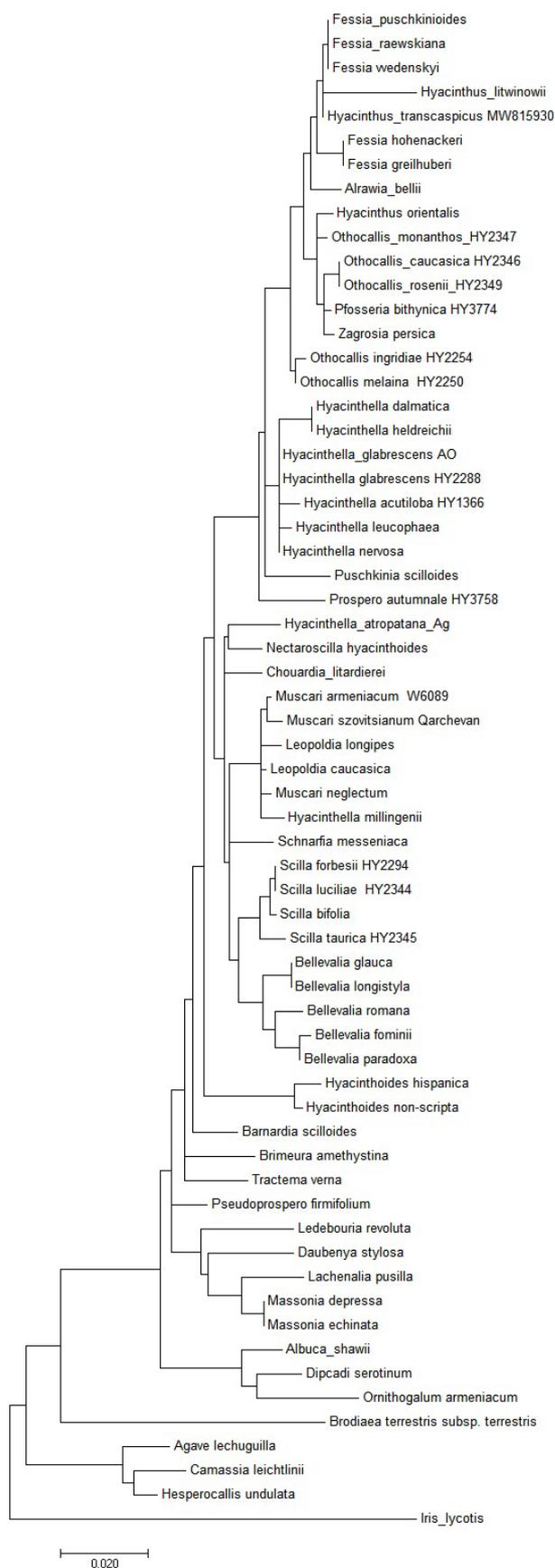


Рис. 1. Филогенетическое дерево *Scilloideae* по данным последовательности *trnL-F* хлоропластного генома, полученное методом максимального сходства.

осторожностью. В дальнейшем результаты, полученные в этой работе, планируется подкрепить данными по двум другим участкам хлоропластной ДНК, *matK* и *rbcL* (см. Buerki et al., 2012; Özüdoğru et al., 2022).

Основанием для включения в род *Hyacinthus* среднеазиатских видов *H. litwinowii* и *H. transcaspicus* служило в первую очередь строение околоцветника. Однако данные S. Buerki с соавт. (2012), показали, что *H. litwinowii* оказывается внутри клады, образованной видами рода *Fessia* Speta. Наши данные для второго среднеазиатского вида этого рода подтверждают родство этих близких между собой видов с родом *Fessia*. По ряду признаков (например, число и строение хромосом) два среднеазиатских вида отличаются от типового *H. orientalis*, но могут быть сближены с некоторыми видами *Fessia*, в особенности *F. gorganica* (Speta) Speta (Greilhuber, Speta, 1976). По всей видимости, срастание долей околоцветника возникло независимо в этих двух группах. *H. litwinowii* и *H. transcaspicus* могут быть, таким образом, либо выделены в отдельный парафилетичный род, анцестральным по отношению к которому является *Fessia*, либо в отдельную секцию в рамках рода *Fessia*.

В работе турецких исследователей (Özüdoğru et al., 2022) рассматривались только виды, относившиеся к роду *Scilla* в его архаической концепции: виды *Bellevalia*, *Muscari*, *Hyacinthella* и *Hyacinthus* из анализа были сознательно исключены, поэтому на дереве, полученном авторами, полифилетичность *Scilla* s.l. видна не так отчетливо, как на деревьях, включающих эти группы на общих основаниях (Buerki et al., 2012; эта работа, рис.). Система, предложенная F. Speta, намного лучше отражает филогенетические связи внутри *Scilloideae*, выделяя почти все группы как монофилетические: исключением оказывается только род *Othocallis*, в случае которого в ранних работах молекулярные данные были получены только для немногих видов. Филогенетические деревья, дополненные данными по другим видам этого рода из работы В. Özüdoğru с соавторами (2022) показывают, что этот род также оказывается в свою очередь искусственным и полифилетичным: для достижения строгой монофилии потребуется разбить его еще минимум на два рода.

Форму, описанную в «Флоре Армении» как *Muscari szovitsianum* Baker, многие авторы и ранее рассматривали в составе *Muscari armeniacum* Leichtlin ex Baker (Stuart, 1970; Davis, Stuart, 1984). При несомненном близком родстве этих таксонов вопрос о степени их обособленности требует детальных генетических исследований на уровне популяций и остается за пределами данной работы.

Описанный исходно как *Scilla atropatana* Grossh., в род *Hyacinthella* закавказский эндемик *Hyacinthella atropatana* был перемещен на основании сходства хромосомных чисел и строения хромосом этого вида с другими видами *Hyacinthella* (Persson, Wendelbo, 1981); морфологические признаки не мотивировали такое объединение, поэтому в роде *Hyacinthella* для этого вида была выделена специальная секция *Atropatana*. Наши данные позволяют предположить, что свободные доли околоцветника у этого вида – примитивный, базальный признак. *H. atropatana* – типичный эфемероид с очень коротким сроком вегетации: морфологическое строение этого растения во многом обусловлено комплексом адаптаций к жесткому ариднему климату (узколинейные короткоживущие листья, обедненное соцветие с сильно извилистой осью). Близкий по молекулярным данным вид *Nectaroscilla hyacinthoides* обладает в целом более мезофитной морфологией и по внешнему виду достаточно далёк от *H. atropatana*. Только детальное изучение всего комплекса морфологических, анатомических, кариологических и эмбриологических признаков этих двух видов в сопоставлении с другими таксонами этой ветви гиацинтовых (*Scilla* s.str., *Bellevalia*, *Muscari*, *Schnarfia messeniaca*, *Chouardia litardierei*) позволит принять взвешенное решение об обоснованности объединения этих двух видов в один таксон.

Молекулярные данные позволяют предположить, что срастание долей околоцветника в эволюции евразийских *Scilloideae* происходило независимо несколько раз – как минимум трижды в ветви *Puschkinia* – *Hyacinthella* – *Hyacinthus* – *Fessia* и дважды в ветви *Scilla* s.str. – *Muscari* – *Bellevalia*.

**Благодарности.** Выражаю глубокую признательность А. А. Криницыной и коллективу лаборатории разведения растений кафедры высших растений биологического факультета МГУ за предоставление лабораторного оборудования и неоценимую помощь, благодаря которым стала возможна эта работа.

#### ЛИТЕРАТУРА

Аверьянов Л. В., Аветисян В. Е., Аветисян Е. М., Агабабян М. В., Агапова Н. Д., Габриэлян Э. Ц., Айрапетян А. М., Мехакян А. К., Нерсисян А. Н., Оганесян М. Э., Таманян К. Г., Ханджян Н. С. Флора Армении / под ред. А. Л. Тахтаджяна. Т. 10. Monocotyledones (исключая Poaceae). – Ruggell, 2001. – 613 с.

Buerki S., Jose S., Yadav S. R., Goldblatt P., Manning J. C., Forest F. Contrasting biogeographic and diversification patterns in two Mediterranean-type ecosystems // PloS one, 2012. – Vol. 7, №6, e39377. DOI: 10.1371/journal.pone.0039377.

**Davis P. H., Stuart D. C.** Flora of Turkey and the East Aegean Islands. – Edinburgh: Edinburgh University Press, 1984. – Vol. 8. – P. 1–632.

**Doyle J. J., Doyle J. L.** A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. // Focus, 1990. – Vol. 12. – P. 13–15.

**Greilhuber J., Speta F.** C-banded karyotypes in the *Scilla hohenackeri* group, *S. persica*, and *Puschkinia* (Liliaceae) // Plant Systematics and Evolution, 1976. – Vol. 126. – P. 149–188.

**Özüdoğru B., Aygören U. D., Tarıkahya H. B., Yıldırım H.** Phylogeny, biogeography, and character evolution in the genus *Scilla* s.l. and its close relatives *Chionodoxa*, *Gemicia*, *Puschkinia* and *Prospero* (Asparagaceae) // Plant Systematics and Evolution, 2022. – Vol. 308. – № 44. DOI: 10.1007/s00606-022-01835-x

**Persson K., Wendelbo P.** Taxonomy and cytology of the genus *Hyacinthella* (Liliaceae-Scilloideae) with special reference to the species in S.W. Asia. Part I. // Candollea, 1981. – Vol. 36. – P. 158–175.

**Pfosser M. F., Speta F.** Phylogenetics of Hyacinthaceae based on plastid DNA sequences // Annals of the Missouri Botanical Garden, 1999. – Vol. 86. – P. 852–875.

**Speta F.** Systematische Analyse der Gattung *Scilla* (Hyacinthaceae) // Phytion (Austria), 1998. – Vol. 37. – P. 120–125.

**Stuart D. C.** Chromosome numbers in the genus *Muscari* Mill. // Notes From The Royal Botanic Garden Edinburgh, 1970. – Vol. 30. P. 189–196.

**Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J.** Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. // Plant Mol Biol., 1991. – Vol. 17(5). P. 1105–1109. DOI: 10.1007/BF00037152. PMID: 1932684.