

## ИЗМЕНЧИВОСТЬ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК УКАЗЫВАЕТ НА АМЕРИКАНСКОЕ ПРОИСХОЖДЕНИЕ СОВРЕМЕННЫХ ПИХТ<sup>1</sup>

© 2021 г. В. Л. Семериков<sup>1, \*</sup>, С. А. Семерикова<sup>1</sup>, Ю. А. Путинцева<sup>2, \*\*</sup>

<sup>1</sup>Институт экологии растений и животных, Уральское отделение  
Российской академии наук, Екатеринбург, 620144 Россия

<sup>2</sup>Сибирский федеральный университет, Красноярск, 660041 Россия

\*e-mail: [semerikov@ipae.uran.ru](mailto:semerikov@ipae.uran.ru)

\*\*e-mail: [yputintseva@sfu-kras.ru](mailto:yputintseva@sfu-kras.ru)

Поступила в редакцию 20.12.2020 г.

После доработки 05.02.2021 г.

Принята к публикации 09.02.2021 г.

Приводятся результаты филогенетического анализа 15 видов пихт, представляющих все основные эволюционные линии рода *Abies*, и *Keteleeria davidiana*, использованной в качестве внешней группы. Данные включают нуклеотидные последовательности митохондриальной ДНК длиной около 28000 пн, полученные путем частичного ресеквенирования сборки митохондриального генома пихты сибирской *A. sibirica*. Установлено базальное положение линий мтДНК некоторых американских пихт, что подтверждает американское происхождение современных *Abies*. Митотипы большинства евроазиатских видов образуют кладу, дочернюю по отношению к американским пихтам, указывая на ее происхождение в результате одной миграции из Америки в Евразию. В то же время ранее полученные данные по ядерной и хлоропластной ДНК свидетельствуют о неоднократных миграциях пихт из Америки в Евразию. Этот конфликт митохондриальных и ядерных данных можно объяснить, предполагая гибридный захват митохондриальной ДНК аборигенных евроазиатских видов видами-мигрантами.

**Ключевые слова:** *Abies*, митохондриальная ДНК, интрогрессивная гибридизация, молекулярная филогения.

**DOI:** 10.31857/S0016675821100118

Миграции между Северной Америкой и Евразией оказали решающий вклад в формирование разнообразия многих таксономических групп умеренной и бореальной флоры северного полушария (например [1, 2]). В ходе трансконтинентальных миграций переселенцы могут вытеснять родственные аборигенные виды, а при отсутствии репродуктивных барьеров — формировать зоны интрогрессивной гибридизации. В последнем случае распространяемый с пыльцой генетический поток со стороны более адаптивного вида “разбавляет” гены менее адаптивного вида, которым обычно является аборигенный вид, вплоть до их полной замены. В то же время менее подвижные гены, передающиеся по материнской линии и не распространяющиеся с пыльцой (например хлоропластные и митохондриальные у цветковых растений), наследуются гибридом от аборигенного вида, что проявляется в виде “гибридного захвата” цитоплазматических

геномов. Древние события “гибридного захвата” проявляются в конфликте между филогенетическими деревьями, основанными на маркерах с разным типом наследования. В частности, такие конфликты характерны для родов сем. Pinaceae (сосны, ели) [3–7], у которых маркеры ядерного, хлоропластного (хлДНК) и митохондриального (мтДНК) геномов имеют двуродительское, отцовское и материнское наследование, соответственно [8]. В современную эпоху локальные процессы “гибридного захвата”, хотя и не связанные с трансконтинентальными миграциями, так же широко распространены [9, 10].

Согласно последнему биогеографическому исследованию рода *Abies* [7], наиболее базальными и удаленными от остальных видов по ядерной и хлоропластной ДНК являются некоторые американские пихты, что указывает на американское происхождение современных *Abies*. В то же время евроазиатские виды входят в несколько клад, часть которых содержат также и американские виды, поддерживая предположение о множественных миграциях из Америки в Евразию. Однако дерево

<sup>1</sup> Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0016675821100118 для авторизованных пользователей.

мтДНК [7] демонстрирует разделение гаплотипов на два кластера – кластер американских видов вместе с несколькими островными азиатскими видами и кластер большинства евроазиатских видов, что, в свою очередь, соответствует однократной миграции мтДНК. Одновременный анализ ядерных, хлоропластных и митохондриальных данных позволил обосновать гипотезу о нескольких волнах миграции пихт из Северной Америки в Евразию [7], которые сопровождалась гибридным замещением ядерного и хлоропластного геномов аборигенных форм – продуктов предыдущих волн миграции, геномами новых мигрантов, что возможно ввиду относительной легкости межвидовых скрещиваний у пихт. При этом, благодаря гибриднему захвату виды-мигранты приобретали митохондриальные геномы видов-аборигенов. Однако разрешение полученного мтДНК дерева [7] было невысоким. Не было установлено положение внешней группы и, как следствие, не были выявлены наиболее дивергентные клады и не были определены филогенетические отношения евроазиатской и американской групп: являются ли они сестринскими, или одна из групп является частью другой. Данное филогенетическое исследование направлено на разрешение этих неопределенностей. Для этого была использована выборка видов, относящихся ко всем основным группам, выявляемым согласно ядерному дереву видов *Abies* [7]. Нуклеотидные последовательности включали 27 регионов митохондриального генома.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В филогенетическое исследование были включены 15 видов *Abies*, представляющих все основные клады дерева видов *Abies*, выделенные ранее на основании изменчивости ядерной и хлоропластной ДНК [7], и все основные секции рода [11], а также *Keteleeria davidiana* в качестве внешней группы (табл. 1).

Для исследования филогении мтДНК рода *Abies* было использовано ресеквенирование сборки митохондриального генома пихты сибирской *A. sibirica*, полученной на основе полногеномного NGS-секвенирования [12]. Для этого в контигах данной сборки были случайно выбраны 42 фрагмента. Для их амплификации и секвенирования с помощью программы Primer3 [13] были разработаны 67 пар ПЦР-праймеров. Фрагменты имели длину 700–1500 пн. Условия ПЦР и секвенирования соответствовали описанным в работе [12]. Для дальнейшего использования были отобраны 27 пар праймеров, дававших амплификацию не менее чем у 13 видов *Abies* из 15.

Редактирование сиквенсных данных и выравнивание последовательностей осуществлялось с помощью программ CodonCodeAligner v. 3.7.1

(CodonCodeCorporation) и BioEdit v. 7.2.5 [14]. Для филогенетической реконструкции нуклеотидные последовательности отдельных фрагментов мтДНК были конкатенированы в объединенный алайнмент. Анализ проводился с использованием байесовского метода (BI) и метода максимальной экономии (MP). Все признаки были равновзвешены. Инделлы и инверсии рассматривались как отдельные события и были закодированы как (1/0). BI выполняли с использованием MrBAYES v. 3.1.2 [15] с использованием модели нуклеотидных замен GTR + G + I. Были сгенерированы две цепи MCMC по 10 млн поколений каждая и с сохранением текущих данных каждые 1000 поколений. Для контроля сходимости цепей учитывали их стандартное отклонение. Когда последнее упало ниже 0.01, уже сгенерированные 10 млн деревьев были отброшены как “burn-in”, а последующие 10 млн деревьев были использованы для построения консенсусного дерева по принципу “majority rule”. MP-анализ был выполнен с помощью RAUP\* v. 4.0b10 [16] с использованием эвристического поиска, случайного порядка выбора с алгоритмом TBR, опцией COLLAPSE, MaxTrees = 500 и опцией MulTrees. Поддержка ветвей была оценена путем “bootstrap” с использованием 1000 повторов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате секвенирования 27 фрагментов мтДНК были получены выровненные последовательности (алайнмент) общей длиной 29968 пн (Приложение, табл. S1). Без делеций и отсутствующих данных длина алайнмента у *Abies* составляла 14015 пн, из которых изменчивыми являлись 153 признака. Нуклеотидное разнообразие  $\pi = 0.002$ .

Байесовское филогенетическое дерево имело существенно лучшее разрешение, чем дерево, построенное на основе метода максимальной парсимонии, при этом они не противоречили друг другу (рис. 1). Евроазиатские виды *A. sibirica*, *A. nephrolepis*, *A. koreana*, *A. fargesii*, *A. recurvata*, *A. firma*, *A. alba* и *A. pindrow* образовали поддержанную кладу (апостериорная вероятность 1). В нее не вошли митотипы восточноазиатских видов недавнего американского происхождения *A. sachalinensis* и *A. mariesii* [7]. Ближайшими родственниками пихты сибирской по мтДНК являются *A. fargesii* (Китай) и *A. koreana* (Корея). Среди евроазиатских пихт гималайский вид *A. pindrow* оказался генетически более обособленным, чем европейско-средиземноморский вид *A. alba*.

Митотипы американских видов не образовали монофилетичную кладу и разделились на несколько дивергентных линий. Клада евроазиатских видов находится внутри клады нескольких американских видов плюс *A. sachalinensis* (1/0.73 апостериорная вероятность/поддержка бутстрэп). *A. bracteata* и *A. amabilis* (западно-североамериканские виды) об-

Таблица 1. Использованный материал

Таксон	Характеристика образца	Естественное распространение	Секция
<i>Abies sibirica</i> Ledeb.	51°48'/87°15' E Is24-2007	Сибирь, Восточная Европа	<i>Balsamea</i>
<i>A. sachalinensis</i> (F. Schmidt) Mast.	46°40'/141°50' E Is41-2008	Хоккайдо, Сахалин и Курилы	<i>Balsamea</i>
<i>A. nephrolepis</i> (Trautv. ex Maxim.) Maxim.	49°00'/131°05' E Is01-2008	Северо-Восточная Азия	<i>Balsamea</i>
<i>A. alba</i> Mill.	47°48'/13°02' E Is6-2010	Европа	<i>Abies</i>
<i>A. balsamea</i> (L.) Mill.	MBG, voucher A0718	Восток Сев. Америки	<i>Balsamea</i>
<i>A. recurvata</i> Mast.	Kew, voucher 36850	Юго-Зап. Китай	<i>Momi</i>
<i>A. mariesii</i> Mast.	35°46'/137°48' Is5n-2015	Япония	<i>Amabilis</i>
<i>A. firma</i> Siebold & Zucc.	36°13'/140°06' E Is7n-2015	Япония	<i>Momi</i>
<i>A. fargesii</i> Franch.	M, v. K09-13-062Is28-2014	Центральный Китай	<i>Pseudopicea</i>
<i>A. amabilis</i> Douglas ex J. Forbes	M, Is19-2014	Запад Сев. Америки	<i>Amabilis</i>
<i>A. bracteata</i> (D. Don) A. Poit	NBG, Is12-2011	Запад Сев. Америки	<i>Bracteata</i>
<i>A. koreana</i> E.H. Wilson	MBG, voucher A048Is48-2013	Корея	<i>Balsamea</i>
<i>A. pindrow</i> (Royle ex D. Don) Royle	34°03'/74°24' E Is31-2013	Зап. Гималаи	<i>Momi</i>
<i>A. concolor</i> (Gordon) Lindl. ex Hildebr.	37°45'/119°30' W Is13-2012	Запад Сев. Америки, Центральная Америка	<i>Grandis</i>
<i>A. magnifica</i> A. Murray	37°45'/119°30' W Is16-2012	Запад Сев. Америки	<i>Nobilis</i>
<i>Keteleeria davidiana</i> v. <i>formosana</i> (Hayata) Hayata	Kew, voucher 40615	Китай	

Примечание. Характеристика образца: указан источник согласно [7] и Приложения, табл. S1, координаты природных популяций (с.ш./долгота), MBG – Московский ботанический сад, М – ботанический сад г. Мустила, Финляндия, Kew – ботанический сад Кью, NBG – Никитский ботанический сад. Секции указаны согласно [11].

разовали кладу с поддержкой 1/0.84. Также весьма дивергентным оказался митотип азиатской пихты *A. mariesii* (о. Хонсю), который занял неопределенное филогенетическое положение в основании дерева.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Мы получили на настоящий момент наиболее поддержанное филогенетическое дерево мтДНК *Abies*. Дерево в основном не противоречит построенному ранее на основе трех фрагментов мтДНК [7]. Евроазиатские виды пихт разделились сходным образом: митотипы большинства из них формируют евроазиатскую кладу (рис. 1), при этом гаплотипы части островных восточноазиатских видов (в настоящем исследовании это *A. sachalinensis* и *A. mariesii*) не входят в данную

кладу и более близки американским гаплотипам, что соответствует их положению в работе [7]. Поддержка евроазиатской клады (рис. 1), согласно полученным данным, оказалась существенно выше (100), чем в предыдущем исследовании (57/54) [7]. Впервые показано, что митотипы большинства евроазиатских видов образуют кладу, дочернюю по отношению к американским пихтам. Это поддерживает гипотезу об американском происхождении современных евроазиатских пихт и о происхождении мтДНК основной части евроазиатских пихт от одной, первоначальной, миграции из Америки в Евразию [7]. Вероятно, последующие волны миграции сопровождались вытеснением видов предыдущих миграций, но при этом митохондриальные геномы первой волны наследовались видами более поздних волн. Филогенетические деревья мтДНК в обоих ис-

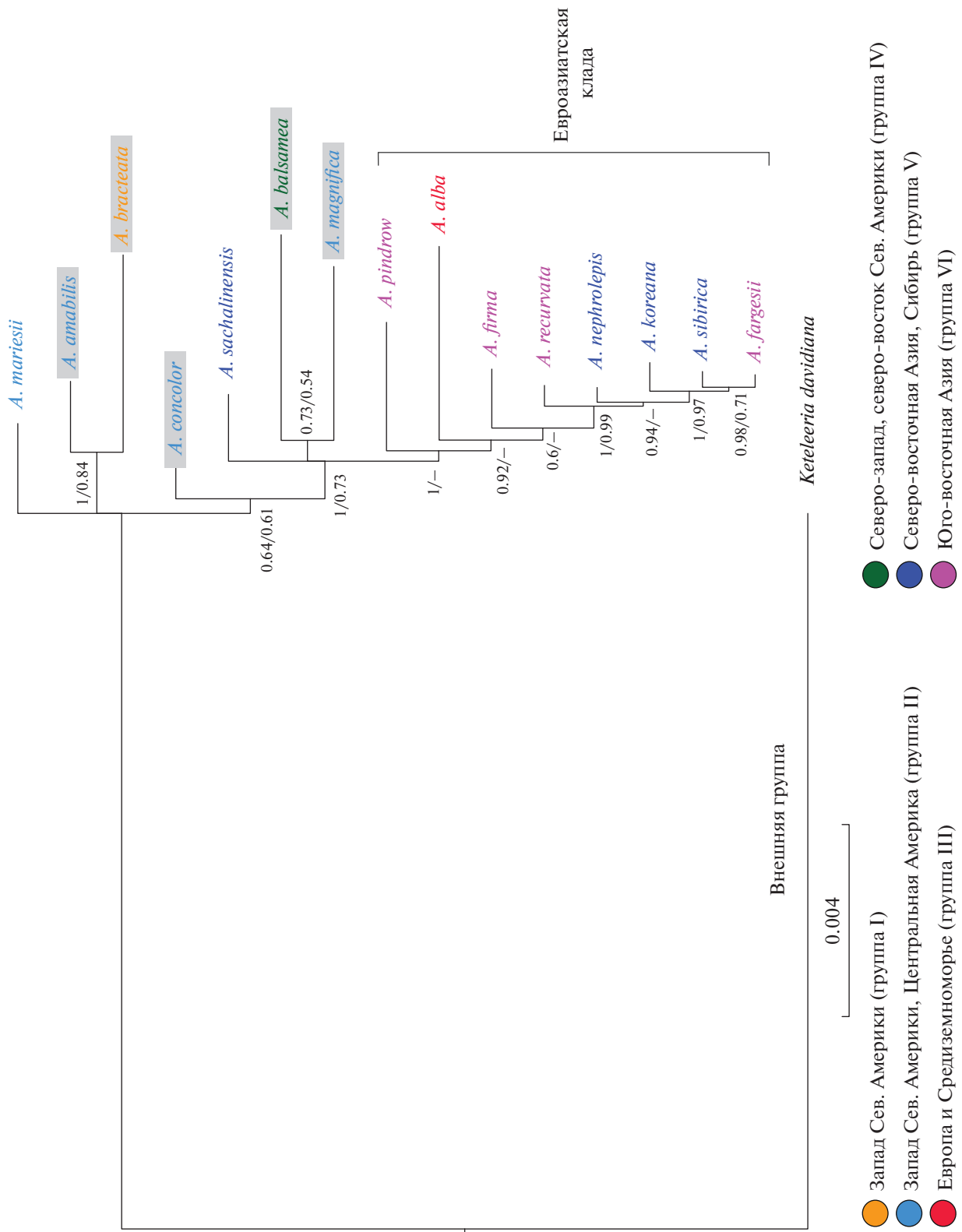


Рис. 1. Филогенетическое дерево 15 видов папик, построенное на основе нуклеотидных последовательностей мтДНК. Статистическая поддержка полученных клад (VI апостериорная вероятность/MP бутстрэп) приведена в их узлах. Группы выделены на основе ядерной ДНК [7], их цветовое обозначение указано в соответствии с работой [7]. Названия таксонов из Северной Америки затенены.

следованиях существенно противоречили деревьям ядерной и мтДНК, в том числе в пределах Евразии. Например, митотипы родственных по ядерной ДНК *A. sibirica*, *A. koreana* и *A. nephrolepis* образуют кладу с митотипами *A. fargesii* и *A. recurvata*, хотя по ядерной ДНК они входят в две обособленные ветви — северо-восточноазиатскую и юго-восточноазиатскую. Несмотря на то, что по ядерной ДНК гималайский вид *A. pindrow* и является более близким родственником восточноазиатских видов, чем средиземноморский вид *A. alba*, но по мтДНК — наоборот, *A. alba* более близка к восточноазиатским видам. Такие противоречия могут быть результатом нескольких причин, включая неполный сортинг линий, гибридный захват, рекомбинацию мтДНК и взаимодействие этих факторов.

Несмотря на значительный объем данных секвенирования, многие узлы дерева оказались слабо поддержаны. Очевидно это может быть связано с низкой скоростью мутирования и, соответственно, с низкой изменчивостью мтДНК. Кроме того, филогенетический сигнал может значительно деградировать ввиду рекомбинации мтДНК. Благодаря этому при гибридном контакте филогенетически удаленных таксонов, возможно формирование химерных митотипов, как, например, у дальневосточных видов пихт [7]. В частности это может быть причиной значительного отклонения положения *A. mariesii* на дереве мтДНК от положения, реконструированного ранее, при использовании меньшего объема сиквенсных данных, когда митотип *A. mariesii* оказался родственным митотипам *A. balsamea* и *A. lasiocarpa* [7]. Мы ожидаем, что включение в анализ большей части видов *Abies* с использованием нескольких образцов на вид, увеличение количества и длины проанализированных фрагментов мтДНК заметно увеличат информативность филогенетического анализа для реконструкции истории пихт. Решение проблемы низкой изменчивости мтДНК видится в использовании NGS-секвенирования, которое позволяет получить значительно больший объем данных. Благодаря существенно большему числу копий на клетку мтДНК, по сравнению с ядерной ДНК, митохондриальные геномы могут быть собраны из прочтений (ридов) при относительно низкой глубине полногеномного секвенирования. Также может быть использовано обогащение геномных библиотек митохондриальной фракцией с помощью гибридизации с митохондриальными зондами “байтами” [17].

Работа выполнена в рамках государственного задания Института экологии растений и животных УрО РАН и при финансовой поддержке РФФИ, проект № 19-04-00795А.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объектов животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объектов людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Tiffney B.H.* Perspectives on the origin of the floristic similarity between eastern Asia and eastern North America // *J. Arnold Arboretum*. 1985. V. 66. P. 73–94. <https://doi.org/10.5962/bhl.part.13179>
2. *Wen J., Nie Z.L., Ickert-Bond S.M.* Intercontinental disjunctions between eastern Asia and western North America in vascular plants highlight the biogeographic importance of the Bering land bridge from late Cretaceous to Neogene // *J. Syst. Evol.* 2016. V. 54. № 5. P. 469–490. <https://doi.org/10.1111/jse.12222>
3. *Tsutsui K., Suwa A., Sawada K. et al.* Incongruence among mitochondrial, chloroplast and nuclear gene trees in *Pinus* subgenus *Strobus* (Pinaceae) // *J. Plant Res.* 2009. V. 122. P. 509–521. <https://doi.org/10.1007/s10265-009-0246-4>
4. *Wang B.S., Wang X.R.* Mitochondrial DNA capture and divergence in *Pinus* provide new insights into the evolution of the genus // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2014. V. 80. P. 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.07.014>
5. *Hao Z.Z., Liu Y.Y., Nazaire M. et al.* Molecular phylogenetics and evolutionary history of sect. *Quinquefoliae* (*Pinus*): Implications for Northern Hemisphere biogeography // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2015. V. 87. P. 65–79. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.03.013>
6. *Ran J.H., Shen T.T., Liu W.J. et al.* Mitochondrial introgression and complex biogeographic history of the genus *Picea* // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2015. V. 93. P. 63–76. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.07.020>
7. *Semerikova S.A., Khrunyk Y.Y., Lascoux M., Semerikov V.L.* From America to Eurasia: a multigenomes history of the genus *Abies* // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2018. V. 125. P. 14–28. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.03.009>
8. *Neale D.B., Sederoff R.R.* Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in loblolly pine // *Theor. Appl. Genet.* 1989. V. 77. P. 212–216. <https://doi.org/10.1007/BF00266189>
9. *Watano Y., Kanai I., Tani N.* Genetic structure of hybrid zones between *Pinuspumila* and *P. parviflora* var. *pentaphylla* (Pinaceae) revealed by molecular hybrid index analysis // *Am. J. Bot.* 2004. V. 91. № 1. P. 65–72. <https://doi.org/10.3732/ajb.91.1.65>
10. *Semerikov V.L., Semerikova S.A., Polezhaeva M.A. et al.* Southern montane populations did not contribute to the recolonization of West Siberian Plain by Siberian larch (*Larix iberica*): A range-wide analysis of cytoplasmic markers // *Mol. Ecol.* 2013. V. 22. № 19. P. 4958–4971. <https://doi.org/10.1111/mec.12433>

11. *Farjon A., Rushforth K.D.* A classification of *Abies* Miller. (Pinaceae) // *Not. Roy. Bot. Garden. Edinburgh*. 1989. V. 46. P. 59–79.
12. *Semerikov V.L., Semerikova S.A., Putintseva Y.A. et al.* Mitochondrial DNA in Siberian conifers indicates multiple postglacial colonization centers // *Canad. J. For. Res.* 2019. V. 49. № 8. P. 875–883. <https://doi.org/10.1139/cjfr-2018-0498>
13. *Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T. et al.* Primer3 – new capabilities and interfaces // *Nucl. Ac. Res.* 2012. V. 40. № 15. e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
14. *Hall T.A.* BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // *Nucl. Ac. Symp. Series*. 1999. V. 41. P. 95–98.
15. *Ronquist F., Huelsenbeck J.P.* MrBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // *Bioinformatics*. 2003. V. 19. № 12. P. 1572–1574. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>
16. *Swofford D.L.* PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony (\* and other methods). Version 4.0 beta10. Sunderland: Sinauer Associates, Massachusetts, 2002.
17. *Mamanova L., Coffey A.J., Scott C.E. et al.* Target-enrichment strategies for next-generation sequencing // *Nat. Methods*. 2010. V. 7. № 2. P. 111–118. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1419>

## Mitochondrial DNA Confirms the American Origin of Modern Firs

V. L. Semerikov<sup>a,\*</sup>, S. A. Semerikova<sup>a</sup>, and Yu. A. Putintseva<sup>b,\*\*</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch of Russian Academy of Science, Ekaterinburg, 620144 Russia*

<sup>b</sup>*Siberian Federal University, Krasnoyarsk, 660041 Russia*

\*e-mail: [semerikov@ipae.uran.ru](mailto:semerikov@ipae.uran.ru)

\*\*e-mail: [yputintseva@sfu-kras.ru](mailto:yputintseva@sfu-kras.ru)

The results of phylogenetic analysis of 15 species of four, representing all the main groups of evolutionary lineages of the genus *Abies*, and *Keteleeria davidiana* as an outgroup, based on the nucleotide sequences of mitochondrial DNA with a size of about 28000 base pairs obtained by partial resequencing of the assembly of the mitochondrial genome of Siberian fir *A. sibirica* are presented. The basal position of mitochondrial DNA lineages of some American firs has been revealed, which confirms the American origin of modern *Abies*. The mitotypes of most Eurasian species form a daughter clade with respect to American firs, which indicates its origin as a result of one migration from America to Eurasia. At the same time, previously obtained data on nuclear (and chloroplast) DNA indicates repeated migrations of fir from America to Eurasia. This conflict between mitochondrial and nuclear data can be resolved by assuming the capture of the mitochondrial DNA of native species by the invading species during migrations.

**Keywords:** *Abies*, mitochondrial DNA, introgressive hybridization, molecular phylogeny.