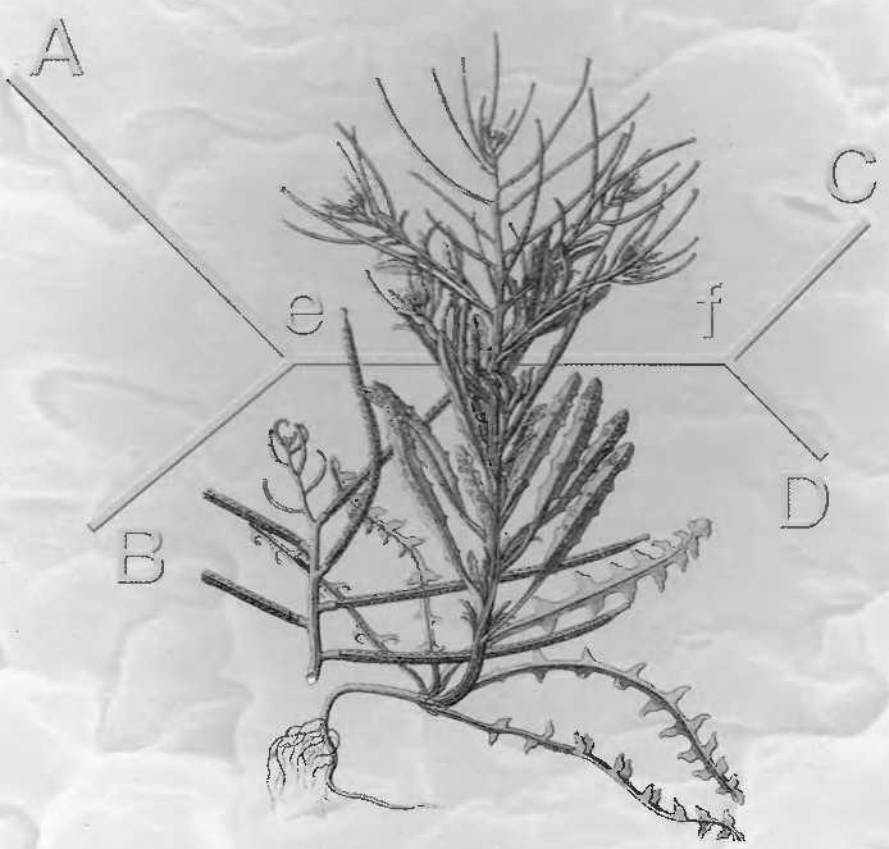
А.С. АНТОНОВ

ГЕНОСИСТЕМАТИКА РАСТЕНИЙ



А.С. АНТОНОВ

ГЕНОСИСТЕМАТИКА РАСТЕНИЙ

A.S. ANTONOV

Plant Genotypes Systematics

МОСКВА
ИКЦ «АКАДЕМКНИГА»
2006

УДК 58
ББК 28.54
Ан 64

Издание осуществлено при поддержке
Российского фонда фундаментальных исследований по проекту
№ 04-04-62047

Антонов А.С. Геносистематика растений – М.: ИКЦ «Академкнига», 2006.

ISBN 5-94628-271-9

Открытие роли ДНК в жизнедеятельности организмов дало возможность систематикам, наряду с сопоставлением свойств фенотипов, перейти к сопоставлению генотипов организмов. Сегодня молекулярная биология предлагает целый комплекс методов, позволяющих различать генотипы как самых близкородственных, так и далеко отстоящих друг от друга на «древе жизни» организмов. Эти методы используют в своей работе геносистематики. Проведенные сопоставления позволили сделать ряд фундаментальных открытий в биологии. Так, например, геносистематиками было открыто новое царство живой природы – архебактерии.

Не все выводы геносистематиков согласуются с представлениями систематиков классической школы («феносистематиков»). Разобраться в причинах таких расхождений – одна из задач, решаемых молодой наукой – современной геносистематикой. Исследования геносистематиков были начаты всего несколько десятков лет тому назад, но перспективность нового направления развития систематики очевидна.

Antonov A.S. Plant Genotypes Systemics – M.: IKC "Academkniga", 2006

Alongside analysis of phenotypes, the basis of classical systematics, new opportunities for biodiversity evaluation emerged with the rise of genotype molecular studies.

Methods elaborated by molecular biologists make it possible to compare genotypes of organisms of different relatedness, from individuals up to the highest taxa. The results of such comparisons are the essence of genosystematics based on the theory of molecular evaluation and cladism.

Genosystematics is a young science ≈50 years old. Obviously, in some aspects it differs from classical systematics adopted by biologists. Time is necessary to decide which of such differences are artefacts, and which demonstrate real inconsistencies between genotype and phenotype systematics.

ISBN 5-94628-271-9

© Антонов А.С., 2006
© ИКЦ «Академкнига», 2006

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ ... 5
Несколько слов о книге ... 5
О задачах, которые ставил перед собою автор ... 8
Геносистематика и биоразнообразие ... 9
Геносистематика и «классическая» систематика растений ... 11

Глава 1. Что такое геносистематика ... 15
О взаимосвязи гено- и феносистематики ... 20

Глава 2. Корни геносистематики. Геносистематика и феносистематика ... 30
Истоки науки ... 30
От сравнительной биохимии нуклеиновых кислот – к геносистематике ... 34
О значимости геносистематики ... 35
Критики геносистематики ... 39

Глава 3. Генотип растений ... 46
Общие сведения ... 46
ДНК ядер ... 48
ДНК хлоропластов ... 61
ДНК митохондрий ... 72
Заключение ... 75

Глава 4. Методы геносистематики ... 76
Объекты исследования ... 76
Генетический текст ... 79
Биохимические и молекулярно-биологические методы изучения семантид растений ... 80
Гибридизация ДНК ... 90
Другие статистические методы ... 96
RFLP-метод ... 97

Глава 5. Методы изучения последовательностей мономеров в семантидах ... 110
Успехи в определении нуклеотидных последовательностей (секвенировании) ДНК и других семантид ... 110
Методы определения нуклеотидных последовательностей (секвенирования) семантид ... 110

Глава 6. Реконструкция эволюции семантид ... 119
Вводные замечания ... 119
Молекулярные механизмы изменения ДНК в эволюции ... 121
Выравнивание последовательностей ... 122
Филогенетические деревья, их свойства и методы построения ... 124
Статистические методы оценки достоверности узлов ... 132
Об оптимальной длине сопоставляемых участков последовательностей ... 134

Редкие изменения в геномах, которые могут быть использованы в филогенетических исследованиях ... 136

Глава 7. Участки геномов, используемые в филогенетических исследованиях ... 137
Вводные замечания ... 137
Анализ последовательностей ядерных ДНК ... 138
Анализ последовательностей ДНК хлоропластов ... 146
Анализ последовательностей ДНК митохондрий ... 151
Какие же фрагменты геномов целесообразнее (и надежнее всего) использовать для реконструкции эволюции генотипов растений? ... 152

Глава 8. Геносистематика о происхождении и ранних этапах эволюции водорослей и наземных растений ... 156
Ранние этапы эволюции ... 156
Молекулярные результаты изучения связей водорослей и высших растений ... 159
Молекулярная эволюция высших растений ... 160

Глава 9. Моховидные: антоцеротовые, печеночники и мхи ... 168
Вводные замечания ... 168
Систематики об эволюционных связях таксонов моховидных ... 169
Молекулярные исследования эволюции печеночников и антоцеротовых ... 170
Молекулярные исследования эволюции мхов ... 176

Глава 10. Геносистематика плауновидных ... 187
История изучения таксона ... 187
Молекулярные исследования плауновидных ... 188

Глава 11. Геносистематика папоротниковидных и хвощей ... 199
Общие сведения о таксонах ... 199
Папоротники и близкие к ним таксоны ... 199
Хвощи ... 206

Глава 12. Геносистематика семенных растений ... 208
О происхождении семенных растений ... 208
Эволюция генотипов семенных растений ... 209
Молекулярная эволюция голосеменных растений ... 212
Молекулярная эволюция покрытосеменных растений ... 231

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ... 231

ЛИТЕРАТУРА ... 237

ПРИЛОЖЕНИЕ ... 287

Все разнообразие органического мира определяется в конечном счете эффектом положения оснований в цепочке ДНК и аминокислот в пептидной цепи...

А.Л. Тахтаджян, 2001

ВВЕДЕНИЕ

Несколько слов о книге

Эта книга написана на основе курса лекций для студентов и аспирантов ботанических кафедр биологического факультета МГУ, что определяет **уровень** и **способ** изложения материала. По сути дела, это **букварь геносистематики растений**. Впрочем, книга может оказаться полезной и для более широкого круга читателей, в частности для тех, кто интересуется современными проблемами ботаники. В первую очередь среди читателей автору хотелось бы видеть своих коллег-ботаников, особенно старшего поколения, привыкших мыслить категориями «классической» систематики, но начинающих понимать, что без знания идеологических основ геносистематики, ее методов и результатов, полученных в последнее время, вряд ли возможно успешно работать в разнообразных разделах современной ботаники.

Необходимость данной книги для практической работы ботаников определяется тем, что других монографий по геносистематике растений на русском языке, за исключением небольшой книги автора [Антонов, 2000б], опубликовано не было, но нужда в них очевидна, тем более что за рубежом уже появился ряд учебников и монографий по ботанике, в которых приведены и обсуждаются результаты исследований, выполненных на молекулярном уровне (см., например, [Hillis et al., 1996: Judd et al., 1997, 2002; Page, Holmes, 1999]), регулярно публикаются и обзорные работы (см., например, обзоры в Amer. J. Bot. 2004. Vol. 91, № 10). По мнению автора, многие из них односторонне освещают проблемы геносистематики, что обосновывает и оправдывает появление этой книги (которая, естественно, также не лишена недостатков, но написана с иных позиций).

Читатели, знакомые с предыдущими публикациями автора по проблемам геносистематики, и, в частности, с последней монографией [Антонов, 2000б] не могут не отметить эволюцию взглядов автора на геносистематику и ее проблемы. К сожалению, развитие этой науки пошло не совсем тем путем, который представлялся автору несколько лет тому назад. Для геносистематики, которой от роду-то всего полвека, это большой срок, отмеченный к тому же бурным развитием этой науки и рядом важных открытий. Под их влиянием взгляды автора на геносистематику и ее возможности несколько изменились.

Немаловажно, что методы геносистематики стали достаточно широко использовать ботаники «классической» школы (в основном, за рубежом), которые оказались недостаточно подготовленными для проведения таких исследований.

Как известно, бурное развитие геносистематики началось после того, как были разработаны методы определения протяженных последовательностей ДНК (методы секвенирования). Первые же опыты с ДНК растений, выполненные путем изучения эволюции индивидуальных и относительно коротких последовательностей ДНК (от нескольких сотен до первых тысяч нуклеотидов), к удивлению многих позволили построить (реконструировать) молекулярные филогенетические деревья, не слишком отличающиеся от представлений ботаников об эволюции изучаемой группы, что вызвало всеобщую эйфорию.

Дело в том, что использование общепринятых методов реконструкции филогенеза растений не дало однозначных результатов. Это нашло свое отражение в схеме, предложенной без малого двадцать лет тому назад известным отечественным палеоботаником С. В Мейеном [1987] (рис. 0-1). Из рисунка видно, что даже происхождение наиболее хорошо изученных, крупных таксонов голо- и покрытосеменных растений оставалось загадкой. Неудивительно, что многие ботаники посчитали методы геносистематики той «волшебной палочкой», которая поможет им решить все проблемы.

Эта эйфория нашла свое отражение даже в высказываниях крупнейших ботаников - систематиков, генетиков и биохимиков в 60-х годах прошлого века (см.

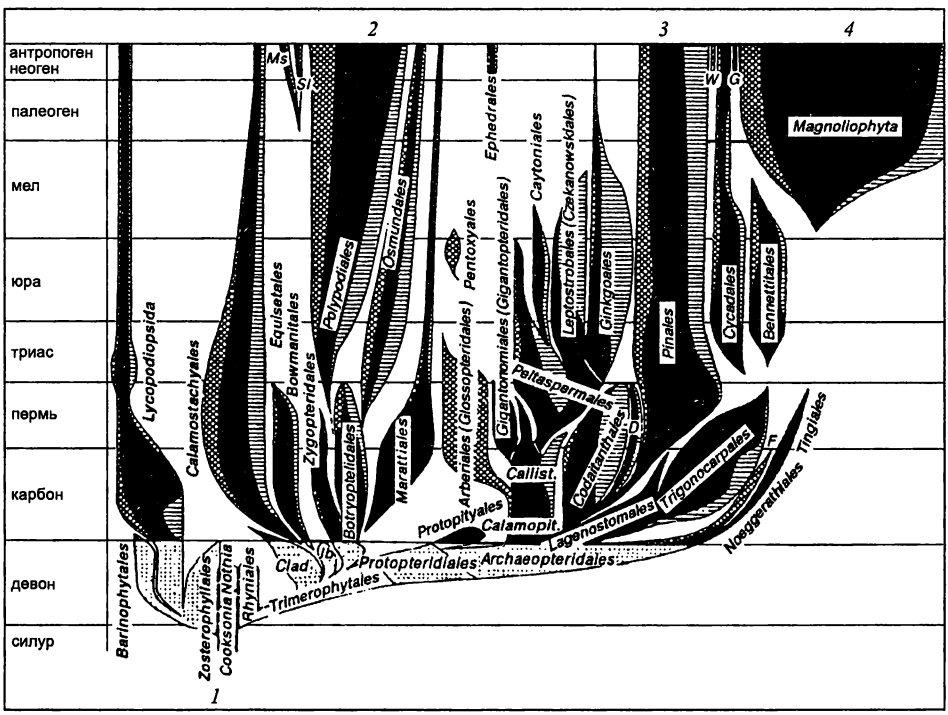


Рис. 0-1 Схема, отражающая процесс эволюционного становления основных групп наземных растений (за исключением бриофитов)

С. В Мейен выводит всех их из харовых водорослей (*1*). Под цифрой *2* сведены все таксоны, за исключением семенных растений. Цифра *3* – это голо- и покрытосеменные. 4 – покрытосеменные. Многие их таксоны не выводятся от какой-то предсуществовавшей конкретной группы вымерших растений. G – гнетовые, W – вельвичиевые. Из [Мейен, 1987]

гл. 2).При этом как-то забывалось, что основой для таких заключений служили данные, полученные при изучении ничтожно малой части геномов растений.

Многие стали считать, что в руках ботаников оказались методы, позволяющие независимо от традиционных подходов верифицировать филогенетические гипотезы ботаников. В целом, это было верным предположением, однако в то время еще не существовало способов оценки достоверности и стабильности самих молекулярных деревьев. Количество работ ботаников, некритически воспринимавших новые данные, стало расти в геометрической прогрессии. Они и сегодня переполняют соответствующие разделы ботанических журналов (см., например, последние номера журнала "Systematic Botany" или "American J. of Botany"). «Успехи» такой геносистематики нашли свое отражение и в материалах последнего Ботанического конгресса (Вена, 2005).

Между тем, специалистам-геносистематикам достаточно быстро стало очевидно, что анализ **разных** индивидуальных последовательностей ДНК часто приводит к реконструкции филогенетических деревьев с **существенно различающейся топологией** (см., например, [Kellog et al., 1996]). В результате ботаники оказались в положении Буриданова осла: они не могли выбрать, какая из множества опубликованных филогенетических реконструкций ближе всего к истине (под истиной будем понимать дерево, отражающее происходившие в прошлом реальные события эволюции растений, точнее, их генотипов).

Чтобы обойти эту сложность, было предложено анализировать «слитные» последовательности, представляющие сумму последовательностей просеквенированных индивидуальных участников ДНК, что в целом ряде случаев (но далеко не всегда !) позволило существенно повысить стабильность топологии реконструированных деревьев. Но сегодня становится очевиден основной недостаток этого подхода: оказалось, что **слитные деревья нужно строить не по сумме случайно взятых, а специально отобранных последовательностей** [Rokas et al., 2003]. Только построенные таким образом деревья отражают реальный ход эволюции генотипов изучаемой группы.

Со временем начали появляться работы по геномике пластид. Если для первой группы работ характерен анализ индивидуальных или малого числа последовательностей ДНК у большого числа видов, то в исследованиях по геномике пластид все было наоборот: в них сопоставлялась эволюция многих десятков последовательностей, но у малого числа видов. Между тем, для вынесения здравых филогенетических заключений необходима еще не достигнутая на сегодня «золотая середина» (анализ многих десятков последовательностей ДНК у репрезентативной выборки видов).

На этом фоне в тени оставались немногочисленные работы, в которых эволюцию генотипов растений пытались понять, сопоставляя крупные, качественные изменения в геномах, например, появление в них новых генов или иных нуклеотидных последовательностей.

Не все благополучно и с методическим арсеналом геносистематики. Вот что написала недавно В. В. Гречко о положении дел в молекулярной филогенетике, одной из важнейших составляющих современной геносистематики: «...Моделирование вариантов течения эволюционного процесса само по себе вызывает критику ... и сложность проблемы реконструкции филогенетических деревьев, по-видимому, в полной мере еще не осознана и требует огромной теоретической

разработки и обоснования» [Гречко, 2002]. Анализ положения дел в молекулярной филогенетике приводит А. А. Банникову к выводу, что источником «... значительного числа ошибок и противоречий является необоснованное использование тех или иных маркеров или слишком малый набор признаков и таксонов и методы интерпретации первичной филогенетической информации, которые основаны по большей части на моделировании» [Банникова, 2004].

Попытки использовать результаты геносистематиики в фундаментальной ботанике для ревизии существующих филогений и систем растений не всегда успешны. Проблема заключается в нестабильности используемых для этой цели реконструкций эволюции генотипов. Автору остается только покаяться, что и выводы его исследований в свое время были несвободны от таких ошибок. В настоящей книге автор пересматривает некоторые субъективные оценки значимости отдельных работ геносистематиков.

Следует отметить, что сфера применения методов геносистематики не ограничивается фундаментальной наукой. Сегодня они используются прикладной наукой и находят все большее применение. Например, в пищевой промышленности геносистематику используют при оценке качества черной икры, вин, муки и макарон и многих других продуктов животного и растительного происхождения.

Научной (геносистематической) предпосылкой для создания новых методов контроля качества продуктов явились результаты углубленного исследования генотипов.

Даже малая примесь муки из мягкой пшеницы (ядерный геном – AA BB DD), снижающая качество макарон, легко определяется путем проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием олигонуклеотидов (праймеров), специфически реагирующих только с нуклеотидными последовательностями геномов ДД (см. гл. 4) [Бикбулатова и др., 2003].

Основываясь на результатах изучения ядерных ДНК растений, в частности, их мини- и микросателлитных нуклеотидных последовательностей (см. гл. 3), селекционеры растений разработали надежные методы генотипирования, т. е. описания особенностей организации генетического материала (видо- и сортоспецифичности) их сортов и разновидностей, оценки генетической гетерогенности сортов и видов культивируемых растений [Брик, Сиволап, 2001; Кочиева и др., 2001, 2002; Форте и др., 2002; Геном растений, 2003; Генетика в XX1 веке, 2004, симпозиумы «Генетика и селекция растений» и «Популяционная и эволюционная генетика»; Кочиева, 2004; и др.].

О возможностях этих методов читатель может судить по результатам аналогичных исследований ДНК животных и человека. Чувствительность и точность этих методов поразительны. Они с успехом были применены при идентификации останков царской семьи, жертв терактов, установлении отцовства и в целом ряде других случаев. Очевидно, что такой же подход может быть использован ботаниками, например, для выяснения родительских видов при анализе происхождения полиплоидов, выявления видов-двойников, истории локальных флор и т.п.

Восприятие материала книги неподготовленным читателем сложно, так как язык и система понятий геносистематики существенно отличаются от тех, которые используют большинство ботаников. Читатель должен быть знаком с основами молекулярной биологии, биохимии и генетики. Без солидного знания математики и теории молекулярной эволюции ему будет трудно освоить

современные методы реконструкции эволюции макромолекул. Для того, чтобы обойти это ограничение и облегчить восприятие текста, в сокращенном виде сведения об объектах и методах исследований геносистематиков приведены в первых главах монографии.

В полном объеме описать все достижения геносистематики растений в небольшой книге (объем ее в немалой степени определяется как объемом курса лекций (один семестр), так и компетенцией автора) невозможно. По этой причине в конце разделов приводится список рекомендуемой литературы для самостоятельного изучения. Ссылки на оригинальные исследования в тексте предназначены для читателя, желающего более глубоко рассмотреть затрагиваемый в данном разделе вопрос.

При обсуждении конкретных достижений геносистематики цитируются далеко не все оригинальные работы. Подразумевается, что с помощью сети Интернет и руководствуясь фамилиями авторов процитированной работы, читатель сам сможет найти все необходимые источники информации по интересующей его проблеме.

О задачах, которые ставил перед собой автор

Геносистематика растений – это новый, современный раздел систематики в широком смысле этого термина. Она сформировалась в основном за последние полвека в результате взаимопроникновения идей и методов нескольких биологических дисциплин, в первую очередь биохимии, молекулярной биологии и генетики и ряда разделов классической ботаники, а также биоинформатики. В разработке методов реконструкци и процессов эволюции макромолекул важную роль сыграли математики. Сегодня геносистематика растений, наряду с геносистематикой микроорганизмов, грибов, позвоночных и беспозвоночных животных и т.п., представляет собой одно из наиболее активно развивающихся направлений современной биологии.

Идеи и методы геносистематики с успехом применяются при исследовании многих проблем систематики растений. Неудивительно, что число публикаций в области геносистематики, и особенно молекулярной филогенетики, в конце прошлого века возрастало из года в год [Pagel, 1999].

Эта тенденция сохраняется. По данным, приведенным М. А. Азаркиной и Г. Н. Панкратовой [2003], только с июня 2001 г. по июль 2002 г. в научной периодике было опубликовано более 400 работ по проблемам филогении растений, в основном, выполненных методами геносистематики. Таким образом, экспоненциальный рост количества публикаций не прекращается. Некоторые ботанические журналы стали регулярно публиковать статьи, в которых представлены результаты, полученные геносистематиками. Например, в хорошо известных отечественным ботаникам журналах "Systematic Botany" или же "Amer. J. of Botany" за год публикуются десятки таких статей, что нельзя сказать об отечественном «Ботаническом журнале». На русском языке работы геносистематиков печатают журналы «Генетика», «Молекулярная биология», «Журнал общей биологии» и реже – некоторые другие.

К сожалению, не всегда публикации по истории развития геносистематики объективны. Автор считает своим долгом указать на приоритетные исследования, способствовавшие становлению отдельных направлений развития этой молодой науки.

Геносистематика и биоразнообразие

Чем привлекательна геносистематика для биологов-систематиков и эволюционистов ? Прежде всего тем, что для оценки видового разнообразия групп организмов (таксонов) или же для создания филогенетической гипотезы об эволюционных связях генотипов изучаемых таксонов (будь то водоросли или высшие растения) обычно требуется несравненно меньше труда, чем при использовании методов и подходов «классических» систематики и филогенетики. Отметим, однако, что сегодня такие оценки относятся к числу предварительных.

Кроме того, достоверность филогенетических гипотез, выдвигаемых на основе данных геносистематики, нередко бывает заметно выше и путем сопоставления иногда позволяет сделать правильный выбор из числа альтернативных схем классической ботаники.

Методы геносистематики хорошо работают при оценке биоразнообразия. Проблема эта далека от окончательного решения. Известно, что наши представления о количестве идентифицируемых видов в некоторых группах водорослей и высших растений далеко не полные. Особенно это касается групп организмов с бедной морфологией, например, рясок (*Lemnaceae)* или одноклеточных водорослей. В этом смысле геносистематика вполне оправдывает ожидания ботаников (см. гл.2).

Как оценить количество описанных, надежно идентифицируемых видов и число реально существующих, но «криптических» видов растений, которых либо называют «видами-двойниками» (когда убеждаются в их существовании), либо по незнанию просто не учитывают при описании биоразнообразия ?

К сожалению, четкие оценки этого соотношения для растений автору не встречались, но аналогичные данные для животных представлены [Blaxter, 2003] на рис. 0-2.

Видно, что видовой состав таксонов, включающих в основном крупных животных с богатой морфологией, описан достаточно полно, но все же нельзя не упомянуть, что и здесь возможны существенные дополнения. Так, зоолог К. Шнейдер недавно открыл на Цейлоне 100 (сто!) новых видов лягушек, что в пять раз обогатило знание видового состава лягушек на этом острове [Pennisi, 2002]. Что же тогда можно сказать, например, о круглых червях – нематодах ? Неудивительно, что ежегодно систематики описывают до двадцати тысяч (!) новых видов животных [Кержнер, Коротаев, 2004].

Аналогичную гистограмму можно построить и для водорослей и высших растений, на которой покрытосеменные будут выглядеть как млекопитающие, а некоторые классы водорослей – как нематоды. Исследования биоразнообразия растений далеко не завершены, и в этой работе важное значение будет иметь применение методов геносистематики.

Сегодня существуют простые методы геносистематики для оценки биоразнообразия любых групп организмов (см., например, [Van de Peer, DeWachter, 1997]), и они уже широко используются ботаниками.

Геносистематика и "классическая" систематика растений

Рассмотрим кратко, как соотносятся эти две науки на примере покрытосеменных растений.

Ботаников давно волнует вопрос о том, как эти растения появились на нашей планете. Оставалось неясно, можно ли сближать покрытосеменных с какой-то конкретной группой ныне живущих голосеменных, предполагая в них ближайших родственников покрытосеменных растений. Предварительные итоги продолжавшейся многие годы дискуссии на эту тему недавно подвел известный отечественный палеоботаник С.В. Мейен . Он писал, что противоречивость взглядов на эту проблему потрясает читателя гораздо больше, чем любой из выводов. В потенциальных предках покрытосеменных уже перебывали практически все основные группы высших растений, и даже красные водоросли (рис. 0-1).

Точно так же остается много нерешенных вопросов филогенетики и систематики других групп наземных растений и водорослей.

Между тем, уже из первых молекулярных данных можно было предположить, что покрытосеменные отделились от некоего общего предка с голосеменными не 125–150 млн лет тому назад, в меловом периоде, как это следовало из данных палеботаники (см. рис. 0–1), а гораздо раньше, около 400–450 млн лет тому назад [Рахимова и др., 1989; Boulter, 1972; W. Martin et al., 1989]. Правда, геносистематики при этом не учитывали, что такой предок мог быть среди вымерших групп голосеменных, скажем, беннетитовых.

Ботаники посчитали вывод геносистематиков абсурдным, ибо он противоречил всем имеющимся на то время сведениям об особенностях эволюции покрытосеменных. В чем-то они были правы: некоторые новейшие датировки этого события молекулярной эволюции указывают на меньшую древность покрытосеменных [Soltis P. et al., 1999 a; 2002; Burleigh, Mathews, 2004], но точность таких датировок, в свою очередь, может быть подвергнута сомнениям. Такое положение дел характерно для «периода первоначального накопления научного капитала» для любой молодой науки.

В поиске подходов к решению этой проблемы П. Мартин с сотр. видимо первыми предложили анализировать филогенез растений путем изучения эволюции их генотипов, одновременного анализа нескольких белков и одной из разновидностей рРНК [Martin P. et al., 1985]. Было высказано предположение, что одновременное использование нескольких типов макромолекул одного класса (например, разных белков [Martin P. et al., 1991a]) и разных классов макромолекул (например, 18S рРНК и гена *rbcL*) позволит сгладить неточности в реконструкции филогенеза генотипов, возникающие при изучении лишь одной из них [Martin P. et al., 1991b]. В то время это предположение было высказано на основании ограниченных экспериментов и самых общих представлений об эволюции нуклеиновых кислот и белков, но в последнее время оно получило мощное экспериментальное подтверждение (см., например, [Vogl et al., 2003]).

Спустя несколько лет после первых работ П. Мартина и его коллег удалось получить более достоверные данные о филогенетических связях генотипов голо-

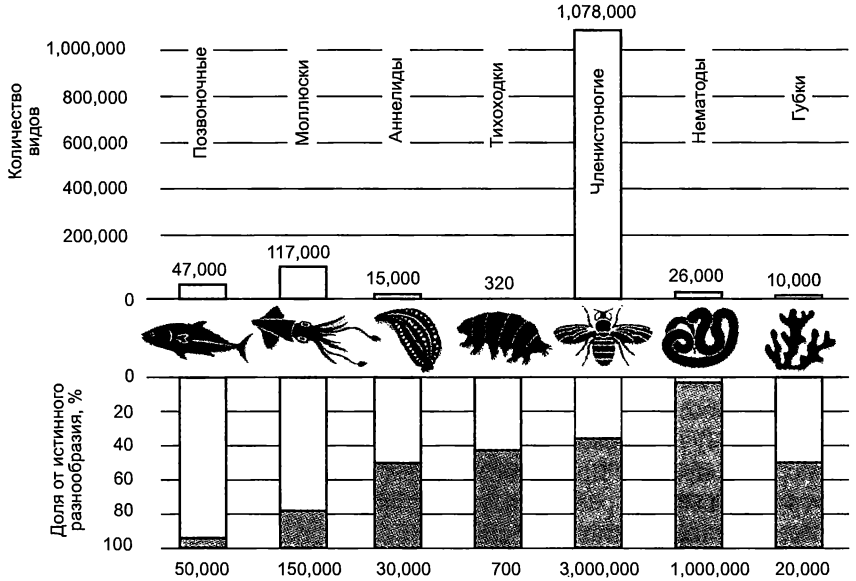


Рис. 0-2. Известное и предполагаемое число видов в составе некоторых групп животных. На рисунке над символическим изображением групп животных указана их известная на сегодня численность Нижняя часть каждого столбика гистограммы показывает соотношение известной (верхняя, серая) и предполагаемой (нижняя, черная) видовой численности для каждой группы, в %%. [из Blaxter, 2003]

и покрытосеменных растений [Рахимова и др., 1989; Troitsky et al., 1991]. Это было сделано путем параллельного анализа эволюции как нескольких разных «малых» рРНК растений, так и частичной нуклеотидной последовательности одной из «больших», 18S рРНК.

На основании полученных данных А. В. Троицкий и его коллеги предположили, что дивергенция генотипов голо- и покрытосеменных растений действительно произошла около 400 млн лет тому назад, но, **главное, до того,** как сформировались основные группы предков современных голосеменных: гинкговых, цикадовых, хвойных и гнетовых. Роль вымерших групп голосеменных тогда не обсуждалась, но в последнее время интерес к этой проблеме вновь возродился (см., например, [Frolich, Parker, 2000; Frolich, 2003]).

Геносистематики продолжали накапливать все новые данные, и в 1996 г. была опубликована работа [Goremykin et al., 1996], которая сыграла роль тревожного сигнала для сторонников гипотезы о близости покрытосеменных с одним из таксонов голосеменных, гнетовыми (см.: [Красилов 1989]). Из этой работы следовал вывод о том, что гнетовые не ближе к ним, чем любая другая группа рецентных голосеменных.

Одно из первых эволюционных деревьев, иллюстрирующее эти отношения [Рахимова и др., 1989], представлено на рис. 0-3.

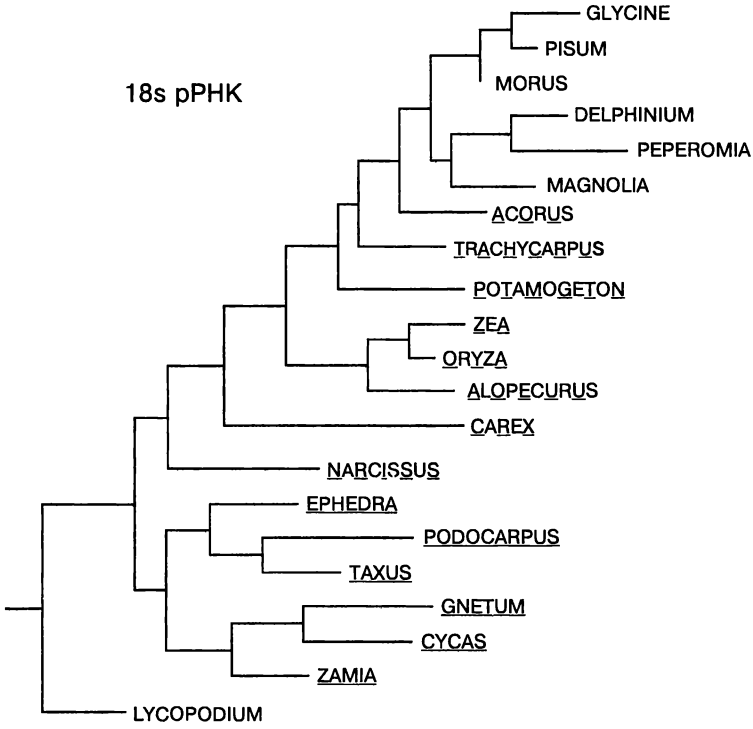


Рис. 0-3. Филогенетическое дерево, построенное по последовательностям нуклеотидов значительной части молекул 18S рРНК 14 видов растений. Сплошной линией подчеркнуты таксоны голосеменных, прерывистой – однодольных растений. Из [Рахимова и др., 1989]

Сегодня такая схема включает многие тысячи видов голо- и покрытосеменных растений.

Спустя всего год эти выводы получили подтверждение в трудах многих других исследователей. Более подробно этот вопрос рассматривается в главе «Геносистематика семенных растений».

Аналогичные изменения происходили в это время в систематике водорослей. Основой для существенного пересмотра филогенетических связей отдельных крупных групп ранга класса вначале послужили результаты анализа эволюции индивидуальных разновидностей семантид, например, рРНК.

Несмотря на недостаточную надежность реконструкции филогений по результатам изучения эволюции всего одного гена, была начата ревизия систем этих организмов. Стало ясно, что водоросли (в их прежнем понимании) – исключительно гетерогенная группа организмов.

Относительная легкость работы с нуклеиновыми кислотами сняла многие проблемы, связанные с анализом белков. Это очевидно после глубокого сравнительного анализа белков, выполненного первоначально на микроорганизмах [Mayer et al., 1986]. Поэтому интерес ботаников к исследованиям ДНК не случаен и растет год от года.

Задача автора этой книги – осветить историю возникновения и развития основных идей и методов геносистематики в целом и на примере систематики растений и продемонстрировать основные результаты приложения новых подходов для решения ее проблем. В книге читатель найдет множество иллюстраций к давнему высказыванию известного биохимика М. Флоркена: «Изучение биохимических признаков ведется обычно весьма сложными методами, и такие исследования проводить труднее, чем прямое изучение морфологических признаков. Тем не менее, если бы натуралисты начали с изучения именно этих признаков, а не с морфологических исследований, то они неизбежно пришли бы к представлениям об эволюции» [Florkin, 1949].

Многие разделы книги будут изложены конспективно. Описывать все методы молекулярной биологии и генетики, как и геносистематики, нет необходимости. Главное, чтобы читатель составил представление о тактике и стратегии исследований геносистематика.

Так, практически без рассмотрения остаются детали методов выделения ДНК, ее специфического гидролиза и клонирования фрагментов ДНК – важнейшего этапа при использовании современных методов определения нуклеотидных последовательностей и ряда других, не менее важных. Читатель может найти их в легко доступных руководствах (см. список литературы в конце раздела).

В своих построениях геносистематики активно используют идеологию, методы и терминологию кладизма. Это направление «классической» систематики (одного из направлений «феносистематики», в терминах, принятых в этой работе) до недавнего времени слабо развивалось в России и многим до сих пор кажется чужеродным явлением [Павлинов, 2004]. Кладизм несравненно популярнее за рубежом, где все более утверждается в системе биологических знаний. Кроме того, в последнее время большим успехом пользуются статистические методы построения филогенетических деревьев. Разобраться во всех этих методах для того, чтобы грамотно использовать их при построении филогенетических деревьев, без знания математики нельзя. Именно поэтому сегодня активно развивается биоинформатика.

Отметим также, что применение двух альтернативных подходов, основанных на изучении фенотипов и генотипов, уже привело к противоречиям. Так, по мнению М. Донохью, Линнеевская систематика, основанная на результатах исследований фенотипов, отживает свой век.

Оставим на совести Донохью это категорическое утверждение, но все же признаем, что в систематике растений наступило время больших перемен. Задача этой книги – подготовить читателей к восприятию современных идей и методов геносистематики.

При работе над книгой и отдельными ее разделами с рукописью знакомились мои коллеги, геносистематики, генетики и ботаники. Они сделали ряд ценных замечаний, которые были учтены при работе над текстом. Автор искренне признателен В. В. Алешину, М. Г. Пименову, В. Р. Филину, В. А. Ратнеру, А. К. Скворцову, а также моим зарубежным коллегам и советчикам А. Кронквисту, Дж. Дойлу (США), В. В. Горемыкину и В. Мартину (Германия), всем аспирантам и сотрудникам лаборатории геносистематики растений НИИ ФХБ МГУ и многим другим коллегам, либо принимавшим участие в экспериментах, результаты которых побудили меня к написанию этой книги, либо участвовавших в их планировании и обсуждении, а О. С.Кедровой и С. Н. Антоновой – за помощь при подготовке рукописи к публикации.

ЧТО ТАКОЕ ГЕНОСИСТЕМАТИКА

Итак, что же такое геносистематика? Чтобы ответить на этот вопрос, сначала определим, какую область биологии специалисты называют систематикой. Так, по мнению Э. Майра , «систематика есть научное исследование различных организмов, их разнообразия, а также всех и каждого взаимоотношений между ними» [Майр, 1971].

В учебнике «Систематика растений: филогенетический подход» [Judd et al., 1999, 2002] предлагается такое определение: «Систематика есть наука о разнообразии организмов. Она занимается открытием, описанием и интерпретацией сведений о биологическом разнообразии, а также синтезом всей информации о биоразнообразии в форме систем классификации, обладающих предсказательной силой[1]».

Итак, систематики призваны изучать все многообразие живого во всех его проявлениях, от микроорганизмов до человека, и на этой основе строить гипотезы, объясняющие эволюционные пути и механизмы возникновения и развития биоразнообразия. Далее, систематики классической школы выделяют из биоразнообразия группы родственных организмов и предлагают схемы иерархического соподчинения таких групп организмов (таксонов). На этой основе они разрабатывают их системы.

Как же сегодня изучают биоразнообразие? В последнее время здесь произошли качественные изменения. Отметим прежде всего, что помимо традиционных подходов – исследований фенотипов – в настоящее время, объектом служат и генотипы организмов (весь комплекс генетической информации, хранимой организмом, передаваемый им из поколения в поколение и реализуемый в ходе онтогенеза путем функционирования молекулярно-генетических систем управления (МГСУ)). .

Важно, что, в зависимости от условий существования , «продукт реализации генотипа», фенотип растения, может быть разным. Так, один из видов растений рода *Ficus* в лесу – это лианы, а на открытом пространстве – деревья.

Исследования геносистематиков обычно начинаются с изучения путей эволюции отдельных участков носителя генетической информации – ДНК. Они также проводят сравнительное изучение отдельных генопродуктов (компонентов МГСУ)– молекул индивидуальных РНК или белков. В структурах последних находит свое отражение информация, содержащаяся в отдельных участках ДНК. Наконец, геномика сопоставляет полные нуклеотидные последовательности ядерных геномов либо пластомов организмов.

[1]Здесь и далее перевод с английского сделан автором.

Заключительный этап работы – сопоставление и на этом основании анализ эволюции МГСУ [Ратнер, 1966; 1993; Ratner et al., 1996; Soranso, Goldstein, 2002]. По своему содержанию понятие «МГСУ» ближе всего к понятию «генотип», так как МГСУ включают не только первичные семантиды (молекулы ДНК), но и вторичные семантиды (РНК и белки), участвующие в передаче и реализации наследственной информации в составе МГСУ.

При функционировании генотипов информация, закодированная в структуре гена, может реализоваться по-разному. Так, например, при синтезе белков она может частично модифицироваться путем так называемого «альтернативного сплайсинга» первичных транскриптов (молекул мРНК) или же их «редактирования» [Keegan et al., 2001].

На стадии МГСУ формируется грань между фенотипом и генотипом организма. Некоторые из образующихся классов соединений уже принадлежат фенотипу (например, запасные белки), другие же, во взаимодействии со средой существования организма, принимают непосредственное участие в формировании его окончательного, конкретного фенотипа.

При формировании фенотипов существует множество путей реализации генетической информации. Недавно открыты новые классы РНК, не несущие информацию о структуре белков, но участвующие в функционировании МГСУ (это некодирующие РНК, или нкРНК). Одной из таких новых разновидностей РНК являются мини-РНК. Они построены всего из 20–25 нуклеотидов, но играют важнейшую роль в регуляции активности генов на уровне трансляции, включая и выключая их на разных стадиях онтогенеза или в зависимости от меняющихся условий среды существования организмов. Описано несколько классов таких нкРНК [Eddy, 2001; Baulcombe, 2002].

Иными словами, открыт новый тип регуляции биосинтеза белка. Такие молекулы РНК, компоненты МГСУ, непосредственно участвуют в формировании того фенотипа, который оптимально адаптирован к конкретным условиям существования растения.

При изучении эволюции генотипов анализ МГСУ позволяет учитывать не только генетические, но и эпигенетические процессы, приводящие к образованию различных фенотипов. Разнообразие последних является результатом взаимодействия семантид в пределах МГСУ и влияния внешних факторов. Подробнейшим образом свойства и механизмы функционирования МГСУ описаны В. А. Ратнером [Ратнер, 2002].

В полном объеме сопоставлять генотипы организмов (= МГСУ) мы сегодня еще не умеем, хотя в этой области наблюдается быстрый прогресс [Soranso, Goldstein, 2002]. Однако мы, как минимум, знаем, что генетическая информация, необходимая для формирования МГСУ и становления фенотипов, закодирована в ДНК.

Неудивительно, что исследователи генотипов достаточно давно стали предпринимать попытки их сравнительного изучения, сначала путем сопоставления физико-химических свойств фрагментов носителя генетической информации (ДНК), затем (косвенно, и в ограниченном объеме) путем сопоставления как МГСУ, так и образующих их первичных структур генопродуктов, РНК и белков. Естественно, что параллельно проводились исследования фенотипов организмов. Как же соотносятся вклады этих двух направлений исследований ?

А. К. Скворцов [2001] образно сравнил исследования генотипов с изучением только одной стороны монеты. Геносистематики, по его мнению, пытаются решить все проблемы филогенетики и систематики, оплачивая знания лишь одними «решками» монет. Неясно, правда, чем лучше платежи, которые ведутся одними «орлами» (результатами исследований фенотипов).

Продолжим далее аналогию А. К. Скворцова. Предположим, что на «решке» есть надпись « 1 цент». Узнать страну, где в ходу такая монета, изучая их «решки», действительно невозможно. Чтобы понять, где была выпущена монета, необходимо перевернуть ее и идентифицировать принадлежность по гербу страны (= определить ее «фенотип»). С другой стороны, если мы начнем изучение монеты с «орла», мы не узнаем ее номинала.

Иными словами, ни исследования фенотипов, ни исследования генотипов по отдельности не могут дать нам полного представления о монете (= организме). Только использование двух альтернативных подходов может привести к успеху.

Результаты таких исследований во многом будут связаны с особенностями процесса видообразования у растений. Здесь уместно вспомнить гипотезы Ю. А. Филипченко – Р. Гольдшмидта о роли в эволюции растений так называемых «успешных уродцев». Эта проблема как в общей форме, так и применительно к растениям, рассматривалась также А. Л. Тахтаджяном [1983], В. Н. Стегнием [1991]. Л. И. Корочкиным [2002], в монографии Н. Н. Воронцова [2004] и рядом других эволюционистов. Вопрос этот весьма актуален в свете последних данных о роли мутаций в гомеотических генах в определении морфологии растений.

Например, альгологам давно известны зеленые водоросли, относимые к родам *Ulva* и *Enteromorpha*. У представителей одного из этих родов талломы трубчатые, а у другого – пластинчатые. По этим признакам морфологи легко различают эти два таксона и считают их отдельными родами.

Как оказалось, "генетическая цена" пребразования трубчатого таллома в плоский и наоборот–всего одна мутация в морфогенах [Tan et al., 1999]. Нет необходимости длительное время накапливать малые изменения в фенотипах: переход от одного типа талломов к другому осуществляется очень просто. Более того, такие переходы от трубчатого таллома к плоскому в этих двух группах по-видимому происходили неоднократно.

Многочисленные аналогичные примеры дают нам семенные растения. Об этом речь идет в обзоре Т. А. Ежовой и О. А. Скляровой [2001]. Не такой ли механизм формирования предка покрытосеменных из голосеменных растений?

Иными словами, проблема соотношения процессов эволюции фенотипов и генотипов представляется очень непростой и до сих пор нерешенной.

О сложности объединения молекулярных и морфологических данных пишет В. Грант в недавно опубликованной работе [Grant, 2003]. С его точки зрения, ни один из подходов к созданию консенсусной системы не является единственно верным или ошибочным, каждый исследователь руководствуется собственными стандартами. Вопрос о возможности создания интегративной системы, опирающейся как на данные фено-, так и геносистематики в настоящее время остается открытым. Говорить о конгруэнтности молекулярных и морфологических филогений преждевременно [Patterson et al., 1993].

Следует отметить еще одно важное обстоятельство: биологи разных специальностей вкладывают в понятие «генотип» несколько различное содержание.

Так, генетики и селекционеры под генотипом понимают комплекс аллелей организма, который они изучают с помощью специфических генетических, молекулярно-генетических и биохимических методов, т.е. они принимают во внимание в основном лишь генную составляющую МГСУ организмов и нередко оставляют без рассмотрения большую часть генетического материала, которая в фенотипе реализуется лишь опосредованно (например, разнообразные «малые» РНК, разные классы повторяющихся последовательностей ДНК, мигрирующие элементы геномов, псевдогены и пр.), не говоря уже о прочих компонентах МГСУ.

Молекулярные биологи, занимающиеся геносистематикой, под генотипом понимают МГСУ, несущую в себе информацию о том, каким будет фенотип организма. Их понимание шире, так как лишь малая часть генотипа представлена специфическими последовательностями нуклеотидов, генами, непосредственно кодирующими белки.

У растений разнообразные некодирующие последовательности нуклеотидов составляют обычно очень значительную часть геномов. Исследование строения как кодирующих, так и некодирующих (например, интронных) последовательностей ДНК дает возможность получать информацию, которую можно (но осторожно!) использовать для развития филогенетики и систематики растений.

Теперь мы подошли к определению используемых в этой работе терминов «геносистематика» и «феносистематика». Они используются уже давно [Антонов, 1974] в соответствии с делением «фенотип-генотип» и **для того, чтобы подчеркнуть разницу в объектах исследований**, причем геносистематики используют термин «феносистематика» как омоним его общеупотребляемого «классическими» систематиками значения и для удобства противопоставления под этим термином они объединили все направления «классической» систематики (эволюционную систематику, кладизм и.т.п.), опирающиеся на результаты изучения фенотипов организмов.

Геносистематикой же стали называть науку, которая изучает все разнообразие генотипов организмов, все и каждое взаимоотношения между ними. Относительно недавно [Ратнер, 1966; Ratner et al., 1996] смысл термина «генотип» был наполнен конкретным содержанием: вместо достаточно неопределенного термина «хранилище наследственной информации клеток» объектом исследований геносистематиков предлагается теперь считать молекулярно-генетические системы управления онтогенезом организмов, организованные из белков, РНК и ДНК.

Изначально предполагали, что основной задачей геносистематики являются определение первичных структур геномов клеточной ДНК и выделение из биоразнообразия естественных группировок геномов (биологи называют аналогичные группы организмов таксонами, мы же будем называть группы организмов со сходными генотипами – **генотаксонами**), определение эволюционных связей между ними (этим занимается молекулярная филогенетика) и, при необходимости, присвоение выделенным генотаксонам определенного ранга в иерархии (т.е. создание систем генотаксонов (генотипов) организмов).

Выяснение филогенетических связей и возможное создание системы генотаксонов – одна из актуальных и сложных проблем, стоящих перед геносистематиками. Впрочем, сама возможность создания системы генотаксонов по типу линнеевской, которая была бы основана как на данных морфологии, так и геноси-

стематики, сегодня многими исследователями оспаривается. Подробно эту проблему мы обсудим позже, а сейчас обратимся к проблеме терминологии геносистематики.

В англоязычной литературе такой **объединяющий** термин, как геносистематика, практически не используется [Molecular systematics and evolution, 2001]: существуют понятия DNA-systematics (*ДНК-систематика*) и molecular systematics (*молекулярная систематика)*, а также molecular phylogenetics (*молекулярная филогенетика*). За рубежом опубликовано достаточно много монографий и обзоров, в которых под этими названиями обсуждаются проблемы геносистематики. Одна из первых таких монографий была издана еще в 1986 г. в США под редакцией проф. С. Датта [DNA systematics. Plants. 1986].

Интерес эта монография представляет потому, что во вводном разделе она содержит более или менее объективный анализ раннего этапа истории становления этой науки. Имеет смысл процитировать фрагмент этого введения.

«Исторически исследования в области ДНК-систематики – пишет С. Датта – были начаты[2] более двадцати лет тому назад Эллисом Болтоном, Роем Бриттеном, Биллом Хойером, Дэвидом Коэном, Брайаном Мак-Карти и другими исследователями в Институте Карнеги в Вашингтоне, а также рядом других исследователей в Англии, Франции и в СССР.[3] Обзор этих исследований был дан в книгах, опубликованных издательством МГУ в 1972 и 1980 гг. под редакцией А. Н. Белозерского и А. С. Антонова. Для оценки сходства и различия организмов авторы применяли в основном метод ДНК×ДНК гибридизации, который сегодня считается «наиболее подходящим из существующих» для построения деревьев сходства, как об этом пишет Левин. Работая этим методом, Чарльз Сибли и Джон Олквист .... предложили «молекулярные часы ДНК[4]», используемые для построения филогенетических деревьев. Еще раньше аналогичные часы предложили Антонов с сотрудниками в СССР ...».

Действительно, А.Н. Белозерскому и А.С. Спирину принадлежит первый обзор достижений сравнительной биохимии нуклеиновых кислот, предтече геносистематики [Белозерский, Спирин, 1960]. Только много лет спустя аналогичные работы стали появляться в зарубежной литературе (см., например, [Diamond, 1983]).

Очередную задачу геносистематики (как до сих пор считают многие) решает *молекулярная таксономия* (molecular taxonomy). Построение систем ведется с учетом данных, полученных молекулярной филогенетикой. Возможна, однако, и иная интерпретация полученных молекулярной филогенетикой данных. Вместо таксонов предлагается различать клады разного уровня генетического родства у формирующих их видов растений (см. далее).

---

[2]Правильнее добавить – в США, в начале 1969-х годов.. На самом деле исследования по геносистематике были начаты во Франции и СССР в конце пятидесятых годов. Уже в 1960 г. А.С. Спирин и А.Н. Белозерский опубликовали первый обзор, в котором обсуждались связи между строением нуклеиновых кислот и положением организмов в системе.

[3]С. Датта считает, что все началось с широкого использования метода гибридизации ДНК. На самом деле это не совсем так. Ряд важных выводов был сделан на основании данных, полученных более простыми методами.

[4]Не совсем так. Авторами гипотезы молекулярных часов являются Э.Ц. Цукеркандль и Л. Полинг.

Как представляется автору, все эти термины не слишком удачны: и первый (DNA systematics), и второй (molecular systematics) недостаточно четко очерчивают предмет исследований геносистематиков. Ведь, помимо ДНК, может изучаться строение и РНК, и белков, не говоря уже о МГСУ, так как все три типа макромолекул и их комплексы (МГСУ) в той или иной мере отражают особенности организации генотипов организмов. Скорее всего, именно поэтому Д. Кроуфорд в одной из недавних своих статей употребляет уже термин «макромолекулярная систематика» [Crawford, 2000].

Второй из перечисленных выше терминов излишне широк: под ним могут укрываться исследования молекул клеток (эписемантид, см. далее), не несущих генетической информации. По той же причине не слишком удачен и термин "molecular phylogenetics": его также можно использовать в описаниях филогенеза, основанных на результатах изучения любого типа молекул, в том числе и эписемантид. Наконец, разве Карл Везе и его коллеги, применившие один из простейших методов сопоставления структур **рРНК** и открывшие в конечном счете новое царство живого – архебактерий [Woese, 1987], работали в области "**DNA** taxonomy"? А что можно сказать об исследованиях Д. Боултера и его коллег (см. далее), которые выдвинули смелую гипотезу о ранней дивергенции голо- и покрытосеменных растений, опираясь на результаты секвенирования белков ? Эти работы можно смело отнести к геносистематике, но никак не к 'DNA taxonomy"

По всей видимости, термин **«геносистематика»** (или, если угодно, **«макромолекулярная систематика»**) все же точнее всего соответствует задачам, которые решаются путем сравнительного изучения макромолекул-семантид и их комплексов (МГСУ). Использовать или не использовать его – дело вкуса, но все же целесообразно избегать ненужных англицизмов и всегда помнить о престиже отечественной науки.

О взаимосвязи гено- и феносистематики

Закономерно возникает вопрос: что же лучше изучать для целей филогенетики и систематики – генотипы или фенотипы организмов ? В результате каких исследований можно получить больше полезных для систематика сведений (~ информацию), особенно в тех случаях, когда количество морфологических признаков, потенциально полезных для систематики, невелико ?

Начнем с того, что термин «информация» понимается и используется различными авторами по-разному. Применимость этого термина для сопоставления количества информации, содержащейся в генотипах и фенотипах, рассматривалась неоднократно. На доступном уровне об этом писал Б. М. Медников [1971]. В его статье содержатся также ссылки на основополагающие работы в этой области. В отечественной литературе этот вопрос обсуждается также в книге «Кибернетика живого: биология и информация» [М.:Наука, 1984], а также в работах И. И. Шмальгаузена [1968], В. И. Корогодина [1991], И. А. Полетаева [1970] и в целом ряде других исследований.

Сразу отметим, что по этому вопросу высказывали прямо противоположные точки зрения. Так, А. Л. Тахтаджян считал [1984], что информация (≈ знания ?),

которую можно получить при изучении фенотипов, во много раз превосходит ту, которая содержится в генотипах организмов. По его мнению, изучение фенотипов позволяет составить более полное представление об организмах и их взаимоотношениях, чем изучение генотипов.

Но В. И. Корогодин пишет [1991], что в ходе онтогенеза накапливать информацию сверх той, которая содержится в генотипах, могут лишь организмы, обладающие памятью и мышлением. Как известно, растения ни памятью, ни мышлением не обладают, так что представления А. Л. Тахтаджяна видимо нуждаются в пересмотре.

По мнению М. В. Волькенштейна [1984], в споре о сравнительном количестве информации в генотипах и фенотипах не может быть победителей, так как «..вопрос о ее (информации, *А.А.*) эквивалентности энтропии остается открытым" Иными словами, не существует физических доказательств того, увеличивается, уменьшается или остается неизменным количество информации в ходе онтогенеза.

Отметим при этом одно важное обстоятельство: простые расчеты показывают: количество информации в ДНК, а тем более в МГСУ клетки, во много раз превышает количество информации во всех разновидностях «вторичных соединений» (эписемантид), являющихся предметом исследований хемосистематиков. Кроме того, далеко не вся информация, содержащаяся в ДНК, каждый раз реализуется для формирования МГСУ в ходе конкретного онтогенеза. Изучение строения как ДНК, так и МГСУ для целей систематики представляет поэтому особый интерес.

Что же изучает геносистематик ? Исследователю, знакомому с определением «геносистематика», сразу же приходит на ум, что между одним из современных разделов молекулярной биологии, **геномикой,** именно так называемой структурной и сравнительной геномикой [Свердлов, 1999], и геносистематикой есть много общего. Общее заключается в том, что геномика и в какой-то мере еще одна наука – **протеомика,** так и геносистематика занимаются определением качественного состава и особенностей организации первичных структур геномов и генопродуктов (РНК и белков) организмов. Если геномика делает это путем прямого определения полных первичных структур ДНК (геномов) организмов, а протеомика дополняет эти сведения путем сопоставления набора белков, синтезируемых организмом на некой стадии его онтогенеза, то геносистематика использует для этого как прямые, так и косвенные методы. Кроме ДНК, она изучает особенности строения и РНК, и белков у разных организмов, так как все эти три типа макромолекул и особенности организации МГСУ в той или иной степени позволяют нам судить о видоспецифичности генотипов.

Иными словами, геносистематика зародилась задолго до того, как были разработаны методы определения полных нуклеотидных последовательностей ДНК ядер и органелл (основные методы геномики) и ряд крупных открытий в биологии был сделан при помощи методов изучения ДНК, РНК и белков, существенно более простых, чем определение полной структуры геномов. Это были, в основном, так называемые **статистические методы** изучения строения семантид (см. раздел «Методы геносистематики»).

Геносистематику следует считать предтечей геномики. Вот тому примеры.

Так, в сравнительных исследованиях рибосомной РНК (рРНК) хлоропластов растений применяли метод гидролиза рРНК ферментом (рибонуклеазой Т1) и

определили количественное соотношение содержащихся в гидролизате рРНК олигонуклеотидов разной длины. Оказалось, что по величине этого соотношения (коэффициенту S_{AB}) рРНК хлоропластов высших растений подобна ДНК цианобактерий.

Таким образом, была экспериментально обоснована гипотеза симбиогенного происхождения хлоропластов растительной клетки. Много лет спустя этот вывод был подтвержден путем полного сиквенса хпДНК этих организмов.

Эту гипотезу выдвинули А. С. Фаминцын и К. С. Мережковский, а впоследствии ее активно пропагандировала Л. Маргулис, но доказательств ее правильности до недавнего времени не существовало, и многие ученые считали, что хлоропласты появились в клетках растений иным, эндогенным путем.

Рис. 1-1 наглядно демонстрирует сходство нуклеотидных последовательностей участка оперона рРНК хпДНК кукурузы и кишечной палочки, *E. coli*. Наличие в них гомологичных последовательностей свидетельствует о том, что в прошлом у хлоропластов и бактерий существовал общий предок.

Позднее было установлено, что это сходство выражено как в полных нуклеотидных последовательностях рРНК, так и в их вторичных структурах. Кроме того, показано, что по своим седиментационным характеристикам один из компонентов МГСУ (рибосомы хлоропластов) бактериального типа.

Рассмотрим еще один важный вопрос: как же соотносятся друг с другом разные способы изучения признаков растений, исследуемых методами биохимии и молекулярной биологии.

Может показаться, что изучая строение или содержание, с одной стороны, алкалоидов, терпенов, углеводов и жиров и других «вторичных» соединений, а с другой – белков, РНК или ДНК, мы просто изучаем разнообразные молекулярные признаки фенотипов, однако только узнав строение нуклеиновых кислот и белков, мы получаем информацию об организации их генотипов. Недаром Э. Цукеркандль и Л. Полинг [Zukerkandl, Pauling, 1965] предложили разделять все биохимические компоненты клеток на два класса: **семантиды** (молекулы, несущие в себе генетическую информацию) и **эписемантиды** (молекулы, лишь опо-

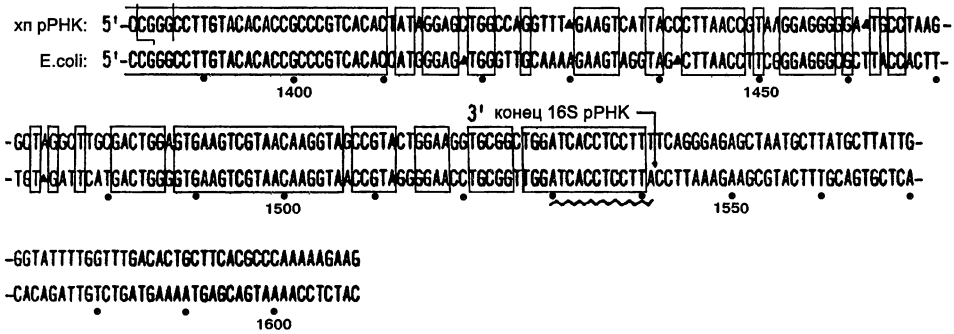


Рис. 1-1. Гомологичные последовательности нуклеотидов (выделены рамками) во фрагментах рРНК кишечной палочки и хлоропластов кукурузы

Цифры соответствуют номерам нуклеотидов в последовательности рРНК

средованно с нею связанные). Среди семантид различают первичные семантиды (ДНК), вторичные семантиды (РНК) и третичные семантиды (белки). Все три типа семантид и их комплексы (МГСУ) являются предметом исследований геносистематиков, однако подавляющую часть информации сегодня получают, исследуя строение первичных семантид.

Впрочем, изучение вторичных семантид также не лишены смысла. Исследователи обычно руководствуются при этом удобством работы с конкретным типом семантид и возможностью проверить выводы, полученные при изучении одного типа семантид с помощью результатов, полученных в сравнительных исследованиях другого типа. В этом плане особенно перспективными представляются исследования недавно открытых **малых** РНК, участвующих в регуляции активности генов, а также специфических наборов белков, характерных для определенных стадий онтогенеза растений.

Более правильным было бы считать, что исследованиями большинства классов эписемантид, компонентов фенотипов организмов, занимается **хемосистематика** (это часть феносистематики). Это направление систематики существует давно [Благовещенский, Александрова, 1974]. Для своих построений хемосистематика использует разнообразные сведения о наличии или отсутствии отдельных классов эписемантид в изучаемых таксонах (например, запасных белков), их структуре, количественных соотношениях и пр. Таким образом, количество признаков фенотипа, подлежащих анализу, существенно расширяется, что способствует созданию более верных представлений о эволюционных взаимосвязях таксонов (см. также: [Шнеер, 1988; Семихов и др., 2001, 2004]).

Однако часть ученых и сегодня продолжает относить к хемосистематике любые исследования биохимических признаков организмов. Конечно, это неправильно: как будет очевидно из дальнейшего изложения, ценность данных, полученных при изучении семантид в большей (ДНК) или меньщей мере (РНК и белки) и дающих нам представление об организации генотипов (= МГСУ) и эписемантид, несопоставима.

Семантиды – это высокомолекулярные полимеры с множеством характерных признаков структуры (молекулярный вес эписемантид, за исключением некоторых белков, полисахаридов и других полимерных соединений) обычно невелик, а строение их молекул с точки зрения химика-органика относительно простое). Сложное строение молекул семантид в полной мере раскрывается в монографиях и курсах лекций по молекулярной биологии. Здесь же мы отметим, что не случайно один из первых обзоров строения одного из типов семантид назывался «**Морфология** молекул рибосомной РНК». В другой работе речь шла **об анатомии** молекул 16S рибосомной РНК [Gutell et al., 1995]. Для описания особенностей сложной организации макромолекул клетки такие термины классической биологии, как «морфология» или «анатомия», были, конечно же, использованы не случайно. Напомним, как, например, выглядит молекула рРНК из малой субчастицы рибосомы кукурузы (рис. 1-2).

Если учесть, что каждая буква на этой схеме соответствует одной из четырех (А, Г, Ц или У) достаточно сложно устроенных органических молекул – нуклеотидов, то станет очевидно с какими архисложными молекулами работают геносистематики. Изучая «морфологию» таких молекул, исследователи сопоставляют взаиморасположение однонитевых и двуспиральных участков («шпилек») и

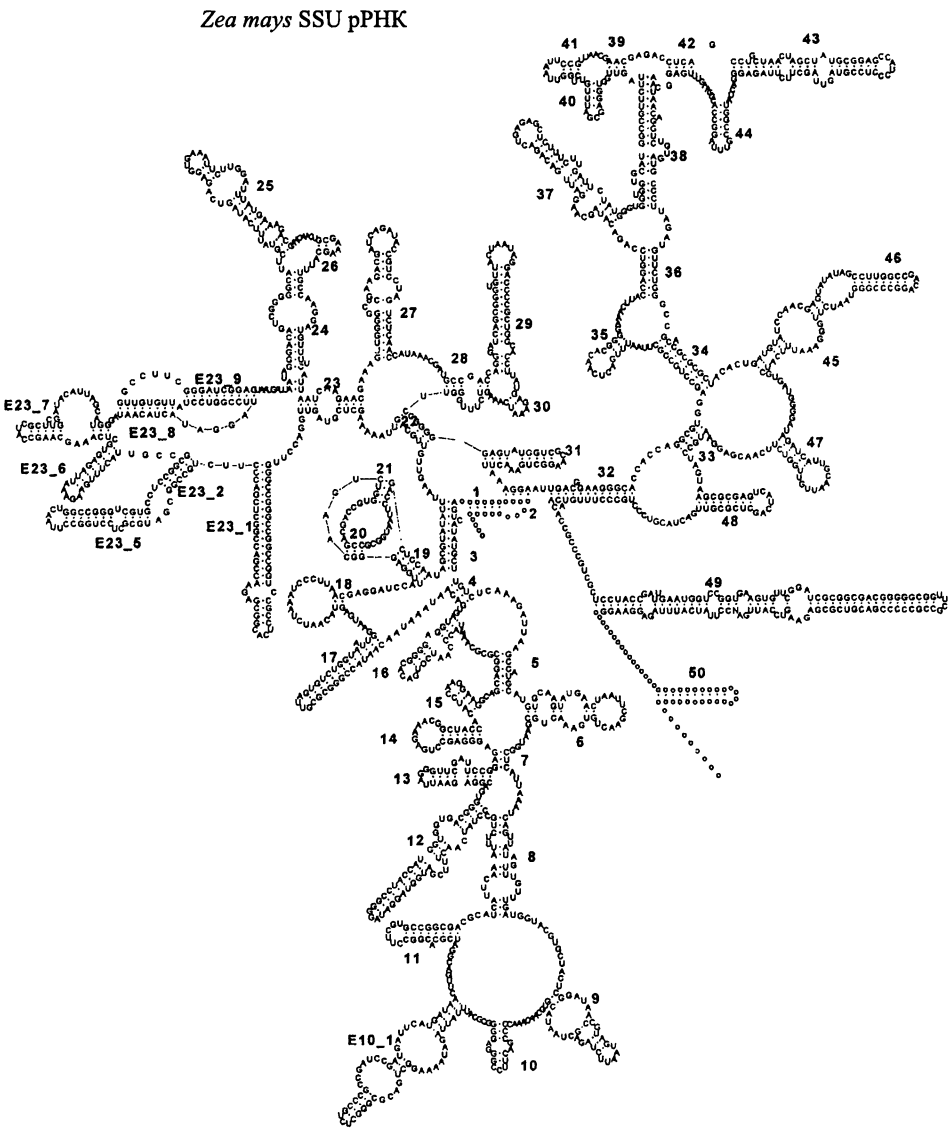


Рис. 1-2. Нуклеотидная последовательность и вторичная структура молекулы рРНК кукурузы. Эта гигантская молекула построена из сотен более простых молекул, нуклеотидов (обозначены буквами А, Г, Ц и У)

ищут сходства и различия в морфологии целых или частей молекул рРНК у организмов разной степени генетического родства.

На рис. 1-2 молекула распластана на плоскости, но на самом деле это трехмерная структура. Современные методы позволяют «увидеть» эту структуру и

«разглядеть» в ней положение каждого атома. Эту фразу не нужно понимать буквально: на самом деле исследователь изучает полученные с помощью компьютеров результаты реконструкции структуры на основании данных, полученных физико-химическими методами анализа.

В ходе эволюции в результате мутаций структура таких молекул непрерывно изменяется, так что у каждого вида организмов, будь то растение, животное или микроорганизм, «своя», только ему присущая рРНК со своими особенностями строения, т.е. с видоспецифичной первичной, вторичной и высшими структурами (ее «морфологией»). Справедливо это и для других типов семантид.

Из многочисленных наблюдений известно, что чем ближе друг к другу сравниваемые виды, т.е чем меньше времени прошло с момента их дивергенции, тем меньше различий успевает накопиться под влиянием мутаций в структуре их семантид. Важно, что темпы накопления таких изменений в разных филогенетических линиях могут быть неодинаковыми [Боброва и др., 1985].

В истории геносистематики методы сопоставления семантид все время совершенствовались. Так, о видоспецифичности строения белков первоначально судили по их иммунохимическим свойствам. Со временем иммунохимические методы совершенствовались и даже сегодня используются в исследованиях микро- и макроэволюции живых существ и, в частности, растений [Семихов и др., 2004; Crawford, 2000].

В середине прошлого века были разработаны общедоступные методы выделения индивидуальных белков и определения их аминокислотных последовательностей. Ф.Сэнгер первым сопоставил первичные структуры инсулинов у трех млекопитающих. К 1970 г. уже была известна полная первичная структура шести белков растений (не говоря уже о других организмах) [Boulter, 1983], после чего число таких белков стало быстро увеличиваться.

С этих работ началась новая эра в геносистематике– эра определения полных последовательностей мономеров у семантид, которая, в конечном счете, привела к появлению и быстрому развитию геномики.

Одной из целей всех этих исследований была проверка правильности представлений биологов об эволюции живых существ, основанных на результатах изучения их фенотипов. Как и в предыдущем случае, была подтверждена отмеченная выше закономерность: **чем ближе виды, тем более сходна у них первичная структура сопоставляемых белков.**

Эта закономерность легла в основу гипотезы **«молекулярных часов»** [Zukerkandl, Pauling, 1965]. Согласно этой гипотезе, в ходе эволюции семантиды (ДНК, РНК и белки) накапливали изменения в своей структуре с более или менее постоянной скоростью, что в принципе позволяет датировать время дивергенции таксонов. Ведь, если нам известно время возникновения таксона, например, из данных палеонтологии, то можно рассчитать среднюю скорость накопления замен (выразив ее, например, в числе замененных нуклеотидов за 1 млн лет, в пересчете на 1000 нуклеотидов) и оценить время дивергенции таксонов, для которых палеонтологическая летопись либо бедна, либо практически отсутствует.

С особенным энтузиазмом этот метод был воспринят микробиологами, протистологами, микологами, альгологами и зоологами, изучавшими ранние этапы эволюции. Дело в том, что палеонтологическая летопись для этих групп крайне

неполная.

Конечно, с позиций теории эволюции, созданной на основе изучения фенотипов, это с самого начала была слабая гипотеза: биологам давно известно, что эволюция фенотипов в различных линиях филогенеза может идти с существенно разной скоростью. При этом, например, при минимальных изменениях в фенотипах, макромолекулы вполне могли эволюционировать и накапливать изменения.

Известно множество видов растений и животных, фенотипы которых очень медленно изменялись в ходе эволюции. Среди растений – это некоторые папоротники, гинкго, среди животных – щитень, мечехвост и.т.п. Это особенно заметно, если сравнить эволюцию их фенотипов с эволюцией фенотипов видов из других современных таксонов, которые за относительно короткое время эволюции дали огромное многообразие форм. Отметим, что при этом их генотипы продолжали изменяться практически со средней скоростью, присущей соответствующему таксону. Недавно появилась работа [Soltis P. et al., 2002], подтверждающая давний вывод Г. Рахимовой с соавт. [1989], в которой прямо говорится о том, что в некоторых эволюционных линиях развития трахеофитов темпы молекулярной эволюции могли замедляться и что, возможно, существуют и «молекулярные живые ископаемые». К ним П. Солтис с соавт. относят древовидные папоротники и группу *Marratia* + *Angiopteris*, морфология которых мало изменилась за последние 165–200 млн лет. Конечно, флюктуации в скорости накопления изменений в ДНК возможны, но со столь выраженными геносистематики столкнулись едва ли не впервые. Выводы этой интересной работы требуют подтверждения в дополнительных исследованиях.

Несмотря на существование очевидных различий в темпах эволюции в разных ветвях эволюционного дерева [Nielsen, 1999], биологи тем не менее стали использовать (а некоторые и сегодня используют) гипотезу молекулярных часов, так как она позволяет хотя бы приблизительно оценить время дивергенции целого ряда таксонов, относительно которых у биологов были лишь смутные догадки.

Выводы такого рода, однако, нужно делать с осторожностью [Антонов, Троицкий, 1986]. Необходимо всегда помнить, что анализ эволюции какой-то одной последовательности ДНК (например, гена рРНК) или белка недостаточен для того, чтобы судить об основных закономерностях эволюции генотипа в целом и тем более соотносить его с результатами изучения фенотипов, так как каждый индивидуальный ген или генопродукт отражает свойства лишь малой части всех генов организма (тем более его генотипа). При анализе процессов эволюции индивидуальных последовательностей семантид и переносе полученных данных на эволюцию генотипов всегда следует помнить об ограничениях, присущих редукционизму.

Последние исследования показали, что ДНК высших растений включает десятки тысяч генов. Так, в состав отдельных хромосом арабидопсиса входит от 3825 до 6543 генов, не говоря о некодирующих последовательностях, а весь геном содержит 25 498 генов. Таким образом, для того, чтобы выносить более или менее достоверные суждения об эволюции генотипов, необходимо изучить репрезентативную выборку генов или иных последовательностей ДНК (в геномах растений много некодирующей ДНК) из всего их разнообразия, слагающего генотип растения. В противном случае мы можем оказаться в положении исследова-

теля, который захотел бы составить представление о расовой принадлежности населения Москвы, остановив на улице первого прохожего. Велика вероятность того, что это будет не славянин, а негр или китаец и, стало быть, вывод будет неверным. Точно так же разнообразны и гены, слагающие генотипы растений, и каждый из них эволюционирует в значительной степени независимо от других генов. Говорить о выраженной «концертной» эволюции всех генов было бы неверно [Goremykin et al., 2004].

Вот, например, из каких генов слагается ядерный геном арабидопсиса (табл.1-1). Видно, что значительная часть генов кодирует белки, осуществляющие метаболизм веществ в клетке. Другая существенная часть генов ответственна за протекание процессов транскрипции, т.е. передачи генетической информации от мест ее хранения (ДНК) ко вторичным семантидам, молекулам РНК. Часть генов отвечает за обеспечение процессов роста, деления клеток, синтез ДНК и.т.п. Функции чуть ли не половины всех генов арабидопсиса нам сегодня не известны: о их существовании судят по «молекулярным признакам» генов, т.е. по наличию в нуклеотидных последовательностях ДНК специфических для всех генов комбинаций нуклеотидов.

Признавая важность иссследований генотипов растений, Б. Тернер писал не-

Таблица 1-1

Доля белков, различающихся по роли или функции и закодированных в хромосоме 2 *Arabidopsis thaliana* [по Lin et al., 1999]. Соотношение генов, кодирующих белки, различающиеся по роли или функции, в хромосоме 4 арабидопсиса отличается незначительно [Mayer et al., 1999]

Роль (или функции)	Доля от всех белков, в %
Регуляция активности генов	7,8
Передача сигналов	4,0
Структура клеток, организация и биогенез	3,6
Транспорт и связывающие белки	3,6
Преобразование белков	3,0
Энергетика	2,7
Рост и развитие	2,6
Обмен вторичных соединений	2,5
Клеточные процессы	2,4
Взаимодействие с патогенами	2,0
Синтез белка	1,9
Обмен жирных кислот и фосфолипидов	1,5
Транскрипция	1,4
Ответ на влияние среды	1,0
Обмен ДНК	0,7
Центральный промежуточный метаболизм	0,7
Биосинтез аминокислот	0,6
Обмен оснований, нуклеозидов и нуклеотидов	0,6
Биосинтез кофакторов, простетических групп и переносчиков	0,4
Другие категории	6,9
Неклассифицированные белки	1,4
Белки с неизвестной функцией	21,4
Предполагаемые белки	27,1

давно [Turner, 1998], что он мечтает о времени, когда в Кодексе ботанической номенклатуры будет специальный раздел, содержащий сведения об эволюции первичных структур генов десятка белков, играющих ключевую роль в метаболизме растительной клетки. Эти сведения, наравне с традиционнными, можно было бы использовать в систематике растений.

Сравнительные исследования семантид не только дают нам представление об особенностях организации генотипов в целом или отдельных их частей (генов и других участков ДНК с иными функциями), но и служат основой для развития теории молекулярной эволюции, краеугольном камне геносистематики.

Появление в начале 1960-х гг. этой теории (один из последних вариантов [Kimura, 1968]; русская версия: Кимура, 1985) стало возможно лишь после того, как исследователи получили первые сравнительные данные о строении семантид. Было выяснено, что процессы эволюции организмов и макромолекул имеют ряд принципиальных различий. В частности, Кимура подчеркивает роль нейтральных, не имеющих выражения в фенотипах, изменений в эволюции семантид. Этот тезис особенно важен для правильного понимания результатов исследований геносистематиков. Похоже, что А.Л. Тахтаджян [Takhtajan, 1997] относит именно такие изменения к «молекулярному шуму» (см. далее).

Так, например, нейтральные изменения возникают в результате синонимических мутаций в третьем положении кодонов генов белков, которые обычно не вызывают изменений в первичной структуре (=аминокислотной последовательности) белков вследствие вырожденности генетического кода. Иными словами, изменения в ДНК не всегда сопровождаются изменениями в фенотипах, но именно изменения в фенотипах попадают под действие естественного отбора. Между тем, некоторые ботаники используют результаты определения именно этого «молекулярного шума» для создания гипотез о филогении организмов (обычно на уровне низших таксонов) и рекомендаций по изменению систем. Порочность такого подхода очевидна, и неудивительно, что нередко молекулярные и морфологические данные существенно расходятся (см., например, [Kirschner et al., 2003]).

Подробно особенности молекулярной эволюции рассматриваются в работах, список которых приведен в конце раздела. Знакомство с этими источниками крайне желательно для каждого, кто хочет разобраться в проблемах и методах геносистематики

Подведем итоги. Со всей очевидностью следует, что геносистематика – это один из двух основных разделов биологической систематики в широком смысле этого термина. Она призвана изучать разнообразие генотипов живых существ, анализируя для этого строение семантид и их комплексов (МГСУ) и на этой основе предлагать гипотезы о путях изменений генотипов в филогенезе, выявлять на этой основе возможную степень филогенетической близости генотаксонов и использовать эти сведения (если это целесообразно) для построения гипотетических систем генотипов организмов. Как уже говорилось, возможны и другие способы интерпретации полученных результатов.

Кроме того, методы геносистематики с успехом могут быть использованы для изучения проблем микроэволюции, популяционной структуры видов [Milton, 1994], проблем географии растений [Newton et al., 1999], формирования локальных флор [Xiang et al., 1998 b], решения прикладных задач и многих других про-

блем.

Главный вопрос, который стоит сегодня перед геносистематикой, заключается в том, насколько топологически подобны филогенетические деревья и системы организмов, построенные на основании изучения их фенотипов и генотипов. Если они полностью совпадают (топологически подобны, конгруэнтны), то это означает, что результаты исследований генотипов можно и нужно особенно смело использовать для решения ряда важнейших проблем классической ботаники, например, связанных с изучением эволюционной истории таксонов. Если же между ними существуют более или менее выраженные отличия, то нам остается либо признать, что гипотезы ботаников классической школы, касающиеся эволюционной истории растений, по крайней мере в части своей не находят подтверждения, либо что биоразнообразие растений может быть описано с разных позиций.

В пределах самой геносистематики необходимо выяснить, насколько правомерно использовать результаты исследования эволюции геномов органелл для понимания эволюционных взаимоотношений в мире растений. Строго говоря, эволюция геномов пластид вовсе не обязательно должна быть полностью конгруэнтной эволюции ядерных геномов и МГСУ организмов (см.,например, [Hardig et al., 2000]). Не случайно одна из последних работ в этой области [Nishiyama et al., 2004] озаглавлена «Филогения хлоропластов **может говорить** (выделено *А. А.*) о том, что бриофиты монофилетичны». Такую осторожность в трактовке экспериментальных данных можно только приветствовать.

Рекомендуемая литература

Антонов А. С. Основы геносистематики высших растений. М.: Наука – Интерпериодика. 2000. 134 с.

Антонов А. С. Геносистематика: достижения, проблемы и перспективы // Успехи соврем. биологии. 1974. Т. 77. С. 31–47.

Ратнер В. А., Жарких А. А., Колчанов Н. А. и др. Проблемы теории молекулярной эволюции. Наука, СО, 1985.

Гречко В.В. Молекулярные маркеры ДНК в изучении филогении и систематики. // Генетика. 2002, Т. 38, С. 1013–1033.

Judd W.S., Campbell C.S., Kellog E.A., Stevens P.F. Plant systematics: A phylogenetic approach. Sunderland (Mass.): Sinauer, 1999; второе издание – 2002).

Ratner V. A., Zharkikh A. A. et al. Molecular evolution // Biomathematics. Heidelberg: Springer, 1996. Vol. 24. P. 241–270.

Woese C. R. Bacterial evolution // Microbiol. Rev. 1987. Vol. 51. P. 221–271

Zuckerkandl E., Pauling L. Evolutionary divergence and convergence in proteins // Evolving genes and proteins. Ed. V. Bryson, H.J. Vogel.N.Y.: Acad. Press, 1965.

Kimura M. The neutral theory of molecular evolution. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1983

Page R., Holmes E. Molecular evolution: A phylogenetic approach. // Oxford: Blackwell Science Ltd. , 1998.

Li W. H. Molecular evolution. Sunderland (Mass.): Sinauer. 1997. 487 p.

КОРНИ ГЕНОСИСТЕМАТИКИ. ГЕНОСИСТЕМАТИКА И ФЕНОСИСТЕМАТИКА

Истоки науки

Как и любая другая наука, геносистематика имеет свою историю. Основные идеи ее созревали постепенно. Трудами многих ученых формировался и продолжает совершенствоваться ее методический арсенал. Исходные результаты для своих гипотез геносистематики получают с помощью методов молекулярной биологии (например, определяя последовательность нуклеотидов во фрагментах ДНК), но на следующем этапе исследований используются уже методы геносистематики (например, различные методы построения филогенетических деревьев и трактовки полученных результатов).

Как же сформировалась геносистематика ?

Мысль об использовании сведений об особенностях организации генотипов для развития теории эволюции и систематики приходила в голову многим ученым, преимущественно тем из них, которые работали в наиболее близких областях биологии, таких, как генетика или сравнительная биохимия, или же занимались разработкой общих вопросов систематики и теории эволюции.

Первоначально для решения этих проблем усилия ученых сконцентрированы исключительно на исследованиях фенотипов. При этом были получены впечатляющие результаты: биологи не только предложили первые научно обоснованные гипотезы, описывающие основные закономерности эволюции живого, но и сумели предложить теорию, объясняющую механизмы возникновения биоразнообразия. Это – теория естественного отбора Дарвина, целиком основанная на результатах исследования фенотипов организмов. Она и сегодня остается одной из главенствующих в биологии, а дарвинизм служит основой эволюционной систематики. В пользу ее говорят и новейшие молекулярные данные [Akashi, Kreitman, 1995].

Практически одновременно с дарвинизмом А. Вейсман выдвинул не менее значимую гипотезу: он предложил различать в каждом организме смертную сому (тело) и бессмертную зародышевую плазму (вещество наследственности). Сегодня эта гипотеза лежит в самой основе геносистематики, которая занимается изучением эволюции «зародышевых плазм».

Тогда же Г. Мендель сформулировал представления о дискретных наследственных факторах (генах), но оно было принято и осознано наукой существенно позже, уже в начале XX в.

В конце XIX в. Ф. Мишер выделил из животных клеток вещество, которое он назвал «нуклеином».

В начале того же века биохимикам удалось доказать, что белки – это высокомолекулярные соединения и строение индивидуальных белков уникально для любого живого организма.

В то же время генетиком Иогансеном были предложены термины «генотип» и « фенотип» и началось бурное развитие генетики.

Однако вплоть до середины XX в. связь между нуклеиновыми кислотами и процессами наследственности и изменчивости достоверно прослежена еще не была. Выявить ее пытались многие, но исследования эти велись параллельно и независимо друг от друга.

Так, в 1934 г. А.Н. Белозерский и А.Р. Кизель впервые выделили химическое соединение тимин, специфичный компонент ДНК, из тканей растения (зародышей гороха) [Belozersky, Kiesel, 1934; русский перевод: Белозерский, 1976], а в 1936 г. и саму ДНК из зародышей конского каштана [Белозерский, Дубровская, 1936, см. там же].

Интерес А. Н. Белозерского к нуклеиновым кислотам не случаен: он был «научным правнуком» Ф. Мишера, который работал в лаборатории известного немецкого биохимика Э. Гоппе–Зейлера. В его же лаборатории трудился позже Г. Коссель, у которого в начале XX в. проходил стажировку учитель А. Н. Белозерского, А. Р. Кизель. Впоследствии он вернулся в Россию, и в результате его трудов в МГУ сложилась первая в нашей стране научная школа по изучению нуклеиновых кислот. Она благополучно работает и сегодня.

Однако эти исследователи в то время даже не подозревали, что спустя полвека ДНК окажется в центре внимания систематиков растений.

Лишь отдельные ученые, начиная с конца XIX в., высказывали предположение, что нуклеиновые кислоты, возможно, играют какую-то роль в процессах наследственности и изменчивости организмов. Гипотезы эти основывались на экспериментах, в которых определяли локализацию ДНК в клетках. Оказалось, что ДНК входит в состав хромосом, а хромосомы в то время уже связывали с передачей наследственных признаков.

Но первую роль отводили не ДНК, доминировала точка зрения, согласно которой ключевую роль в передаче наследственных признаков организмов играют белки. Эта гипотеза базировалась на классических работах лаборатории Э. Фишера, который занимался структурой белков и на последних достижениях генетики. В 1920-х г. Г. Меллер, Т. Морган, К. Бриджес и А. Стертевант и некоторые другие крупные генетики считали, что взаимоотношения между видами могут быть поняты путем определения степени сходства генетического материала (тогда – на уровне генов). Эта гипотеза впоследствии оказалась совершенно верной. Однако в то время предполагалось, что гены имеют белковую природу.

Оставалось выяснить, каков же механизм передачи наследуемых признаков ?

В 1927 г. Н. К. Кольцов предложил гипотезу матричного синтеза, при помощи которого генетическая информация могла бы высокоточно передаваться от белка к белку, а с их помощью от родителей – потомкам. Механизм этого синтеза был основан на принципе комплементарности (матрица – оттиск) вновь синтезируемых и предсуществовавших молекул белка. Именно тогда Н.К. Кольцовым был сформулирован тезис *"Omnis molecula ex molecula"* (Каждая молекула – от

А.Н. Белозерский

Э. Чаргафф

молекулы). Ученые стали догадываться как передаются наследственные признаки от родителей потомкам.

Следует отметить, что генетики оставили без внимания опубликованную в 1928 г. работу бактериолога Ф. Гриффитса, которая сегодня считается исключительно важной для выяснении генетической роли ДНК. О работе Ф. Гриффитса по трансформации, как и о последующих работах М. Даусона и Р. Сиа (1931 г.) и Дж. Эллоуэя (1931 г.), осуществивших этот процесс *in vitro,* подробно рассказано в монографии Р. Олби [Olby, 1974].

Одновременно ценные знания были получены и в опытах по экспериментальному индуцированному мутагенезу, впервые проведенных Н.К. Кольцовым. Результаты указывали на то, что мутагены, по всей видимости, взаимодействуют именно с ДНК [Olby, 1974]. Существенно позже эта идея была развита и сформулирована в виде представления о консервативной редупликации ДНК, когда от родителей потомкам передается весь генетический текст, но с изменениями, внесенными мутациями [Тимофеев–Ресовский и др., 1968].

В 1935 г. Н. К. Кольцов назвал хромосомы, которые, как известно, содержат и белки, и ДНК, **наследственными молекулами**. Это был очень важный вывод. Дело в том, что строение хромосомы в целом в немалой степени связано с направленностью эпигенетических процессов [Ченцов, 2004].

В 1935 г. Н.В. Тимофеев–Ресовский, К.Г. Циммер и М. Дельбрюк опубликовали знаменитую «Зеленая тетрадь», в которой подтверждалось, что ген – это макромолекула [Тимофеев–Ресовский и др., 1996]. Но какова химическая природа гена ? Ответа на этот вопрос все еще не было.

Проблемы биологии привлекли внимание физиков. В середине 1940-х гг. вышла в свет книга физика Э. Шредингера «Что такое жизнь? С точки зрения физика», в ней были перечислены все основные задачи, которые, как оказалось, предстояло решать будущей молекулярной биологии (и, соответственно, геносистематике).

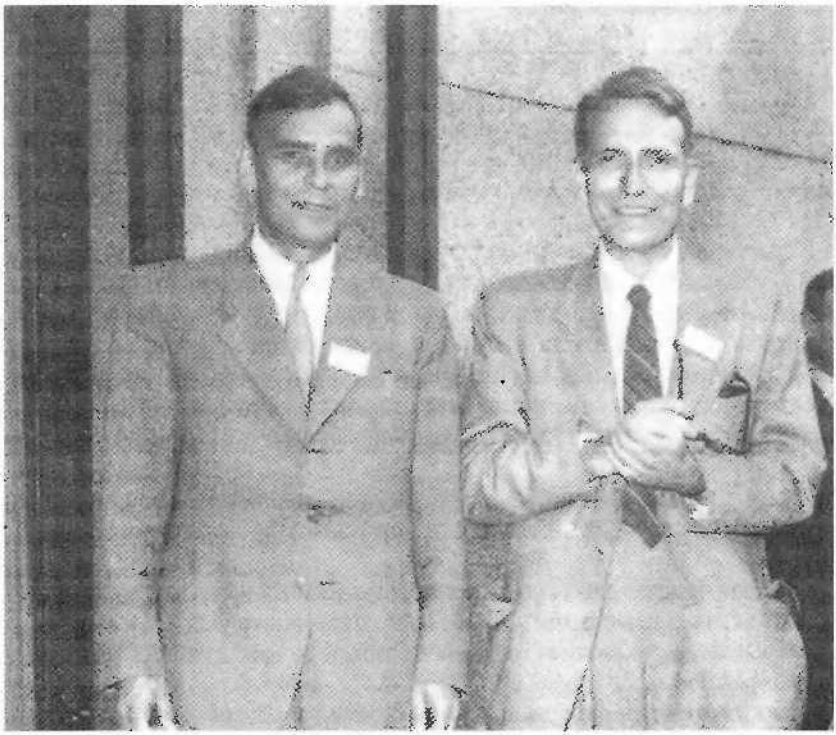
Вот что писал Э. Шредингер: «Хромосомы...содержат в виде своего рода шифровального кода весь «план» будущего индивидуума и его функционирования в зрелом состоянии. Каждый полный набор хромосом содержит весь шифр...

Но термин «шифровальный код» , конечно, слишком узок. Хромосомные структуры служат в то же время и инструментом, осуществляющим развитие, которое они же предопределяют... Они являются одновременно и архитектором, и строителем...

Как же такая крошечная частичка вещества – ядро оплодотворенного яйца – может вместить сложный шифровальный код, включающий в себя все будущее развитие организма ? **Хорошо упорядоченная ассоциация атомов, наделенная достаточной устойчивостью для длительного хранения своей упорядоченности, представляется единственно мыслимой материальной структурой, в которой разнообразие возможных («изомерных») комбинаций достаточно велико, чтобы заключать в себе сложную систему детерминации в пределах минимального пространства.»** [Шредингер, 1972] (выделено *А.А.*).

Были предприняты энергичные попытки материализовать идеи Э. Шредингера.

Признание роли ДНК в передаче наследственных признаков произошло в 1944 г. практически одновременно с появлением книги Шредингера и широко известных работ О. Эвери, К. Мак–Леода и М. Мак-Карти по трансформации пневмококков, но о строении молекул ДНК в то время достоверно известно было еще очень мало.



А.Н. Белозерский и Э. Чаргафф (справа) на биохимическом конгрессе в Вене (1958 г.)

Лишь в конце 1940-х гг. трудами в первую очередь Э. Чаргаффа и его сотрудников было доказано, что строение ДНК «видоспецифично» [Chargaff, 1951]. В современных терминах это означает , что особенности организации (первичной структуры) ДНК любого организма индивидуальны и отличаются от строения ДНК другого организма как внутри вида, так и различных видов.

Немногие ученые смогли тогда правильно оценить эпохальную значимость для биологии открытия Э. Чаргаффа и его коллег, среди них был А.Н. Белозерский. Им была разработана программа сравнительных исследований видоспецифичности ДНК.

Признание генетической роли нуклеиновых кислот, т.е. прямое соотношение явлений наследственности со структурой химического соединения, в России требовало известного мужества: вспомним, что печально знаменитая сессия ВАСХНИЛ прошла всего за несколько лет до этих событий.

К счастью, мировоззрения Лысенко и его коллег не повлияли на развитие науки в западных странах, и в 1953 г. появились знаменитые работы Дж. Уотсона и Ф. Крика. Помимо описания модели структуры молекул ДНК, авторы предлагали гипотезу о молекулярном механизме передачи признаков ДНК от родителей к потомкам по принципу комплементарности. Была использована идея комплементарности, основанная на работах Н. К. Кольцова и Э. Чаргаффа. К сожалению, уместных ссылок на основополагающие работы Н.К. Кольцова в списке литературы в этих статьях не было.

От сравнительной биохимии нуклеиновых кислот – к геносистематике

Исследования биохимиков и молекулярных биологов в конечном счете привели к тому, что понятие «генотип» стало наполняться материальным содержанием. Если раньше под генотипом понимали некую абстрактную «генетическую программу развития организма», оставляя в стороне вопрос о том, где эта программа содержится, как она зашифрована и реализуется, то теперь биологам стало ясно, что носителем этой генетической информации является ДНК. Информации (в том числе и генетической) без ее материальных носителей просто не бывает [Корогодин, 1991].

С середины 50-х годов начались развернутые сравнительные исследования ДНК. Результаты исследований стали основой, из которой родилась геносистематика.

Молекулярная биология в своем арсенале в то время имела лишь ограниченное число методов исследования ДНК. По этой причине ученые могли изучать лишь некоторые макромолекулярные свойства этого важнейшего биополимера и его химический состав.

Было высказано предположение, что данные о строении семантид (молекул, участвующих в процессах хранения и передачи генетической информации: [Zukerkandl, Pauling, 1965]) могут быть использованы систематиками для различения видов в самых разных группах организмов, в том числе и высших расте-

ний. На примере белков об этом писал Анфинсен [Anfinsen, 1959], а об использовании данных о строении ДНК и РНК первыми написали Белозерский и Спирин [1960]. Насколько мне известно, это была первая обзорная работа, в которой подводились итоги опытов по изучению видоспецифичности ДНК.

Таким образом, сравнительной биохимией был предложен подход к решению первой из многочисленных проблем будущей геносистематики – проблеме выявления индивидуальных разновидностей генотипов. О решении последующих задач (определения генотаксонов, их филогенетических связей, и.т.п.) речь пока не шла.

К началу 1970-х годов были накоплены данные и сделаны первые обобщения, позволившие говорить о возникновении нового направления в систематике. Уже в 1972 г. издательством МГУ был выпущен сборник "Строение ДНК и положение организмов в системе", в котором обсуждались первые результаты сравнительного изучения ДНК самых разных организмов, от вирусов до позвоночных животных и высших растений.

На множестве примеров авторами этой книги доказывалась важная роль таких исследований для развития систематики. Это была первая в мировой практике попытка широкого обобщения данных, накопленных при сравнительном изучении ДНК самых разных организмов.

Новое направление быстро развивалось, и многим ученым стало ясно, что речь идет о новой тенденции в развитии биологических исследований. Данные о тонком строении семантид накапливались лавинообразно, в том числе и о строении ДНК. Был сделан ряд важных обобщений. В конечном счете в отечественной литературе для нового направления исследований укоренилось название **"геносистематика"** [Антонов, 1974].

Этот термин является производным от двух терминов, "генотип" и "систематика" (а не от термина «ген», что сужало бы сферу применения геносистематики), и представляется более удачным, чем используемые в зарубежной литературе термины (об этом шла речь ранее).

Сегодня многие биологи склонны думать, что систематика в широком понимании этого термина состоит всего из двух крупных разделов, гено- и феносистематики, качественно отличающихся друг от друга из-за различий в объектах исследования (генотипы и фенотипы организмов). Это различие обусловлено тем, что в первом случае речь идет об изучении носителей генетической информации, а во втором – о результатах их реализации.

О значимости геносистематики

Ряд крупных генетиков и систематиков-эволюционистов, не говоря уже о первых пропонентах нового направления в систематике, уже в 1960-х годах поняли перспективность исследований ДНК. Место белков в их рассуждениях прочно заняла ДНК. Из ученых, сыгравших важную роль в становлении геносистематики, в первую очередь следует упомянуть Дж. Симпсона, И. И. Шмальгаузена, Э. Майра, А. Н. Белозерского и Ф. Добржанского.

В книге, выпущенной в США в 1962 г. (всего 5 лет спустя после того, как были опубликованы самые первые работы по геносистематике бактерий, и через 9

лет после основополагающих публикаций Чаргаффа, Уотсона и Крика), известный американский эволюционист Дж. Симпсон так прокомментировал высказанные в ту пору идеи о том, что решающим, «пробным камнем» для систематики будет полный код ДНК: «Действительно, я не могу представить себе ничего более желаемого в качестве дополнения к нашим критериям классификации, но я глубоко сомневаюсь, что даже этот желанный критерий сам по себе будет достаточным. Я подозреваю, что **особенно в случае высших таксонов интерпретировать сходства и различия в ДНК будет так же сложно, как и в их анатомическом строении** (выделено мною, *А. А.*). Необходимо одновременно использовать оба метода и все прочие данные, чтобы получить разумные результаты.»

Из цитаты видно, что Дж. Симпсон рассматривал молекулярные признаки ДНК наряду с другими, давно используемыми признаками организмов, и считал возможным объединять полученные данные для воссоздания картины эволюции. Сегодня такая точка зрения единодушным одобрением уже не пользуется (см., например, [Антонов, 2000б; Grant, 2003]).

Кроме того, впоследствии оказалось, что гомологии в ДНК несложно обнаружить у всех живых существ, и они вполне поддаются интерпретации. Это существенно обогащало систематику.

По сути дела, вся классическая эволюционная систематика с момента своего зарождения строилась на поисках гомологий, которые вначале обнаруживали путем сопоставления внешних признаков организмов, доступных невооруженному глазу, затем с помощью светового микроскопа, затем путем применения гистологического или сравнительно-эмбриологического методов,а в последнее время – электронного микроскопа. Важную роль сыграли исследования палеонтологов.

В конечном счете сформировалась классическая «триада методов» систематики. Казалось, что с появлением методов исследования ДНК триада стала постепенно преобразовываться в тетраду методов.

На самом деле все оказалось сложнее, так как и сам обьект исследований, генотип или фенотип, определяет конечные выводы и влияет на них.

Вот что писал И. И. Шмальгаузен: "В пределе фенотипическое разнообразие форм определяется генотипическим разнообразием, причем количество фенотипической информации равно количеству наследственной информации... **Вся система признаков фенотипа представляет собой конечный результат преобразования наследственной информации в процессе индивидуального развития"** [Шмальгаузен, 1968. С. 146].

Это – очень важное заключение. Из него следовало, что изучение генотипов для целей филогенетики и систематики не менее важно, чем изучение фенотипов, а поэтому имеет прямой смысл.

В результате систематики быстро поняли, что появился совсем новый способ изучения живых организмов, дающий возможность получать сведения, отличающиеся от всего того, что ранее было в их распоряжении.

Э. Майр писал: «Организмы обладают уникальным свойством, которое отличает их от неживых объектов: у них есть генотип и фенотип...Когда мы классифицируем организмы, классификация по фенотипу – это только первый шаг. В качестве второго шага мы пытаемся сделать заключение о генотипе – созданной в процессе эволюции генетической программе, которая имеет гораздо большую

познавательную и прогностическую ценность, чем фенотип. **Фенотипы могут обладать разного рода сходствами, не относящимися к делу, и только анализ логически оцененного генотипа позволяет нам установить, какие сходные черты фенотипа обусловлены конвергенцией, а какие являются выражением генотипов предков** [Майр, 1971, с. 97 (выделено *А. А.*)].

Иными словами, Э. Майр отдает предпочтение результатам, которые могут быть получены при сравнительном изучении генотипов организмов.

Прошел, однако, не один десяток лет, прежде чем в литературе стали появляться статьи, авторы которых призывали к созданию банков препаратов ДНК для целей систематики и филогенетики (см., например, [Ryder et al., 2000])

Среди систематиков растений, особенно в России, первоначально геносистематика встретила весьма холодный прием.

В 1973 г. А. Л. Тахтаджян писал, что "...сам по себе химический подход не может привнести сколько-нибудь существенные изменения в ныне существующую общую классификацию Magnoliophyta, либо любой другой крупной ветви высших растений" [Takhtajan, 1973. P. 17].

Таким образом, взгляды крупнейших систематиков, зоологов и ботаников в конце прошлого века иногда противоречили друг другу.

К счастью, в настоящее время отношение ботаников к геносистематике изменилось. Так, в обзоре Р. Бейтмена, П. Крейна и др. со всей определенностью говорится, что благодаря использованию идей кладизма и результатов секвенирования ДНК произошли "...революционные пересмотры филогенеза наземных растений и, в результате, их систем...[Bateman et al., 1998]. Та же мысль проводится как в более позднем обзоре Кроуфорда [Crawford, 2000], так и во многих других работах..

И все же сегодня, даже в начале XXI века, многие систематики-ботаники продолжают считать геносистематику всего лишь новомодным направлением в науке, от которого вряд ли стоит ждать каких-либо крупных открытий. Более того, некоторые из них склонны напрочь отрицать вполне достоверные данные геносистематики, противоречащие устоявшимся взглядам. В традициях отечественной школы ботаников, к сожалению, исключительно сильна тенденция безоговорочно следовать высказываниям учителей и лидеров «классической» ботаники, а не трезво оценивать и активно использовать ее последние достижения. Об этой тревожной ситуации писали многие.

В 1989 г. палеоботаник В. А. Красилов начинал свою монографию «Происхождение и ранняя эволюция цветковых растений» такими словами: «Современная ботаника являет собой печальный пример науки, находящейся уже почти двести лет во власти одной парадигмы, возникшей как поэтическое озарение и в результате бесконечных повторений превратившейся в окостеневшую догму. Речь идет о классической морфологии и ее детище – классической систематике. Последняя беспрепятственно шагнула из эпохи типологических представлений в эволюционную, сменив лишь вывеску: теперь она называется филогенетической, хотя почти не содержит реальной исторической информации. Попытки изменить положение вещей предпринимались неоднократно, но пока не имели успеха. Критика просто не попадает на страницы сводок и учебных пособий, авторы которых , как правило, не утруждают себя изучением каких-либо источников, кроме «признанных» (большей частью это предшествующие учебные пособия). **В результате молодое по-**

коление оказывается неподготовленным к восприятию новых идей (или, лучше сказать, подготовленными к их неприятию) (выделено *А. А.*). Понятно, что такое резкое высказывание В. А. Красилова относится в основном к «классической» ботанике, а не к геносистематике, но и сегодня остается лишь с грустью констатировать, что «воз и ныне там». Знакомство с последними отечественными учебниками по ботанике показывает, что выпускники большинства отечественных вузов остаются в полном неведении относительно содержания новых направлений в ботанике. Один из профессоров-«классиков» весьма престижного вуза в присутствии автора заявил в ответ на вопрос «А как же Вы учите студентов?» следующее: «Как нас учили, так и мы учим». Увы, от традиций до застоя – один шаг.

Однако от внимания ботаников ускользнуло, что в том же 1973 г. А.Л. Тахтаджян в другой своей работе писал следующее: "... **наиболее интересное и, бесспорно, самое важное направление систематики – сравнительное изучение состава и структуры самого генетического материала. В этом отношении исключительно перспективно определение нуклеотидного состава (нуклеотидной последовательности) ДНК и особенно изучение степени гомологичности первичных структур нуклеиновых кислот методом "гибридизации" диссоциированных комплементарных нитей** [Тахтаджян, 1973]. Что же касается сегодняшних взглядов А.Л. Тахтаджяна, то они представлены эпиграфом к этой книге.

Перспективность нового направления была более понятна генетикам, с середины 1920-х годов пытавшимся применить результаты исследования генотипов (на надмолекулярном, хромосомном уровне) для решения проблем систематики. Возможно именно по этой причине генетик Ф. Добржанский занимал иную, чем некоторые ботаники, позицию: **"Со временем, можно предположить..." писал он "....нам станет известна последовательность генетических «букв», нуклеотидов во всех генах всех организмов. Это создаст предпосылки для количественной оценки сходств и различий между организмами и для создания классификации всех живых существ основанной на точных данных об их генетических компонентах"** [Dobzansky, 1970. P. 414].

Сегодня мы уже можем оценить затраты труда на такую работу. Так, всего несколько лет тому назад в журнале "Nature" была опубликована одна из первых полных нуклеотидных последовательностей генома бактерий – хромосомы *Bacillus subtilis* [Kunst et al., 1997]. В этой работе принимали участие более 150 генетиков, биохимиков и геносистематиков, и она заняла несколько лет. Теперь такие исследования бактериальных геномов занимают намного меньше времени, так как методический арсенал геносистематики за последние годы существенно обогатился. На сегодня полностью расшифровано строение геномов сотен видов архе- и эубактерий.

От исследований прокариот геносистематики быстро переключили свое внимание на изучение геномов эукариот, и, в частности, растений. К настоящему времени определены полная первичная структура ядерной ДНК высшего растения – арабидопсиса [Meyerowitz, 1999], риса [Yu et al., 2002; Goff et al., 2002] и ряда других высших растений, а также некоторых водорослей; установлены полные первичные структуры ДНК хлоропластов десятков видов наземных растений и водорослей. К 2006 г. их число, согласно принятой в США программе исследований, рассчитывают увеличить до 50–100. Немецкие и японские исследователи также движутся в этом направлении и вполне с ними конку-

рируют: первичная структура хпДНК некоторых ключевых видов растений была определена в работах [Goremykin et al., 2003а,б, 2004; 2005; Nishiyama et al., 2004].

Как уже говорилось ранее, новое направление геносистематики, нацеленное на изучение полных первичных структур ДНК ядер или органелл эукариот, а также генетического материала (хромосом) прокариот получило название "*геномика*". Предполагали [O'Brien et al., 1997], что лет через 5–7, т.е. к 2002–2003 г., будут известны полные первичные структуры ядерных ДНК у представителей всех отрядов млекопитающих и построено соответствующее филогенетическое дерево. Работа в этом направлении ведется, но конечный результат достигнут пока не был [Банникова, 2004].

Геномика высших растений развивается еще медленнее: трудно даже приблизительно назвать время, когда будут изучены, например, ядерные геномы у представителей всех порядков покрытосеменных растений, хотя методы крупномасштабного сиквенса геномов растений уже разработаны [Rounsley et al., 1997], как и автоматизированные способы обработки результатов секвенирования [Nishimura, 1999; Rawitch, 1999] и построения филогенетических деревьев сразу для большого числа видов и длинных последовательностей ДНК [Lemmon, Millinkovitch, 2002]. Разрабатывается метод, позволяющий обойти одно из «узких мест» реконструкции филогенетических деревьев – стадию выравнивания анализируемых последовательностей. Иногда это выравнивание сильно затруднено, так как последовательности могут глубоко дивергировать и в них трудно выделить комплементарные участки [Tompa, 2001].

Однако полного анализа генетического аппарата растений для целей систематики и филогенетики вероятно не потребуется: достаточно провести сравнительный анализ структур репрезентативной выборки хотя бы части нуклеотидных последовательностей ДНК ядер и пластид для того, чтобы составить достаточно верное представление о путях эволюции генотипов организмов, из которых взяты эти последовательности и использовать полученные сведения для понимания эволюции фенотипов организмов (при условии достаточной тесноты связи генотип-фенотип). Примером может служить одна из недавних работ Грэхема и Олмстеда, в которой авторы приводят весьма надежные данные об эволюции **хпДНК** покрытосеменных, полученные в результате сравнительного исследования эволюции 17 , т.е.≈ 1/5 всех генов хпДНК [Graham, Olmstead, 2000], и предпринимают попытку осознать и эволюцию изученных **видов** растений.

Кроме того, недавно были предложены принципиально новые методы определения последовательностей ДНК, которые резко уменьшают трудозатраты [Kehoe et al., 1999; Pandey, 2001]. Когда один из них – например, мембранный метод – будет доведен до совершенства, то с его помощью можно будет определять последовательности ДНК с невиданной ранее скоростью – 1000 нуклеотидов в секунду (!). А в одном из последних номеров журнала Nature сообщается о методе, позволяющем определить последовательность молекулы ДНК длиной в 25 млн нуклеотидов за четыре часа [Margulies et al., 2005].

Критики геносистематики

Вернемся, однако, в 1970-е гг.. Тогда А. Л. Тахтаджян, даже спустя несколько лет после появления работ И. И.. Шмальгаузена, А. Н. Белозерского, Э. Майра, Ф. Добржанского и др. ,продолжал утверждать, что "**часто высказываемая мысль о возможности существования «систематики генотипов» как главной цели развития систематики... в основе своей не верна**....[Takhtajan, 1973. P. 24].

Итак, сама **возможность существования** систематики генотипов А. Л. Тахтаджяном не оспаривается, но он не считает ее «главной целью» развития систематики в широком смысле этого термина. Что же касается **цели развития** систематики, то автору не удалось найти ни в одной из опубликованных к тому времени статей заключения о том, что геносистематика действительно претендует на главную роль в развитии систематики. У этой науки стали вырисовываться другие собственные цели.

Новую науку критиковали многие. С критикой геносистематики в начале 1970-х гг. выступал А. А. Любищев [1971 (ответ на его критику см. [Белозерский, Медников, 1971]). Несколько позже, в 1979 г. В. Н. Тихомиров писал, что развитие новых направлений уже сказалось явно неблагоприятным образом на гармоничном развитии систематики, имея в виду прежде всего влияние геносистематики растений [Тихомиров, 1979].

Некоторые ботаники продолжают игнорировать успехи геносистематики и сегодня. Вот один пример – даже в 2002 г. в одном из учебных пособий для вузов по географии растений ничего не говорится о том, с каким успехом методы геносистематики были использованы для изучения истории формирования локальных флор, восстановления ареалов растений после оледенений и других важных вопросов. Признавая, что престиж географии растений в последнее время значительно снизился, авторы видят причину этого в массовом заблуждении, вызванным мощной рекламной кампанией генной инженерии, молекулярной систематики и близких к ним наук.

Действительно, в этой области уже опубликованы сотни работ геносистематиков, но они, к сожалению, не нашли никакого отражения в книге, предназначенной быть учебным пособием для студентов. А в целом, эта книга – иллюстрация к приведенному ранее высказыванию В. А. Красилова о «современных» способах преподавания ботаники.

Впрочем, такое восприятие достижений новых направлений в науке – дело обычное и не новое. Вспомним: один из зоологов времен Линнея отмечал, что применение микроскопа противоречит самой сути систематики, а Ж. Фабр вообще считал, что "**...свиньи** (биологи-экспериментаторы, *А.А.*) **замутили воду чистого потока, и естественная история, которая всегда привлекала молодежь, в результате манипуляций с клетками стала презренным и отталкивающим занятием**" [Fabre, 1947, с. 14].

Пожалуй лишь один ботаник А. Кронквист [Cronquist, 1976] первым подверг серьезной и обоснованной критике результаты, полученные биохимиками Д. Боултером и его коллегами [Boulter et al., 1972] при сравнительном изучении строения цитохромов *с* растений. Авторы попытались использовать результаты этих сопоставлений для понимания закономерностей эволюции растений и при-

шли к парадоксальному выводу: непосредственные предки покрытосеменных возникли не в меловом периоде, как это следовало из палеоботанических данных [Красилов, 1989], а гораздо раньше – более 400 млн лет тому назад.

Во многом А. Кронквист был прав: действительно, при определении последовательностей семантид могли быть допущены ошибки (последующие исследования показали, что так оно и есть: см., например [D. Soltis et al., 1997a]. Верно, что для оценки времени возникновения таксона (руководствуясь гипотезой молекулярных часов, которая сама не лишена недостатков) некорректно использовать данные о темпах эволюции этого же белка, полученные при изучении совсем другой группы организмов (грибов): они могут существенно различаться. Ведь именно такого рода исходные данные, за неимением лучших, использовали упомянутые авторы в своих построениях.

Возможности компьютерных методов построения филогенетических деревьев были тогда ограничены, и только сейчас мы можем анализировать сразу много видов и длинные последовательности ДНК [Lemmon, Millinkovitch, 2002], а для систематика так важен "взгляд с высоты птичьего полета".

Тем не менее, правыми оказались И.И. Шмальгаузен, Э. Майр, Ф. Добржанский, А. Н. Белозерский, Д. Боултер и многие другие, разделявшие с самого начала их взгляды (см. [Антонов, 1974]). Даже А. Л. Тахтаджян в 2001 г. написал, что все разнообразие органического мира определяется в конечном счете эффектом положения оснований в цепочке ДНК и аминокислот в пептидной цепи [Тахтаджян, 2001].

И все же новые результаты в конечном счете заинтересовали ботаников, и прежде всего зарубежных. Интересные данные приведены в обзоре В.С.Шнеер [1991]: если в 1987 г. на годичном собрании Американского ботанического общества было представлено всего пять докладов, в которых были использованы результаты исследования хпДНК для целей систематики, то в 1989 г. таких докладов было уже 40, или около 1/5 всех представленных сообщений, а в 1998 г. результаты изучения ДНК были использованы уже в 75% всех докладов! [J. Doyle, 1998b]. Результаты множества таких исследований докладывались и на последнем Ботаническом конгрессе в Вене (2005).

Такое повальное увлечение геносистематикой просто опасно: интерпретация результатов изучения ДНК ведется не всегда корректно. О сложности трактовки данных геносистематики речь идет в работах [Антонов, 1999; 2000 а, б].

Под напором новых фактов скептическое отношение к геносистематике растений стало меняться. Так, А. Кронквист в 1988 г. писал уже так: "На сегодня наиболее многообещающим подходом в реконструкции филогений является сопоставление последовательностей пар оснований в нуклеиновых кислотах. ...**Одним из безусловных преимуществ метода секвенирования нуклеиновых кислот является его относительная независимость от традиционных методов и концепций...Я предвижу две принципиальные возможности использования этого метода. Во-первых, он позволяет выбирать наилучшую из существующих таксономических схем. Во-вторых, он позволяет предполагать новые возможности, которые до этого ускользали от нашего внимания.** [Cronquist, 1988. С. 246—247]. В этом высказывании А. Кронквиста особенно импонирует, наряду с другими совершенно верными суждениями, мысль об «относительной независимости» геносистематики.

Что же касается А. Л. Тахтаджяна, то и он к 1997 г. несколько смягчил свое отношение к геносистематике и, обосновывая изменения в своей системе, напи-

сал, что причиной для них, в частности, послужило ..." быстро растущее число молекулярно-таксономических исследований, в особенности исследований последовательностей белков и нуклеиновых кислот...хотя **нередко эти исследования указывают на отношения, которые очевидно не согласуются с другими данными, а иногда выглядят и невероятными ...**" [Takhtajan, 1997].

Под этим тезисом невозможно не подписаться. О причине таких различий речь пойдет позже. Впрочем, ниже А.Л. Тахтаджян добавляет, что "...помимо «белого шума» в последовательностях ДНК, молекулярные признаки не свободны от проявлений эволюционной конвергенции, параллелизмов и реверсий. Поэтому молекулярные методы не могут служить панацеей. Молекулярные данные следует использовать вместе с, а не вместо данных морфологии." Такая постановка вопроса сужает спектр открывающихся возможностей. Ведь, наряду с «вместе с, а не вместо» существует и возможность параллельного развития двух направлений исследований. Если же речь здесь идет обо **всех** молекулярных исследованиях (включая вторичные соединения), то А.Л. Тахтаджян безусловно прав. Что касается возможности конвергентных, параллельных и обратных изменений в структуре ДНК в ходе эволюции, то они, видимо, в большинстве случаев все же маловероятны. В молекулярной эволюции они все же происходят реже, чем на уровне фонотипов.

Вот один из примеров, говорящий в пользу представлений А.Л. Тахтаджяна, который удалось обнаружить в литературе. В структуре хпДНК двух базальных линий эволюции покрытосеменных, Nymphaeales и Laurales, в обращенном повторе хпДНК была обнаружена сходная инверсия длиной приблизительно 200 пн [Graham, Olmstead, 2000]. Ранее таких инверсий в хлоропластном геноме не наблюдали. Порядки эти достаточно удалены друг от друга, поэтому скорее всего эта инверсия возникла в них независимым образом, т.е. эти данные можно трактовать как пример молекулярной конвергенции или параллельной эволюции. Этому могло способствовать наличие высоко консервативных повторов, ограничивающих инвертированный участок.

Еще один пример приводится в работе [Michelangeli et al., 2003]. Анализ филогенетических отношений Poaceae и близких к ним семейств показал, что крупная инверсия в хпДНК (28 т.п.н.) у видов Restionaceae и общего предка Ecdeiocolea, Joinvillia и злаков возникла конвергентно. Впрочем, авторы допускают и альтернативное обьяснение: возможно, она возникла лишь один раз, но затем была утрачена у Anarthria.

Недавно появилась работа [Frankel et al., 2003], в которой указывается на возможность аналогичных конвергенций и у других растений. Конкретно в ней речь идет об изменениях в структуре гена *Asr2* у растений томата, адаптированных к условиям засухи.

Подробнейшим образом вопрос о возможности конвергентных и параллельных изменений в структурах ДНК был рассмотрен в работах [Hillis, 1991; Hillis, Huelsenbeck, 1992]. По мнению авторов, речь может идти только о редких событиях, связанных, скорее всего, с латеральным переносом генов или участков ДНК [Mathews et al., 1997]. Такие "конвергенции" легко вскрываются путем анализа других последовательностей ДНК и не могут спутать геносистематиков. О редкости истинных событий молекулярной конвергенции и параллелизмов, которые так и не были выявлены при анализе огромного количества молекулярных

данных, накопленных в "банках генов", отмечено в работе [Messier, Stewart, 1998].

А.Л. Тахтаджян, к сожалению, не раскрывает понятия «белый шум». Если под ним он подразумевает нейтральные изменения в структуре ДНК, то он безусловно прав. Этот «белый шум» послужил основой для многих поспешных и неверных заключений геносистематиков.

Все результаты, накопленные генетикой, со всей очевидностью свидетельствуют о том, что на морфологическом уровне генетическая основа таких явлений, как конвергенции, параллелизмы и пр., если они отмечены в изучаемых группах организмов, практически всегда определяется различными изменениями в генетическом аппарате.

Первоначально отрицательное отношение к геносистематике ведущих отечественных ботаников затормозило развитие этой науки в России. Редкие попытки отечественных исследователей в 1960 – 1980-х гг. работать в этой области не меняли общей картины. К счастью, в самое последнее время под влиянием успехов геносистематики за рубежом ситуация стала медленно изменяться в лучшую сторону: достаточно вглянуть на программы последних съездов Всероссийского ботанического общества, Московских совещаний по филогении растений и съездов ВОГИС. К сожалению, о «пророке» нового направления, А. Н. Белозерском, в его Отечестве никто из ботаников не упоминает.

Теперь давайте вспомним, сколько поколений ботаников работало и работает для того, чтобы получить исходную информацию для своих «классических» филогенетических построений. Филогенетические гипотезы разных авторов –"классиков" (одно из следствий таких исследований), и в особенности тех, кто исповедует разные подходы и методы обработки исходных данных, противоречат друг другу ничуть не меньше, чем аналогичные построения геносистематиков, исследующих разные макромолекулы или методы реконструкции их эволюции. Создается впечатление, что отечественные ботаники игнорируют этот подход не из-за сложности и дороговизны геносистематических исследований, а по причине зашоренности мышления многих, которые не хотят понять,что в ботанической систематике наступило время больших перемен.

Эти перемены начались более десяти лет тому назад. Так, в 1996 г. состоялось заседание Американского общества систематиков (Society of Systematic Biologists), на котором президентом общества был избран ботаник М. Донохью.

В своем докладе при вступлении в должность М. Донохью высказал мнение, что правила, введенные в 1753 г. К. Линнеем, не только не современны, но могут вводить в заблуждение. В системе Линнея таксономисты упорядочивают живое, руководствуясь внешним видом и помещая виды в определенные роды, которые в свою очередь группируются в категории более высокого ранга.

В настоящее время биологи все чаще связывают родство организмов с их эволюционной историей, но Линнею об эволюции ничего известно не было и принятые им правила номенклатуры и таксономических категорий – вид, род, семейство, порядок, класс – соответствуют рангам, которые не имеют биологического смысла. В результате существующие классификации могут вводить в заблуждение относительно эволюционных взаимоотношений таких групп.

Прекрасным примером справедливости этих слов могут быть последние результаты, полученные геномикой. Эти данные касаются одной из вечных проб-

лем систематики – проблемы эквивалентности таксонов в разных группах организмов. В свое время мы предложили использовать для выделения эквивалентных (равномасштабных) таксонов результаты определения глубины генетической дивергенции у образующих их видов [Antonov et al., 1988]. Тогда для этой цели предлагалось использовать результаты гибридизации ДНК.

Геномика позволила подойти к решению этой проблемы путем определения полных первичных структур геномов. Стало ясно, что выделяемые систематиками классической школы таксоны одного ранга в разных группах организмов неравномасштабны. Собственно, в свое время это признавал и Э. Майр [1971].

Например, небольшая группа грибов, гемиаскомицетные дрожжи, по глубине генетической дивергенции оказалась подобной всем хордовым животным [Dujon et al., 2004].

Сегодня, говорил М.Донахью, мы должны перейти к рангам, основанным на структуре филогенетических деревьев, основе обсуждения биоразнообразия во времени и пространстве. Деревья описывают порядок ветвления, которое выясняется в ходе филогенетических исследований путем сравнения физических, поведенческих и молекулярных признаков. Хотя форма деревьев отражает, насколько разные виды близки друг к другу и какие из них имеют общего предка, эти выводы не всегда совпадают с тем, как организмы группируются и как таким группам присваивается определенный ранг в системе Линнея... . Донохью считает, что использование линнеевской иерархии может ввести в заблуждение исследователя при изучении процесса эволюции.

.На съезде Де Куейрос и Готье предложили вообще отказаться от рангов и именовать группы организмов исходя из их происхождения. Донохью поддержал это предложение в своем докладе, назвав его «разумной альтернативой» к определениям Линнея, так как это позволит сохранить названия групп.

Иными словами, Донохью предлагает и ботаникам всерьез задуматься над тем, соответствует ли линневский подход построению систем растений, современному состоянию дел в ботанике и шире использовать принципы кладизма и молекулярные признаки при ревизии филогений и систем растений.

Многим, если не большинству ботаников в России, смелые предложения Донохью могут показаться бредовыми. Еще более невероятным может показаться замена линневской номенклатуры так называемым ФилоКодом или же так называемыми штрих-кодами, пригодными для идентификации отдельных видов живых существ [Blaxter, 2003]. Сегодня всякие выводы не имеют достаточных оснований. Будущее покажет, насколько жизнеспособными окажутся эти прогнозы.

В этой связи мне хотелось бы привести выдержку из книги С. В. Мейена [Мейен, 1981]: «С какого-то момента начинаешь понимать, что наши нынешние взгляды – не вершина научной мысли, а преходящий этап, что пройдут годы, и самые прочные убеждения могут подвергнуться сомнению, будут отброшены и забыты. И чем сложнее проблема, тем меньше шансов у господствующих взглядов удержаться надолго и тем более навсегда».

При обсуждении доклада М. Донохью и в ряде более поздних публикаций [см. Taxon, Vol. 51, 2000] высказывались в защиту классической систематики. Критика новых представлений прозвучала и на последних Московских совещаниях по филогении растений.

Если работа по коренной ревизии систем все же будет предпринята ботаниками, объем ее будет колоссальным: предстоит ревизия на новой основе всех выделяемых сегодня таксонов высших растений.

На самом деле ситуация не столь трагична и, как кажется автору книги, имеет, по крайней мере, одно простое решение. О выборе дальнейшего пути речь пойдет в следующих главах, а здесь уместно процитировать Б. Тернера: "В будущем результаты сравнительного исследования макромолекул без сомнения будут служить в качестве основного критерия при построении филограмм высших таксономических категорий, на уровне по крайней мере выше рода». Отметим, что Б. Тернер все еще считает результаты исследований генотипов простым дополнением к существующим данным.

Далее Б. Тернер пишет: «Надо надеяться, что в таких попытках будут использоваться результаты изучения нескольких или даже многих генов. Сам я нахожусь в стороне от этих проблем, но могу помечтать, что в 2010 г. в Кодексе ботанической номенклатуры в главе «Применение данных, полученных при изучении макромолекул» будет написано: «До того, как такие данные будут использованы для перестановки семейств или уточнения места «болтающихся родов», необходимо изучить эволюцию 10 генов, ответственных за синтез соответственного числа метаболитически важных ферментов. Рекомендуются для изучения следующие гены...» [Turner, 1998]. Что же, до 2007 г. ждать осталось совсем немного.

Оставляя пока в стороне вопрос о том, совместимы ли в принципе результаты исследований генотипов и фенотипов, отметим, что отбор 10 генов из всей массы генов ядерной ДНК по ряду причин представляет сегодня нелегкую задачу, но такая работа уже ведется. С другой стороны, уже сейчас нам предлагается альтернатива – изучать не 10, а несколько десятков генов, закодированных в хлоропластах. Их отбор произвела сама эволюция [Goremykin et al., 1997].

Методы исследования, которые использовались и используются для этих целей сегодня, основаны на применении последних достижений молекулярной биологии и компьютерной техники. Прежде чем приступить к обсуждению результатов геносистематики, полезно с ними ознакомиться. Необходимо также описать особенности организации объектов исследования геносистематиков.

К рассмотрению этих вопросов мы переходим.

Рекомендуемая литература

Белозерский А. Н. Биохимия нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов.М.: Наука, 1976.

Kimura M. The neutral theory of molecular evolution. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1983.

Olby R. The path to the double helix. Seattle: Univ. Washington Press, 1974.

Антонов А.С. Основы геносистематики высших растений. М.: Наука, 2000.

Скворцов А.К. Вид в систематике сегодняшнего дня. Эволюционная биология/ Материалы конференции "Проблемы вида и видообразования" Под ред. Стетния В.Н. Томск: Томский гос. ун-т, 2001. Т. 1. С. 122–127.

ГЕНОТИП РАСТЕНИЙ

Общие сведения

Генотип растений формируется из семантид, содержащихся в трех клеточных компартментах (ядрах, хлоропластах и митохондриях). Реализация генотипов МГСУ в фенотипы происходит при участии цитоплазмы клеток, играющей роль передатчика сигналов от внешней среды к МГСУ клеток.

На морфологическом уровне тонкая структура ядер всех растений исследована достаточно подробно [Ченцов, 2004] и в главных чертах в основном единообразна. С другой стороны, строение отдельных участков ядерной ДНК (яДНК) может существенно различаться [Kellog, Bennetzen, 2004].

Строение хлоропластной ДНК и самих хлоропластов у некоторых водорослей (например, красных) совсем не такое, как у зеленых водорослей или у высших растений. Рассматривать строение генотипов у них мы не будем: они эволюционно отдалены от интересующих нас зеленых водорослей и высших растений. У последних отмечается особенно выраженное сходство в организации хлоропластов и хпДНК. Строение митДНК у растений может существенно различаться.

Основная часть генетической информации растительных клеток содержится в яДНК и существенно меньшая – в ДНК клеточных органелл. Сколько содержится и как наследуется ДНК в генетических компартментах клеток у покрытосеменных растений представлено в табл. 3-1.

Более подробные характеристики ядерного, хлоропластного и митохондриального геномов одного из семенных растений – арабидопсиса приведены в табл. 3-2.

Таблица 3-1

Сопоставление трех геномов клеток покрытосеменных растений

Геном	Размер генома (в т.п.н.)	Наследуемость
Хлоропластов	135–160	У семенных растений чаще всего по материнской линии
Митохондрий	200–500	То же
Ядер	от 1,1 × 10 млн до 110 × 10 млрд	От двух родителей

Таблица 3-2

Геномы арабидопсиса

	Ядерный	Хлоропластный	Митохондриальный
Размер генома	128 м.п.н.	154 т.п.н.	367 т.п.н.
Кол-во геномов на клетку	2	560	26
Число белок-кодирующих генов	25498	79	58
Кол-во тысяч пар нуклеотидов на ген	4,5	1,2	6,25
Средняя длина кодирующей последовательности	1900 п.н.	900 п.н.	860 п.н.
Генов с интронами	79%	18,4 %	12 %
Отношение ген–псевдоген	1 : 0,03	1 : 0	1 : 0,2–0,5
Транспозоны (в % от размера генома	14%	0 %	4 %

Примечание. м.п.н. – миллионов пар нуклеотидов, т.п.н. – тысяч пар нуклеотидов.

Из данных, представленных в табл. 3-2, видно, что геном хлоропластов у растений более компактный (гены в нем расположены ближе друг к другу), чем в ядерном геноме. Кодирующие последовательности в нем в среднем короче, генов с интронами меньше, псевдогенов практически нет. В ходе эволюции часть генов хлоропласты утеряли: если геном современной цианобактерии – синехоцистиса – содержит около 2000 генов, то геном хлоропластов маршанции – только 83, табака – 76, арабидопсиса – 79 генов.

Геномы хлоропластов и митохондрий включают значительную часть генов, необходимых для обеспечения синтеза белка, хотя за время эволюции многие из таких генов перешли в ядро [W. Martin, Herrman, 1998a]. По данным [Rujan, W. Martin, 2001], в ядерном геноме арабидопсиса 1,6–9,2 % всех генов обнаруживает явное сходство с генами *Synechocystis,* т. е., скорее всего, перешли туда из геномов хлоропластов, потомков цианобактерий.

Потеря генов, кодирующих разные стороны жизнедеятельности, в ходе эволюции, происходила неравномерно [W. Martin, Herrman, 1998a; W. Martin et al., 1998b]. Создается впечатление, что часть своих генов предки современных хлоропластов и митохондрий «уступили» ядрам на самом первом этапе симбиогенеза [W. Martin et al., 2002].

Таким образом, ДНК ядер, хлоропластов и митохондрий качественно и количественно отличаются друг от друга. В результате беглого сопоставления складывается впечатление, что наиболее «эволюционно стабильным» геномом у современных зеленых водорослей и высших растений является геном хлоропластов. Все глобальные перестройки в нем произошли, видимо, на самых первых стадиях симбиогенеза и в начале формирования пластид в кладе растений.

Дальнейшее более подробное описание основных характеристик ДНК ядер, хлоропластов и митохондрий поможет читателю лучше понять свойства этих важнейших объектов исследований геносистематиков и причин, по которым исследователи-геносистематики выбирают те или иные объекты для своих экспериментов.

ДНК ядер

Функции яДНК многообразны. Большая часть генов растений и обслуживающих их элементов генотипа сосредоточены в ядрах клеток. яДНК у представителей разных групп растений изучена далеко не одинаково. Один из последних обзоров строения и эволюции ядерного генома семенных растений опубликован в 2004 г. [Kellog, Bennetzen, 2004].

Ядра клеток растений нередко содержат существенно больше ДНК, чем, например, ядра клеток животных. Так, геномы некоторых лилий или фритиллярий (рябчиков) построены из миллиардов или даже десятка (ов) миллиардов нуклеотидов (табл. 3-3).

В целом же размеры геномов как водорослей, так и высших растений могут различаться в тысячу раз, и эти различия прямо не связаны с количеством хромосом. У сосны, риса, томата и рябчика их по 24, а размеры геномов различаются многократно! При этом такие геномы высших растений кодируют формирование фенотипов в общем-то близкого уровня морфофизиологической сложности. Это можно оценить по числу разнокачественных тканей и клеток, участвующих в их формировании.

Таблица 3-3

Размеры ядерных геномов растений по сравнению с животными

Организм	Размер генома (в парах нуклеотидов)	Количество хромосом
Животные:		
Дрозофила	$1{,}8 \times 10^8$	2n = 8
Человек	$3{,}4 \times 10^9$	2n = 46
Растения		
Водоросли:		
Cyanidioschyzon merolae	$1{,}2 \times 10^7$	n = 15
Chlorella vulgaris	$3{,}9 \times 10^7$	n = 16
Chlamydomonas sp.	$1{,}0 \times 10^9$	n = 18
Coscinodiscus asteromphales	$2{,}5 \times 10^{10}$	n = ?
Мхи:		
Physcomitrella patens	$6{,}0 \times 10^8$	n = ?
Голосеменные:		
Сосна	$6{,}8 \times 10^{10}$	2n = 24
Покрытосеменные:		
Резуховидка (арабидопсис)	$1{,}45 \times 10^8$	2n = 10
Рис	$4{,}15 \times 10^8$	2n = 24
Томат	$4{,}99 \times 10^8$	2n = 24
Арахис	$2{,}81 \times 10^9$	2n = 40
Ваниль	$7{,}67 \times 10^9$	2n =32
Лилия	$9{,}0 \times 10^{10}$	2n = 24
Рябчик	$1{,}24 \times 10^{11}$	2n = 24

Из: [Л. А. Лутовой и др., 2000], с сокращениями.

Долгое время эти различия служили важным аргументом в спорах сторонников и противников роли ДНК в жизни клеток. Оппоненты задавали вполне разумный вопрос: что делает эта «лишняя» ДНК ? Сегодня ответ на этот вопрос получен, и об этом речь пойдет далее.

Как устроена яДНК растений ? Качественный состав яДНК у всех растений обычен для всех эукариот: они построены из четырех типов нуклеотидов (А, Г, Ц и Т). Для яДНК высших растений характерен высокий уровень метилирования Ц- нуклеотидов. Содержание в них 5-метилцитидиловых нуклеотидов может достигать 10 мол. %, т.е. фактически каждый второй-третий Ц-нуклеотид в них может быть метилирован [Слюсаренко, 1972]. У водорослей ситуация сложнее: в разных группах в ДНК отмечены и другие «минорные» основания [Белозерский, 1976б; Пахомова, 2002]. Так, в ДНК у зеленых водорослей был найден не только 5-метилцитозин (2,7 – 3,7 мол. %), но и метилированные производные аденина, 6-метиламинопурин (0,1 – 0,5 мол. %) и 6- диметиламинопурин (0,1 – 0,6 мол. %).

Существуют предположения, что путем метилирования клетки «метят» функционально неактивную ДНК. С другой стороны, метилирование играет важнейшую роль в регуляции активности генов. По этой проблеме существует обширная литература.

В хромосомах ядер клеток растений, при микронных размерах самих клеток, и еще меньших – самих хромосом – содержатся молекулы ДНК, длина которых – от долей миллиметра до нескольких сантиметров. Эти оценки получены методами светооптической радиоавтографии и выделения ДНК в щадящих условиях. При обычных способах выделения молекулы ДНК рвутся (деградируют) в основном под влиянием сил гидродинамического сдвига, действующих на ДНК после диссоциации ДНК-белковых комплексов хромосом.

Даже самые маленькие геномы (ДНК) покрытосеменных, имеющие в десятки раз меньшие размеры, чем у большинства растений, обладают вполне макроскопическими размерами. Так, небольшой ядерный геном арабидопсиса состоит из 125 млн пар нуклеотидов. Расстояние между парами нуклеотидов вдоль по цепи ДНК составляет 3,4 ангстрема. Таким образом, общая длина яДНК арабидопсиса составляет $3,4 \times 125\,000\,000 = 425\,000\,000$ ангстрем, или порядка 4 см, на одну хромосому приходится порядка 0,4 см ДНК.

Если учесть, что диаметр самих клеток в сотни и тысячи раз меньше, это не может не поражать. Понятно, что такие гигантские молекулы могут нести очень много генетической информации.

Отметим, что суммарная длина всех белок-кодирующих последовательностей нуклеотидов (генов) составляет лишь малую часть (проценты или даже доли процента) всей ядерной ДНК растений. Об этом должны всегда помнить исследователи, пытающиеся реконструировать эволюцию **видов** растений путем изучения эволюции отдельных генов.

Общее число индивидуальных последовательностей генов составляет в яДНК десятки тысяч [Meyerowitz, 1999]. Относительный порядок расположения генов в яДНК сохраняется более или менее постоянным в ходе эволюции [Eckardt, 2001], но это правило имеет множество исключений [Kellog, Bennetzen, 2004].

Означает ли это, что вся остальная часть яДНК не функциональна и не играет никакой роли в жизнедеятельности растительных клеток ? Этот вопрос встал

особенно остро, когда было показано, что даже ядра клеток растений, принадлежащих к одному роду или даже виду, могут существенно, во много раз отличаться по содержанию ДНК (так называемый C-value paradox: [Bennett, Smith, 1976; Murray, 1998; Hartl, 2000]). Такие различия особенно характерны для наиболее «продвинутых» таксонов. Виды растений, занимающих базальное положение на древе покрытосеменных, обычно имеют небольшие геномы [Soltis et al., 2003].

Было предложено несколько объяснений «C-value»- парадокса [Ченцов, 2004]. Первые исследования с использованием физико-химических методов анализа показали, что вся яДНК построена из «уникальных» и «повторяющихся» последовательностей нуклеотидов (Flavell et al., 1974; Петров, 1980]. Вывод этот впоследствии был существенно уточнен. Подробности развития этих исследований в живой форме излагаются в статье одного из пионеров в этой области. Р. Голдберга [Goldberg, 2001].

В дальнейшем все повторяющиеся последовательности были условно разделены на два больших класса: **тандемные повторы**, т.е. группы расположенных одна за другой, «хвост в голову», одинаковых или очень сходных по первичной структуре последовательностей и **диспергированные повторы**, члены семейств которых рассеяны по геному [T. Schmidt, 1999]. Геном арабидопсиса на 17% слагается из тандемно повторенных генов [Bancroft , 2001].

Повторяющиеся последовательности появляются в яДНК путем многократной амплификации («размножения») отдельных уникальных последовательностей или увеличения числа всех предсуществовавших последовательностей геномов при их дупликации. Некоторые классы тандемных повторов, обычно существенно отличающиеся от основной массы яДНК по нуклеотидному составу, получили название **«сателлитных ДНК»**. Они были открыты в начале 1960-х гг. С. Кит (см.: [Беридзе, 1982]). Близкородственные виды иногда могут существенно отличаться по набору и содержанию таких сателлитных ДНК.

«Уникальные» и «повторяющиеся» последовательности ДНК первоначально были чисто операциональными понятиями, появившимися как результат исследований процессов денатурации-реассоциации ДНК [Петров, 1980]. Выяснено, что их относительное содержание в геномах растений может быть далеко не одинаково. Позже эти термины наполнились совсем новым содержанием.

Диспергированные повторы неоднородны и представлены рядом структурно и функционально различающихся классов последовательностей. Долгое время казалось, что они не несут функциональной нагрузки и по незнанию их относили к «мусорной» ДНК. В последние годы такая точка зрения успешно оспаривается (см., например, [Гиббс, 2004; Makalowski, 2000]). Существовало также предположение, что «уникальные» последовательности соответствуют генам, кодирующим, в частности, белки.

Однако недавно было показано, что в геномах растений большинство генов, кодирующих белки, также многократно амплифицированы (или дуплицированы) и относятся таким образом к фракции повторяющихся последовательностей. Возможно, что такие участки ДНК содержат функционально сходную генетическую информацию, которая реализуется в различные моменты онтогенеза.

Показано, что у «генотрофов» льна содержание повторов менялось при изменении условий питания растений, и эти изменения наследовались. Это говорило о высокой лабильности фракции повторов.

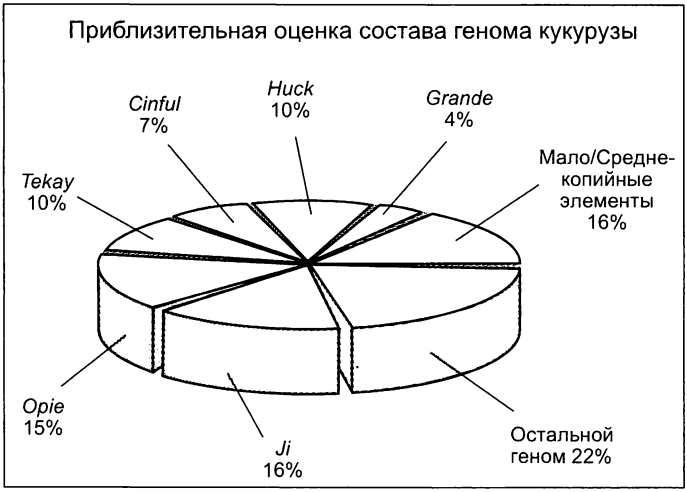


Рис. 3-1. Приблизительная оценка состава генома кукурузы

Сегодня этой фракции яДНК отводят важнейшую роль в определении специфичности организации МГСУ, хромосом и их поведения в клеточном цикле [Ченцов, 2004]. В целом, функции повторов исключительно разнообразны. Типы повторяющихся последовательностей в геноме кукурузы представлены на рис. 3-1.

Тщательное изучение одной из фракций **минисателлитных** (короткие олигонуклеотиды) **диспергированных повторов** показало, что они представляют интерес для систематиков растений, особенно в случае низших таксонов. Такой класс повторов был обнаружен в яДНК как покрыто-, так и голосеменных растений [Rogstad et al., 1988].

Описание методов изучения такого рода последовательностей с применением «праймеров» (радиоактивных зондов) со случайно избранной последовательностью (*RAPD-метод*) содержится во многих доступных источниках (см., например, [Rogstad et al., 1988; Кочиева, 2004]). Суть метода иллюстрирует рис. 3-2 .

В качестве примера результаты электрофореза RAPD- фрагментов ДНК ячменей показаны на рис. 3-3. Видно, что чем ближе сравниваемые формы, тем больше в результате ферментативного гидролиза ДНК у них образуется фрагментов с одинаковой подвижностью при электрофорезе.

Впрочем, одинаковая подвижность в геле еще не гарантирует полной гомологии фрагментов, полученных для разных видов. Как показали исследования рода *Helianthus*, действительно гомологичных среди них около 80% [Riesberg, 1996].

Анализируя такие результаты путем построения матриц сходства, полученных для разных объектов, их легко трансформировать в дендрограммы, наглядно демонстрирующие близость или отдаленность изучаемых форм (рис. 3-4).

Справедливо это и для фракции **микросателлитных последовательностей** длиной всего в несколько нуклеотидов. Эта фракция повторов обычно исключительно быстро изменяется в ходе эволюции. Происходит это в основном за счет мутаций при созревании половых клеток. Специфический набор микросателли-

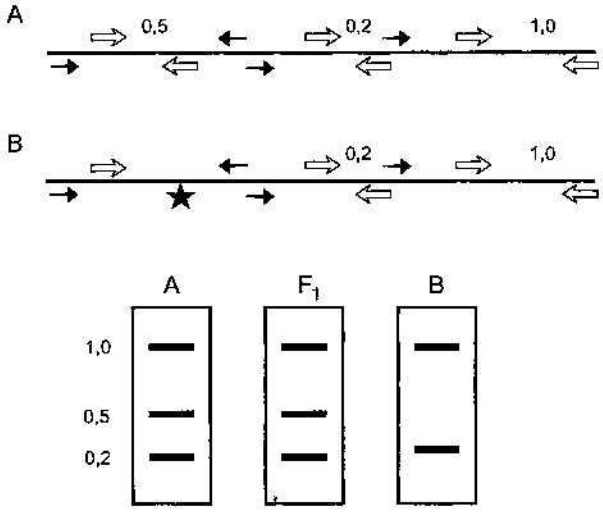


Рис. 3-2. Полиморфизм последовательностей ДНК, выявляемый с помощью RAPD-маркеров у родительских видов A и B и их гибрида F1

Используемые праймеры обозначены стрелками; праймеры между которыми может проходить амплификация участков ДНК, обозначены объемными стрелками. Место утраты одного из сайтов посадки праймера (места взаимодействия его с последовательностью ДНК по принципу комплементарности) у одного из родительских видов (B) обозначено звездочкой. На практике результаты электрофореза фрагментов ДНК выглядят сложнее (см. рис. 3-3). [из: Ежова и др., 2002]

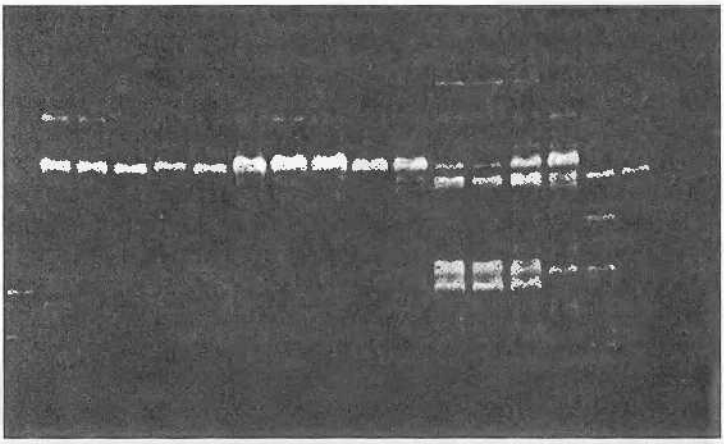


Рис. 3-3. Электрофореграмма фрагментов ДНК, полученных в результате ферментативного гидролиза разных сортов (правая часть рисунка) и видов ячменей (левая часть рисунка)

Видно, что по набору и подвижности фрагментов сорта мало отличаются друг от друга, но в случае разных видов наблюдаются заметные различия

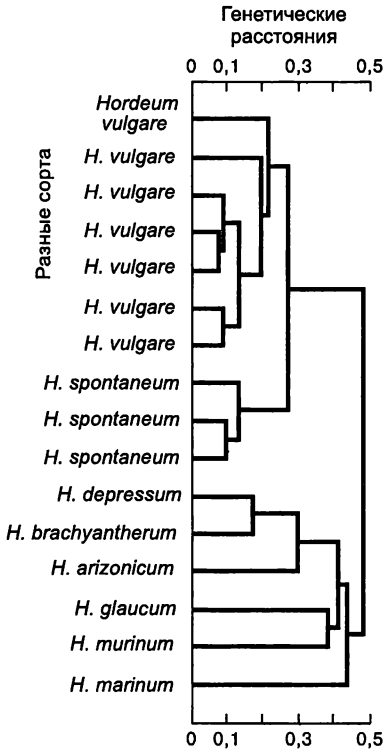


Рис. 3-4. Дендрограмма, показывающая генетические дистанции между изученными сортами и видами ячменей (см. рис. 3-3)

Видно, что *H. vulgare* сходен с близким видом, *H. spontaneum*, но существенно отличается от других видов ячменей

тов образует неповторимый, видоспецифичный «портрет» любой ядерной ДНК, что создает предпосылки для молекулярно-эволюционных исследований [Ellegren, 2000; Gugerli et al., 2001; Тугучева, Кочиева, 2000; Рыжова, Кочиева, 2004]. Преимущество изучения мини- и микросателлитов заключается в том, что происходят они из разных групп сцепления и, в принципе, исследование их эволюции должно более объективно отражать эволюцию геномов, чем изучение индивидуальных последовательностей ДНК.

Степень эволюционной консервативности таких «портретов» для видов из разных таксонов неодинакова.

Использование микросателлитных последовательностей, особенно на уровне видов, ограничивается относительно высокой стоимостью специфических праймеров, используемых в таких анализах [Nybom, 2004]. Если учесть, однако, что анализ микросателлитов можно сегодня проводить с помощью автоматических анализаторов, а его разрешающая способность при этом выше, чем у метода с использованием радиоактивных праймеров, то будущее у этого метода совсем неплохое [Nagaraju et al., 2002].

Что касается других фракций повторяющихся последовательностей ядерных ДНК растений, то в последнее время особое внимание уделяется ретротранспозонам [Kumar, Bennetzen, 1999; Weissler, 2001; Feschotte et al., 2002].

Ретротранспозоны – это особые участки нуклеотидных последовательностей яДНК, которые являются мобильными (способными к перемещениям) генети-

ческими элементами и могут мигрировать по геному растений при участии фермента – обратной транкриптазы – и РНК-посредника. Некоторые классы ретротранспозонов «деградировали» в ходе эволюции и уже не несут в своей структуре информации, необходимой для их активного перемещения [Witte et al., 2001]. но продолжают присутствовать в ядерной ДНК.

Роль ретротранспозонов в эволюции геномов растений исключительно велика. Они могут составлять до 50% и более всей яДНК (см. рис. 3-1). Структурно и функционально они сходны с ретротранспозонами и ретровирусами других эукариот. От последних их обычно отличает высокая частота повторенности элементов (units), слагающих данный класс ретротранспозонов, высокая гетерогенность их «популяций» в геномах и характер распределения в хромосомах.

В геномах растений присутствует множество классов (популяций) ретротранспозонов, отличающихся по нуклеотидной последовательности. Многими исследованиями установлена важная роль ретротранспозонов в эпигенетических процессах, т.е. они являются важнейшим компонентом МГСУ. Их количественное содержание в геномах чрезвычайно лабильно и может, по крайней мере, частично объяснять «C-value»-парадокс.

Считается, например, что размер генома кукурузы за последние 3 млн лет практически удвоился за счет «размножения» межгенных ретротранспозонов. Геном кукурузы, как и геномы других высших растений, оказался весьма «жидким», быстро изменяющимся. Так, различия могут быть обнаружены даже в bz-участке ДНК у двух линий кукурузы (Fu, Dooner, 2002) или в хромосомах у близких форм ячменя [Shirasu et al., 2000].

Количественное содержание определенных транспозонов может определяться условиями роста растения (см., например, [Kalendar et al., 2002]). Видимо, именно изменение количества ретротранспозонов и определяет существование упомянутых выше «генотрофов» у льна.

Довольно подробно изучены ретротранспозоны злаков [Vicient et al., 2001]. Они составляют до 20% их геномов. Интерес к ретротранспозонам злаков определялся тем, что по количественному содержанию ДНК на гаплоидный набор хромосом разные виды злаков могут сильно отличаться. К тому же у *Oropetium thombaeum* они построены из ≈ 200 000 п.н., а у *Lygeum spartum* – из ≈13 млн п.н. (т.е. разница почти в сто раз).

В геномах растений наиболее часто встречаются *gipsy*-подобные и *copia*-подобные ретротраспозоны. Это длинные последовательности, построенные из 5 – 10 т.п.н. Показано, что весь ядерный геном растений состоит из «островов генов» и разделяющих их «морей транспозонов».

Ретротранспозоны кодируют специфические белки, большая часть которых необходима для их синтеза и осуществления перестроек геномов. Многие исследования были посвящены изучению структуры ретротранспозонов у голосеменных и покрытосеменных растений [Stuart-Rogers, Flavell, 2001 и др.], и эти данные были использованы для выяснения филогенетических связей отдельных групп растений.

Среди различных «семейств» ядерных генов некоторые играют исключительно важную роль в осуществлении онтогенеза растений. К их числу относятся, например, так называемые **"MADS-box"- гены** [Becker et al., 2000]. Изучение этого семейства генов у мха *Physcomitrella patens* позволило вскрыть некоторые общие

закономерности эволюции подсемейства MIKC-генов этого семейства у всех сосудистых растений [Henschel et al., 2002]. Оказалось, что MIKC-гены имеют экзон-интронное строение и их можно подразделить на две группы, различающиеся, в основном, по строению спейсерной последовательности. Одна из таких групп обнаруживается у всех наземных растений, а другая – лишь у некоторых. На основании проведенного анализа авторы пришли к выводу, что дупликация гена произошла около 450 млн лет тому назад, и возникшая молекулярная синапоморфия (вторая подгруппа генов) характерна лишь для эволюционно продвинутых таксонов.

У арабидопсиса семейство MADS-box генов состоит из более чем 80 членов. Гены такого типа принимают самое непосредственное участие в формировании цветов и вегетативных органов растений. Мутации в большинстве из них имеют явное фенотипическое проявление. Так, изменения в строении гена *abph1* приводит к тому, что у растений кукурузы очередное расположение листьев на стебле сменяется на супротивное [Glulini et al., 2004], совершенно для злаков не характерное. Не так ли возникали новые линии эволюционного развития покрытосеменных?

Сопоставление первичных структур генов из «MADS-box» семейства сегодня активно применяется для выявления филогенетических связей растений [Jack, 2001].

Более подробно все эти вопросы мы обсудим позже, при описании вклада геносистематики в понимание эволюционных отношений отдельных групп растений.

Высказывалась и гипотеза о возможной полинемной (многонитчатой) организации хромосом растений. Эта гипотеза сегодня особой популярностью не пользуется [Ченцов, 2004], как и некоторые другие гипотезы, объясняющие «C-value paradox» [Hartl, 2000].

Итак, в результате глубоких исследований было выяснено, что в яДНК растений количество генов с уникальной первичной структурой гораздо меньше, чем это первоначально предполагалось. Выявление таких генов – находка для геносистематиков, так как в этом случае возможно легко выполнимое и уверенное сопоставление ортологичных генов из яДНК разных организмов. Это позволяет четко реконструировать процесс эволюции гена.

Размер генома растений (как и многих других эукариот) в процессе эволюции увеличивался как путем полиплоидизации (с последующей частичной диплоидизацией), так и в результате амплификации и рекомбинации предсуществовавших генов. Такой геном видимо неоднократно дуплицировался до разделения клад Brassicaceae и Poaceae [Kellog, Bennetzen, 2004]. Отдельные амплифицированные или дуплицированные гены из семейств, связанных общностью происхождения, получали возможность эволюционировать независимо друг от друга и кодировать белки с несколько отличающимися функциями, либо выполнять эту функцию на разных фазах онтогенеза, либо деградировать и превращаться в псевдогены, не кодирующие никаких белков. Соответственно менялись и свойства МГСУ [Kellog, 2003; Adams et al., 2003].

Так, например, анализ «генного состава» хромосомы 2 арабидопсиса показал, что она содержит около 400 псевдогенов – молекулярных останков эволюционных процессов. Таким образом, ядерные геномы растений все же изрядно «заму-

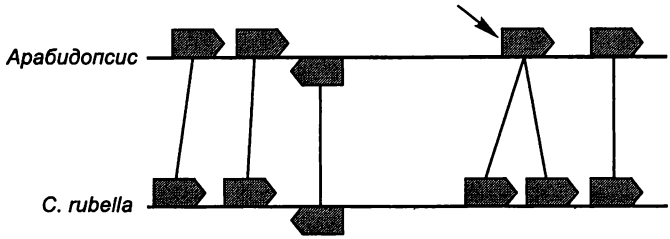


Рис. 3-5. Сопоставление гомологичных участков одной из хромосом арабидопсиса и пастушьей сумки

Черными прямоугольниками показаны гены. Видно, что за относительно короткое время независимой эволюции двух линий в геноме пастушьей сумки произошла дупликация одного из генов (указан стрелкой)

сорены» отходами эволюции генов. Иногда при дупликации наблюдается и «смена функций» у одной из копий гена до того, как он превращается в псевдоген.

Важнейшую роль играли также эволюционные превращения других классов повторов. Подробно все эти процессы описаны, в частности, в монографии Ли [W. Li, 1997].

Итак, в результате дупликаций-амплификаций образовывались семейства генов, часть которых, находящаяся под жестким давлением отбора, оказалась эволюционно консервативной, т. е. медленно накапливала изменения в своей первичной структуре (например, гены рибосомных РНК в яДНК) и даже подвергалась процессам «унификации», т.е. когда первичные структуры участков ДНК (генов) с помощью некоторых генетических механизмов (ведущую роль здесь, видимо, играют неравный кроссинговер и конверсия генов) "устраняют" возникающие в них мутации, в результате члены семейства остаются похожими друг на друга. Гены – члены других семейств – напротив, весьма быстро меняют первичную структуру соответствующих участков яДНК, так что спустя некоторое время в них становится все сложнее находить гомологичные участки последовательностей. Видимо, именно члены таких семейств и определялись как компоненты фракции «уникальных» последовательностей.

Из этого общего правила существуют интересные исключения, которые нужно иметь в виду при анализе эволюции рибосомного ядерного оперона у высших растений, в частности, покрытосеменных. Показано, что в клетках некоторых видов, даже на фоне процессов унификации, может существовать по нескольку различных классов этого оперона, отличающихся по числу или первичной структуре внутренних транскрибируемых участков, разграничивающих гены рРНК ([Рыжова с соавт., 2002] и цитируемая в этой работе литература по данному вопросу.)

Процессы полиплоидизации-диплоидизации геномов, амплификации и дупликации могут идти с высокой скоростью: это было выяснено при сопоставлении структур паралогичных генов семейств в геномах арабидопсиса и близких видов покрытосеменных. Показано, что такие паралогичные гены из одного генома всегда более сходны по строению, чем при попарном сопоставлении с ге-

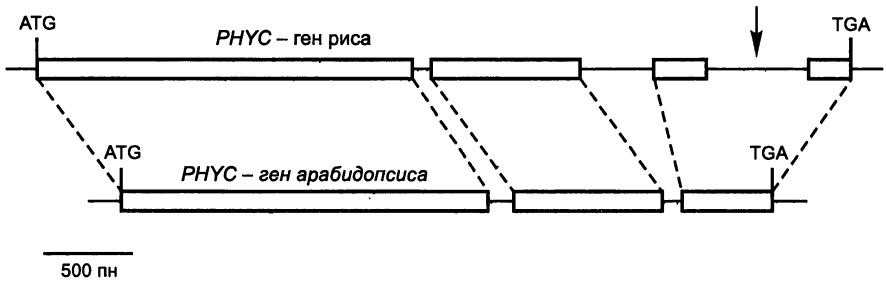


Рис. 3-6. Эксон-интронная структура генов у растений (на примере *phyc*-гена риса и арабидопсиса)

Доля генов, имеющих интроны в геномах растений, представлена в табл. 3-4. Черные прямоугольники – эксоны, линии между ними – интроны

нами других видов. Из этого делается вывод, что дупликация этих генов в геноме арабидопсиса произошла уже **после** разделения филетических линий, ведущих к арабидопсису и сравниваемых с ним близкими видами [Lin et al., 1999].

Количество индивидуальных генов – членов разных семейств – у отдельных видов растений может быть далеко не одинаковым [Gaut et al., 1999]. Так, у покрытосеменных число индивидуальных последовательностей в семействе *Adh*-генов невелико (два-три), а семейство генов теплового шока состоит из множества копий. Справедливо это и для семейств других повторов, например, «MADS-box» – генов. В геноме арабидопсиса их более восьмидесяти [Jack, 2001].

Чем глубже ученые разбираются в эволюционной судьбе разных фракций ядерного генома, тем более удивительные картины перед ними раскрываются. Сейчас уже можно судить не только о числе генов и их превращениях, но и о том, как гены иногда меняют свое положение в геномах в ходе эволюции.

Было проведено сопоставление расположения ортологичных генов в геномах крестоцветных (*Capsella rubella*, *Brassica nigra* и др.), томатов, картофеля, кукурузы, риса и других покрытосеменных [Tanksley et al., 1992; Kowalski et al., 1994; Lagercrantz et al., 1996, 1998; Bancroft, 2001].

Оказалось, что макроструктура яДНК (геномов) у этих растений в целом стабильная (они в значительной мере колинеарны), но расположение отдельных генов между генетическими маркерами, позволяющими проводить такие сопоставления, может иногда варьировать. Специфические маркеры для таких исследований получают, изучая полиморфизм длин фрагментов, образующихся в результате действия ферментов – эндонуклеаз рестрикции. Таким образом, микроструктура геномов оказалась несколько «жидкой», она подвержена небольшим изменениям. Гены довольно легко меняют свое расположение в пределах хромосом и даже в геноме в целом, многие из них при этом дуплицируются. Результаты этих процессов иллюстрирует в своем обзоре Я. Банкрофт [Bancroft, 2001] (рис. 3-5).

Из рис. 3-5 видно, что за относительно короткое время, прошедшее со времени дивергенции двух видов крестоцветных, *Capsella rubella* и *Arabidposis thaliana* (они дивергировали порядка 6–10 млн лет тому назад) один из генов успел дуплицироваться (указан стрелкой).

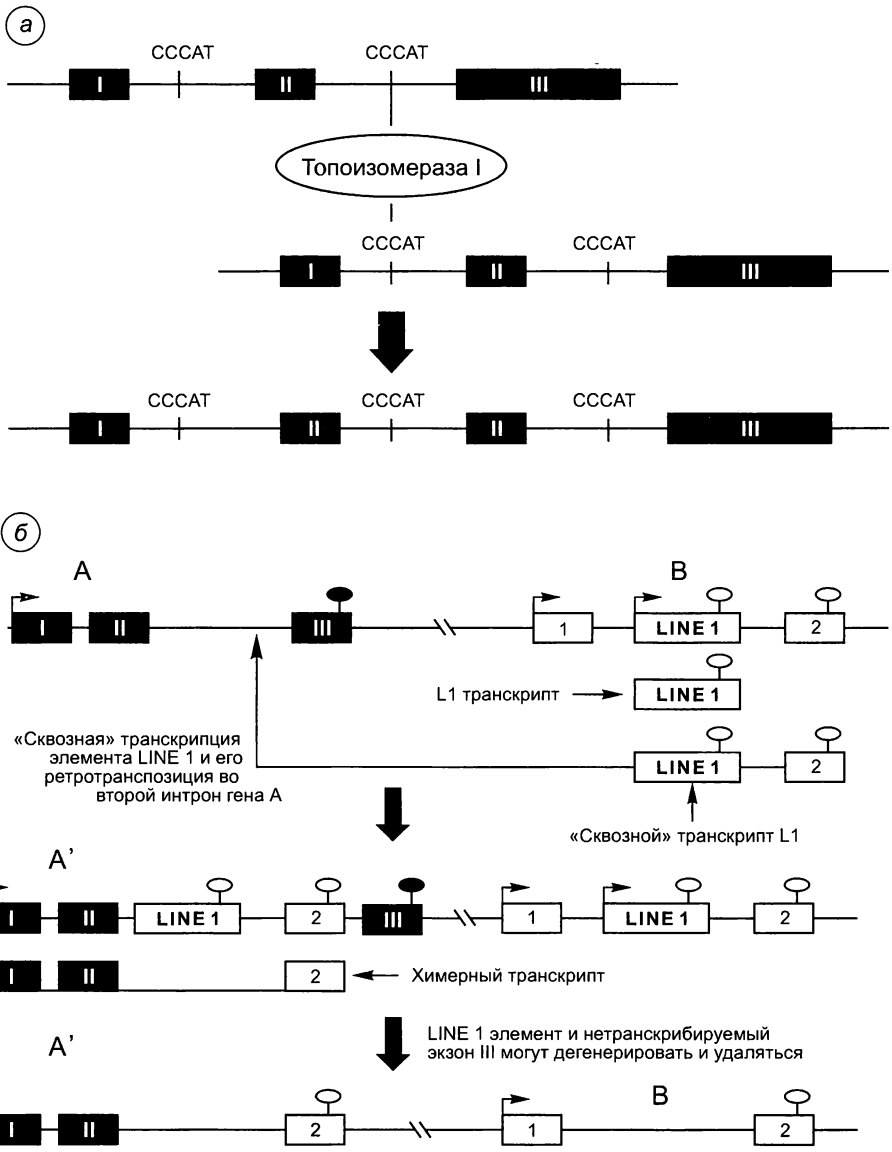


Рис. 3-7. Два возможных механизма перетасовки эксонов в генах [Инге-Вечтомов, 2004]

а – путем незаконной рекомбинации, с участием фермента – топоизомеразы 1, узнающей в генах последовательность CCCAT; *б* – более сложный способ, с помощью ретротранспозона Line 1 (L1). Пояснения – на рисунке

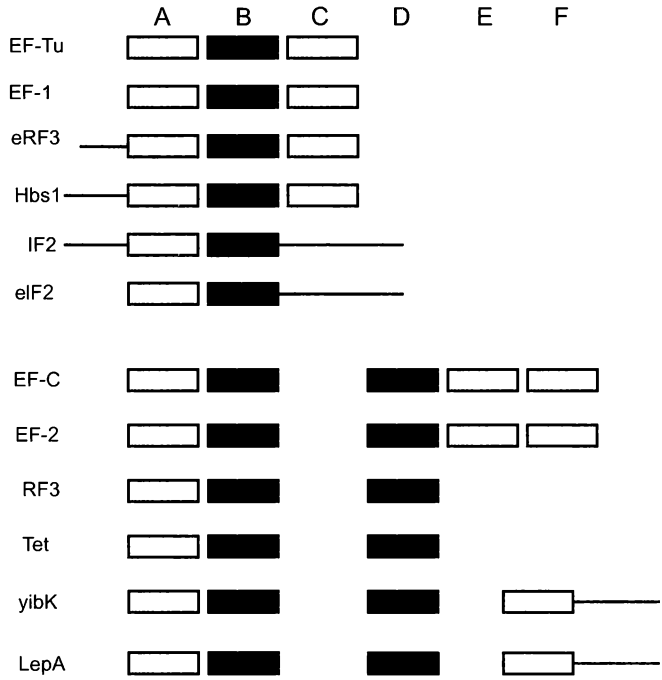


Рис. 3-8. Формирование доменной структуры различных факторов трансляции у про- и эукариот из пяти типов «материнских» доменов [Инге-Вечтомов, 2004]

При сопоставлении линий, ведущих к арабидопсису и *Brassica oleracea*, дивергировавших порядка 36 млн лет тому назад, произошло порядка 90 таких (дупликации генов) или иных (например, изменения положения генов на хромосомах) перестроек в строении хромосом.

Еще более существенные изменения мы обнаружим, если сопоставим расположение генов в хромосомах арабидопсиса и томата.

Крупным шагом в расшифровке строения геномов высших эукариот и в том числе растений было открытие, что многие (если не большинство) из их генов имеют сложную внутреннюю структуру и построены из **эксонов** (от **ЭКС**прессируемая часть цистр**ОНА**), каждый из которых несет информацию о строении части молекулы белка, кодируемого данным геном, и **интронов**, разделяющих эксоны гена (от INTervining sequences of cistRONS).

Правильнее поэтому писать «эксон», а не «экзон» (см. рис. 3-6). Доля генов в трех геномах растений, имеющих эксон-интронное строение, представлено в табл. 3-2.

Опираясь на эти представления о строении генов, был предложен и доказан экспериментально новый механизм образования генов в геномах. Оказалось, что они могут образовываться не только в результате процессов амплификации-дивергенции, но и путем обмена эксонами между разными генами. Возможные механизмы образования новых генов путем перетасовки эксонов показаны на (рис. 3-7).

Эксон-интронная структура генов не есть нечто застывшее. Длина и число как эксонов, так и интронов в генах могут изменяться. Сравните, например, структуру *PHYC*-генов [Basu et al., 2000] у риса и арабидопсиса (см. рис. 3-6).

Во многих случаях эксонам соответствуют специфические, обычно функционально нагруженные участки в третичной структуре белков, так называемые домены. В результате перетасовки эксонов могут возникать семейства белков. Так, можно представить себе, как из ограниченного числа доменов (A – F) формируется семейство ГТФ-связывающих факторов трансляции про- и эукариот [Инге-Вечтомов, 2004]. В таких случаях целесообразно сопоставлять первичную структуру ортологичных эксонов (доменов) (рис. 3-8).

Новые копии генов, возникшие в результате дупликаций и за счет действия других генетических механизмов (например, обмена эксонами), могут оказаться "лишними" для клеток. В этом случае они путем структурных перестроек постепенно переходят в разряд **псевдогенов**.

Псевдогены принадлежат к "молчащим участкам ДНК", т. е. не принимающих участие в синтезе РНК и белков. "Опасность" псевдогенов для геносистематика заключается в том, что, когда исследователь "вылавливает" из сложнейшего комплекса всех генов растительной клетки нужный ему ген, он может "поймать" вместо гена псевдоген, у которого комплементарный "удочке" участок еще не успел измениться за счет мутаций, а другие его части уже мало чем напоминают исходный ген. Определив нуклеотидную последовательность такого псевдогена и включив ее в анализируемый набор ортологичных генов других организмов, исследователь с неизбежностью получит филогенетическое дерево с ложной топологией.

Обычно псевдогены накапливают изменения в своей структуре гораздо быстрее, чем «обычные» гены, так как они находятся вне действия отбора.

Многочисленные исследования были проведены по выяснению функциональной роли той ДНК, которая не несет информации о строении структурных белков, ферментов и других обычных компонентов растительной клетки [Гиббс, 2004]. Во-первых, было выяснено, что в клетке существует сложнейшая иерархия некодирующих последовательностей ядерной ДНК, отвечающих за интенсивность работы того или иного гена (это промотеры, энхансеры и.т.д.) и за взаимодействие разных систем генов друг с другом в ходе онтогенеза (так называемые гомеотические гены). О количественном соотношении разных типов генов в хромосоме 2 арабидопсиса речь шла ранее.

Аналогичные результаты получены при анализе последовательностей в хромосоме 4 арабидопсиса. В какой-то мере эти соотношения видимо отражают долю генов каждого типа в геномах всех растений.

Кроме того, в ДНК ядер содержатся многочисленные "*спейсерные*" (разделительные) последовательности, отделяющие один ген от другого. Долгое время считалось, что они нужны лишь для правильного "процессинга" ("созревания") молекул-предшественниц мРНК, когда из длинного первичного транскрипта (информация с ДНК у эукариот нередко считывается в виде последовательностей, содержащих информацию о структуре нескольких генов) получаются пригодные для биосинтеза белка молекулы индивидуальных мРНК. В последние годы стали появляться работы, которые показывают, что они могут нести и иные функции.

Наконец, в геномах растений встречаются многочисленные гены, в структуре которых закодирована последовательность **малых РНК**, принимающих самое непосредственное участие в организации МГСУ и их функционировании [Гиббс, 2004]. Конечным продуктом активности таких генов являются не белки, а РНК. В своей работе У. Гиббс пишет о существовании «... двух глубоко запрятанных информационных слоях, влияющих на развитие организмов, наследственность и возникновение различных болезней», о неких «эпигенетических текстах». Иными словами, сегодня концепция МГСУ, разработанная В.А. Ратнером с сотр., наполняется совершенно конкретным биохимическим содержанием.

Год от года доля "нефункциональной" ДНК в клетках все уменьшалась и продолжает уменьшаться. Подробный обзор, касающихся структуры ядерных геномов растений и его молекулярных характеристик, был сделан [Dean, Schmidt, 1995; Bennetzen, 1997; Dimitry, Junakovich, 1999; Kumar, Bennetsen, 1999; Kellog, Bennetzen, 2004].

ДНК хлоропластов

До недавнего времени из-за относительной простоты строения и особенностей механизмов эволюции хлоропластные ДНК являлись излюбленным объектом исследований геносистематиков [Adachi et al., 2000].

В клетках растений хлоропласты появились путем симбиогенеза. О возможности происхождения хлоропластов от цианобактерий писали еще в XIX в. А. С. Фаминцын и К.С. Мережковский, а в XX в. эту гипотезу активно пропагандировала Л. Маргулис. Другие исследователи (Л. Богорад, Т. Кавалье-Смит) ратовали за аутогенное происхождение хлоропластов.

Первые экспериментальные доказательства правильности гипотезы Мережковского—Фаминцына появились лишь в середине 1970-х гг. Л. Бонен и Ф. Дулитл показали, что по частоте встречаемости специфических группировок нуклеотидов, образующихся под действием Т1-РНКазы, рибосомные РНК цианобактерий и хлоропластов весьма сходны (этот метод был также с успехом использован К. Везе при открытии архебактерий). Позже, в результате разработки методов секвенирования ДНК, З. Шварц и Г. Коссель показали, что первичная и вторичная структуры генов рРНК хлоропластов более сходны с генами рРНК бактерий, чем с генами рРНК ядерных генов эукариот [McFadden, 2001] (см. соотв. рисунки предыдущего раздела). Более того, в середине 1960-х гг. было обнаружено, что по своим седиментационным характеристикам рибосомы хлоропластов более похожи на бактериальные, а не на эукариотические рибосомы.

Хлоропласты разных групп водорослей имеют неодинаковое происхождение. В целом, понятие «водоросли» в последние годы наполнилось совсем новым содержанием. Молекулярно-биологическими методами и путем изучения ультраструктуры водорослей было показано, что многие их таксоны не ближе друг к другу, чем сами они к некоторым таксонам из царств животных и грибов. Исследования хлоропластов водорослей сыграли в установлении этого факта едва ли не главную роль.

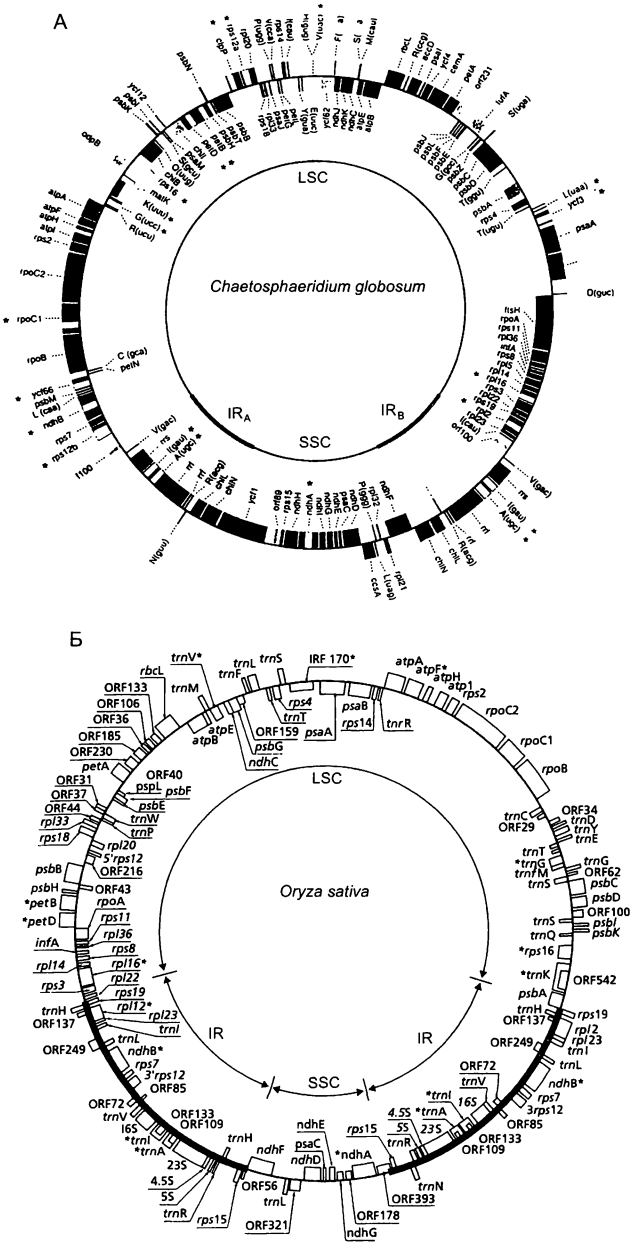


Рис. 3-9. Строение кольцевой молекулы хлоропластной ДНК у водоросли (А) и овса (Б)

У водоросли она построена из 131183, а у овса – из 134525 п.н. Обозначены входящие в состав молекул ДНК гены и многочисленные открытые рамки считывания (ORF) – неидентифицированные гены. Указаны основные составляющие молекулы: LSC – большая уникальная последовательность, SSC – малая уникальная последовательность, IR – обращенные повторы

Таблица 3-4

Свойства хпДНК высших растений и водорослей

Признак	Водоросли		Высшие растения	
	Mesostigma	*Chaetosphaeridium*	*Marchantia*	*Arabidopsis*
Размер, п.н.	118 360	31 183	121 024	154 418
A + T, мол. %%	69,9	70,4	71,2	63,7
Общее число генов	136	125	120	110

Некоторые типы хлоропластов возникли путем слияния клеток примитивных эукариот и цианобактерий, а впоследствии в некоторых филогенетических линиях такие клетки образовали новый симбиогенный организм путем слияния с клетками эукариот либо новой цианобактерии. В таких водорослях хлоропласты имеют сложное строение.

Таким путем сформировались основные таксоны современных водорослей, которые могут быть охарактеризованы как строением мембран хлоропластов, так и специфическими наборами пигментов фотосинтеза.

Из всех таксонов водорослей нас более всего интересуют зеленые водоросли, так как именно один из ныне существующих таксонов этих водорослей видимо имел общего предка с высшими растениями. Скорее всего, такой общий предок был у харовых водорослей и наземных растений. Это доказывается сходством в структуре некоторых генов и их интронов [Sanders et al., 2003].

О присутствии ДНК в хлоропластах стали предполагать с момента открытия феномена цитоплазматической наследственности [E. Baur, 1909; Hagemann, 2000], но убедительные доказательства этого были получены много лет спустя путем прямого выделения ДНК из хлоропластов, полученных методом дифференциального центрифугирования.

О структуре и свойствах хпДНК написано много обзоров (см., например, [Юрина, Одинцова, 1998; Palmer, 1985,1990; Downie, Palmer, 1992b] и более поздние работы), поэтому при изложении этих вопросов мы не будем вдаваться в подробности.

В хлоропластах ДНК локализована в так называемых **«электрон-прозрачных участках»**. В одной пластиде высшего растения содержится $\approx (1–8) \times 10^{-15}$ г ДНК (приблизительно столько же, сколько в клетке бактерий). Как и хромосомы бактерий, молекулы хпДНК высших растений и большинства водорослей имеют кольцевую форму (рис. 3-9 А, Б). На схеме показано расположение генов в кольцевых молекулах хпДНК водоросли (А) и овса (Б) и направление их считывания. Контурная длина одной молекулы хпДНК обычно составляет порядка 40 мкм. Некоторые характеристики хпДНК водорослей и высших растений приведены в табл 3-4.

Размер молекулы хпДНК зависит от вида растений. У подавляющего числа высших растений молекулы хпДНК построены из 120–217 т.п.н. [Palmer, 1987]. Контурная длина хпДНК водорослей также укладывается в эти пределы.

Например, у водорослей *Mesostigma* и *Chaetosporidium* хпДНК построены из 118-131 т.п.н., у маршанции – из 121 т.п.н , у папоротников *Asplenium nidus* и *Pteris vittata* – из 134 т.п.н., у покрытосеменных, *Nicotiana tabacum* и *A. thaliana* –

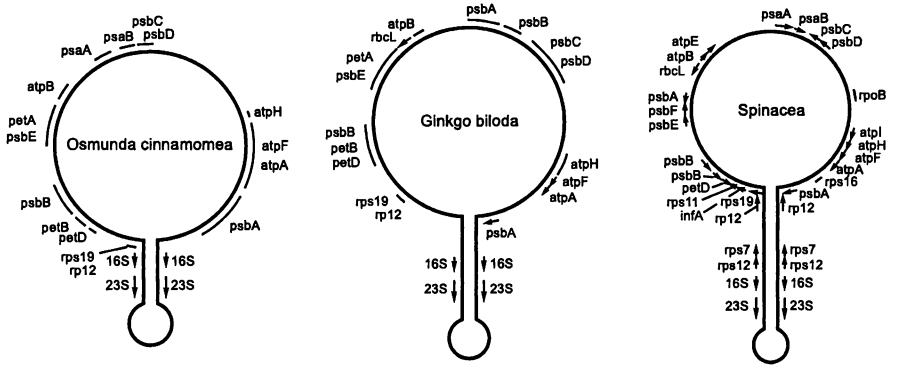


Рис. 3-10. Сходство в строении хпДНК некоторых высших растений

из 160 и 135 т.п.н., соответственно [Herrman et al., 1980; Cattolico, 1985 и др.]. Эти различия определяются в основном потерями и приобретениями генов в ходе эволюции. Изменения в наборе и числе генов специфичны для разных линий эволюционного развития растений. Результаты этих наблюдений с успехом могут быть использованы как молекулярные синапоморфии при изучении филогенеза растений (рис. 3-10).

Среди покрытосеменных самая крупная хпДНК (≈ 163 т.п.н) найдена у *Amborella trichopoda* [Goremykin et al.,2003a], а максимальное число генов (133) – в хпДНК *Calycanthus fertilis* [Goremykin et al., 2003б]. На конец 2006 г. полное строение (первичная структура) хпДНК изучена у нескольких десятков видов растений, среди которых немало культивируемых [Nishiyama et al., 2004, Jansen et al., 2006].

Преобразования размеров (контурной длины) хпДНК в ходе эволюции могут происходить довольно быстро: например, хпДНК риса по размерам отличается от хпДНК табака на 14% [Shimada, Sugiura, 1989]. Могут различаться по длине хпДНК даже в пределах одного вида растений, например, у картофеля [Кочиева, 2004; Рыжова, Кочиева, 2004]. Эти различия связаны с делецией части хпДНК длиной 230 пн в районе генов *psaA-psbD*, в результате чего в хлоропластах присутствует ДНК двух типов, T и W.

Как и яДНК, ДНК из "зрелых" хлоропластов наземных растений построена из четырех типов нуклеотидов, А, Г, Ц и Т, но в них, видимо, отсутствуют "минорные" нуклеотиды, например, 5-метилцитидиловые [Ванюшин, Огаркова, 1990], столь типичные для ядерных ДНК этих организмов. Впрочем, имеются данные, что ДНК амилопластов клена белого и хромопластов томатов достаточно сильно метилирована [Ngernprasirtsiri et al., 1988], что связывают с процессами дифференцировки пластид. Такую возможность следует учитывать при рестрикционном анализе ДНК : некоторые ферменты "не узнают" свои сайты рестрикции, если один из нуклеотидов в нем метилирован.

Всего в одном хлоропласте мезофильной клетки содержится от 20 до 200 (есть сведения, что и до 900 [Bendich, 1987] и даже тысячи, у махорки), по всем данным, практически одинаковых или очень сходных молекул. Количество хлоро-

Таблица 3-5

Скорость накопления синонимических и несинонимических замен нуклеотидов в генах хпДНК, митДНК и яДНК в ходе эволюции

Геном	Скорость накопл. синонимических замен (на сайт за 1 млрд лет)	Скорость накопления несинонимических замен
митДНК покытосеменных	0,5	0,1
хпДНК покрытосеменных:		
оба уникальных участка	1,5	0,2
больший из них	1,4	0,2
меньший из них	1,8	0,3
обращенные повторы хпДНК	0,3	0,1
яДНК покрытосеменных	5,4	0,4
яДНК млекопитающих	2,8	0,5-1,3
их митДНК	20–50	2–3

пластов в клетках высших растений зависит главным образом от условий освещенности. В клетке "типичного" листа зеленого растения их содержится 10 – 30, но иногда до нескольких тысяч. Напротив, у некоторых водорослей в клетках содержится всего по одному хлоропласту (хроматофору) длиной до 50 мкм.

Генетический потенциал хлоропласта невелик: в одной молекуле хпДНК может быть закодирована информация о структуре около сотни семантид, белков и РНК (см. табл. 3-4).

D. Palmer [1992], а впоследствии и японские исследователи, сопоставили скорость накопления синонимических и несинонимических изменений как в генах хпДНК, так и митДНК и ядерной ДНК в ходе эволюции (табл. 3-5).

Было показано, что отдельные участки хлоропластной ДНК накапливают такие изменения в ходе эволюции с разной скоростью. Это значит, что раздельный анализ эволюции таких участков может быть использован для изучения процессов филогенеза геномов на разных таксономических уровнях.

Гены хпДНК могут быть разделены межгенными спейсерами. Строение часто анализируемого в межвидовых сопоставлениях участка хпДНК, включающего гены, кодирующие рибосомные РНК, представлено на рис. 3-11.

Считается, что количество хпДНК может составлять 1–10% от суммарной ДНК клеток растений (в одном хлоропласте может содержаться несколько десятков молекул хпДНК, а хлоропластов в клетке много), так что при необходимости ее достаточно просто получить в чистом виде.

Функционирование ядерного и хлоропластного геномов тесно взаимосвяза-

Рис. 3-11. Участок инвертированного повтора хпДНК, включающей гены рРНК и разделяющие их спейсерные последовательности нуклеотидов (ITS)

Гены больших (16S и 23S) РНК и одной из малых рРНК (4,5 S) могут быть использованы для филогенетического анализа

но. Особенно это проявляется при синтезе некоторых ключевых ферментов растительной клетки. Так, меньшая из субъединиц фермента– рибулозо дифосфат карбоксилазы, *rbcS*, – важнейшего участника превращений молекул углекислого газа, синтезируется в ядре, а другая, большая, *rbcL*, – в хлоропластах.

Возникает вопрос: почему в ходе длительной эволюции хлоропласты все же сохранили свои геномы? Почему этот процесс остановился на некой стадии, когда *in vitro* изолированные из клеток растений хлоропласты более или менее длительное время существовать не могут, но упорно сохраняют часть своего генетического аппарата ?

Недавно Х. Рейс с соавт. высказали гипотезу, согласно которой некоторые структурные белки биоэнегетических мембран должны синтезироваться там, где они используются, во избежание потенциально крайне опасных побочных эффектов работы АТФ-генерирующих систем транспорта электронов [Race et al., 1999].

В эволюции гены хлоропластов неоднократно переходили в ядра [Nagley, Devenish, 1989; W. Martin, Herrman, 1998; W. Martin et al., 2002], а в самих хпДНК происходили делеции, вставки и инверсии нуклеотидных последовательностей, что объясняет различия в молекулярных весах хпДНК у разных видов [Palmer, 1990; W. Martin et al., 1998].

О процессах макроэволюции хпДНК у растений можно судить, изучая порядок расположения в них групп генов [Stoebe, Kowallik, 1999], например, генов рибосомных белков или кластера генов *atpB*. По мнению этих авторов, полученные данные свидетельствуют о том, что хлоропласты всех зеленых водорослей и высших растений монофилетичны, т.е. произошли от одной группы предковых цианобактерий.

Число генов в хпДНК может несколько различаться даже у довольно близких видов, например, риса и табака. Это говорит о достаточно высоких темпах эволюции их структур. Из этого следует, что не все гены хпДНК пригодны для сравнительного анализа. Этот вопрос изучили В. Горемыкин с соавт. [Goremykin et al., 1998]. Было показано, что для этих целей пригодны лишь $\approx 2/3$ от общего числа хлоропластных генов высших растений.

Размножаются хлоропласты, как и бактерии, простым делением. Это обеспечивает единообразие молекул хпДНК во всем организме растения. Процесс деления происходит в основном на стадии пропластид. Последние часто встречаются в делящихся тканях растений (меристемах). Считается, что процесс «онтогенеза» пластид необратим и из них постепенно и в зависимости от условий среды формируются все типы пластид растительной клетки – лейкопласты, хлоропласты, хромопласты и амилопласты. Видимо, уже пропластиды содержат «материнские» молекулы ДНК, дуплицирующиеся по мере созревания пластид, но цитологическими методами они там не обнаруживаются. Зрелые хлоропласты делятся довольно редко.

Сначала предполагали, что от родителей к потомкам структура хпДНК передается по материнской линии, но сейчас уже известны и многочисленные исключения из этого правила. В ряде таксонов хпДНК наследуется по отцовской линии, например, у многих голосеменных, у некоторых видов покрытосеменных (*Medicago sativa, Nicotiana plumbagifolia,* и др.), а иногда наблюдается смешанное наследование.

Характер наследования хпДНК обычно устанавливается путем рестрикционного анализа (см. ниже). Так, при анализе 233 родов покрытосеменных у 11%

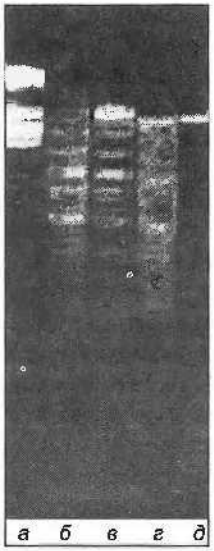


Рис. 3-12. Оригинальная фотография продуктов ферментативного гидролиза хпДНК бобовых [Амерханова с соавт., 1976], дорожка *б*, *в* и *г*). Дорожки *а* и *д* – контроли

Видно, что в результате гидролиза, в отличие от продуктов гидролиза яДНК, образуются наборы хорошо различимых фрагментов

найден только материнский тип наследования структуры хпДНК (например, у *Campanula* и *Melilotus*). Для выяснения характера наследования хпДНК разработан простой и удобный метод [Corriveau, Coleman, 1988].

Характер наследования хпДНК в каждой конкретной группе растений целесообразно учитывать при сравнительных исследованиях хпДНК, например, для выяснения происхождения культивируемых растений (картофеля, пшеницы, капусты, люцерны, и.т.п.), при изучении популяционной структуры видов, решении проблем географии растений и для иных целей систематики и филогенетики.

Резюмируя вышесказанное, отметим, что хпДНК представляет собой удобный объект исследований для геносистематики (не менее удобный, чем бактерии): если яДНК представляет собой высоко гетерогенную смесь макромолекул, а молекулы митохондриальных ДНК могут сильно различаться по размерам, то практически **все** молекулы хпДНК у подавляющего большинства видов растений имеют практически одно и то же, **видоспецифичное** строение, и кроме того они одинаковы во всех клетках разных тканей растения.

Если после гидролиза яДНК образуется очень сложная смесь фрагментов, которые при электрофоретическом разделении дают сплошное распределение фрагментов разного молекулярного веса (так называемый "*шмер*", от англ. "*smear*" – мазок). Лишь изредка на электрофореграммах отмечаются полосы, соответствующие фрагментам определенного молекулярного веса (они образуются при расщеплении ферментами высокоповторяющихся последовательностей яДНК, например, сателлитных ДНК). Напротив, в результате гидролиза хпДНК образуется дискретный набор фрагментов. Их положение и количество на электрофорезграмме образуют видоспецифическую картину («паттерн», от англ. pattern, порядок расположения), что впервые было продемонстрировано при сопоставлении переваров хпДНК бобовых [Амерханова и др., 1976]. Аналогичные данные были получены французскими, немецкими и американскими учеными на других объектах [Vedel et al., 1976; Atchison et al., 1976 и др.] (рис. 3-12).

Именно эти публикации, показавшие образование видоспецифических патернов при переваривании хпДНК эндонуклеазами рестрикции послужили основой для огромного числа работ по сравнительному анализу хпДНК с помощью набора ферментов рестрикции, из которых следовал ряд нетривиальных выводов, представляющих интерес для систематиков [Шнеер, 1991; Downie, Palmer, 1992b]. Такой способ изучения хпДНК получил название **"метод рестрикционного анализа хпДНК"** (RFLP).О сути этого метода речь пойдет далее, а с конкретными результатами, которые дает его применение сегодня, можно ознакомиться, например, по работам [Bukhari et al., 1999; Clarke et al., 2000], в которых этот метод использован для изучения филогении акаций. Удивимся, с какой смелостью эти (да и многие другие ученые) переносили результаты изучения эволюции геномов хлоропластов на эволюцию самих растений.

Первоначальный вариант *RFLP*-метода получил дальнейшие развитие: его стали использовать совместно с методом гибридизации ДНК, причем в качестве молекулярного зонда, (т.е. препарата, меченого радиоактивным изотопом), стали применять фрагменты хпДНК с хорошо изученной первичной структурой. Такие зонды получены для хпДНК, выделенных из многих видов наземных растений. Именно этим путем удалось получить обильную информацию о строении хпДНК многих растений.

Показано, что кольцевые молекулы хпДНК большинства растений содержат две протяженные повторяющиеся последовательности нуклеотидов в 20–30 т.п.н.., а иногда содержат лишь одну из них, например, хпДНК травянистых бобовых из триб Galegeae, Vicieae, Cicereae, Trifolieae, Carmichaelieae и Hedysareae, а также тропического рода *Wisteria* из трибы Miletieae (в хпДНК других изученных членов этой трибы повторы имеются). Эти отличия могут быть и неслучайными: известно, что по ряду признаков виды рода *Wisteria* сходны с теми членами трибы Galegeae, в хпДНК которых повторы есть. Иными словами, даже результаты изучения макроструктуры хпДНК уже ставят перед систематиками вопрос о естественности системы этих триб Papilionoideae.

Отсутствие одного из двух таких повторов отмечено также у части голосеменных, у лобелиевых [Knox et al., 1993] и ряда других растений. Иногда длина таких повторов существенно отличается от "стандартной" Так, у гераней найдены повторы тройной длины и множество других изменений в структуре хпДНК [Palmer et al., 1987, 1993] (рис. 3-13).

Длина повторов определяет частично различия в размерах хпДНК у растений. При этом их сложность (sequence complexity) варьирует в существенно более узких пределах (110–150 тпн). У некоторых растений в хпДНК обнаружено и небольшое число коротких повторов [Shimada, Sugiura, 1989]. Как правило, «больших» повторов всего по два и длина их в молекулах хпДНК приблизительно одинакова: это справедливо для многих зеленых водорослей, печеночников, папоротников, гинкго, гнетовых и большого числа таксонов покрытосеменных [Fluhr, Edelman, 1981; De Heij, 1983; Palmer, 1987] (рис. 3-14).

Существование двух обращенных повторов в хпДНК создает предпосылки для частых внутримолекулярных рекомбинаций между двумя частями молекул хпДНК. В результате геномы хлоропластов присутствуют в клетках в форме эквимолярной смеси двух физически различных, но генетически идентичных ин-

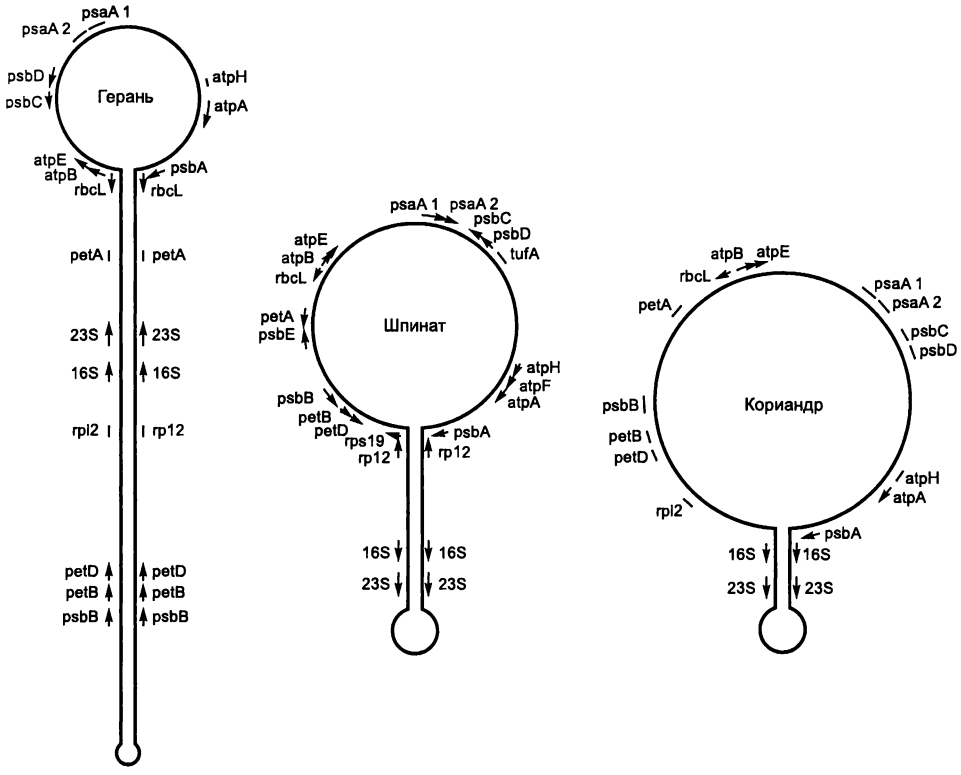


Рис. 3-13. Схема строения хпДНК некоторых видов покрытосеменных
Видно, что длина обращенного повтора у них может существенно различаться

версионных изомеров, которые различаются только относительной ориентацией уникальных участков, малого и большого.

Это обстоятельство не затрудняет работу по изучению первичных структур хпДНК и входящих в их состав генов.

"Большие" повторы в хпДНК высших растений всегда инвертированы: если гены *a*, *b*, *c* и т.п., в одном из них располагаются от 3' к 5'- концу, то в другом повторе тот же порядок расположения генов наблюдается от 5' к 3'-концу ДНК. В состав повторяющихся участков хпДНК, в частности, входят гены рРНК. В хпДНК они короче, чем в цитоплазме; их называют генами 23S и 16S рРНК. Там же имеются гены тРНК и некоторых белков.

Как было отмечено, иногда в структуре хлоропластных ДНК отсутствует один из обращенных повторов. Такая структура хпДНК встречается у бобовых, некоторых голосеменных и у ряда более просто устроенных, в том числе и одноклеточных растений. Различия в организации участка ДНК, включающего гены рРНК, в разных группах водорослей и растений представлена на рис. 3-14.

В таких «одноповторных» ДНК чаще происходят инверсии нуклеотидных последовательностей [Palmer, Thompson, 1982], т.е. их структура эволюционно ме-

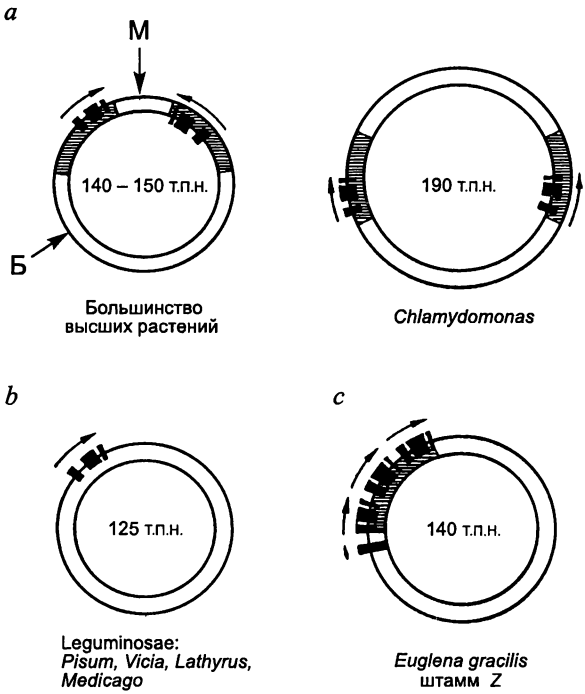


Рис. 3-14. Организация участка хпДНК, включающего гены рРНК, у разных видов водорослей и высших растений

М – малый уникальный участок; Б – большой уникал ьный участок

нее стабильна. Это обстоятельство осложняет работу исследователей эволюции хпДНК, так как приводит к неравным темпам изменения структур отдельных участков хпДНК в разных филогенетических линиях.

Исходя из структуры генетического кода было показано, что строение ряда генов хлоропластов соответствует не охарактеризованным пока белкам. Это – так называемые "открытые рамки считывания" (англ. "open reading frames", или ORF). Их положение на кольцевых картах хпДНК показано на рис. 3-9.

Расположение генов в хпДНК у разных растений имеет много общего, а в пределах таксонов ранга порядка или семейства обычно очень сходно. У однодольных встречаются случаи, когда порядок расположения генов нарушается, в основном на счет инверсий [Quigley, Weil, 1985; Howe et al., 1988; Hiratsuka et al., 1989; Olmstead, Palmer, 1994, et al.]. Длина инвертированного участка у кукурузы и пшеницы достигает 20 т.п.н, а у риса 28 т.п.н.

Вместе с тем, при сопоставлении строения хпДНК папоротника *Osmunda cinnamomea* и гингко с хпДНК семенных растений отмечено большое сходство общего плана их организации [Palmer, Stein, 1982].

Наиболее полные сведения о числе и местоположении вставок, делеций и инверсий (так называемых **инделей**) в хпДНК было получено при сопоставлении

полных первичных структур хпДНК. Весьма интересно, что ряд инделей в структуре хпДНК оказывается таксон-специфичным и характеризует структуры хпДНК филогенетически более или менее родственных групп растений [Шнеер, 1991; Downie et al., 1992b; Olmstead, Palmer, 1994; Li W.-H., 1997; Graham, Olmstead, 2000]. Анализ инделей в некодирующих последовательностях хпДНК оказался полезным для понимания начальных этапов эволюции покрытосеменных [Graham et al., 2000]. Все это еще раз подчеркивает важную роль изучения крупных изменений в структурах хпДНК для понимания механизмов ее эволюции.

Исследование порядка расположения генов в хпДНК голосеменных растений показало, что по этому признаку они несколько отличаются от покрытосеменных растений: структура хпДНК у них менее единообразна [Strauss et al., 1988].

В среднем, первичная структура хпДНК в ходе эволюции накапливает изменения медленнее, чем яДНК (см. табл. 3-4). По этой причине ее изучение дает возможность анализировать эволюционное родство генотипов растений на более высоких филогенетических уровнях. Конечно, все зависит от того, какой участок хпДНК (или яДНК) выбран для анализа. Так, медленно эволюционирующие гены рРНК из ядерных и хлоропластных ДНК пригодны для получения филогенетической информации об эволюционной истории генотипов практически во всех таксонах растений. В то же время, среди последовательностей хпДНК всегда можно выбрать такой участок, который будет давать наиболее надежные результаты на уровне классов, порядков или семейств наземных растений. Все зависит от того, какой метод анализа использует исследователь. В принципе, из яДНК (и хпДНК) могут быть выделены участки, по которым можно судить даже об индивидуальной изменчивости геномов.

Примером может служить анализ микросателлитных локусов, присутствующих как в ядерной, так и в хлоропластной ДНК [Gugerli et al., 2001]. Чувствительность этого метода в значительной степени определяется подбором праймеров. Анализ микросателлитов хпДНК нашел широкое применение при изучении многообразия культивируемых растений, например, пшениц, сои, олив, помидоров, перца, промышленно выращиваемых деревьев (эвкалиптов, сосен) и других растений [Рыжова, Кочиева, 2004; Кудрявцев и др., 2004]. Для многих культивируемых растений созданы микросателлитные генетические карты. Активно используется анализ микросателлитов и ботаниками-систематиками, особенно работающими с таксонами низших рангов.

Таким образом, вследствие относительного единообразия молекул хпДНК и их низкого молекулярного веса все операции с ней осуществлять до недавнего времени было гораздо легче, чем с яДНК. Впрочем, с разработкой методов клонирования и ПЦР эти различия в последние годы перестали играть такое важное значение. Описывать подробно методы изучения первичной структуры хпДНК в настоящей монографии вряд ли целесообразно. Ориентируясь на круг проблем, которые были изучены с помощью того или иного метода, читатель в имеющейся на этот счет литературе всегда найдет описание используемых приемов. Ссылки на методические руководства приводятся в соответствующих разделах книги.

ДНК митохондрий

В отличие от хпДНКМ, митДНК за время существования в растительной клетке претерпела существенно более глубокие изменения. Она потеряла почти все свои "прокариотные" гены и сегодня кодирует всего несколько десятков полипептидов (белков или их субъединиц, в основном, ферментов дыхательной цепи) и скромный набор рРНК: большую и малую рибосомные рРНК, которые у растений крупнее, чем, например, в митохондриях у дрожжей (15S и 21S), неполный набор тРНК и некоторые малые РНК (табл. 3-7).

В отличие от многих других митДНК, в структуре митДНК растений есть ген 5S рРНК, а 95% всех полипептидов, входящих в состав митохондрий, закодировано в ядре. Таким образом, в ходе эволюции часть генов митДНК перешла в ядерную ДНК [Nagley, Devenish, 1989; Thorness, Weber, 1996]. Процесс этот был растянутый: так, ген *cox2* видимо перешел из митохондрий в ядра уже в процессе диверсификации бобовых [Adams et al., 1999]. С другой стороны, и в геноме митохондрий могут быть гены-иммигранты из других органелл клетки [Marienfeld et al., 1999].

В последние годы появились сообщения о том, что некоторые участки митДНК способны не только мигрировать внутри клеток одного вида, но и способны к переходу в другие виды (горизонтальному переносу), нередко в виды из отдаленных таксонов. Считается, что в этом переносе могут принимать участие вирусы, бактерии, паразитирующие на растениях сосущие насекомые и грибы. Все виды-хозяева обычно близкородственны, но описан даже случай переноса части генетического материала митДНК от покрытосеменных к голосеменным (гнетуму) [Won, Brenner, 2003] и даже от мхов – в митДНК амбореллы [Bergthorsson et al., 2004]. Все эти парадоксальные факты требуют тщательной проверки.

Таблица 3-7

Свойства митДНК высших растений и водорослей

Признак	Водоросли		Высшие растения	
	Mesostigma	*Chaetosphaeridium*	*Marchantia*	*Arabidopsis*
Размер, п.н.	42 424	56 574	186 609	366 924
A + T, мол. %%	67,8	65,6	57,6	55,2
Кодирующих посл., в %%	86,6	76,3	65,0	45,5
Всего генов	65	67	69	50
Интроны группы 1	4	9	7	0
группы 2 *cis*-сплайсируемые	1	2	25	18
trans-сплайсируемые	2	0	0	5

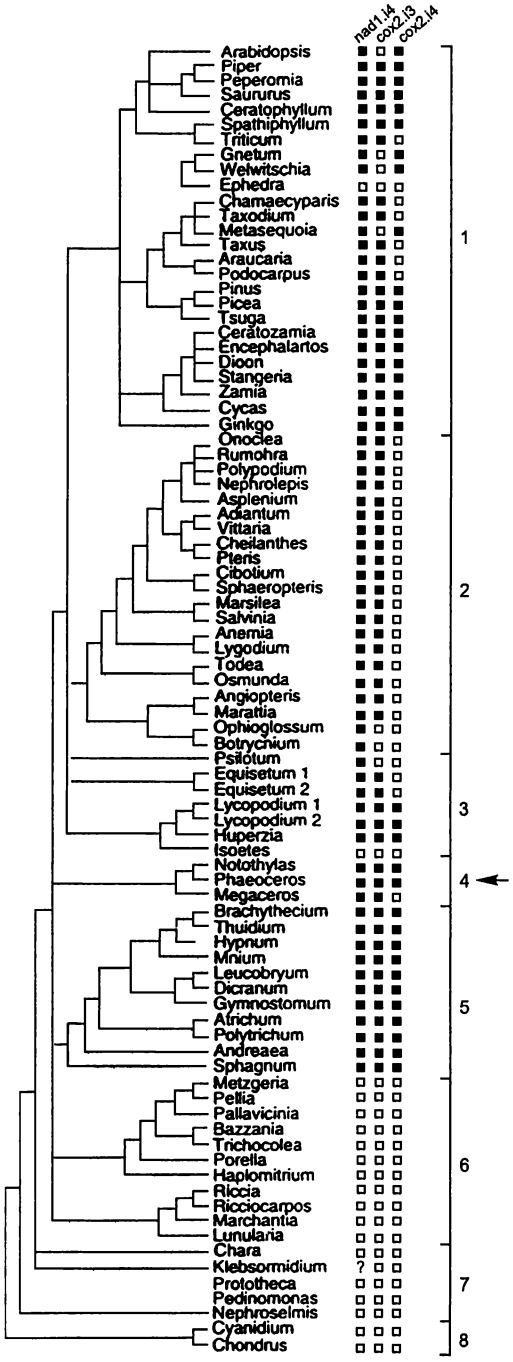


Рис. 3-15. Интроны, присутствующие (черные квадратики) или отсутствующие (белые квадратики) в трех генах митДНК водорослей и высших растений

Названия генов даны в верхней части рисунка. Видно, что интронов нет у водорослей и печеночников (белые квадратики). Одного из интронов нет у папоротниковидных. Наличие или отсутствие интронов может служить синапоморфным признаком, маркирующим крупные клады растений. Из: [Qiu et al., 1998]

Что касается «морфологии» молекул митДНК, то они, как правило, гораздо крупнее молекул хпДНК, причем существенные различия отмечены даже у близких видов [Bendich, 1985]. Так, например, у арбуза митДНК построена из ≈360 т.п.н, а у дыни – из 2500 т.п.н. Полная первичная структура митДНК известна для меньшего числа видов, чем в случае хпДНК.

Исследования митДНК у растений были начаты с определения полной первичной структуры митДНК маршанции [Oda et al., 1992]. Это одна из наиболее просто организованных митДНК высших растений. Получены данные о строении митДНК и для некоторых других высших растений, например, арабидопсиса [Unseld et al., 1997; Marienfeld et al., 1999]. У последнего митДНК построена из 366 924 п.н. и кодирует 57 генов. Исследования эти развиваются медленно: на 2004 г. первичная структура митДНК была определена всего у шести видов покрытосеменных [Bergthorsson et al., 2004].

Увеличение размеров митДНК обусловлено, в основном, сложностью (sequence complexity) ее молекул, а также различиями в длине спейсерных участков между генами. Спейсерные последовательности с легкостью импортируются в митДНК из ядер и хлоропластов. Последовательности, импортированные из хлоропластов, могут составлять до 10% всех последовательностей митДНК. Ядерные последовательности, видимо, импортируются реже. Наиболее подробно соотношение нативных и импортированных последовательностей изучено для арабидопсиса [Marienfeld et al., 1999.]

Есть в составе митДНК и разнообразные повторяющиеся последовательности. Таким образом, по своей организации молекулы митДНК высших растений скорее ближе к ядерной, чем к хлоропластной ДНК. Они обычно имеют форму кольца, причем количество колец на митохондрию у разных видов варьирует. Одно из колец – главное (master chromosome), а другие образуются в основном за счет рекомбинационных процессов. Общее число их у разных видов неодинаково. Причины этого разнообразия до сих пор окончательно не выяснены. Есть в составе митДНК и линейные молекулы, а также плазмидоподобные элементы [Schuster, Brennicke, 1994].

Бедный набор генов и сложный характер эволюции не позволяют широко использовать митДНК для целей геносистематики. В целом митДНК растений эволюционирует очень медленно. По-видимому, первыми исследовали гены митДНК для изучения филогении растений Р. Хизель с соавт. [Hiesel et al., 1994]. Позднее появилась работа [Pesole et al., 1996], в которой для этих целей были изучены так называемые редактируемые и нередактируемые участки митДНК. И. Киу с соавт. исследовали встречаемость трех интронов в генах митДНК (*nad1. i4, cox2. i3 и cox 2. i4*) и показали, что на этом основании можно судить о самых ранних этапах эволюции высших растений [Qiu et al., 1998] (рис. 3-15).

Интересные данные, касающиеся эволюционной истории бриофитов, были получены при изучении митохондриального гена *nad5* [Steinhauser et al., 1999]. Результаты исследования другого гена *nad1B* у представителей сем. Polemoniaceae приводятся в работе [Porter, Johnson, 1998]. К филогенетическим выводам из этих работ надо относиться с осторожностью: существуют выраженные различия в топологии деревьев, построенных по разным генам [Bergthorsson et al., 2004].

Сопоставление структуры 19S рРНК митохондрий у достаточно большого числа видов высших растений позволило установить [Duff, Nickrent, 1999], что она, по мнению авторов, несет в себе больше филогенетической информации, чем ее гомологи в ядрах и хлоропластах. Отметим, что построенные авторами филогенетические деревья не совсем сходны с опубликованными по результатам исследования других семантид, особенно это касается антоцеротовых мхов.

Заключение

Какое же общее заключение мы можем сделать из этого неполного описания генотипа растений ? Наиболее важное для нас наблюдение заключается в том, что в результате постоянно идущего обмена генетической информацией (миграции генов и других участков ДНК) и, несмотря на существующие различия в скорости накопления изменений в структурах ядерной, хлоропластной и митохондриальной ДНК, есть все основания думать, что структуры этих ДНК в значительной мере **коэволюционируют**. Из этого следует важный вывод: для целей геносистематики (с некоторой,но, видимо, достаточно высокой долей достоверности) можно изучать ДНК из любого клеточного компартмента (ядер, хлоропластов и митохондрий). Очевидно также, что ценность результатов изучения эволюции какой-то отдельной последовательности, в зависимости от цели исследования, всегда неодинакова, но тем не менее они могут оказаться полезными, особенно, если будут рассматриваться в ряду данных об аналогичных изменениях других последовательностей ДНК.

МЕТОДЫ ГЕНОСИСТЕМАТИКИ

Объекты исследования

Рассмотрим прежде всего вопрос о том, с каким исходным материалом целесообразнее работать геносистематикам. Основные усилия сегодня сконцентрированы на изучении эволюции семантид растений и некодирующих последовательностей ДНК.

Чтобы избежать ошибок при реконструкции эволюции семантид, всегда необходимо помнить о возможной **внутривидовой изменчивости их структур,** не говоря уже об особенностях строения МГСУ. Это означает, что в публикуемых работах необходимо представлять сведения о том, где был взят материал для анализов. Главным образом это касается исследований генотипов у представителей низших таксонов.

Простейшие исследования геносистематиков начинаются с выделения препаратов нуклеиновых кислот (ДНК или РНК) или белков из подлежащих анализу растений. Первоначально основная масса сведений поступала от исследователей ДНК и РНК [Мирошниченко, Дьяченко, 1981].

В клетках растений подавляющая часть ДНК и РНК образует комплексы с белками, которые необходимо разрушить (диссоциировать). После этого из сложной смеси веществ растительной клетки надо выделить лишь один класс соединений – нуклеиновые кислоты – а затем, в зависимости от целей эксперимента, его отдельные компоненты.

Проще всего это сделать, переведя другой класс семантид – белки – в нерастворимую форму (денатурировать их). Для этого обычно используют фенол или смесь хлороформа и изоамилового спирта. К лизированным клеткам или тщательно измельченным (обычно – в жидком азоте) тканям добавляют денатурирующий агент, и смесь некоторое время интенсивно встряхивают. С помощью центрифугирования смесь делят на три фракции: верхнюю водную фракцию, фракцию денатурированных белков и фенольную (или хлороформную) фракцию. К водной фазе добавляют 2–3 объема этанола и осаждают из раствора нуклеиновые кислоты, после чего (если это необходимо) отделяют ДНК от РНК. Можно идти и другим путем: после диссоциации комплексов к смеси добавляют соединения (например, цетилтриметил аммоний бромид, ЦТАБ), образующие с нуклеиновыми кислотами специфические соединения. Последние также отделяют, затем диссоциируют и, в конечном счете, получают чистые препараты нуклеиновых кислот.

Выделение препаратов индивидуальных белков из растений представляет собой несравненно более сложную задачу. Универсальных подходов здесь не существует, и практически для каждого индивидуального белка требуется свой комплекс методов выделения. **Сегодня гораздо проще выделить ген (участок ДНК), кодирующий тот или иной белок, чем сам белок.** Используя генетический код, можно реконструировать аминокислотную последовательность белка, соответствующего данному гену. Таким образом, определив первичную структуру гена, мы при его анализе получаем практически столько же филогенетической информации, сколько и при изучении белка. По этой причине методы выделения индивидуальных белков мы рассматривать не будем.

Для анализа нуклеиновых кислот можно использовать как свежесобранный, так и гербарный материал [Savolainen et al., 1995; Doyle, Doyle, 1987], причем «возраст» такого материала, конечно же, сказывается на успешности выделения: и нуклеиновые кислоты, и белки со временем деградируют, их структуры необратимо изменяются. Тем не менее, короткие фрагменты нуклеиновых кислот иногда удается выделить даже из археологического материала, например, из семян пшеницы, взятых из гробниц фараонов (и из мумий фараонов тоже).

Понятно, что для проверки достоверности выводов геносистематики было бы интересно изучить структур семантид у вымерших видов, которые условно соответствуют «узлам» на филогенетических деревьях, которые строят геносистематики.

Такие попытки предпринимались. Так, в литературе появлялись сообщения о выделении фрагментов ДНК из листьев миоценовой магнолии [Golenberg et al., 1987], болотного кипариса [Soltis et al., 1987], одного из видов таксодиевых [P. Soltis et al., 1992] и некоторых других ископаемых видов.

Проведенные позже исследования показали, что достоверность полученных этими авторами результатов скорее всего невелика.

На методические огрехи таких исследований указано в работе [Sykes, 1997]. Отмечено, что говорить о сохранности даже мелких фрагментов ДНК в материале старше 100.000 лет невозможно. Того же мнения ранее придерживался и Хосс [Hoss, 1994]. Об условиях грамотного проведения экспериментов с ископаемым материалом была опубликована специальная статья [Cooper, Poinar, 2000].

Таким образом, из мумии фараона, растений из гербария, собранного Линнеем, или даже костей неандертальца [Ovchinnikov et al., 2000], можно выделить отдельные фрагменты ДНК (как правило, анализируют мтДНК), но из костей динозавра -- уже невозможно, хотя об этом писалось в журнале "Science" [Woodward et al., 1994].

Неоднократно сообщалось о выделении ДНК из трупов мамонтов, пещерных медведей и других животных останков плейстоценового возраста. Из их желудков извлекались идентифицируемые растительные останки [Greenwood et al., 1999; Paabo, 2000] . Похоже, что это данные надежные: относительная сохранность таких объектов обеспечивается вечной мерзлотой. Если материал содержался в дегидратированном состоянии, без доступа кислорода (как, например, в янтаре), то срок его относительной сохранности увеличивается, но незначительно.

Вернемся, однако, к образцам растений, которые чаще всего анализируют геносистематики. В полевых условиях высушивание растений для последующего анализа лучше всего проводить при помощи силикагеля [Chase, Hillis, 1991];

можно фиксировать образцы растений этиловым спиртом (конечная концентрация не ниже 60%) или просто высушивать их «старым дедовским способом».

Выделение препаратов нуклеиновых кислот из свежесобранных растений можно проводить по методу, описанному в работе [Doyle, Doyle, 1987], но используются и другие приемы [Сазонова и др., 2001].

Желательно, чтобы в лаборатории исследователей сохранялась часть растений, использованных для анализа (например, гербарий изучаемых видов, либо образцы растений, сохраненные в низкотемпературном холодильнике или в спирте). Такой материал можно использовать для повторного определения видовой принадлежности препаратов нуклеиновых кислот, что особенно необходимо, если результаты анализов сильно расходятся с представлениями ботаников. В случае несовпадения данных, полученных в разных лабораториях при изучении одного и того же фрагмента генома у одного и того же вида растений одним и тем же методом, можно будет установить, кто ошибся при определении вида растений. Справедливо это и при анализе белков растений.

Обычно для определения видов растений геносистематики прибегают к услугам квалифицированных ботаников, либо используют этикетированный коллекционный материал. Ошибки на этом этапе работы обычно возникают, когда анализируются такие «сложные» роды как манжетки, одуванчики, малины и.т.п., где сами ботаники не выработали еще общепринятых критериев вида . Здесь возможны существенные расхождения в построениях фено- и геносистематиков [см., например, Kirschner et al., 2003]. Сложности могут возникать при анализе любых растений с бедной морфологией, например, рясок, или некоторых одноклеточных водорослей, которых трудно определять до вида.

Если при выборе исходного материала для исследований будут допущены небрежности в определении, то виды на заключительных кладограммах будут занимать неподобающее место, что вызовет справедливые возражения ботаников.

Важное значение имеет репрезентативность выборок видов из изучаемых таксонов [Lecointre et al., 1993; Judd et al., 1999; Wiens, Servedio, 2000 ; Rydin, Kallersjo, 2002]. Неравновесность выборок может сказаться на конечном результате и исказить топологию построенного филогенетического дерева или же, например, привести к неверным выводам о популяционной структуре видов, истории формирования локальных флор, и.т.п.. Конечно, если среди сопоставляемых групп есть монотипические таксоны, например, гинкговые, то наши возможности ограничены одним видом. Такая же ситуация может сложиться с другими монотипическими таксонами, но молекулярные исследования могут в конечном счете и не подтвердить их изолированного положения. В этом, в частности, заключается одно из достоинств геносистематики. Особенно опасно сопоставлять результаты, полученные при изучении солидных выборок из одного таксона, и недостаточных – из другого, между которыми проводятся сопоставления. На практике это может приводить к искажениям в топологии филогенетических деревьев, например, за счет так называемого “long branch attraction” (взаимопритяжению длинных ветвей дерева) и неверным выводам. Подробнее мы рассмотрим этот феномен при обсуждении методов компьютерного анализа полученных биохимических данных.

В случае таксонов, включающих много видов, для оценки объема выборки, достаточной для вынесения обоснованных суждений, недавно предложен уни-

версальный статистический метод, пригодный для использования как в фено-, так и в геносистематике [Wiens, Servedio, 2000].

Генетический текст

Как уже было отмечено выше, объектом исследований геносистематики является генотип клеток, формирование фенотипа происходит путем реализации информации, хранимой в ДНК клеток. По этой причине частичные, но важные сведения о строении генотипа мы можем получить, даже изучая только структуру ДНК.

Исторически первыми стали несколько упрощенные, но достаточно эффективные подходы к изучению семантид (общее название макромолекул, несущих генетическую информацию). Это так называемые статистические методы геносистематики [Бородовский, Певзнер, 1990], позволяющие оценить особенности организации ДНК, РНК и белков организмов.

Для геносистематики особый интерес представляют результаты применения статистических методов исследования ДНК, так как они позволяют получить некоторые интегральные характеристики генотипов. Наряду с ними сегодня используются многочисленные методы, основанные в конечном счете на определении нуклеотидных последовательностей изучаемого фрагмента ДНК или всей ДНК клетки.

Сравним носитель генетической информации – ДНК – с книгой, или даже целой библиотекой, представляющей собой линейную последовательность символов кода (букв). Мы можем сопоставлять и подразделять (систематизировать) такие книги ДНК, определяя частоту встречаемости в них отдельных букв алфавита и их сочетаний. В случае ДНК задача усложняется: во всех «книгах» (организмах) алфавит будет бедным и одинаковым (А, Г, Ц и Т). Остается определять частоту встречаемости этих букв, пар соседствующих нуклеотидов (АА, ГЦ, ТА и т.п., всего 16 пар), триплетов и более крупных сочетаний нуклеотидов.

В последующем мы можем оценить, какова средняя длина групп букв алфавита в книге (слов≈ генов), разделенных пробелами, и пределы варьирования этого признака, какие символы, не принадлежащие к алфавиту, в ней использовались (например, знаки пунктуации, математические символы, химические формулы и.т.п) и множество других характеристик текста.

Наконец, выделив из всего многообразия фрагменты с некой характерной структурой (например, несущие молекулярные признаки определенных генов), мы можем узнать их нуклеотидную последовательность и сопоставлять последовательности из разных организмов.

Известно, что сложность строения ДНК (= генетических текстов) высших организмов велика. Чем сложнее устроен организм, тем больше ДНК необходимо для кодирования его наследственной информации. В ходе эволюции увеличивалось содержание ДНК в самых разных линиях эволюционного развития эукариот.

Содержание ДНК в клетках высших эукариот и, в частности, высших растений очень высокое (см. табл. 3-3), что создает большие трудности в ее изучении.

Если оценить объем информации, хранимой в минимальном по объему геноме высшего растения (порядка 1 пкг, или 125 млн пар нуклеотидов), то окажется, что она сопоставима с объемом информации, хранимой в солидной библиотеке.

Отметим, что применение **любого из** методов сопоставления текстов ДНК, начиная от простейших, может давать информацию, которая используется для понимания особенностей строения ДНК у разных организмов и выяснения путей ее эволюции.

Биохимические и молекулярно-биологические методы изучения семантид растений

Сегодня в распоряжении геносистематиков есть молекулярно-биологические и биохимические методы, позволяющие вести сопоставления генотипов любых организмов на самом разном уровне, от индивидуальных организмов, отдельных видов и вплоть до самых высоких таксономических категорий.

Молекулярно-биологические методы исследования ДНК, РНК и белков, активно используемые сегодня геносистематиками, можно подразделить на две основные группы: назовем их условно «статистическими методами» и «методами, основанными на изучении последовательностей мономеров в семантидах (ДНК, РНК и белках)».

В группу **статистических методов** входят различные методы определения частот встречаемости отдельных классов мономеров в изучаемых полимерах-семантидах, например, методы определения нуклеотидного состава ДНК и РНК.

В эту же группу входят и методы определения частот встречаемости специфических коротких группировок мономеров, например, пар соседствующих нуклеотидов в ДНК, либо группировок нуклеотидов, образованных только пуриновыми или же пиримидиновыми нуклеотидами, либо более сложные комбинации [Бородовский, Певзнер, 1990; Karlin, Burge, 1995].

Сюда относится и метод гибридизации ДНК, который позволяет дать интегральную оценку сходства геномов или его отдельных фракций [Вальехо-Роман, 1980].

Первые надежные методы определения нуклеотидного состава нуклеиновых кислот были предложены еще в конце сороковых годов прошлого века. Ведущую роль в их разработке сыграли труды лаборатории Э. Чаргаффа (США) [Chargaff, 1951. Им были сформулированы правила **(правила Чаргаффа)**, согласно которым содержание А-нуклеотидов в двуцепочечных ДНК (таких ДНК – подавляющее большинство, но некоторые вирусы в составе вирионов имеют одноцепочечную ДНК) всегда равно содержанию Т-нуклеотидов, а содержание Г-нуклеотидов – содержанию Ц-нуклеотидов (А = Т и Г = Ц). Это так называемые «комплементарные пары нуклеотидов», из которых слагается структура ДНК. Кроме того, ДНК содержат в равном количестве пуриновые (А + Г) и пиримидиновые (Ц + Т) нуклеотиды. Разные ДНК могут отличаться друг от друга по содержанию и взаиморасположению комплементарных пар нуклеотидов (А=Т или Г=Ц), находящихся в противолежащих цепях ДНК. Проще всего охарактеризовать состав

ДНК, определив в ней молярную долю пар нуклеотидов. Состав ДНК обычно выражают в молярных процентах содержания Г + Ц (или, реже, А + Т) пар нуклеотидов.

У высших растений состав «тотальной» (всей клеточной) ДНК в среднем составляет 40% ГЦ и варьирует приблизительно от 30 до 50 мол. % ГЦ, а иногда и выходит за эти пределы. В основном он отражает состав яДНК. Так, в такой ДНК злаков доля ГЦ-пар нередко превышает 50 мол. %. Анализ небольшой выборки водорослей показал, что доля ГЦ-пар нуклеотидов в их ДНК варьирует от 65 до 45 мол. % [Пахомова, 2002], но реальные границы шире. Для бактерий разработан метод, который позволяет определять долю ГЦ-пар в ДНК даже без ее выделения из клеток [Sanders et al., 1990]), и в принципе он может быть применен при работе с культурами клеток растений и одноклеточными водорослями.

Как уже было отмечено, помимо четырех «основных», в ДНК и РНК могут содержаться и **минорные** (относительно редко встречающиеся) основания, главным образом 5-метилцитозин.

В ДНК разных групп высших растений количественное содержание 5-метилцитозина (5-МЦ) может сильно отличаться, вплоть до практически полного его отсутствия. У водорослей содержание 5-МЦ не превышает 4 мол.%. Они также содержат метилированные производные аденина (6-МАП, 6-ДМАП)) [Пахомова, 2000], которые встречаются иногда и в ДНК высших растений. Такие различия в составе могут быть использованы для грубой дифференциации ДНК разного происхождения.

Далее, в нуклеиновых кислотах мы можем определять частоту встречаемости пар соседствующих нуклеотидов (пар АГ, ЦТ(У), ГГ, и.т.п., всего 16 возможных пар). Если мы характеризуем структуру ДНК не по частоте встречаемости четырех нуклеотидов, а по частоте встречаемости шестнадцати их пар, то можно производить более тонкую дифференциацию таксонов по этим признакам [Бородовский, Певзнер, 1990; Karlin, Burge, 1995].

Например, частота встречаемости пар ГЦ и ТА в геномах высших животных и растений оказалась ниже статистически ожидаемой, а у бактерий частота встречаемости пары ГЦ – выше ее. У прокариот АА встречается чаще, чем АТ, ГЦ чаще чем ЦА, а ТГ – чаще, чем ТА. В целом у 88 проанализированных видов прокариот частота встречаемости пары ГЦ > АТ > ГТ > ТА, а у эукариот ГГ > ГЦ > ГТ > ТА > ЦГ.

Для любого крупного таксона характерны свои отклонения в частотах встречаемости пар нуклеотидов от статистически ожидаемых частот. Р. Нусинов назвал такие отклонения «дуплетными характеристиками» (doublet rules) каждого таксона (табл. 4-1). В тех редких случаях, когда неясно, к какому таксону относится исследуемый организм, такая характеристика может быть использована для предварительной его идентификации.

О возможностях простейшего из этих методов – метода определения частот встречаемости мономеров в семантидах – можно составить себе представление из уже упоминавшейся аналогии. Представим себе, что мы не знаем русского языка, а нам нужно разобрать научную, техническую и художественную литературу. Такой молекулярно-лингвистический подход вполне правомерен [Миронов, 1990; Ратнер. 1993].

Определим для начала частоту встречаемости букв русского алфавита в изучаемых текстах. Вряд ли по этому признаку мы сможем четко разделить художест-

Таблица 4-1

Частота встречаемости пар и триплетов нуклеотидов в ДНК эукариот (А) и прокариот (Б)

А

AA	17,431	AC	11,726	AG	15,317	AT	13,885
CA	15,531	CC	13,417	CG	5,746	CT	15,827
GA	14,346	GC	11,963	GG	14,198	GT	11,324
TA	11,047	TC	13,440	TG	16,532	TT	16,344
AAA	5,6865	AAC	3,203	AAG	4,584	AAT	3,939
ACA	3,848	ACC	3,020	ACG	1,348	ACT	3,494
AGA	4,579	AGC	3,610	AGG	4,184	AGT	2,921
ATA	3,095	ATC	3,011	ATG	3,883	ATT	3,882
CAA	4,220	CAC	3,216	CAG	4,500	CAT	3,570
CCA	4,013	CCC	3,6111	CCG	1,670	CCT	4,089
CGA	§,371	CGC	1,469	CGG	1,613	CGT	1,280
CTA	2,602	CTC	3,841	CTG	5,366	CTT	3,980
GAA	4,301	GAC	2,889	GAG	4,162	GAT	2,968
GCA	3,576	GOC	3,162	GCG	1,359	GCT	3,839
GGA	4,043	GGC	3,344	GGG	3,604	GGT	3,174
GTA	2,140	GTC	2,649	GTG	3,681	GTT	2,838
TAA	3,183	TAC	2,399	TAG	2,048	TAT	3,400
TCA	4,076	TCC	3,606	TCG	1,347	TCT	4,368
TGA	4,307	TGC	3,521	TGG	4,747	TGT	3,935
TTA	3,196	TTC	3,913	TTG	3,580	TTT	5,622

Б

AA	4,178	AC	2,938	AG	2,858	AT	3,149
CA	3,149	CC	2,881	CG	3,837	CT	3,003
GA	3,383	GC	4,061	GG	3,269	GT	3,231
TA	2,383	TC	2,994	TG	3,977	TT	3,493
AAA	1,380	AAC	995	AAG	985	AAT	814
ACA	686	ACC	803	ACG	790	ACT	658
AGA	719	AGC	928	ACG	621	AGT	588
ATA	504	ATC	905	ATG	900	ATT	815
CAA	813	CAC	660	CAG	974	CAT	700
CCA	726	CCC	526	CCG	1,007	CCT	619
CGA	894	CGC	1,083	CGG	903	CGT	953
CTA	397	CTC	545	CTG	1,416	CTT	643
GAA	1,209	GAC	703	GAG	583	GAT	882
GCA	951	GCC	895	GCG	1,246	GCT	966
GGA	642	GGC	1,021	GGG	635	GGT	966
GTA	732	GTC	672	GTG	851	GTT	971
TAA	768	TAC	575	TAG	312	TAT	726
TCA	784	TCC	654	TCG	790	TCT	759
TGA	1,119	TGC	1,026	TGG	1,106	TGT	723
TTA	750	TTC	872	TTG	806	TTT	1,062

венную и научно-популярную литературу, но вот книги по фотографии, философии или фортификации заведомо образуют отдельную группу, так как в них с

очень высокой частотой будет встречаться буква Ф (в то же время, говорят, во всей пушкинской «Полтаве» буква Ф встречается всего один раз !).

Иными словами, из всего многообразия текстов нам удастся выделить тексты, существенно отличающиеся по частоте встречаемости одного или нескольких символов кода. При этом они отличаются и по своему содержанию, т.е. их состав «видоспецифичен».

Конечно, на практике возможности такого подхода для дифференциации организмов весьма ограничены. Состав ДНК (в мол.% ГЦ) реально возможно определять с точностью не выше 0,1%. Если состав (как в случае покрытосеменных) варьирует в пределах 30 –50% ГЦ, то это означает, что по этому признаку мы сможем различить не более 200 видов – величина ничтожная по сравнению с их биоразнообразием. Тем не менее, этот метод неоднократно и с успехом применялся для выявления искусственных, ошибочно выделенных группировок организмов, включавших, помимо сходных по составу, резко отличающиеся по этому признаку виды (см. далее результаты опыта А.Н. Белозерского и др.).

С другой стороны, сходство по частоте встречаемости индивидуальных символов кода нужно использовать с осторожностью. В рассматриваемом выше случае в одну группу попали столь разнородные книги (по философии, фотографии и фортификации), что сразу же позволяет сформулировать первое правило геносистематики: **сходство по составу семантид есть необходимый (все книги по фотографии, философии и фортификации имеют приблизительно одну частоту встречаемости буквы Ф), но не достаточный признак эволюционной близости организмов**. Из одного и того же набора букв можно составить множество разных слов, которые будут отличаться по **последовательности** символов кода. С другой стороны, большие различия в частоте встречаемости символов кода однозначно говорят о глубокой дивергенции сопоставляемых форм.

Можно также определять частоту встречаемости специфических блоков пуриновых или пиримидиновых нуклеотидов разной длины, так называемых «изоплитов» (например, одиночных пуриновых нуклеотидов А и Г, у которых с двух сторон в цепи ДНК стоят пиримидиновые нуклеотиды), их парных сочетаний (АА, АГ, ГА, ГГ) и более длинных олигонуклеотидов (например, ААА, ААГ, АГА, и.т.п.) (см. табл. 4.1). С помощью этого метода можно проводить весьма сложные сопоставления. Ведь, по сути дела, этот метод столь же чувствителен, как и тот метод, который был использован К. Везе при открытии архебактерий (см. далее).

В приведенном выше примере мы легко разделим выделенную группу книг на три составляющих, если определим в них не частоту встречаемости буквы Ф, а частоту встречаемости сочетания пар символов кода (пар букв ОФ, ИФ и АФ) – филосОФия, фортИФикация и фотогрАФия. Чем длиннее сопоставляемые последовательности, тем выше разрешение метода.

Аналогичные исследования могут быть выполнены и с белками. Статистический анализ может быть проведен после определения полной первичной структуры изучаемого белка.

Конечно, эти методы дают нам весьма скудную информацию о строении семантид и, как правило, не позволяют различать семантиды, происходящие, например, из разных, но близких видов или даже более крупных таксонов ранга рода или семейства. Тем не менее, даже с их помощью был сделан ряд интересных наблюдений.

Таблица 4-2

Матрица сходства наборов олигонуклеотидов, полученная при сопоставлении ДНК высших растений и позвоночных животных по методу, впервые описанному К. Везе для микроорганизмов

Организм	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. *Nicotiana tabacum*		0,89	0,87	0,85	0,74	0,67	0,60	0,33	0,26,	0,17
2. *Galium mollugo*	0,89		0,87	0,85	0,73	0,66	0,60	0,33	0,26	0,18
3. *Catharanthus roseus*	0,87	0,87		0,84	0,77	0,66	0,63	0,35	0,26	0,18
4. *Ruta chalepensis*	0,85	0,85	0,84		0,77	0,66	0,60	0,32	0,25	0,17
5. *Dioscorea composita*	0,74	0,73	0,77	0,77		0,65	0,63	0,32	0,27	0,18
6. *Lemna minor*	0,67	0,66	0,66	0,66	0,65		0,54	0,31	0,25	0,18
7. *Abiea grandis*	0,60	0,60	0,63	0,60	0,63	0,54		0,32	0,27	0,16
8. *Xenopus laevis*	0,33	0,33	0,35	0,32	0,32	0,31	0,32		0,27	0,16
9. *Saccharomyces cerevisiae*	0,26	0,26	0,26	0,25	0,27	0,25	0,27	0,27		0,15

Так, Везе с сотр. [1987] обрабатывали ферментом, Т1-РНКазой препараты меченой фосфором 18S рРНК, в результате чего получали смесь олигонуклеотидов с Г-нуклеотидом на 3′-конце. Частота встречаемости таких продуктов гидролиза определялась распределением Г-нуклеотидов вдоль по цепи РНК.

Смесь олигонуклеотидов разделяли в двумерной системе хроматографией (или хроматографией и электрофорезом), и определяли последовательности ну-

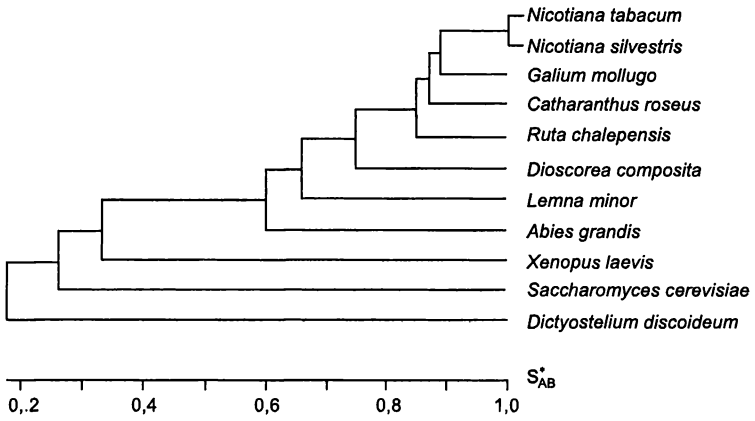


Рис. 4-1. Дендрограмма, отражающая родство видов, представленных в табл. 4-2, построенная исходя из матрицы величин коэффициента S_{AB}

клеотидов в каждом из индивидуальных олигонуклеотидов с длиной цепи более 6. Затем создавали каталоги олигонуклеотидов для каждого изученного вида и сопоставляли их, вычисляя коэфициент S_{AB}.

$$S_{AB} = \frac{2N_{AB}}{N_A + N_B},$$

где N_{AB} – число общих олигонуклеотидов у сравниваемых видов, а N_A и N_B – число всех олигонуклеотидов, полученных в гидролизатах видов *A* и *B*. При этом короткие фрагменты длиной до шести нуклеотидов не учитывались, а сопоставлялись целые «слова» генетических текстов. В таких опытах далее строят матрицу сходства (табл. 4-2) и на этой основе – дендрограммы сходства (рис. 4-1).

Различные по строению «слова» в опыте Везе однозначно свидетельствуют о том, что семантиды происходят из разных организмов (тематика книг различна). Чем больше различия в частотах, тем дальше друг от друга дивергировали организмы.

Давно известно: если две сопоставляемые ДНК (эти оценки были даны для бактерий) отличаются друг от друга по содержанию ГЦ-пар нуклеотидов более чем на 10 мол.%, то у таких ДНК вряд ли есть много сходных протяженных нуклеотидных последовательностей, например, генных, кодирующих белки. Иными словами, это далеко дивергировавшие формы.

Понятно, что это чисто статистическая оценка, и некоторые гены из-за особенностей их эволюции могут сохранять сходство и у очень отдаленных организмов (например, гены рРНК).

Отметим, что на самом деле (из-за вырожденности генетического кода) последовательности нуклеотидов, кодирующие гомологичные белки, могут заметно отличаться по нуклеотидному составу, но в принципе вывод Н. Суеока был правильным: чем больше различия в составе ДНК, тем выше вероятность того, что сопоставляемые организмы далеко дивергировали друг от друга.

Определение количественного состава мономеров у семантид было с успехом реализовано уже в самых первых работах в области геносистематики.

Вот лишь один пример: в конце 1950-х гг., исследовав состав ДНК у ряда бактерий, среди которых были многочисленные представители «кишечной группы» (возбудители брюшного тифа, дизентерии, кишечная палочка), А.Н. Белозерский с соавт. [1960]обнаружили, что одна из этих бактерий, *Proteus vulgaris*, по составу ДНК существенно отличалась от всех других бактерий этой группы.

Надо отметить, что среди микробиологов тогда не было единого мнения о том, относится ли этот протей к группе кишечных бактерий или нет. Получив данные о составе ДНК, А.Н. Белозерский с соавт. [1960] высказали предположение, что правы те микробиологи, которые отрицали близкое родство *Proteus vulgaris* и остальных кишечных бактерий. Это был один из первых, если не первый случай, использования данных о составе ДНК для решения конкретных вопросов систематики.

Разберем еще один пример того, как простое изучение состава ДНК позволило с количественных позиций подойти к решению одной из важных проблем систематики. Пример этот опять-таки возьмем из мира бактерий.

Анализируя результаты изучения состава ДНК у разнообразных микроорганизмов, Л. Хилл еще в 1966 г. обратил внимание на то, что в таксонах одного ран-

га (например, в пределах рода) состав ДНК может варьировать в разных пределах [Hill, 1966].

Из этого он сделал вывод, что, видимо, некоторые выделяемые систематиками рода бактерий (например, тогдашний род *Lactobacillus,* где состав ДНК варьирует очень сильно) объединяют малородственные организмы и являются искусственными (вспомним оценки, данные Н. Суеока).

Справедливость этого заключения вскоре была подтверждена опытами по гибридизации ДНК. Таким образом, микробиологам был предложен эффективный способ определения **естественности** выделяемых ими таксонов микроорганизмов: если при изучении состава ДНК у видов некоего «рода» окажется, что один или несколько его представителей существенно отличаются по составу ДНК от основной массы видов, то скорее всего они были ошибочно отнесены к этому роду.

В некоторых случаях «хорошие» **роды** все же немного отличались по степени вариабильности ДНК у входящих в их состав видов бактерий, но эта вариабильность все же всегда была существенно меньше, чем у видов одного **семейства** бактерий. Статистический анализ всего массива данных в конечном счете позволил предложить **количественные критерии ранга таксона у микроорганизмов и выразить их через вариабильность состава ДНК у образующих их видов.**

В более сложных случаях глубина дивергенции геномов у видов, составляющих таксоны ранга вида, рода, семейства и.т.п., может быть определена как по результатам опытов по гибридизации ДНК [Antonov et al., 1988], так и в ходе сравнительного изучения первичных структур гомологичных семантид.

Это положение иллюстрируется следующим рисунком, на котором представлены результаты опытов по гибридизации ДНК покрытосеменных растений из двух семейств – касатиковых и зонтичных. С помощью гибридизации определяли «валовое» сходство последовательностей ДНК у сопоставляемых организмов.

Как следует из результатов, разные **виды** из рода *Iris* по структуре ДНК отличаются больше, чем растения из разных **родов** зонтичных (рис. 4-2).

Более подробно речь об этом пойдет позже, когда мы будем обсуждать перспективы использования результатов секвенирования нуклеиновых кислот. Здесь же мы обратим внимание на следующее обстоятельство.

Вполне естественным кажется, что в пределах некой группы организмов таксоны одного ранга (например, рода) должны объединять виды с равной или, по крайней мере, достаточно близкой степенью генетического родства. В идеальном случае они должны быть отделены от близких групп того же ранга более или менее выраженным разрывом в этом сходстве, хиатусом. В случае монотипических таксонов последний параметр будет играть определяющую роль.

В представленном примере величина разрыва явно неодинакова у ирисов и зонтичных, т.е. их рода не эквивалентны по глубине дивергенции генотипов. Таким образом, **геносистематика предлагает экспериментальный подход к решению проблемы эквивалентности таксонов – одной из самых сложных в систематике.**

В чем еще проявлялись расхождения в представлениях гено- и феносистематиков? Прежде всего еще раз упомянем, что следует различать **феновиды** и **геновиды** микроорганизмов. На это обстоятельство и обратил внимание А. Рейзенер. Именно **с этого времени, т. е. с начала 1960-х годов, стала вырабатываться новая идеология исследований, основанная на возможном существовании различий между фено- и геновидами.**

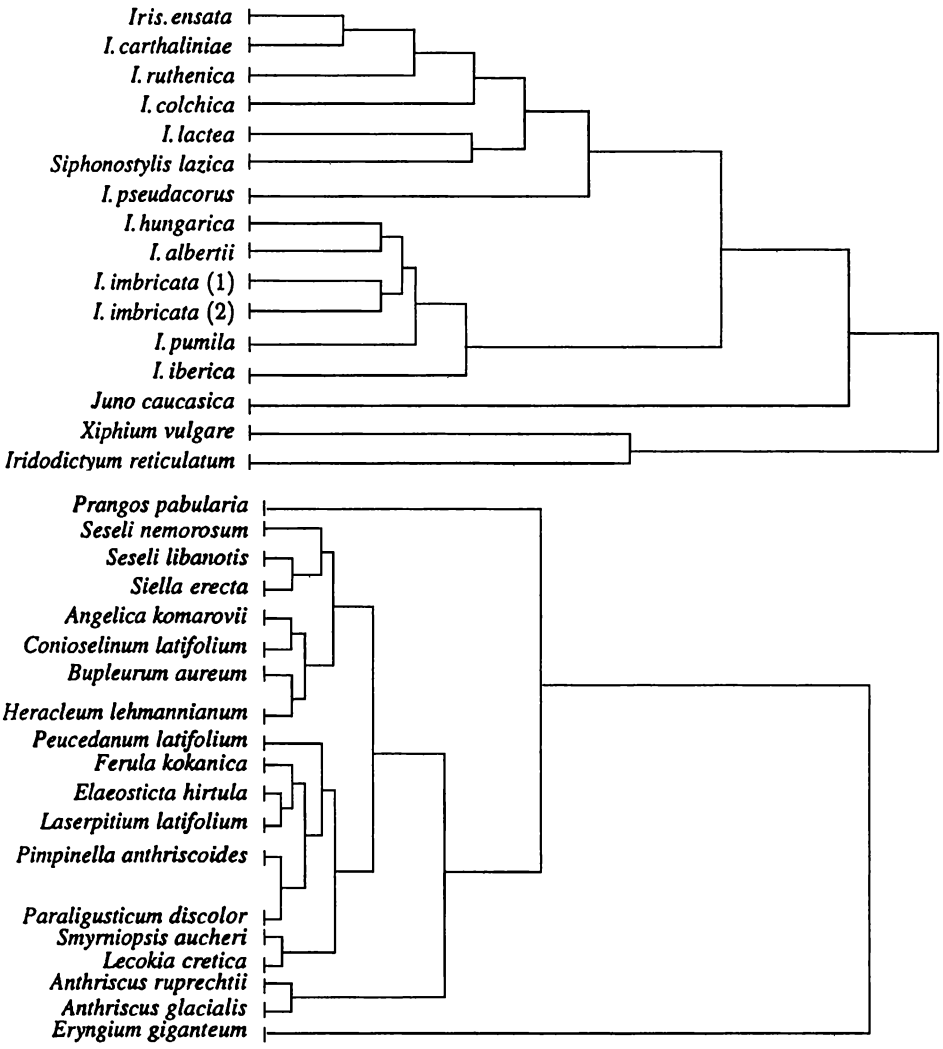


Рис. 4-2. Дендрограммы, иллюстрирующие глубину дивергенции ДНК у ирисов и зонтичных и построенные по результатам гибридизации ДНК

Опыты по гибридизации ДНК ставили в одинаковых условиях. Видно, что ирисы (род) дивергировали глубже, чем многие роды зонтичных

А. Рейвен обратил внимание на то, что все штаммы некоторых видов бактерий могут лишь незначительно отличаться друг от друга по составу ДНК, в то время как у других видов такие различия между штаммами явно выражены [Ravin, 1963 a,b] и вполне сопоставимы с различиями, наблюдаемыми между разными видами. Таким образом, **один феновид микроорганизмов может представлять собой конгломерат геновидов.** Верно и обратное: **один геновид может включать несколько фенотипически хорошо различимых феновидов.**

Таблица 4-3

Пределы варьирования нуклеотидного состава ДНК в некоторых таксонах позвоночных животных и покрытосеменных растений

Таксон	Эволюционный возраст таксона × 10^{-6} лет	ΔGC молярных,%
Животные		
Рыбы	450–500	16
Млекопитающие	150–200	5
Покрытосеменные		
Однодольные	125–150	17
Двудольные	125–150	15

Открытие Рейвена было первым указанием на то, что представления об эволюционной истории таксонов и системы фенотипов и генотипов могут отличаться друг от друга. В последующие годы усилия ученых были направлены на выяснение, может ли принцип Рейвена быть перенесен на таксоны более сложно устроенных организмов, например, растений.

Исследования вариабильности состава ДНК внесли свой вклад и в обсуждение проблемы «молекулярных часов». Если верить этой гипотезе, то состав ДНК должен варьировать приблизительно в одних пределах в группах сравнимого эволюционного возраста. На деле оказалось не совсем так (табл. 4-3).

Впервые это было отмечено в работе Мариновой с соавт. [Маринова и др., 1969; Antonov, 1971]. Поскольку в то время палеонтологи практически единодушно утверждали, что покрытосеменные появились и стали активно дивергировать всего 125–150 млн лет тому назад, был сделан вывод, что скорость изменения структур ДНК у них была существенно выше, чем в группе того же эволюционного возраста – млекопитающих. Эти наблюдения зародили сомнения в правильности гипотезы «молекулярных часов».

Другое объяснение наблюдаемых различий в свое время казалось просто еретическим: быть может, покрытосеменные – гораздо более древняя группа, чем представляли ботаники ?

Как уже упоминалось выше, Д. Боултер на основании сравнительных исследований структур цитохрома *c* у растений и гипотезы «молекулярных часов» также высказал предположение о том, что покрытосеменные – гораздо более эволюционно древняя группа и по этому признаку сопоставима с рыбами, что и следует из приведенной выше таблицы [Boulter et al., 1972]. К сожалению и Д. Боултер, и другие геносистематики и не пытались искать сестринскую семенным растениям группу среди вымерших голосеменных.

Впоследствии оказалось, что существенная вариабильность состава ДНК у семенных растений определялась действием и первого, и второго факторов. Так или иначе, но уже в конце 1960-х – начале 1970-х годов эти данные заронили сомнения в универсальности гипотезы «молекулярных часов», которые с годами становились все более обоснованными [Антонов, Троицкий. 1986].

Ядерные ДНК высших растений (см. гл. 3) гетерогенны и содержат фракции, значительно различающиеся по нуклеотидному составу. Существуют способы оценки этой гетерогенности, например, по результатам «плавления» ДНК или

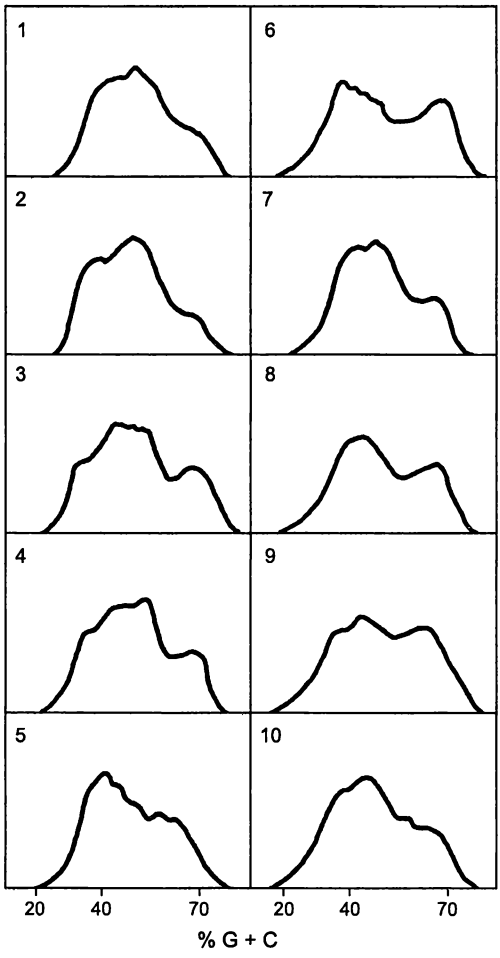


Рис. 4-3. Количественное содержание фракций в яДНК у разных видов злаков

При сходном валовом составе яДНК доля фракций разного нуклеотидного состава в них может существенно различаться

равновесного ультрацентрифугирования. При этом оказалось, что даже у видов с одинаковым составом «тотальной» ДНК количественное содержание отдельных фракций ДНК разного состава (а они присутствуют) может существенно отличаться (рис. 4-3).

Используя специальные методы обработки результатов такого рода, их можно преобразовать в дендрограммы, отражающие близость изученных видов.

Поскольку при исследовании состава тотальной ДНК мы изучаем особенности строения всей ДНК клетки, мы получаем более полную информацию об особенностях организации генотипов, чем при определении состава тотальной РНК организмов (большую часть которой составляют ядерные рибосомные РНК, т.е. продукт реализации генетической информации всего нескольких генов), или аминокислотного состава индивидуальных белков, или даже их комплексов, выделенных из отдельных частей растений (например, белковых комплексов семян), которые опять-таки кодируются ограниченным числом генов.

Гибридизация ДНК

Еще один статистический метод сопоставления ДНК – это метод гибридизации, основанный на способности ДНК к денатурации и реассоциации (ренатурации) двуцепочечных молекул ДНК.

Если нагревать раствор ДНК (или, например, резко изменить pH в сторону от нейтральных значений), то в строении молекул ДНК происходят изменения: связи между двумя цепями молекул ДНК рвутся, и из двуцепочечных молекул образуются одноцепочечные, которые свертываются в беспорядочные клубки. За этим процессом легко наблюдать, повышая температуру растворов ДНК и одновременно измеряя поглощение ими УФ-света: с переходом ДНК в одноцепочную форму оно растет.

При достижении некой температуры (или крайних значений pH) процесс прироста поглощения («гиперхромный эффект») прекращается, вся ДНК денатурирует. Этот фазовый переход обычно характеризуют значением температуры (или pH), при которой ДНК денатурирует наполовину. Температуру, при которой происходят такие изменения ДНК, называют «температурой плавления ДНК» и обычно обозначают как T_m (m – от англ. *melting* – плавление) или $T_{пл}$ (рис. 4-4).

Показано, что в стандартных условиях T_m ДНК и содержание ГЦ-пар в ней связаны простой линейной зависимостью. Метод «плавления» ДНК для определения ее состава нужно применять с осторожностью, так как на результаты может оказать влияние чистота препарата ДНК.

Если ДНК содержит значительную долю «минорных» оснований, то эта зависимость несколько нарушается, но для приблизительных оценок содержания ГЦ-пар в ДНК описанный выше метод вполне пригоден.

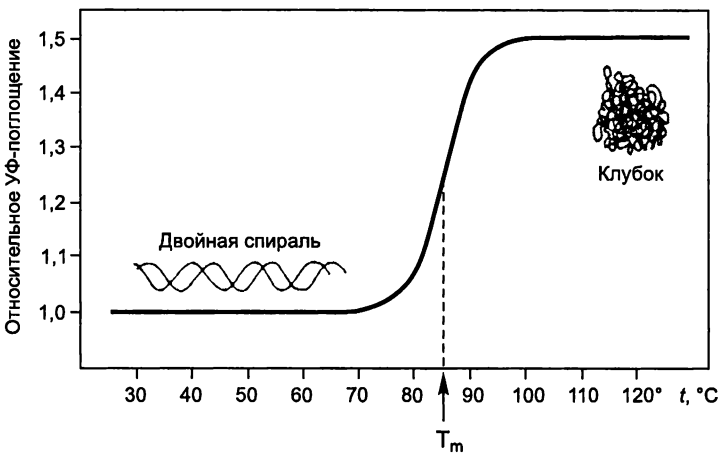


Рис. 4-4. Изменение поглощения УФ-света раствором ДНК при повышении температуры [Marmur, Doty, 1962]

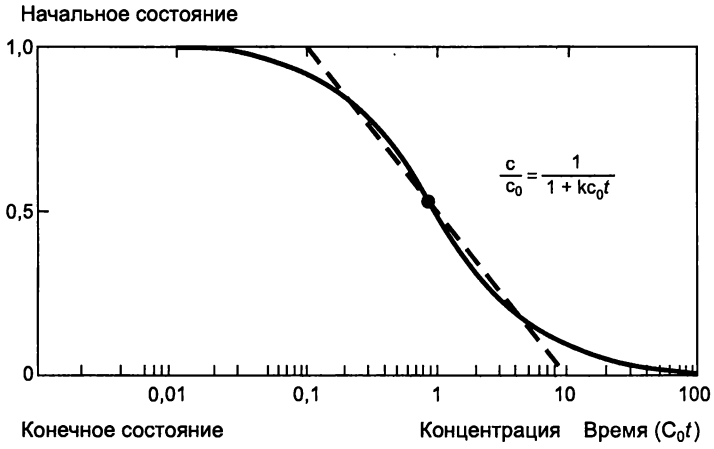


Рис. 4-5. Кинетическая кривая идеальной реакции второго порядка, описывающая процесс реассоциации (ренатурации) ДНК

На основе кривой можно вычислить величину Cot, характерную для процесса реассоциации данной ДНК [Britten, Kohne, 1968]

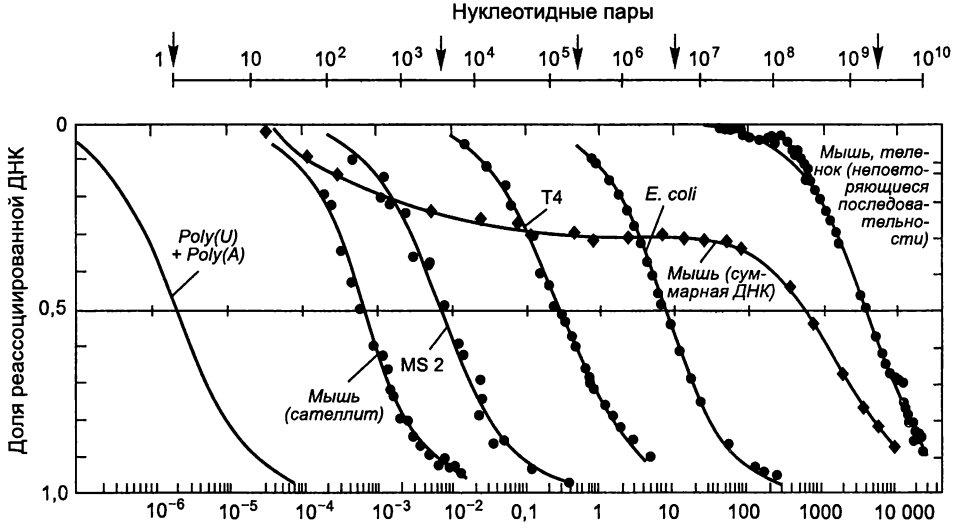


Рис. 4-6. Кинетика реассоциации синтетических и природных ДНК разного происхождения

Видно, что чем сложнее ДНК (судя по количеству образующих ее пар нуклеотидов и наличию и содержанию повторов), тем медленнее она реассоциирует [Britten, Kohne, 1968]

Если медленно охлаждать раствор ДНК (или медленно нейтрализовать его до pH 7), то начинается обратный процесс – процесс реассоциации, или ренатурации ДНК. УФ-поглощение раствора при этом падает («гипохромный эффект»).

Этот процесс можно регистрировать с помощью соответствующей техники, позволяющей фиксировать изменения в УФ-поглощении раствора ДНК (рис. 4-5).

Отмечено, что разные ДНК реассоциируют с различной скоростью (рис. 4-6). Быстрее всего этот процесс идет в случае просто устроенных относительно небольших ДНК вирусов и бактерий или же синтетических полинуклеотидов. В этом случае комплементарные участки в ходе реассоциации достаточно легко находят друг друга в растворе и восстанавливают двуцепочечную структуру.

Для ДНК эукариот ситуация намного сложнее: даже небольшой геном, например, арабидопсиса включает несколько десятков тысяч генов, и вероятность того, что они «отыщут» друг друга в растворе близка к нулю, так как под влиянием теплового движения молекул комплементарные участки все время меняют свое положение в растворе. Поэтому **нативные (полимерные) молекулы ДНК эукариот при охлаждении практически не реассоциируют** и в них в основном образуются лишь двуспиральные участки за счет близко расположенных и комплементарных, так называемых «палиндромных» последовательностей.

Поэтому, чтобы добиться реассоциации сложно устроенных ДНК эукариот, их перед денатурацией разрушают, деградируют до фрагментов длиною обычно в несколько сотен или тысяч пар нуклеотидов. Проще всего этого добиться с помощью сил гидродинамического сдвига, например, быстро пропуская раствор ДНК через иглу медицинского шприца или воздействуя на раствор ультразвуком. Длина молекул ДНК превышает размер зон, где скорость потока существенно различается, и он буквально разрывает длинные молекулы ДНК на более короткие фрагменты.

Если денатурировать такую ДНК, то кривая плавления будет практически идентична той, которую мы получаем для нативной ДНК, но при реассоциации поиск комплементарного партнера будет существенно облегчен, так как фрагменты ДНК «ищут» их без влияния нарушающих этот процесс других участков ДНК. В целом, **фрагментированные ДНК эукариот реассоциируют, но гораздо медленнее, чем ДНК прокариот** (см. рис. 4-6).

Обычно кривую реассоциации ДНК эукариот можно разложить на ряд составляющих кривых, описывающих процесс реассоциации отдельных фракций ДНК. Так, практически мгновенно реассоциируют **палиндромные** последовательности, которые расположены в структуре ДНК поблизости друг от друга в одной цепи ДНК и взаимокомплементарны. Далее, с высокой скоростью реассоциируют фракции **повторяющихся последовательностей ДНК**. Как известно из гл. 3, фракция повторяющихся последовательностей высокогетерогенна, что находит свое отражениие на графиках.

В последнюю очередь реассоциирует фракция так называемых **уникальных** последовательностей ДНК.

Все эти понятия – сугубо операциональные, предназначенные для описания различий между фракциями. Сам процесс и свойства отдельных фракций подробнейшим образом описаны в обзорах Н.Б. Петрова [1980] и Р. Флейвела [Flavell, 1980].

Процесс денатурации-ренатурации лежит в основе **метода гибридизации нуклеиновых кислот** (рис. 4-7).

При работе по классическому (и уже устаревшему) методу гибридизации, одну из ДНК (А) сначала денатурируют и иммобилизуют (в агаровом геле, на нитроцеллюлозном фильтре или иным способом). С наибольшей точностью гибри-

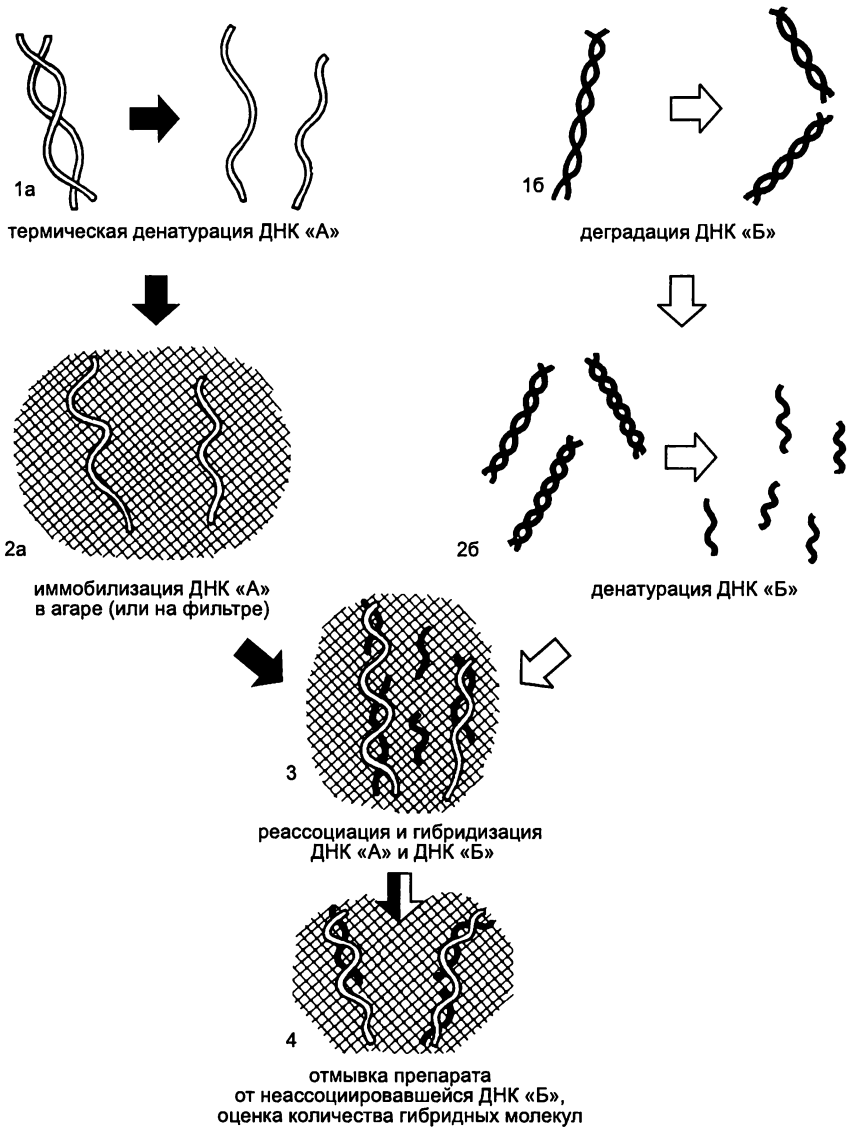


Рис. 4-7. Схема опыта по гибридизации ДНК
См. пояснения в тексте

дизация ДНК происходит в растворе [Вальехо–Роман, 1980]. Другую гибридизуемую ДНК (Б) деградируют до фрагментов длиной порядка 1000 нуклеотидов, метят радиоактивным изотопом и также денатурируют. Затем смешивают ДНК Б и А в соотношении ≈1: 1000 (чтобы избежать самореассоциации ДНК Б) и создают условия, способствующие реассоциации смеси ДНК А+Б. После завершения реассоциации отмывают непрореагировавшие фрагменты ДНК Б (или отделяют

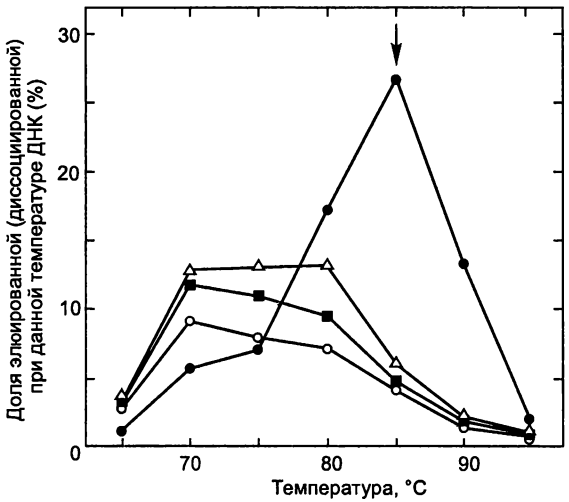


Рис. 4-8. Термостабильность гибридных молекул, полученных в гомологичной и гетерологичных реакциях в опытах по ДНК х ДНК гибридизации видов из рода *Atriplex*.

Соотношение меченой к немеченой ДНК 1: 3000. Длина фрагментов ДНК 300-400 п.н. В гибридизации использовали ДНК *A. hortensis* (гомологичная реакция, •; ДНК *A. triangularis* (Δ); *A. sabulosa* (■) и *A. serenana* (о) [Belford, Thompson, 1976]

1– доля элюированной (диссоциировавшей) при данной температуре ДНК; 2 – температура, °С. Стрелкой указана гомологичная реакция

их иным способом) и оценивают количество образовавшейся гибридной ДНК по ее радиоактивности.

За 100% сходства принимают результаты, полученные в гомологичной реакции, т.е. когда ДНК А и Б взяты из одного и того же организма . В гетерологичной реакции связывание как правило меньше, в соответствии со степенью сходства геномов. ДНК далеких друг от друга видов могут вообще практически не образовывать гибридных молекул .

Количество взаимодействующих фракций ДНК в разных геномах может быть неодинаково, поэтому иногда можно наблюдать гипергибридизацию. Иными словами, однозначно трактовать результаты гибридизации ДНК сложно.

Первоначально метод гибридизации ДНК использовали для определения только **количества** гомологичных последовательностей в двух сравниваемых ДНК. Оказалось, однако, что этот метод обладает существенным дефектом: определив количество гомологичных участков, мы ничего не знаем **о качестве** образовавшихся гибридных молекул. Чтобы обойти эту неопределенность, был предложен метод гибридизации ДНК в растворе и оценки **термостабильности** образующихся гибридных молекул, которая напрямую зависит от точности спаривания комплементарных участков в гибридных молекулах. Как может различаться термостабильность гибридных молекул при близком количестве связанной ДНК представлено на рис. 4-8.

С помощью метода гибридизации ДНК × ДНК (или РНК × ДНК) и определения «качества» образующихся гибридных молекул были изучены многие сотни и тысячи видов растений, но постепенно интерес к этим методам угас: на сцену

вышли методы определения нуклеотидных последовательностей ДНК, которые позволяют учитывать гомологии несравненно более точно, путем их прямого сопоставления. Однако методы денатурации–реассоциации ДНК являются неотъемлемой составляющей целого ряда ультрасовременных методов. Методы ДНК-«блоттинга», полимеразная цепная реакция (знаменитый метод ПЦР) и ряд других включают в себя проведение реакций денатурации–ренатурации ДНК.

Таким образом, метод гибридизации ДНК, основанный на процессах ее денатурации и реассоциации, предназначен для определения количества комплементарных участков в сопоставляемых ДНК и оценки степени совершенства получаемых двуцепочечных участков молекул, т.е. насколько восстановленная вторичная структура «гибридных» молекул близка к исходной, идеальной, когда взаимодействующие комплементарные участки полностью гомологичны, что наблюдается в случае гомологичной реассоциации просто устроенных ДНК.

Оценки близости эукариотических организмов (особенно с небольшими и сопоставимыми по размерам геномами), полученные современным методом гибридизации ДНК и путем определения гомологий в сопоставляемых индивидуальных последовательностях ДНК, с помощью секвенирования, оказались все же сходными, особенно при оценке близости мало дивергировавших видов [van Tuinen et al., 2000].

Метод ДНК х ДНК гибридизации позволил обнаружить существование ряда интересных закономерностей в эволюции ДНК высших растений. Прежде всего, с его помощью было подтверждено, что ДНК растений эволюционировали очень быстро [Bendich, Bolton, 1967; Маринова и др., 1969], хотя в настоящее время этот вывод нельзя считать полностью достоверным. Например, этим методом не удалось обнаружить заметного количества гомологичных последовательностей в ДНК однодольных и двудольных растений. Уже сейчас известно, что такие последовательности в геномах этих растений есть, но количество таких гибридных молекул были таковы, что их невозможно было обнаружить используемыми в то время методами.

С помощью гибридизации ДНК был получен новый сильный аргумент против универсальности гипотезы «молекулярных часов»: было показано, что стрелки молекулярных часов у растений бегут гораздо быстрее, чем у животных. Возможно и другое объяснение: эволюционный возраст покрытосеменных гораздо больше, чем это считалось ранее.

Интересными являются результаты, полученные при изучении влияния полиплоидизации геномов на скорость молекулярной эволюции. Такие исследования были выполнены в НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ [Вальехо–Роман и др., 1979; Кашеваров, Антонов, 1982].

Было выяснено, что полиплоидизация геномов приводит к существенному ускорению темпов накопления замен нуклеотидов, о чем мы могли судить по характерным изменениям в термостабильности гибридных молекул у полиплоидных по сравнению с диплоидными видами и, следовательно, об ускорении молекулярной эволюции. Кроме того, это, по крайней мере частично, отвечало на вопрос, почему ДНК покрытосеменных растений эволюционировала быстрее, чем ДНК в группах животных сравнимого (как тогда казалось) эволюционного возраста, например, млекопитающих. Ведь среди покрытосеменных полиплоиды – обычное явление, а среди млекопитающих их практически нет.

В транскриптонах отдельные члены семейств дуплицированных (амплифицированных) генов дивергируют или могут выражаться по-разному в разных тканях растений и на разных стадиях онтогенеза [Adams et al., 2003].

Другие статистические методы

Следующая группа статистических методов основана на разных частотах встречаемости в первичной структуре ДНК специфических комбинаций нуклеотидов. Простые комбинации (например, пары соседствующих нуклеотидов) встречаются в ДНК очень часто, но более длинные, со специфической последовательностью из четырех и более нуклеотидов – существенно реже. Еще реже встречаются комбинации из большего числа нуклеотидов. Так, специфическая комбинация (последовательность) из семи нуклеотидов в относительно небольшой по размерам **хлоропластной** или **митохондриальной** ДНК может встретиться всего несколько раз. Если бы мы умели гидролизовать ДНК по таким специфическим участкам последовательности, то возможно было бы разделить исходную ДНК на ряд фрагментов, число и длина которых определялись бы природой организма, из которых эти ДНК были выделены. К сожалению, эти соображения не подходят для анализа **ядерных ДНК**, так как при их гидролизе по специфическим последовательностям даже длиной до восьми нуклеотидов образуется огромное число фрагментов, как правило, не поддающихся разделению.

Практика показала, что с помощью методов специфического гидролиза ДНК можно составить представление о полиморфизме первичных структур хпДНК и митДНК на уровне как внутри-, так и надвидовых таксонов. Например, может быть использован метод рестрикционного анализа ДНК (RFLP-метод) и производные от него методы (RAPD, AFLP, RAMD, CAPS и.т.п.).

Преимущество указанных методов заключается в том, что они дают нам более полную и достоверную информацию об особенностях организации анализируемой части генотипов. Данные, полученные с помощью таких методов, обычно проще сопоставлять, а выводы, которые делаются на основании таких сопоставлений, как правило, бывают более определенными и достоверными.

Рассмотрим сначала достоинства и области применения метода рестрикционного анализа ДНК (RFLP-метод, от английского термина Restriction Fragment Length Polymorphism).

RFLP-метод

Суть этого метода заключается в сопоставлении коротких последовательностей ДНК (ДНК-маркеров), которые образуются в результате переваривания ДНК специальными ферментами, затем разделяются электрофорезом, и по которым наблюдается полиморфизм у сопоставляемых форм организмов (сортов, мутантов, представителей разных популяций одного вида, разных видов, и.т.п.).

Оценивать полиморфизм методом RFLP можно по числу и положению на электрофореграммах различающихся по длине фрагментов ДНК, образующихся при гидролизе ДНК.

Этот метод был разработан вскоре после того, как был открыт новый класс гидролитических ферментов – **эндонуклеаз рестрикции**. Из названия этих ферментов следует, что они вызывают гидролиз межнуклеотидных связей во внутренних частях молекул ДНК.

Эндонуклеазы рестрикции гидролизуют ДНК не хаотично, а высоко специфично, причем каждая из них взаимодействует со строго определенной короткой комбинацией нуклеотидов в цепи ДНК, и именно в пределах этой последовательности или рядом с ней осуществляет акт гидролиза. Такая короткая линейная последовательность нуклеотидов, узнаваемая ферментом, называется **сайтом рестрикции** (рис. 4-9). Если в сайте рестрикции двуцепочечная молекула ДНК разрывается не строго напротив в двух противолежащих цепях ДНК, а на некотором расстоянии, то после разделения цепей у них образуются так называемые **«липкие концы»**, способные взаимодействовать с гомологичными липкими концами гетерологичной ДНК, гидролизованной той же эндонуклеазой рестрикции, например, с фрагментами ДНК плазмид. В другом случае образуются **«тупые» (blunt) концы.** Наличие липких концов облегчает встраивание одной ДНК в другую, гетерологичную, что используется в экспериментах по клонированию ДНК.

К настоящему времени выделены и охарактеризованы сотни ферментов-эндонуклеаз (они известны еще под названием «рестриктазы»), и каждый из них при образовании комплекса «фермент-субстрат» «узнает» и гидролизует строго определенную последовательность нуклеотидов ДНК. Длина такого узнаваемого участка варьирует обычно от четырех до шести и более нуклеотидов. В табл. 4-4 приведены некоторые эндонуклеазы рестрикции и узнаваемые ими последовательности нуклеотидов в ДНК.

Из таблицы видно, что сайты рестрикции могут существенно отличаться по нуклеотидному составу и последовательности нуклеотидов.

Что же получится, если мы обработаем какой-либо эндонуклеазой рестрикции ядерную ДНК или же ДНК органелл растений? В зависимости от длины и состава узнаваемой последовательности мы получим смесь фрагментов разной длины. Это зависит от частоты встречаемости и расположения сайтов рестрикции в изучаемых ДНК. Если узнаваемая последовательность (сайт рестрикции) более или менее длинная, то вероятность нахождения такой последовательности в ДНК будет меньше, а образуемые в результате переваривания фрагменты будут длиннее. Такой гидролиз ДНК осуществляют длинно- или редкощепящие рестриктазы. Напротив, если сайт рестрикции невелик и частота встречаемости его в цепи анализируемой ДНК высока, то длина образующихся фрагментов будет меньше, а их число больше. Такая картина наблюдается при использовании коротко- или частощепящих рестриктаз.

Поскольку **ядерная** ДНК представлена колоссальным количеством самых разнообразных последовательностей нуклеотидов, в которых (из чисто статистических соображений) будет множество сайтов рестрикции для любой эндонуклеазы, в результате гидролиза образуется чрезвычайно сложная, многокомпонентная смесь фрагментов, которую невозможно разделить на образующие ее отдельные фракции с помощью электрофореза: отдельные классы (разновидности)

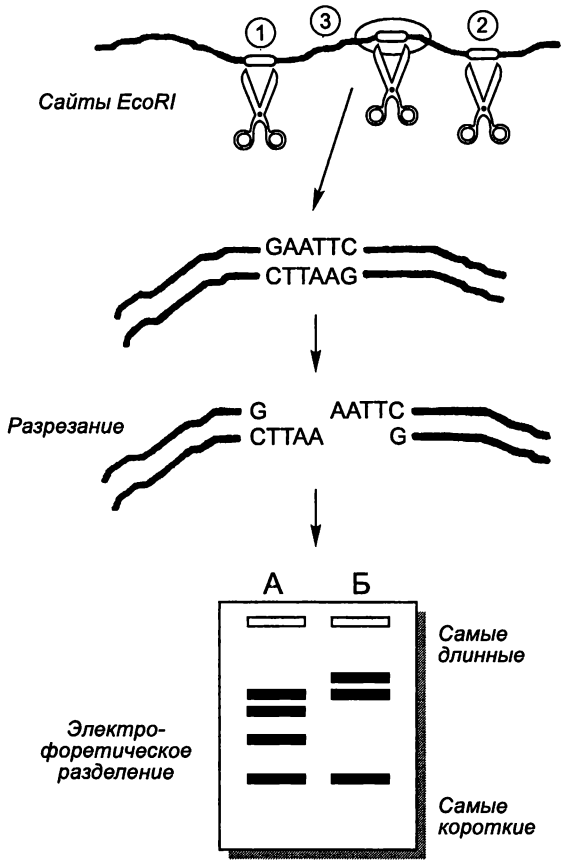


Рис. 4-9. Схема, иллюстрирующая механизм ферментативного гидролиза ДНК одной из эндонуклеаз рестрикции, *Eco*R1

Нуклеотидная последовательность, узнаваемая этим ферментом (сайт рестрикции), достаточно протяженная и молекула ДНК в противолежащих цепях гидролизуется с образованием «липких концов». В нижней части рисунка показаны результаты электрофоретического разделения фрагментов ДНК, образующихся после гидролиза. При разрезании по сайту 3, 2, 1 образуется набор фрагментов А, а по сайтам 1 и 2 – набор фрагментов Б

фрагментов дискретных полос, как правило, не образуют, наблюдается только некий «мазок» (шмер), указывающий на образование громадного разнообразия фрагментов.

Иногда на фоне мазка можно различить слабо выраженные полосы, свидетельствующие о том, что какая-то последовательность представлена в ядерной ДНК большим количеством копий. Примером могут быть сателлитные ДНК (см. гл. 3). Расположение и количество таких полос может быть в известной степени полезным при решении проблем микросистематики растений, но, в общем-то, первоначальный вариант RFLP-метода анализа **ядерных** ДНК в силу ограниченности его возможностей широкого использования не получил.

Результаты электрофореза используют для создания бинарных матриц, а на их основе – дендрограмм сходства (см. далее).

Разработан другой метод, производный от метода RFLP, который позволяет анализировать сложную смесь фрагментов яДНК, образующихся под действием рестриктаз. Это **AFLP-метод** [Ежова идр., 2002], основанный на использовании двух эндонуклеаз рестрикции, редкощепящей и частощепящей, с последующим связыванием (лигированием) полученных фрагментов ДНК с двунитевыми олигонуклеотидами с известной последовательностью мономеров (адаптерами). Да-

Таблица 4-4

Некоторые ферменты-эндонуклеазы (рестриктазы), специфически гидролизующие ДНК по сайтам рестрикции

Фермент	Сайт	Конец	Фермент	Сайт	Конец
	Ферменты, узнающие сайты из 4- пар нуклеотидов				
Acc II	CG/CG	тупой	*Mbo* 1	/GATC	5′
Alu I	AG/CT	тупой	*Msp* I	C/CGG	5′
Cfo I	GCG/C	3′	*Nde* II	/GATC	5′
Dpn I	Gm/A/TC	тупой	*Nfa* III	CATG/	3′
*Fnu*D II	CG/CG	тупой	*Pal* I	GG/CC	тупой
Hae III	GG/CC	тупой	*Rsa* I	GT/AC	тупой
Hha I	GCG/C	3′	*Sau*3A I	/GATC	5′
Hin PI	G/CGC	5′	*Taq* I	T/CGA	5′
Hpa II	C/CGG	5′	*Tha* I	CG/CG	тупой
Mae I	C/TAG	5′	*TthHB*8 I	T/CGA	5′
Mae II	A/CGT	5′			
	Ферменты, узнающие сайты из 5- пар нуклеотидов				
Apy I	CmC/(AT)CG	5′	*Hlnf* I	G/ANTC	5′
Asu I	G/GNCC	5′	*Mae* III	/GTNAC	5′
Ava II	G?G(AT)CC	5′	*Ncl* I	CC/(CG)GG	5′
*Bst*N I	CC/(AT)GG	5′	*Bsp* IV	G/GNCC	5′
Dde I	C/TNAG	5′	*Sau*96 I	G/GNCC	5′
*Eco*R II	/CC(AT)GG	5′	*ScrF* I	CC/NGC	5′
*Fnu*4H I	GC/NGC	5′	*Sln* I	G/G(AT)CC	5′
	Ферменты, узнающие сайты из 6- пар нуклеотидов				
Asi II	GACGT/C	3′	*BssH* II	G/CGCGC	5′
Acc I	GT/)AC)(GT)AC	5′	*Bst* I	G/GATCC	5′
Ana II	GPu/CGPyC	5′	*Cla* I	AT/CGAT	5′
Apa I	GGGCC/C	3′	*Dra* I	TTT/AAA	тупой
*Apa*L I	G/TGCAC	5′	*Eae* I	Py/GGCCPu	5′
*Asp*718 I	G/GTACC	5′	*Eag* I	C/GGCCG	5′
Ava I	C/PyCGPuG	5′	*Eco*R1	G/AATTC	5′
Avr II	C/CTAGG	5′	*Eco*R V	GAT/ATC	тупой
Ssu II	TT/CGAA	5′	*Fsp* I	TGC/GCA	тупой
Bal I	TGG/CCA	тупой	*Hae* II	PuGCGC/Py	3′
*Bam*H I	G/GATCC	5′	*HgI*A I	G(AT)GC(AT)C	3′
Ban I	G/GPyPuCC	5′	*HgI*D I	GPu/CGPyC	5′
Ban II	GPuGCPylC	3′	*Hlnc* II	GTPy/PuAC	тупой
Bbe I	GGCGC/G	3′	*Hlnd* II	GPTPy/PuAC	тупой
Bcl I	T/GAT	5′	*Hlnd* III	A/AGCTT	5′
Bgl II	A/GATCT	5′	*Hpa* I	GTT/AAC	тупой
*Bsp*1286 I	G(AGT)GC(ACT)/C	3′	*Kpn* I	GGTAC/C	3′
*Bsp*M II	T/CCGGA	5′	*Mlu* I	A/CGCGT	5′

Затем ДНК амплифицируется с меченными изотопом праймерами, гомологичными адаптерам и сайтам рестрикции. Продукты ПЦР разделяют электрофорезом. Идентификацию продуктов проводят с помощью радиоавтографии. Этот метод позволяет выявить значительно большее число полиморфных маркеров, чем

обычно используемые для этой цели методы и дает более воспроизводимые результаты. Неудивительно, что в последнее время он нашел широкое применение.

Совсем другая картина наблюдается при гидролизе рестриктазами **ДНК органелл**. В 1976 г. одновременно в нескольких лабораториях было показано, что при обработке эндонуклеазой рестрикции ДНК хлоропластов образуется относительно бедный набор фрагментов, который легко разделить электрофорезом [Амерханова и др., 1976; Vedel et al., 1976; Atchison et al., 1976].

Из этих наблюдений следовал важнейший вывод: видимо, все молекулы хпДНК в клетках растений устроены относительно просто, и их нуклеотидные последовательности практически одинаковы. Из этого правила известны немногочисленные исключения.

Как и следовало ожидать, разные рестриктазы дают разные наборы фрагментов (так называемые «паттерны», от англ. "pattern" – характерное распределение), так как гидролизуют молекулы ДНК специфично, в разных местах (рис. 4-10).

Образовавшиеся и разделенные электрофорезом RFLP-фрагменты ДНК в гелях выявляют обычно различными методами окрашивания.

Сопоставление таких наборов фрагментов по количеству и расположению на геле и составляет суть первоначального метода RFLP.

Применение RFLP-метода для анализа хпДНК в свое время буквально совершило переворот в геносистематике растений [Шнеер, 1991]. Он активно использовался геносистематиками, но потом его вытеснил метод секвенирования нуклеотидных последовательностей хпДНК. Историю «соревнования» двух методов иллюстрирует рис. 4-11. Сегодня RFLP в основном используется для проверки реконструкций, выполненных на основании результатов секвенирования.

Тогда же, в начале 1980-х г., впервые в руках исследователей оказался метод, позволяющий получать информацию о тонкой структуре хпДНК. Используя разные рестриктазы, мы получаем представление о нуклеотидных последовательностях индивидуальных, специфичных для данного фермента участков сопоставляемых хпДНК. Каждая рестриктаза имееет свой характерный сайт узнавания длиной 4 – 6 п.н. а иногда и больше, так что обработав две или больше хпДНК десятком- двумя рестриктаз мы можем без труда вычислить количество сходных в них (по длине, которая определяется из опытов по электрофорезу фрагментов) нуклеотидных последовательностей. Делается это тем же способом, как и при обработке результатов опытов с применением Т1 РНКазы, т.е путем построения матриц сходства и их дальнейшего анализа.

Различные виды растений дают характерные паттерны после обработки их хпДНК эндонуклеазами рестрикции и электрофореза продуктов гидролиза.

На рис. 4-10 представлены данные, полученные для однодольного и двудольного растения, т.е. для видов, которые давно дивергировали друг от друга. Отсюда и различия в числе и положении сайтов рестрикции в сопоставляемых гомологичных участках ДНК.

В случае близких видов различия в длине и числе фрагментов обычно выражены слабо либо, при использовании части рестриктаз (особенно длиннощепящих), вообще отсутствуют, если данный сайт рестрикции в ходе эволюции изменений не претерпел.

Длину фрагментов определяют при сопоставлении с фрагментами "контрольного" образца ДНК с известной первичной структурой (например, ДНК не-

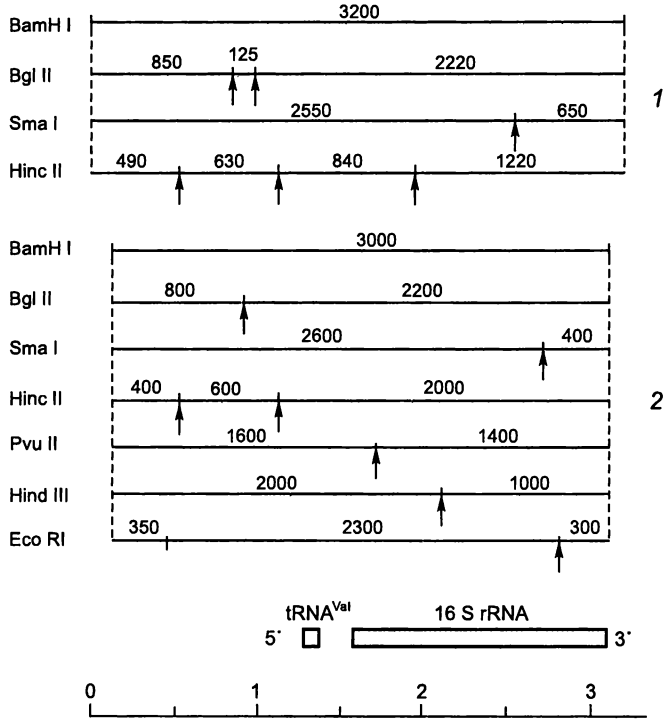


Рис. 4-10. Различия в длине фрагментов, образующихся при гидролизе фрагмента хпДНК кукурузы и горчицы (схема его строения дана в нижней части рисунка) под действием разных эндонуклеаз рестрикции

Видно, что эндонуклеаза Bam H1 последовательность фрагмента вообще не гидролизует, но другие эндонуклеазы ее атакуют в разных местах. Последние три эндонуклеазы внизу рисунка атакуют только хпДНК горчицы, но не способны гидролизовать этот участок хпДНК кукурузы

– хпДНК кукурузы, 2– хпДНК горчицы

которых бактериофагов или плазмид), дающего при гидролизе фрагменты известной длины.

Этот подход нашел широкое применение для изучения и составления первичных структур отдельных генов и – что для нас самое важное – геномов органелл растений. Возможности применения метода до недавнего времени ограничивались необходимостью выделять для анализа значительные количества чистых препаратов ДНК. Клонирование фрагментов сняло эти ограничения.

Первоначально были исследованы культивируемые растения и их ближайшие природные родственники, в связи с тем, что происхождение многих видов культивируемых растений до недавнего времени выяснено не было.

Впечатляющие результаты были получены при изучении родов *Orysa, Aegilops, Lycopersicon, Solanum, Brassica, Triticum* и др.[Palmer, 1986].

Рассмотрим результаты, полученные при изучении структур хпДНК капуст (род *Brassica*) и редек (род *Raphanus*). Из представленной на рис. 4-12 дендро-

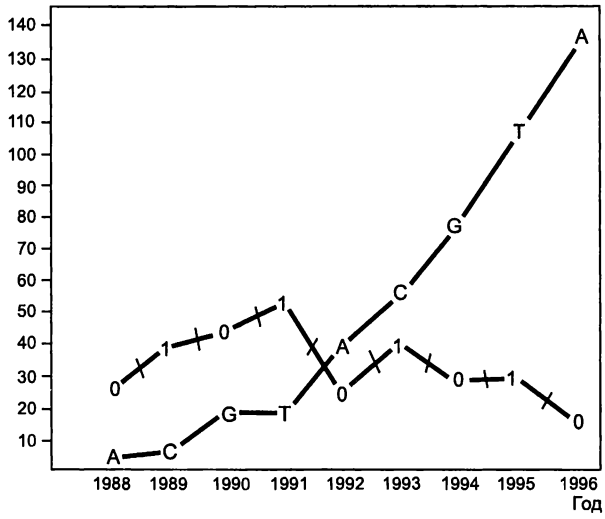


Рис. 4-11. Динамика изменения численности сообщений по молекулярной систематике, выполненных методами RFLP и секвенирования и представленных на собраниях Botanical Society of America с 1988 по 1996 г. [Jansen et al., 1998]

0-1-0-1 – исследования проводили методом RFLP с хпДНК, А-Ц-Г-Т – исследования проводили методом секвенирования

граммы видно, что один из видов рода *Raphanus* занимает на дендрограмме промежуточное положение между видами капуст. Это означает, что строение хпДНК *R. sativa* более сходно со строением хпДНК группы видов из одной клады (подрода ?) рода *Brassica*, чем строение хпДНК видов из двух клад рода *Brassica*.

Если принять, что эволюция хпДНК повторяет эволюцию растений, из которых она была выделена, то из этого следует, что система родов крестоцветных видимо нуждается в уточнении. Кстати, между некоторыми видами *Brassica* и *Raphanus* возможна «межродовая» гибридизация, что свидетельствует о генетической близости, если не идентичности этих родов. Скорее всего, все виды капуст и редек следует свести в один род, так как нам не удается обнаружить разрыва, хиатуса, в структурах их хпДНК.

Точно такая же ситуация сложилась с томатами и картофелем [Palmer, Zamir, 1982]. Построенные дендрограммы сходства хпДНК однозначно говорят о том, что многие виды томатов ближе к некоторым видам картофеля , чем наиболее далеко отстоящие друг от друга виды рода *Lycopersicon*.

Как же результаты рестрикционного анализа хпДНК согласуются с результатами, полученными с помощью других методов и при изучении эволюции других генов? Рассмотрим это на примере злаков (рис. 4-13). Видно, что наблюдается неплохое совпадение результатов, полученных как при использовании метода RFLP (особенноо в случае низших таксонов), так и при помощи иных подходов. Это означает, что филогенетические деревья хпДНК и организмов, из которых они были выделены, действительно достаточно высоко конгруэнтны, но полностью все же не совпадают. Сравнение рестриктных паттернов и построенных на их основе «карт» хпДНК позволяет выявить крупные структурные перестройки (делеции, вставки, транслокации, и.т.п.) в ее молекулах. Вероятность независимого, конвергентного возникновения одинаковых крупных перестроек ядерных геномов и пластомов у разных таксонов невысока, поэтому такое событие представляет значительный интерес для систематики.

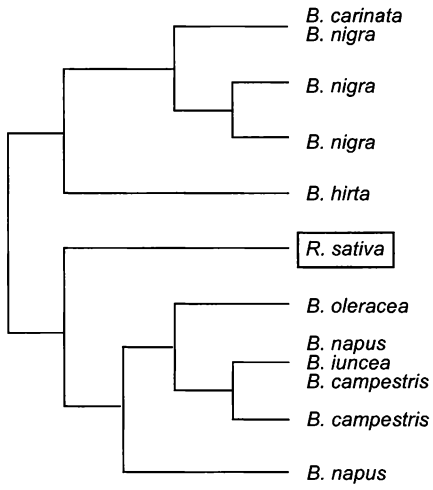


Рис. 4-12. Дендрограмма, отражающая сходство хп ДНК капуст и редьки

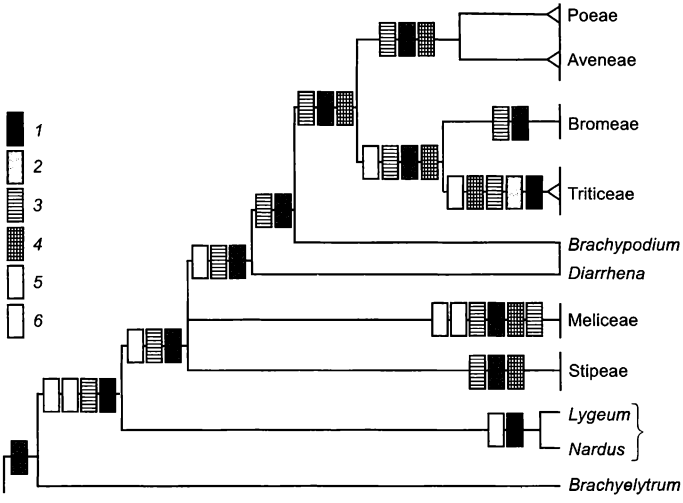


Рис. 4-13. Дендрограмма, отражающая эволюцию некоторых злаков

Для ее построения использованы данные, полученные морфологами (*1*), путем изучения эволюции гена *ndhF* (*2*), ITS (*3*), RFLP хпДНК (*4*), гена фитохрома (*5*) и методом CBSCI (*6*). Видно неплохое совпадение данных, полученных разными методами

Так показано, что в хлоропластных геномах представителей семейств хвойных, включая Тахасеае, нет двух инвертированных повторов, имеющихся у печеночников, папоротников, гнетовых и представителей около полусотни семейств покрытосеменных (за исключением некоторых бобовых) [Strauss et al., 1988; Raubeson, Jansen, 1989]. Рибосомный оперон хпДНК у этих растений один.

Хлоропластная ДНК моховидных и плауновидных содержит характерную крупную инверсию (28 т.п.н.), которой нет в хлоропластном геноме остальных

высших растений [Raubesson, Jansen, 1992]. Крупные инверсии в хлоропластном геноме были обнаружены RFLP-методом у видов из 57 родов семейства Asteraceae [Jansen, Palmer, 1987], сравнительно много крупных перестроек хлоропластных геномов обнаружено в семействе Fabaceae [Palmer; 1992].

RFLP-метод используется не только для построения дендрограмм, отражающих филогенетическое родство изучаемых таксонов растений, его применяли также при изучении популяционной структуры природных видов растений, например, *Tellima grandiflora* (Saxifragaceae) и в сравнительных исследованиях полиморфизма хпДНК как у видов рода *Coreopsis* (Asteraceae), так и многих других родов высших растений.

Как уже было отмечено, с началом широкого применения методов определения нуклеотидных последовательностей ДНК рестрикционный анализ хпДНК перестал быть ведущим методом геносистематики растений, и количество работ, выполненных с его помощью, существенно уменьшилось. Сегодня его в основном используют для контроля результатов, полученных при изучении филогенетических связей видов в пределах таксонов низших рангов методом секвенирования ДНК.

Используя гидролиз хпДНК эндонуклеазами рестрикции и определяя нуклеотидные последовательности фрагментов, оказалось возможным построить "физические карты" хпДНК, т.е. расположить на схеме строения кольцевой молекулы хпДНК все гены и негенные последовательности, ее образующие (см., например,[Певзнер, 1990; Dang, Pring, 1986]).

Для этого хпДНК полностью или частично гидролизуют какой-либо рестриктазой, определяют молекулярный вес и число образовавшихся фрагментов и, при необходимости, их нуклеотидную последовательность, а затем, если это нужно, гидролизуют ту же ДНК другим ферментом. Получают несколько иной набор фрагментов и путем их сопоставления можно реконструировать физическую карту хпДНК. В сомнительных случаях можно использовать третью эндонуклеазу рестрикции и т.д. Такой подход позволяет понять, произошли ли в ходе эволюции хпДНК как мелкие, так и крупные перестройки в ее строении. Последние данные особенно ценны, так как крупные перестройки в строении хпДНК (или митДНК) происходят относительно редко и обычно характерны для крупных клад растений. Понятно, что такие изменения легче обнаружить при определении полных нуклеотидных последовательностей ДНК (см. далее), но часть их может быть идентифицирована и обсуждаемым методом.

В ходе дальнейшего совершенствования метода был предложен его вариант, суть которого заключается в использовании для гибридизации меченных радиоактивным изотопом фрагментов хпДНК какого-то вида или иного меченого зонда . Можно работать и с препаратами "холодной" ДНК, но тогда идентификацию полос на конечной стадии проводят путем окрашивания бромистым этидием. Размеры фрагментов-зондов могут быть разными. Такие зонды используют затем для гибридизации с фрагментами ДНК изучаемого вида, полученными при обработке эндонуклеазой рестрикции и перенесенными с геля на нитроцеллюлозный фильтр (гибридизация по Саузерну) (рис. 4-14).

Ясно, что фрагменты хп-геномов или иные зонды должны обладать высокой гомологией, что и позволяет осуществлять их гибридизацию. Оценивая молекулярный вес и число образовавшихся гибридов, т.е их положение на

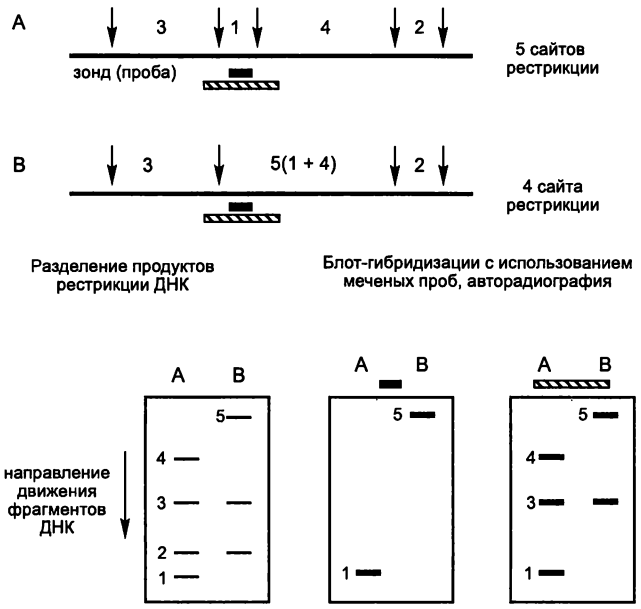


Рис. 4-14. Схема опыта для последовательностей с разным числом сайтов рестрикации

электрофореграмме, можно судить, как изменялась первичная структура хпДНК в ходе эволюции.

Таким образом, выполнены многочисленные эксперименты, которые позволили установить, что даже небольшая общая дивергенция последовательностей хп ДНК (3–10% замен нуклеотидов) выражается в существенно более высокой дивергенции фрагментов (40–80%) [Kossel et al., 1983].

RAPD и близкие методы

Широкое распространение получил еще один метод анализа ДНК, **RAPD-метод** (от английского Randomly Amplified Polymorphic DNA), преимуществом которого является возможность использования при анализе ядерных ДНК [Williams et al., 1990; Welsh, McClelland, 1990]. Вот, например, как могут различаться RAPD-паттерны условно обозначенных (A, B, C) трех видов (рис. 4-15).

Для проведения RAPD используют короткие олигонуклеотиды длиной 8–10 нуклеотидов со **случайной последовательностью**, желательно содержащие 50–70 мол. % ГЦ. Это так называемые **праймеры**, или **затравки**. На первом этапе выясняют, какие праймеры из большого исходного набора, включающего сотни их коммерческих разновидностей, могут взаимодействовать с изучаемыми ДНК, давая при этом удобное количество продуктов комплементарного взаимодействия, которые уверенно разделяются электрофорезом.

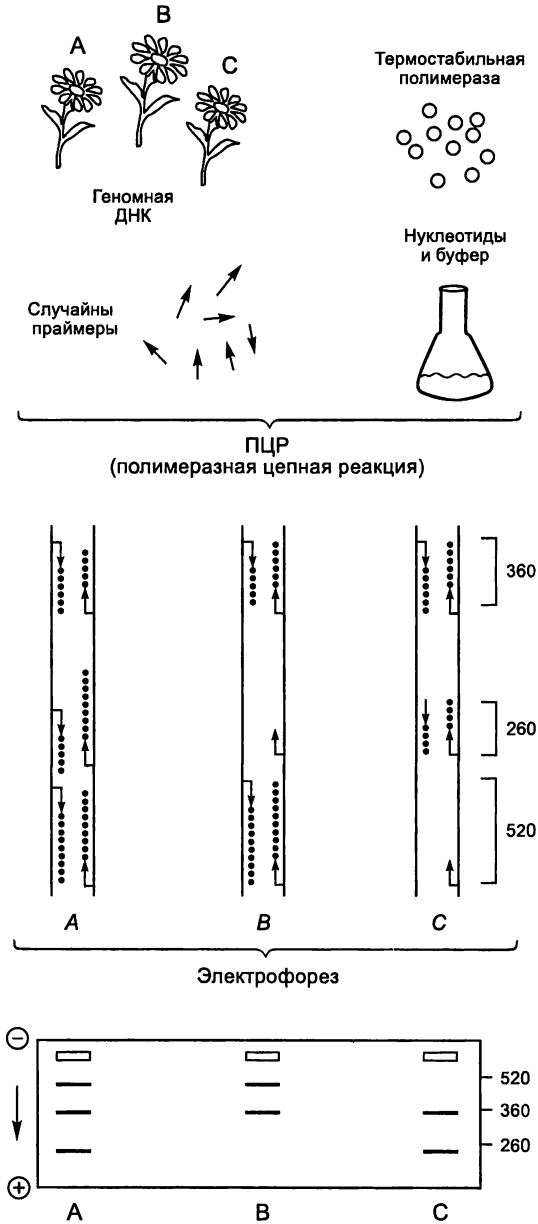


Рис. 4-15. Дендрограмма, построенная по результатам RAPD-электрофоретического анализа видов A, B, и C [Гостимский и др., 2000]

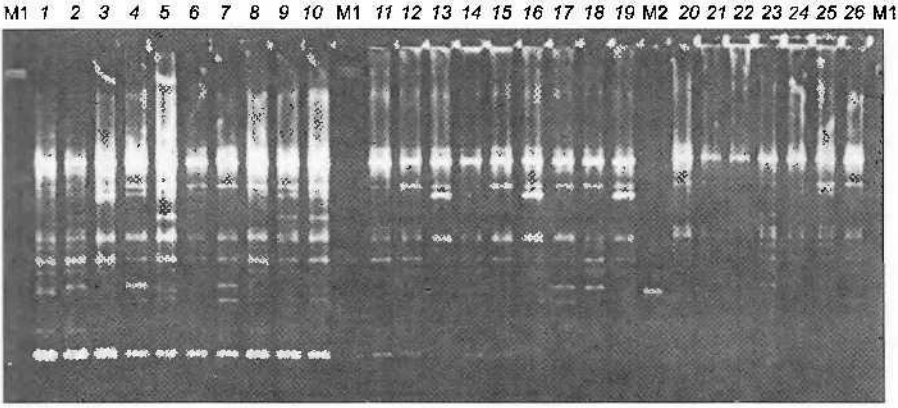


Рис. 4-16. Результаты электрофореза фрагментов ДНК, полученных RAPD-методом для сортов (дорожки *1–10*), линий (*11–19*) и мутантов (*20–26*) гороха

M1 и M2 – перевары фага и плазмиды, используемые для определения длин фрагментов, образующихся при RAPD- анализе ДНК гороха. Выявлено 132 бинарных признака, использовано 6 праймеров [Гостимский и др., 2000]

На следующем этапе осуществляют амплификацию ДНК с «подходящим» праймером. Как правило, в анализируемой ДНК имеется несколько участков, гомологичных последовательности нуклеотидов в выбранном праймере. Они могут быть расположены и в противолежащих цепях ДНК. Один и тот же праймер, взаимодействуя с такими участками, может служить как **прямой** и **обратный праймер**. Если расстояние между такими участками правильной посадки (т.е. посадки с образованием максимального количества комплементарных пар нуклеотидов) праймера не более 2000 п.н., то можно осуществить синтез фрагментов с разных противолежащих последовательностей анализируемой ДНК.

Отметим, что доля таких фрагментов от общей массы ДНК в реакционной смеси вначале будет невелика, но их количество может быть существенно увеличено (они могут быть **амплифицированы**) путем проведения **полимеразной цепной реакции (ПЦР)**. О сути этой реакции мы поговорим позже.

Если в сайтах связывания произошли мутации, то в продуктах амплификации регистрируются различия между наборами фрагментов сопоставляемых ДНК. Обычно это выявляется электрофорезом. Результаты электрофореза RAPD-фрагментов ДНК разных сортов, линий и мутантов гороха демонстрирует рис. 4-16. Видно, что в ряде случаев число и положение отдельных полос на гелях различается, что говорит о специфичности организации нуклеотидных последовательностей ДНК у сопоставляемых форм гороха [Гостимский и др., 2000]. Это хорошо видно на рис. 4-17. Понятно, что при работе этим методом в параллельных экспериментах можно использовать не один, а сколько угодно разных праймеров, получая при этом все более надежные сведения о степени сходства сопоставляемых ДНК.

Например, при изучении генетических связей дальневосточных видов семейства Аралиевых было использовано 84 разных праймера, что позволило проследить вариабильность 595 локусов [Журавлев и др., 2003]. Впрочем, лишь три

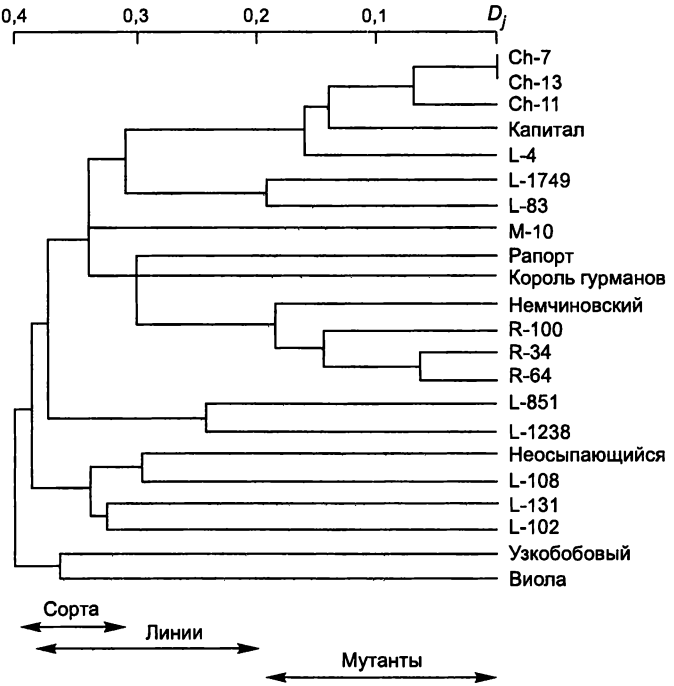


Рис. 4-17. Дендрограмма, отражающая генетическое родство мутантов линий и сортов гороха

праймера из 84-х могли быть ипользованы при исследовании всех изученных видов семейства. Эта работа хорошо показывает возможности метода RAPD для анализа филогенетических связей геномов растений из одного семейства, как и более ранняя работа А.С. Оганисян с соавт [1996], выполненная в пределах таксона ранга рода – на сортах и видах картофеля. Таких работ по изучению эволюционных связей в пределах родов покрытосеменных было выполнено множество. Помимо этого, RAPD-маркеры были использованы для изучения и водорослей, и голосеменных растений.

С другой стороны, метод RAPD не без дефектов [Ежова и др., 2002] и не всегда позволяет дифференцировать близкородственные формы (см., например, [Nkongolo et al., 2003]). В основном сегодня используют более эффективные CAPS- и другие типы ДНК-маркеров.

Таким образом, указанными выше методами было оценена степень сходства хпДНК и некоторых генов у многих высших растений и построены дендрограммы сходства мало дивергировавших хпДНК, например, у сортов, видов одного рода или даже семейства. На этом основании делали выводы о степени их филогенетического родства.

Мы перечислили основные «статистические» методы, используемые при сопоставлении и изучении семантид. В дальнейшем, речь пойдет о методах, основанных на определении последовательностей мономеров в семантидах.

Рекомендуемая литература

Петров Н.Б. Денатурация и реассоциация ДНК. В сб. «Молекулярные основы геносистематики». М.: Изд. МГУ, 1980.

Вальехо–Роман К.М. Гибридизация ДНК. В сб «Молекулярные основы геносистематики», М.: Изд. МГУ, 1980.

МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ МОНОМЕРОВ В СЕМАНТИДАХ

Успехи в определении нуклеотидных последовательностей (секвенировании) ДНК и других семантид

Помимо статистических методов исследования структуры семантид в распоряжении геносистематиков есть целый набор методов, позволяющих частично или полностью определять первичную структуру их молекул. В настоящее время разработаны методы определения даже полных первичных структур (секвенирования) гигантских ядерных геномов высших эукариот, не говоря уже о геномах более просто устроенных организмов.

Методы определения последовательностей (секвенирования) семантид

Долгое время исследования по геносистематике растений значительно отставали от аналогичных работ для других групп организмов. Первые значимые шаги были сделаны при сравнении аминокислотных последовательностей белков растений, цитохрома *c*, ферредоксина и пластоцианина (обзор: [Crawford. 2000]). Оказалось, однако, что в большинстве случаев филогенетические деревья, построенные по аминокислотным последовательностям белков растений, в отличие от аналогичных схем, построенных, например, для позвоночных животных, плохо согласуются друг с другом и общепринятыми схемами.

Был сделан вывод, что изучения только аминокислотных последовательностей индивидуальных белков недостаточно для надежной реконструкции филогении генотипов растений, и большую помощь для получения достоверной картины их филогенеза могут оказать исследования нуклеиновых кислот. К тому времени было уже показано, что выделить для анализа генную последовательность, в которой закодирована первичная структура белка, гораздо проще и дешевле, чем выделить в чистом виде сам белок [Califano, 2001].

Методы определения нуклеотидных последовательностей РНК и ДНК стали активно использовать для целей геносистематики с середины 1980-х гг. Объектами первых исследований служили малые РНК (5S, 5,8S, 4,5S, тРНК) из цитоплазмы и органелл растений. Оценена была универсальность распространения, информационная емкость и темпы эволюции 4,5S, 5S и 5,8S рРНК растений [Troitsky et al., 1984; Hori et al., 1985; Боброва и др., 1987; Bobrova et al., 1987; Troitsky et al., 1991]. Для этого были использованы методы определения первичных структур РНК, которые сегодня практически для целей геносистематики уже не находят применения, так что описывать их мы не будем.

На основании результатов, полученных при **сопоставлении РНК**, были построены первые дендрограммы, в той или иной степени отражавшие эволюционные связи изученных таксонов. В результате этих исследований стало ясно, что достоверные реконструкции невозможны по результатам исследования первичной структуры, например, одного гена, и большим достижением следует считать выполненные тогда работы П. Мартина и соавт. и А.В. Троицкого с соавт. [P.Martin et al., 1985; Рахимова и др., 1989; Troitsky et al., 1991], в которых было предложено выводы делать на основании результатов параллельного анализа первичных структур нескольких генопродуктов, РНК и белка.

Большое влияние на развитие геносистематики оказало открытие в 1980-х гг. возможности избирательной амплификации определенных участков ДНК с помощью ПЦР. Наряду с другими подходами (рис. 5-1) этот метод стал активно использоваться при изучении последовательностей ДНК.

До появления ПЦР для секвенирования можно было использовать только рекомбинантные молекулы ДНК, т.е. плазмиды со вставками ДНК последовательностей, интересующих исследователя. Причина этого – низкое относительное содержание в геномах какой-либо определенной, даже повторяющейся последовательности.

Обогащение материала, необходимого для анализа, достигалось посредством клонирования. Отдельные участки ДНК (после фрагментации) встраивали в плазмиды или бактериофаги, субклонировали и размножали бактерии (и, одновременно, соответствующий фрагмент ДНК), вырезали фрагмент при помощи какой-то определенной эндонуклеазы рестрикции, выделяли его электрофорезом и анализировали. Это требовало немало времени и усилий исследователей. Амплификация же определенных фрагментов ДНК методом ПЦР с помощью специфических праймеров, приводящая за короткий промежуток времени к накоплению значительных количеств нужных участков ДНК, оказалась эффективной альтернативой клонированию [Чемерис и др., 1999]. В книге А. Чемериса с соавт. подробно описаны почти все методы определения последовательностей ДНК. Сведения о последних достижениях в этой области можно получить через Интернет.

ПЦР основана на уже описанном ранее процессе денатурации и реассоциации ДНК и синтезе комплементарных участков ДНК при помощи затравок, «праймеров», и соответствующих ферментов, полимераз (например, *Taq*-полимеразы).

Важную роль при проведении ПЦР играет выбор специфических праймеров, которые должны взаимодействовать со строго определенными участками ДНК. (рис. 5-2). Длина таких праймеров обычно составляет ≈ 20 нуклеотидов, что

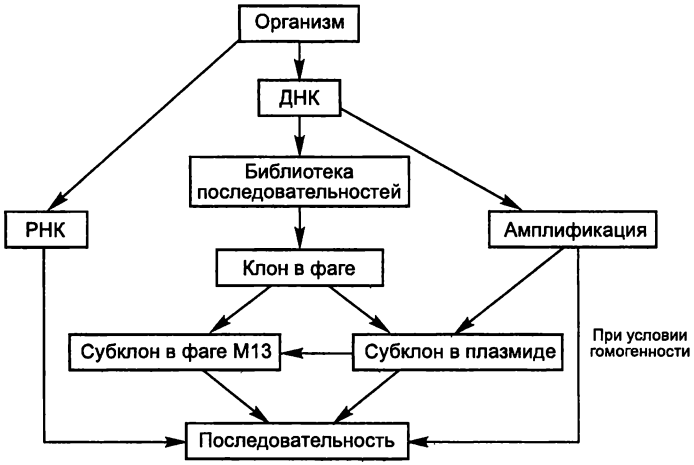


Рис. 5-1. Альтернативные способы секвенирования нуклеиновых кислот

Первый способ: из организма можно выделить препарат РНК (например, 4,5S рРНК) и определить его нуклеотидную последовательность. Сегодня этот метод практически не используется; *второй способ*: можно получить препарат ДНК, создать из него, используя плазмиды, полную «библиотеку последовательностей», включающую отдельные клоны (например, в фаге λ) и далее либо субклонировать в фаге M13, либо в плазмиде, и определить нуклеотидную последовательность клонированной последовательности ДНК; *третий способ*: можно непосредственно в препарате ДНК амплифицировать какую-либо последовательность, создать плазмидные субклоны и определить нуклеотидную последовательность вставки – изучаемого фрагмента ДНК. В зависимости от целей исследования, используют либо вариант 2, либо вариант 3

обеспечивает их специфическое взаимодействие по принципу комплементарности с участками ДНК, избранными для анализа. В результате ПЦР конечный препарат содержит в основном интересующую исследователя последовательность ДНК и ее легко выделить с помощью электрофореза.

Такой гомогенный препарат ДНК, содержащий молекулы «строго одного сорта», можно использовать для определения последовательности нуклеотидов с помощью двух основных методов, названных по именам предложивших их ученых Максама–Гилберта и Сэнгера. Эти методы подробно описаны в статьях авторов метода (см., например, [Максам, Гилберт, 1986; Sanger, Coulson, 1975; Sanger et al., 1977]) и книге А. Чемериса с соавт. [1999].

Метод Максама–Гилберта основан на реакциях специфической ограниченной химической модификации анализируемых ДНК (рис. 5-3). Описание метода для облегчения восприятия сознательно упрощено. На самом деле существует множество его модификаций.

Комплементарные цепи ДНК разделяют и метят один из концов радиоактивным изотопом (на рисунке показана лишь одна цепь). Препарат меченой ДНК делят на четыре части.

ДНК в первой пробирке обрабатывают диметилсульфатом и пиперидином, в результате чего в молекулах ДНК фосфодиэфирные связи разрываются у Г-нуклеотидов.

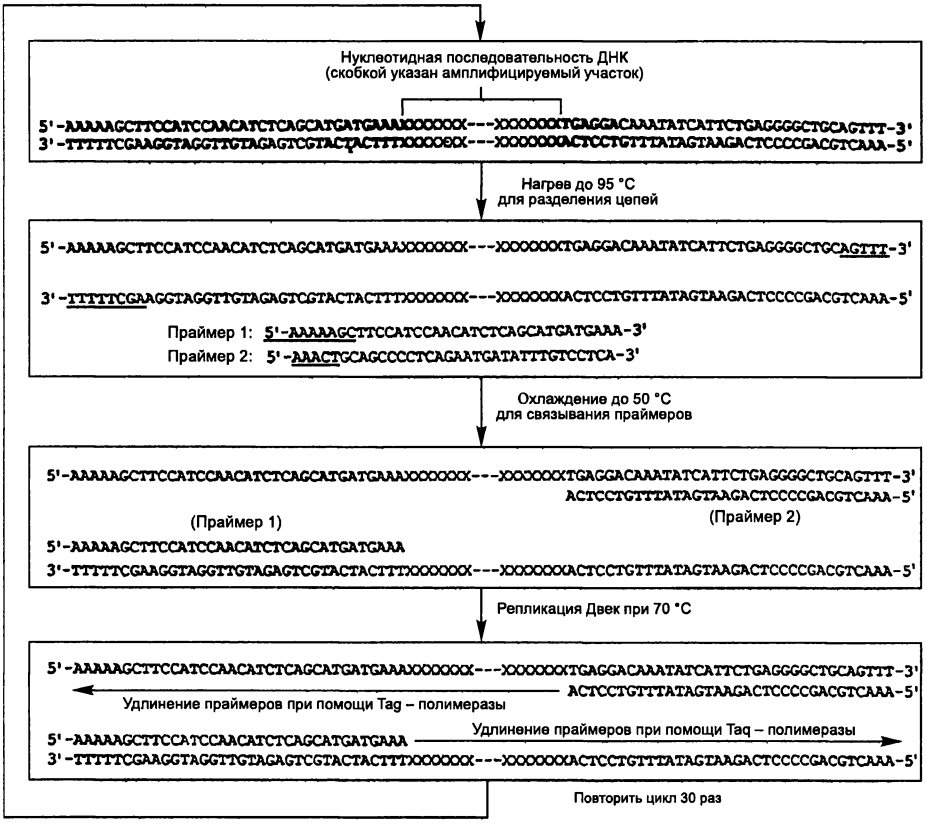


Рис. 5-2. Схема ПЦР

Показана последовательность действий, осуществляемых при амплификации участка последовательности ДНК длиной порядка 300 п.н.

В другой пробирке ДНК обрабатывают смесью муравьиной кислоты и пиперидина, в результате чего молекулы ДНК разрываются у А и Г-нуклеотидов.

В третьей пробирке ДНК обрабатывают гидразином и пиперидином, разрыв происходит у Т и С-нуклеотидов.

Наконец, в четвертой пробирке ДНК гидролизуют в солевом растворе хлористого натрия, содержащем гидразин и пиперидин.

При этом подбирают такую концентрацию реагентов, чтобы осуществить неполную модификацию ДНК. В идеальном случае в каждой отдельной молекуле ДНК модифицируется всего один нуклеотид, но число таких молекул в растворе настолько велико, что всегда какая-то их часть будет модифицирована нужным образом. Практически такая точечная модификация недостижима, но молекулы, модифицированные по нескольким сайтам, просто увеличивают долю фракции коротких меченых фрагментов.

Далее ДНК в пробирках гидролизуют по сайту модификации. В результате в каждой из них образуется смесь фрагментов ДНК разной длины Эту смесь разде-

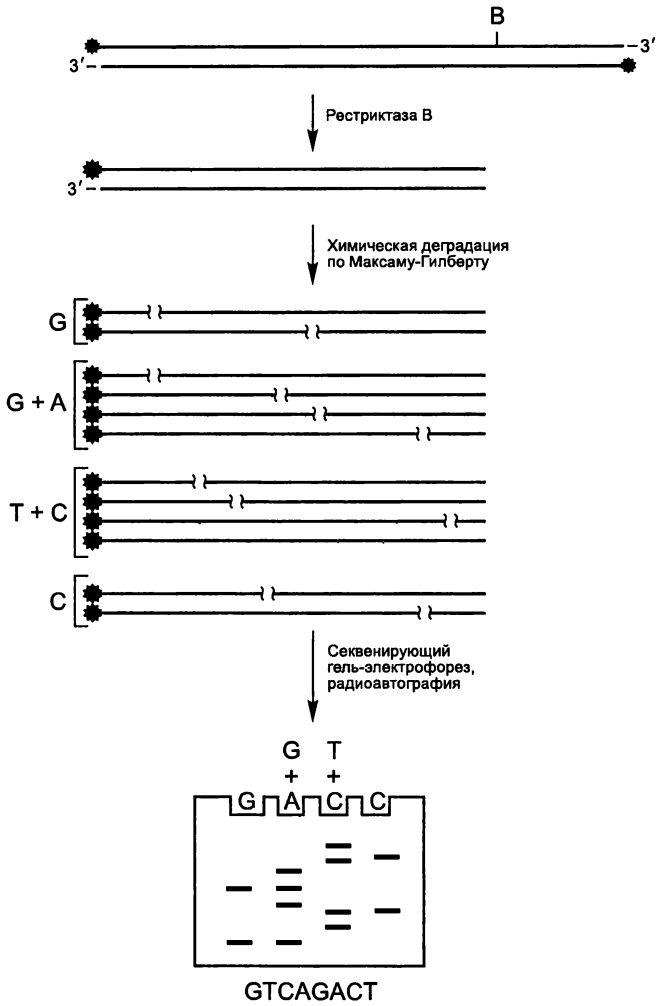


Рис. 5-3. Схема, описывающая способ определения нуклеотидных последовательностей по методу Максама-Гилберта [Чемерис и др., 2002]

ляют электрофорезом в геле или микрокапиллярах и определяют положение каждого из меченых фрагментов по его радиоактивности или иным особенностям строения (при этом образуется и множество немеченых фрагментов, но они нас не интересуют и на результатах анализа не сказываются). При ручном способе анализа, определив положение каждого пятна, считывают с геля последовательность нуклеотидов в анализируемом фрагменте ДНК. Разработаны методы ручного, полуавтоматического и автоматического чтения последовательностей. Последние используются в специальных приборах – ДНК-секвенаторах. Для проведения реакций в секвенаторах в основном используют другой метод, метод Сэнгера (рис. 5-4).

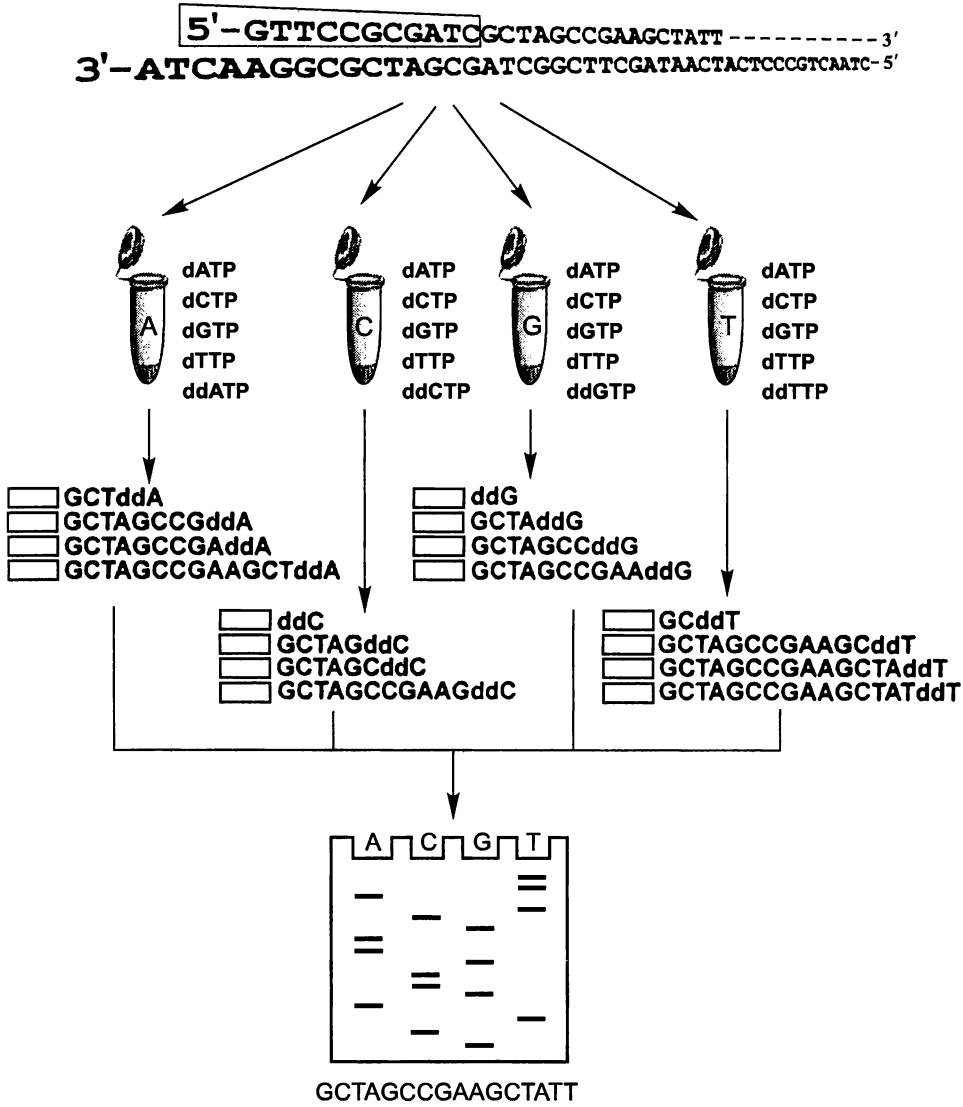


Рис. 5-4. Схема, иллюстрирующая способ определения нуклеотидных последовательностей по методу Сэнгера [Чемерис и др., 2002]

На начальном этапе ДНК денатурируют и образуют одноцепочечные матрицы (на рисунке показана лишь одна из них). К раствору ДНК добавляют «праймеры» – специфические короткие олигонуклеотиды, комплементарные одному из участков изучаемой ДНК, затем ДНК реассоциируют. Поскольку концентрацию праймера используют высокой для того, чтобы именно он взаимодействовал с избранным для изучения участком ДНК, а не происходила реассоциация исходной ДНК, то в результате получают структуру, изображенную в средней части рисунка.

Раствор ДНК, содержащий матрицы ДНК с реассоциированными с ними праймерами, делят на четыре части, добавляют все четыре нуклеозид трифосфата (дАТФ, дГТФ, дТТФ и дЦТФ), необходимые для последующего ферментативного достраивания молекул ДНК (по меньшей мере один из них должен быть помечен радиоактивным изотопом), а также специфические ингибиторы синтеза – дидезокси нуклеозид трифосфаты (можно использовать и другие специфические ингибиторы).

В первую пробирку добавляют ддАТФ, во вторую – ддГТФ, в третью – ддТТФ, и в четвертую – ддЦТФ. Во все пробирки добавляют фермент – полимеразу и на исходных матрицах ведут синтез комплементарных цепей ДНК. Используя различные соотношения концентраций взаимодействующих веществ, можно подобрать условия, когда в инкубационной смеси образуется смесь полупродуктов синтеза (см. рис. 5-4). Содержимое каждой из пробирок наносят на гель, разделяют фрагменты и определяют их положение на геле по радиоактивности. Как уже говорилось выше, сегодня все эти операции проводятся несколько иначе, и они полностью автоматизированы.

При ручном способе анализа по положению фрагментов на геле судят о последовательности нуклеотидов в изучаемом фрагменте ДНК.

В итоге в руках исследователя оказывается последовательность нуклеотидов интересующего его участка ДНК, которую можно сопоставлять с другими ортологичными (или паралогичными) последовательностями, полученными при работе с другими источниками ДНК из разных видов. О том, как это делается, мы расскажем в главе, посвященной компьютерному анализу результатов таких экспериментов.

Секвенирование ДНК, и в особенности ПЦР-секвенирование, по сравнению с рестрикционным анализом, имеет ряд преимуществ: во-первых, для секвенирования достаточно очень небольших количеств ДНК, выделенной из образцов свежего или даже гербарного материала, во-вторых, данные, полученные этим методом, легко воспроизводятся, а результаты секвенирования, проведенного в разных лабораториях, достаточно хорошо совпадают [Jansen et al., 1998]. Хотя и у него есть дефекты, определяемые ошибками в работе используемых ферментов. Широкое применение методов секвенирования ДНК привело к значительному увеличению числа работ по молекулярной систематике.

Подбирая соответствующие гены и анализируя их структуру, мы можем сопоставлять их строение у самых разнообразных организмов.

При реконструкции филогенеза генотипов наиболее эффективно каждый ген может быть использован только в определенном «окне» в эволюционной истории растений. Одни гены больше подходят для сопоставления генотипов близких видов, а другие – для самых отдаленных. Пределы использования разных генов иллюстрируются рис. 5-5. В настоящее время этот рисунок может быть существенно дополнен, так как число анализируемых генов за несколько лет, прошедших с его публикации, сильно возросло, что привело к увеличению надежности выводов. Более подробно мы поговорим об этом в одной из последующих глав.

К сожалению, и сегодня при изучении эволюции генотипов исследователи ограничиваются изучением эволюции всего одной последовательности ДНК и делают на этой основе выводы об эволюции генотипа в целом. Такие выводы не-

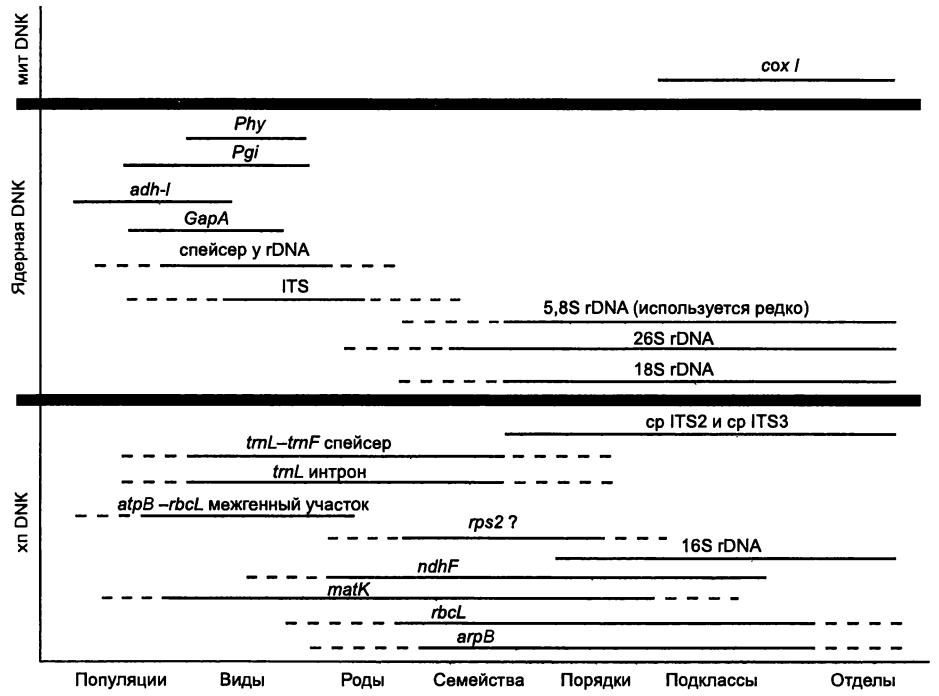


Рис. 5-5. Ориентировочные границы применимости разных участков ДНК для реконструкции процессов их эволюции [P. Soltis et al., 1998]

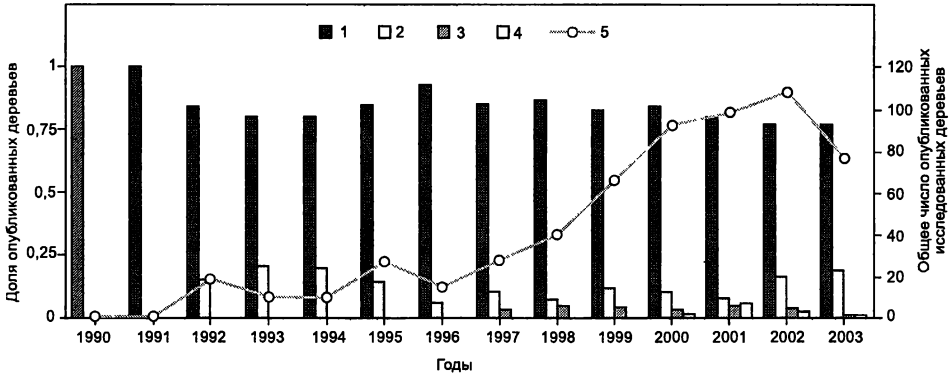


Рис. 5-6. Динамика изменения численности опубликованных «филогенетических деревьев», основанных на изучении одного или нескольких участков ДНК

Видно, что вплоть до 2003 г. доминировали работы, в которых выводы делались на основании изучения эволюции всего одного фрагмента ДНК. С тех пор положение дел в этой области геносистематики радикально не изменилось. 1, 2, 3, 4 – число участков ДНК, сопоставленных в конкретной статье; 5 – рост числа построенных деревьев

достаточно надежны. Число исследований, где для этих целей сопоставлялись результаты изучения эволюции нескольких разновидностей последовательностей ДНК, с годами растет очень медленно (рис. 5-6).

Кроме того, методами геномики уже сейчас мы можем соопоставлять в целом ядерные геномы и геномы органелл. Это очень трудоемкий, но перспективный и эффективный путь сравнения генотипов организмов для целей систематики и филогенетики.

Литература

Ежова Т. А., Солдатова О. П., Пенин А. А., Шестаков С. В. Молекулярно-генетическое картирование генома растений. М.: МАКС Пресс, 2002, с. 70.

Чемерис А. В., Ахунов Э. Д., Вахитов В. А. Секвенирование ДНК. М.: Наука, 1999.

РЕКОНСТРУКЦИЯ ЭВОЛЮЦИИ СЕМАНТИД

Вводные замечания

В настоящее время в геносистематике пока нет надежного метода сопоставления полных геномов растений, а тем более генотипов (МГСУ). Даже если возможно расшифровать нуклеотидные последовательности ДНК геномов всех видов растений, доказательством чему является определение их у арабидопсиса, риса, кукурузы и других растений, то количественно определять их суммарные сходства или различия пока представляется нереальным.

Большинство исследователей сегодня ограничивается секвенированием фрагментов ДНК, сопоставлением полученных данных, которые затем используют для построения схем отношений между исследуемыми последовательностями. С помощью этих же методов могут быть построены схемы на основании выравненных последовательностей мономеров молекул РНК и белков. Такие схемы не слишком искушенный исследователь обычно называет **«филогенетическими деревьями».** На самом деле такое название пригодно лишь для одного класса из числа возможных схем, и каждая из них лишь приближенно иллюстрирует эволюционные взаимоотношения генотипов изучаемых организмов [Неи, Кумар, 2004].

В зависимости от метода анализа фрагментов ДНК (и других семантид) и целей исследования это могут быть взаимоотношения внутривидовых форм, видов, родов и таксонов более высокого ранга, вплоть до самых высших.

Во избежание неверной, излишне однозначной трактовки результатов, полученных методами геносистематики, необходимо подчеркнуть, что **любое дерево, построенное по результатам сопоставления индивидуальных (скажем, генных) или иных последовательностей ДНК (например, полных первичных структур хпДНК) есть не что иное, как математическая гипотеза относительно эволюционных связей генотипов (или их частей) изучаемых организмов.** Эти деревья лишь приближают исследователя к пониманию истинных филогенетических связей исследуемых видов растений. Выявление таких связей и датировка событий дивергенции клад в процессе эволюции принадлежат к числу важнейших, но не нашедших окончательного решения проблем геносистематики [Гречко, 2002].

Изучение эволюции отдельных последовательностей ДНК или иных частных особенностей МГСУ и перенос результатов на эволюцию организмов является примером максимально выраженного редукционистского подхода к изучению феномена эволюции.

Очевидно, что здесь возможны как успехи, так и провалы. О достоинствах и недостатках редукционизма написано множество книг, но на практике все сомнения относительно достоверности выводов редукционистов нередко игнорируются. Большинство ботаников до сих пор не усвоило, что нет прямой связи между количеством статей, описывающих эволюцию какого-либо одного участка ДНК, и вкладом этих работ в понимание закономерностей эволюции генотипов и тем более фенотипов растений. К счастью, среди них (ботаников), не говоря уже о наиболее «продвинутых» геносистематиках, уже появились исследователи, исповедующие тезис о необходимости более широких сопоставлений МГСУ. Хорошим подтверждением этого могут быть даже первые результаты изучения эволюции семейства Pontederiaceae [Graham et al. 1998] или порядка Cornales [Fan. Xiang, 2003].

Так, при изучении эволюции Cornales были обнаружены существенные различия во взаиморасположении отдельных клад (ветвей эволюционного развития) в пределах этого порядка как на филогенетических деревьях, построенных MP- и NJ-методами, так и на деревьях, построенных одним и тем же методом, но для разных нуклеотидных последовательностей. Аналогичные результаты были получены при сопоставлении данных, полученных морфологическими и разными молекулярными методами у Pontederiacceae. Таких примеров множество. С другой стороны, иногда наблюдается удивительное совпадение представлений морфологов и результатов геносистематиков. Это, например, было отмечено при изучении семейства Betulaceae [Bousquet et al., 1992 b]. Именно примеры таких удивительных совпадений и воодушевили многих ботаников использовать методы геносистематики для изучения интересующих их проблем.

Между тем, решение проблем ботаники с помощью методов геносистематики – задача сложная. В результате мутаций в ходе эволюции в ДНК накапливаются изменения, в результате чего такие ДНК начинают сначала незначительно, а со временем все более существенно отличаться друг от друга по первичной структуре. Это касается как ядерных ДНК, так и ДНК органелл.

Процессы накопления изменений в структуре генетического материала идут в разных клеточных компартментах и филогенетических ветвях с разной скоростью. Так, без малого двадцать лет тому назад уже было показано, что у высших растений скорость накопления изменений в ядерных, хлоропластных и митохондриальных ДНК может существенно различаться [K. Wolfe et al., 1987]. Различаются и скорости накопления изменений в ДНК в разных линиях эволюционного развития растений [Антонов, Троицкий, 1986].

Под влиянием изменений в первичных структурах ДНК изменяются и МГСУ организмов. Чем глубже происходит дивергенция генотипов, тем сложнее их сопоставлять. По этой причине однозначно реконструировать эволюцию генотипов, особенно на ранних стадиях эволюции растений, до сих пор не удалось.

В дальнейшем, мы будем главным образом рассматривать изменения в структурах ДНК, но всегда будем помнить, что сравнительные исследования первичных структур ДНК – это только первый этап изучения генотипов организмов, а дальней целью геносистематики является уход от редукционизма и сопоставление целых молекулярно-генетических систем управления.

Молекулярные механизмы изменения ДНК в эволюции

На рис. 6-1 приведены наиболее характерные типы самых простых мутационных изменений в первичной структуре ДНК, которые учитывают при построении наиболее распространенного класса молекулярных филогенетических деревьев и названия которых чаще всего встречаются в литературе. Это замены одиночных нуклеотидов (транзиции и трансверсии), вставки и делеции (индели), инверсии и транслокации. Считается, что наибольший вклад в различия в строении близкородственных ДНК вносят индели [Britten et al., 2003].

При транзициях один пиримидиновый нуклеотид в нуклеотидной последовательности молекулы ДНК заменяется на другой пиримидиновый (например, Т на Ц, или наоборот), или же один пуриновый – на другой пуриновый (например, А на Г, или наоборот). При трансверсиях пиримидиновые нуклеотиды заменяются пуриновыми и наоборот (например, Ц на А или Г на Т).

Транзиции – одно из самых «мягких» изменений в структуре последовательностей ДНК, кодирующих белки, так как нередко являются синонимическими

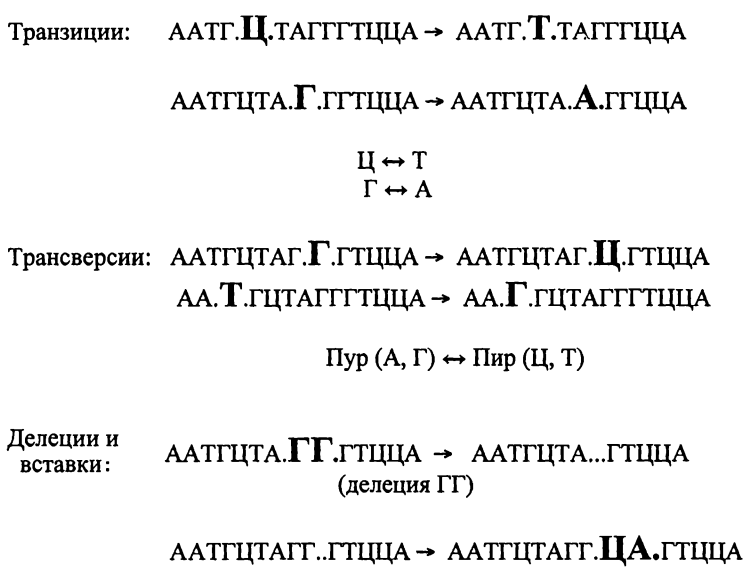


Рис. 6-1. Возможные изменения в первичной структуре ДНК в ходе эволюции

заменами, не изменяющими «смысл» кодонов. Поэтому многие транзиции не имеют явного фенотипического проявления. Если же они происходят в некодирующих участках, то эффект зависит от локализации замены.

Изменения в первичных структурах ДНК, которые могут быть учтены при реконструкции филогенеза генотипов организмов, называются филогенетически значимыми.

Если несходство первичных структур сопоставляемых ДНК выражено сильно (например, когда сопоставляемые генотипы давно дивергировали друг от друга), это затрудняет построение филогенетических деревьев. Длительный процесс дивергенции приводит к тому, что в одном и том же сайте замены могут происходить неоднократно. Это не может не сказаться на точности реконструкции процессов эволюции изучаемого фрагмента ДНК.

При использовании любого из существующих методов реконструкции филогении по результатам определения нуклеотидных последовательностей, важную роль играет корректная подготовка исходных данных, заключающаяся в выравнивании сопоставлемых нуклеотидных последовательностей.

Выравнивание последовательностей

Выравнивание – это выявление гомологичных позиций (нуклеотидов) в анализируемом наборе последовательностей [Уотермен, 1999; Гасфилд, 2003]. Выравнивание может производиться как автоматически с помощью компьютера (см., например, [Thompson et al., 1994; Rambaut, 1995]), так и «ручным» способом [Чемерис и др., 1999].

Для проведения автоматического выравнивания предложены специальные алгоритмы (см., например , [Shih, Li, 2003]). Однако обычно, наряду с такими алгоритмами, применяется и «ручное» выравнивание, которое производится путем сопоставления последовательностей «на глаз». Нередко последовательно применяют оба способа, сначала машинный, а затем ручной. Такое сочетание обычно оказывается максимально эффективным.

В основе ручного способа выравнивания лежат знания, накопленные в результате сравнительного изучения эволюции первичных структур отдельных классов последовательностей, например, генов *rbcL* или 18S рРНК. При автоматическом выравнивании важно, например, учесть в программе ожидаемое соотношение транзиций и трансверсий в сравниваемых последовательностях. Впрочем, это соотношение малостабильно и группоспецифично.

Наличие в сопоставляемых нуклеотидных последовательностях большого числа замен нуклеотидов (транзиций и трансверсий), вставок, делеций и инверсий затрудняет выравнивание и часто дает несколько его вариантов [Уотермен, 1999; Kelchner, 2000]. При выравнивании стараются добиться максимально возможного совпадения сопоставляемых последовательностей путем внесения минимального числа «пробелов», что все же иногда приводит к нескольким конечным вариантам выравнивания и, соответственно, к построению нескольких альтернативных деревьев по таким выравниваниям.

AATGCTTGCATGGGGC....TAGTT
ATTGCT...GCATGAGGCGCGCGCTAGT (выравнивание А)
и
AATGCTTGCATGGGGCTAGTT
ATTGCT...GCATGAGGCGCGCTAGT (выравнивание Б)

В выравнивании А высока степень комплементарности, совпадения нуклеотидов (всего одна трансверсия и одна транзиция), но есть два пробела, один из которых длинный. Таким скорее всего был бы результат выравнивания при низком «штрафе» за пробелы. При высоком штрафе большое число пробелов нежелательно. Скорее всего, мы получим при этом вариант выравнивания Б, но при этом число трансверсий увеличивается до трех, плюс одна транзиция. Правда, при этом сохраняется всего один короткий пробел. Размеры штрафов устанавливаются при создании программ выравнивания.

На практике число вариантов выравнивания нередко больше двух. Пример трех вариантов выравнивания одной и той же пары последовательностей приведен на рис. 6-2.

Объективных способов оценки «качества» выравнивания (т.е. пригодности одного из вариантов для дальнейших реконструкций) **не существует. Это вносит элемент неопределенности в реконструкции эволюции семантид.**

Выравненные последовательности используются для построения схем («деревьев»), отражающих процессы эволюции семантид.

AATGCTTGCATGGGGC.....TAGTT
ATTGCT...GCATGAGGCGCGCGCTAGT (А)

AATGCTTGCATGGGGCTAGTT.....
ATTGCT...GCATGAGGCGCGCTAGT (Б)

AATGCTTGCATGGGGCTAGTT.....
ATTGCTGCATGAGGCGCGCTAGT (В)

Рис. 6-2. Три альтернативных варианта выравнивания одной и той же пары нуклеотидных последовательностей ДНК

Филогенетические деревья, их свойства и методы построения

Как же осуществляется сама процедура построения «филогенетических деревьев»? Это название применяют при описании весьма различных графов, отражающих сходство сопоставляемых последовательностей.

Прежде всего, опишем некоторые общие свойства таких деревьев. Многие используемые при этом термины пришли в геносистематику из кладизма.

В каждом эволюционном «дереве», представляющем собой математическую структуру, моделирующую процесс эволюции, различают узлы и ребра (или ветви). **Узлы** – это место ветвления дерева, а ребра – его ветви. **Концевые узлы** на дереве (листья) соответствуют ныне живущим организмам, семантиды которых исследовались для построения дерева. **Промежуточные узлы** дают нам сведения о структуре анализируемой семантиды у гипотетического предка ныне существующих видов. Чем дальше такие промежуточные узлы отстоят от концевых узлов, тем о более древних предках идет речь (рис. 6-3).

Ребра отражают процесс эволюции изучаемой семантиды. На **дендрограммах** (см. далее) их длина соответствует количеству накопленных изменений за время эволюции. На многих дендрограммах, представленных в книге, хорошо видно, что количество таких изменений в разных ветвях дерева могло быть далеко не одинаковым.

Зная последовательности семантид ныне существующих организмов, мы можем реконструировать гомологичную последовательность у предсуществовавшего вида. Если речь идет о гене, кодирующем белок, то, руководствуясь генетическим кодом, мы можем, используя принципы парсимонии или максимальной экономии, реконструировать аминокислотную последовательность соответствующего белка, а затем его синтезировать.

Такие эксперименты проводили неоднократно, и они дали замечательный результат, говорящий о достоверности реконструкций: такие белки обладали биологической активностью. Именно таким способом была реконструирована ами-

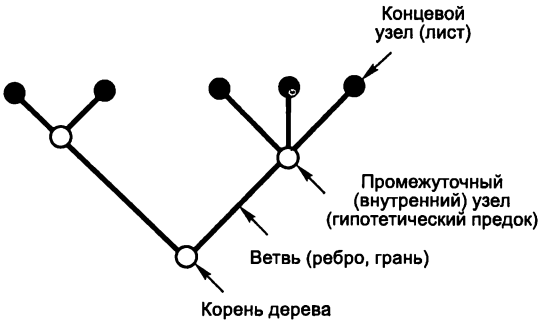


Рис. 6-3. Элементы филогенетического дерева

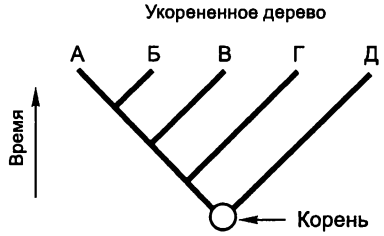
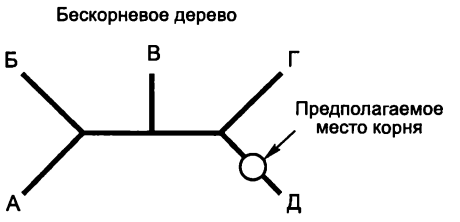


Рис. 6-4. Укорененное и бескорневое дерево



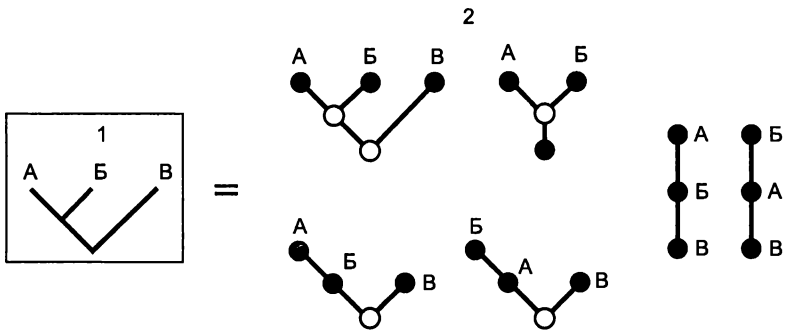


Рис. 6-5. Кладограмма и эволюционные деревья
– кладограмма; *2* – эволюционные деревья

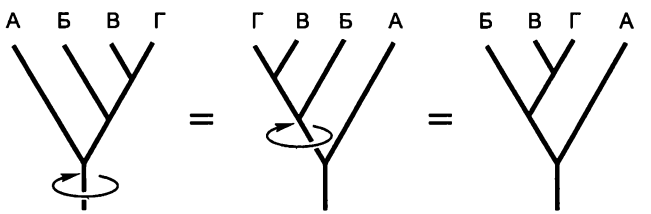


Рис. 6-6. Фрагменты деревьев можно вращать на 180° по любому из ребер без изменения смысла содержащейся в нем информации

нокислотная последовательность и синтезирован зрительный белок одного из видов динозавров. Анализ физико-химических свойств белка показал, что у динозавра было хорошее сумеречное зрение. Аналогичные эксперименты были выполнены со зрительными белками приматов.

Вернемся к описанию общих свойств деревьев.

В зависимости от метода построения **дерево может либо иметь корень, либо быть бескорневым**. О положении корня (гипотетической предковой формы) в бескорневых деревьях судят, опираясь на общие представления, подсказываемые классической систематикой (рис. 6-4).

Для описания разных сторон эволюционного процесса, исходя из выравненных последовательностей, могут быть построены разные деревья. Основной их тип – это **кладограммы**, отражающие лишь порядок ветвления. Так, на рис. 6-5 у видов А и Б общий предок существовал позже, чем у любого из этих видов с видом В.

Отметим, что у деревьев любого типа есть много общего с так называемыми «*мобилями*» – игрушками, допускающими свободное вращение частей вдоль осей (ветвей дерева) относительно друг друга (рис. 6-6). Незнание этой особенности деревьев нередко смущает новичков: они могут считать, что чем выше на рисунке дерева располагается тот или иной таксон, тем более он «эволюционно продвинут».

«Бездушным» компьютерам эта особенность деревьев хорошо известна. Так, на следующем рисунке поворот вокруг ребра А–Б на 180° сразу приводит схему в вид, более привычный для ботаников, не меняя при этом ее содержания (рис. 6-7).

Как же филогения может быть отражена в структуре дерева ? Это можно сделать тремя способами, построив кладограмму, аддитивное или ультрапараметрическое дерево [Гасфилд, 2003] (рис. 6-8)).

Кладограммы отражают лишь порядок ветвления. Аддитивные деревья (или **филограммы**) несут дополнительную информацию: они указывают на относительную длину ветвей, ведущих к видам А, Б и В. У ветвей таких деревьев обычно стоят цифры, указывающие на количество накопленных изменений (например, число произошедших замен нуклеотидов) с момента отхождения от общего предка. Наконец, **ультраметрические деревья** (называемые также **дендрограммами**) представляют собой особый класс аддитивных деревьев, у которых концы ветвей равноудалены от корня. Их строят, когда нужно дать временну́ю характеристику эволюционных изменений в семантидах, сопоставить скорость эволюционных изменений в отдельных ветвях дерева.

Для понимания дальнейшего изложения важное значение имеет термин **топология дерева**. Этот термин пришел из математики и в первом приближении может быть заменен более длинным термином «общая форма и структура дерева». Смысл его проще всего понять из рис. 6-9. На нем представлены разные топологии корневого дерева , описывающие эволюционную историю пяти гипотетических видов. Важно отметить, что на топологию дерева может оказывать влияние число анализируемых таксонов, использованных для его построения [Gauthier et al., 1988].

Эволюционные деревья сами по себе содержат неполную информацию о характере изменения изучаемых признаков. В простейшем случае признак – это стоящий в определенном месте последовательности нуклеотид. Наличие одного и того же нуклеотида в одном и том же положении последовательности у двух сопоставляемых видов еще не позволяет судить, унаследован ли он от общего предка или появился там иным путем Если же в сопоставляемых нуклеотидных пос-

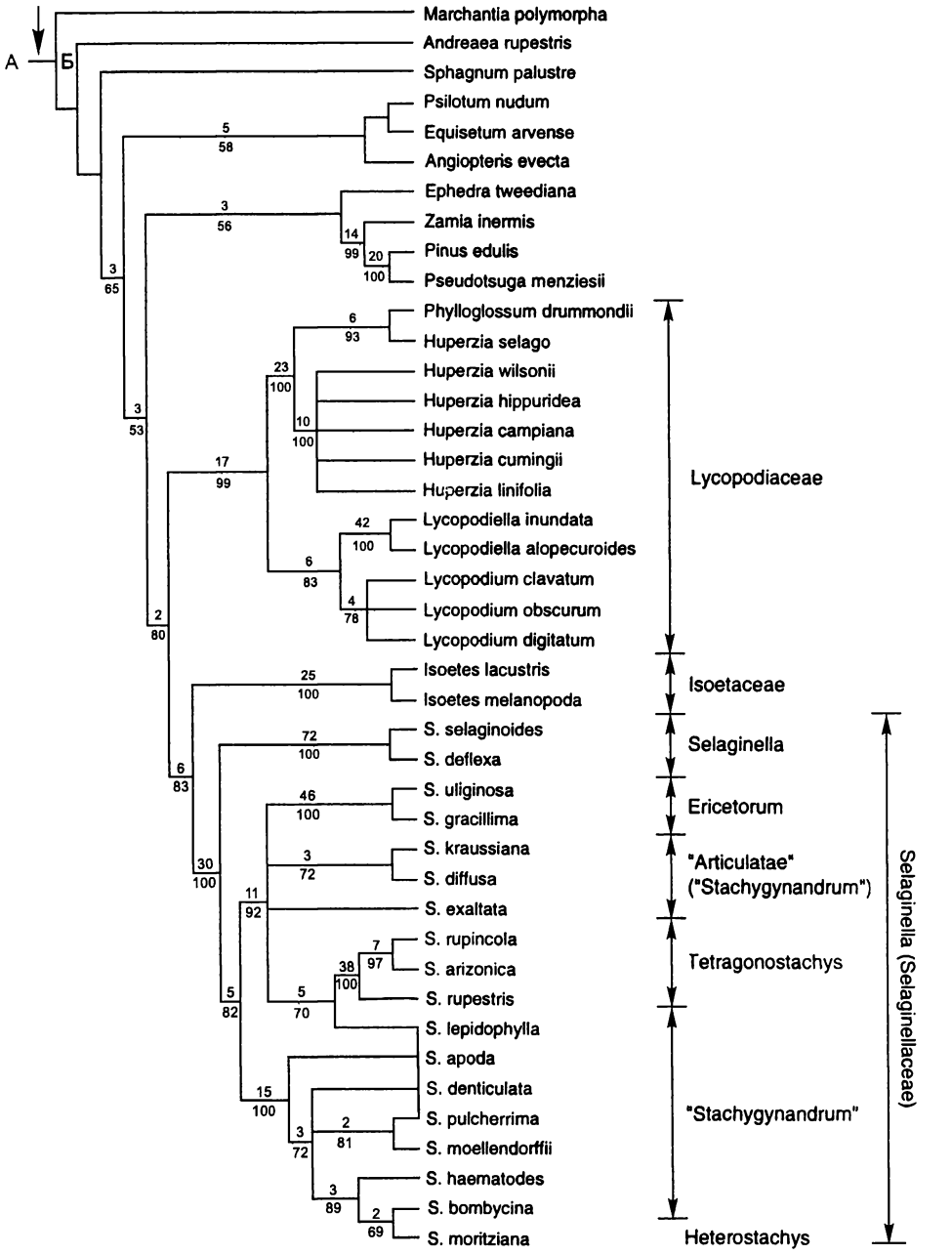


Рис. 6-7. Дерево, отражающее эволюцию плауновидных

Может создастся впечатление, что плауновидные – наиболее «продвинутая» группа высших растений (располагается в верхней части дерева). На самом деле поворот этого «мобиля» по ребру, указанному стрелкой, приводит дерево к виду, привычному для ботаников

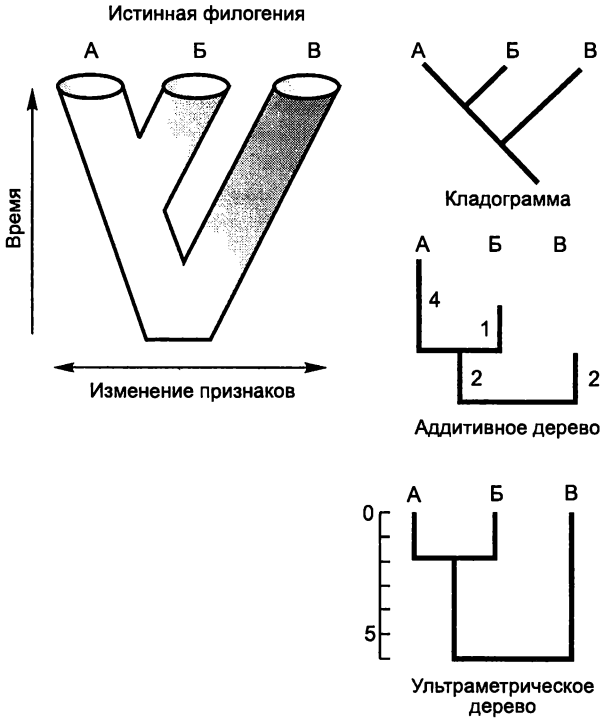


Рис. 6-8. Отражение процесса эволюции в структуре деревьев

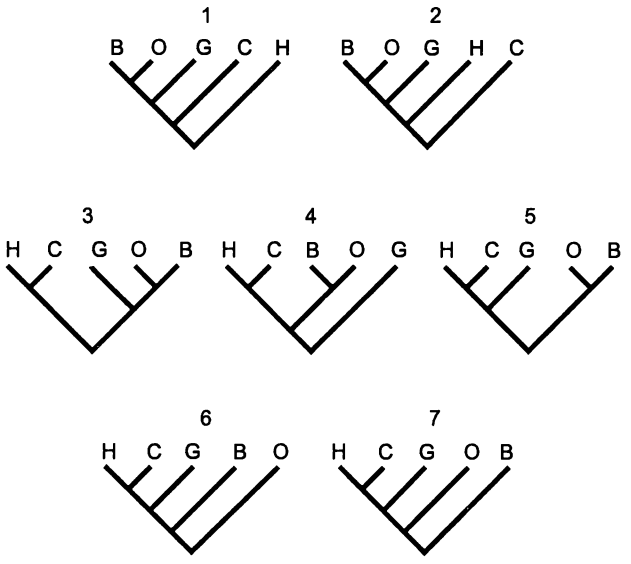


Рис. 6-9. Семь вариантов топологии деревьев, описывающих эволюцию пяти видов

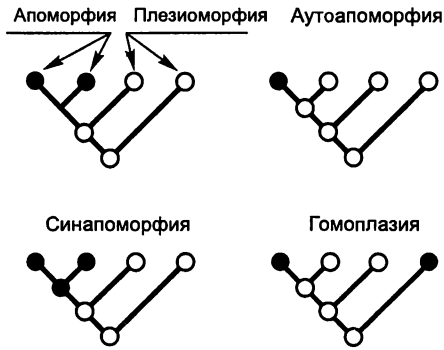


Рис. 6-10. Примитивное (предковое) и производное (продвинутое) состояние признаков

ледовательностях два достаточно длинных участка происходят от общего предка, то можно говорить об их **гомологии**.

При рассмотрении последовательностей мы можем различать предковое («примитивное») и производное состояния признака. Если анализируемая последовательность имеет тот же признак (нуклеотид), что и предковая последовательность, то это признак примитивный, или **плезиоморфный**; в противном случае он называется **апоморфным**. Уникальные апоморфные признаки называют **аутоапоморфными**, а встречающиеся у ряда видов – **синапоморфными**. Группа видов, имеющая синапоморфные признаки, в кладистике считается **монофилетической группой** или **кладой**. Сходство, однако, может появиться, например, за счет конвергенции, и в этом случае мы имеем дело с явлением **гомоплазии** (см. рис. 6-10).

Как возникают гомоплазии на молекулярном уровне? Чаще всего они наблюдаются в структурах нуклеиновых кислот и реже – в белках. Это обусловлено тем, что нуклеиновые кислоты построены из гораздо меньшего числа мономеров, чем белки. Отсюда более высокая вероятность обратных замен, возврата к исходному состоянию. Так, высока вероятность прямой и обратной транзиции Т в Ц и обратно в Т. Но такие изменения сразу многих нуклеотидов маловероятны, и поэтому выраженные гомоплазии даже в нуклеиновых кислотах – достаточно редкое явление. Они как правило не могут помешать реконструкции верной топологии дерева.

Сразу отметим, **что об общности происхождения говорит только наличие гомологичных последовательностей.** В случае гомоплазии имеет смысл различать изменения, возникшие в результате **конвергенции** или же **параллельной эволюции**, а также **вторичной потери признака** (реверсии к исходному состоянию) (рис. 6-11).

Отметим, что на молекулярном уровне явления конвергенции, параллельной эволюции и вторичной потери признака – явления достаточно маловерояτные. С ними сталкиваются реже, чем при сопоставлении фенотипов. Именно поэтому исследования семантид для выяснения филогенеза генотипов организмов стали столь популярными среди биологов.

Все названные термины в той или иной мере будут использованы при описании изменений в структуре ДНК в ходе эволюции растений.

Теперь перейдем к рассмотрению способов или методов построения деревьев. Изложение будет кратким, так как все они подробно описаны как в оригинальных работах, так и в методических руководствах.

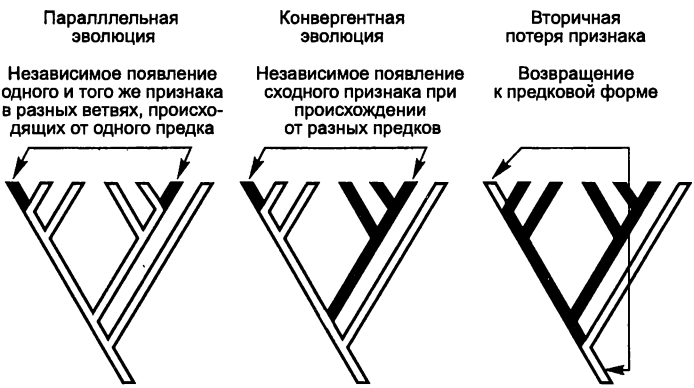


Рис. 6-11. Три механизма проявления гомоплазии

Все существующие методы реконструкции филогении можно условно разделить на две группы. В методах первой группы (distance methods – **дистанционных методов**) для всех изучаемых нуклеотидных последовательностей определяются попарные эволюционные расстояния, и филогенетические деревья строятся по определенным алгоритмам с использованием одной из существующих математических моделей эволюции. Такие математические модели описываются в учебниках по теории молекулярной эволюции, например, в учебнике В. Ли «Молекулярная эволюция» или же в монографии В. А. Ратнера с соавт. [Ratner et al., 1996; Li, 1997].

К методам этого типа принадлежат **«невзвешенный парно-групповой метод с арифметическим усреднением (UPGMA-метод)»**, в основе которого лежит гипотеза о постоянстве скорости эволюции в разных филогенетических линиях, а также часто используемый **«метод ближайшего связывания» (neighbor-joining method, NJ-метод)** и производный от него новейший **neighbor-net (NN) метод** [Bryant, Moulton, 2004].

Любому биологу ясно, что признание постоянства скоростей эволюции в разных линиях эволюционного развития вряд ли может считаться правильной посылкой, так как из результатов исследований эволюции фенотипов со всей очевидностью следует, что эти скорости могут сильно различаться. Есть все основания думать, что и на уровне генотипов дело обстоит так же .[Антонов, Троицкий. 1986; P. Soltis et al., 2002].

Кроме того, прямой анализ скоростей накопления изменений в структуре генов свидетельствует о том же: она может существенно меняться в разных ветвях построенного эволюционного дерева. По этой причине UPGMA-метод мы здесь подробно рассматривать не будем.

Филогенетическая реконструкция **«методом ближайшего связывания» (NJ-метод)** [Saito, Nei, 1987] начинается с определения генетических расстояний между парами выравненных нуклеотидных последовательностей, при вычислении которых также используется одна из моделей молекулярной эволюции, затем строится фигура в форме звезды, в которой все ветви отходят от одной точки. Постепенное группирование пар ветвей происходит до тех пор, пока не сформируется полное дерево. Оптимальным будет такое дерево, для которого сумма длин всех ветвей минимальна [Вейр, 1995].

Ко второй группе (discrete-character methods) относятся методы, основанные на использовании дискретных признаков. Для реконструкции филогении используются дискретные признаки (характеристики), такие как, например, нуклеотидные позиции в ДНК, и филогенетические деревья строятся, принимая во внимание эволюционные взаимоотношения нуклеотидных последовательностей для каждой позиции нуклеотида. Наиболее часто применяемые из этой группы **«метод максимальной экономии» (maximum parsimony, MP-метод)** [Swofford, 1993] и **«метод максимального правдоподобия» (maximum likelihood, ML-метод)** [Huelsenbeck, Crandall, 1997], а в последнее время его вариант – **Байесов метод**. Отмечается, что оценки достоверности узлов, получаемые ML- и Байесовым методами (см. далее), могут существенно различаться [Douady et al., 2003].

Метод максимальной экономии учитывает непосредственные значения молекулярных признаков, наблюдаемых в сопоставляемых семантидах каждого вида, и состоит в поиске наиболее экономной топологии, связывающей последовательности для нескольких видов. В каждом узле каждой возможной топологии размещают такие последовательности, в которых нужно произвести минимальное число изменений. Затем находят общее число изменений, необходимое для построения всего дерева. Дерево, для построения которого требуется наименьшее суммарное число изменений, является наиболее экономичным. Дж. Фельзенштейн указывает, что если число изменений за рассматриваемое эволюционное время мало, то использование методов экономии оправдано. Однако в тех случаях, когда изменения значительны, методы экономии могут давать деревья, которые оказываются ошибочными (с неверной топологией) с тем большей вероятностью, чем больше объем используемых данных.

Метод максимального правдоподобия отличается от метода максимальной экономии тем, что в нем применяются стандартные статистические методы. В его развитие недавно был предложен **Байесов метод филогенетического анализа (Bayesian phylogenetics).**

Достоинства и недостатки этого метода сегодня широко обсуждаются [Alfaro et al., 2003].

При использовании этих методов построения деревьев, как и при применении методов экономии, отдельно рассматривается каждый признак (позиция нуклеотида в выравнивании) и, также как в distance- методах, используются модели эволюции. Преимущество этих методов состоит в способности оценивать параметры эволюционных моделей и делать выводы о процессе эволюции. При их использовании однако существуют определенные сложности при анализе большого набора исходных данных. Недавно предложен способ расчетов, в значительной степени позволяющий обходить эти сложности и анализировать большие выборки исходных последовательностей значительной протяженности [Lemmon, Millinkovitch, 2002].

Все существующие методы реконструкции филогении не свободны от недостатков. Нужно всегда помнить, что **любое построенное дерево является лишь филогенетической гипотезой, с некоторой долей вероятности описывающей сходство первичных структур сопоставляемых семантид, но никак не видов организмов**. По этой причине исследователи обычно используют параллельно несколько методов и строят свои выводы об эволюции организмов, анализируя топологии деревьев, построенных с их помощью. Без такой стадии «экспертной оценки» по-

строенных деревьев вряд ли можно делать сколько-нибудь надежные заключения об эволюции первичных структур изучаемых семантид, хотя большую помощь в определении достоверности полученных дереьев могут оказать использование адекватных статистических методов оценки.

Все перечисленные выше методы основаны на анализе «суперматриц» анализируемых признаков семантид. Они были разработаны для анализа относительно небольших последовательностей семантид у малого числа видов и до недавнего времени помогали успешно справляться с проблемой реконструкции филогений. С увеличением длины анализируемых последовательностей и числа сопоставляемых тем или иным методом фрагментов ДНК время компьютерной обработки «суперматриц» увеличивается и постепенно становится тормозом на пути дальнейшего развития молекулярной филогенетики.

Альтернативным подходом стал **метод супердеревьев** ([Sanderson et al., 1998] и цитируемые там более ранние работы). Согласно предложенным алгоритмам, возможно объединение в одно «супердерево» всех деревьев, построенных «классическими» методами даже по небольшому числу исходных данных (см. выше), но имеющих хотя бы один сходный узел. Этот метод находится в стадии разработки и ему присущи свои недостатки. Впрочем, имеются указания, что два подхода дают во многом совпадающие результаты (см., например, [Salamin et al., 2002; Davies et al., 2004]). Программа для работы по этому методу опубликована [www.tcd.ie/Botany/NS /SuperTree.html].

Так, в работе Т. Дейвеса с соавт. супердерево покрытосеменных растений строили путем сведения воедино сорока шести деревьев, построенных в результате анализа эволюции индивидуальных последовательностей ДНК у представителей 379 клад ранга семейства и выше. Отмечается, что построенное дерево несколько отличается от дерева, построенного традиционными методам для слитной последовательности трех генов (*atpB*, *rbcL* и 18S rDNA) [Soltis et al., 1998 b] и имеет ряд неразрешенных политомий. Попытки датировки дивергенции отдельных клад на дереве нередко давали результаты, существенно расходившиеся с данными палеонтологов [Davies et al., 2004].

Статистические методы оценки достоверности узлов

Для оценки достоверности реконструкции узлов дерева обычно используют искусственно создаваемые выборки признаков.

Для этих целей чаще всего применяется так называемый **«бутстреп-метод»** [Felsenstein, 1985; Hillis, Bull, 1993]. Он позволяет оценить насколько надежен тот или иной узел на построенном дереве, однако не позволяет судить о филогенезе изучаемых семантид (и, косвенно, таксонов) в целом. Возможности этого метода не следует переоценивать [Carpenter, 1996].

При использовании метода бутстрепа осуществляется построение вариантов дерева и оценивается, в какой доле из них сохраняется анализируемый узел (дихотомия). Эти варианты создаются путем искусственного отсечения части исход-

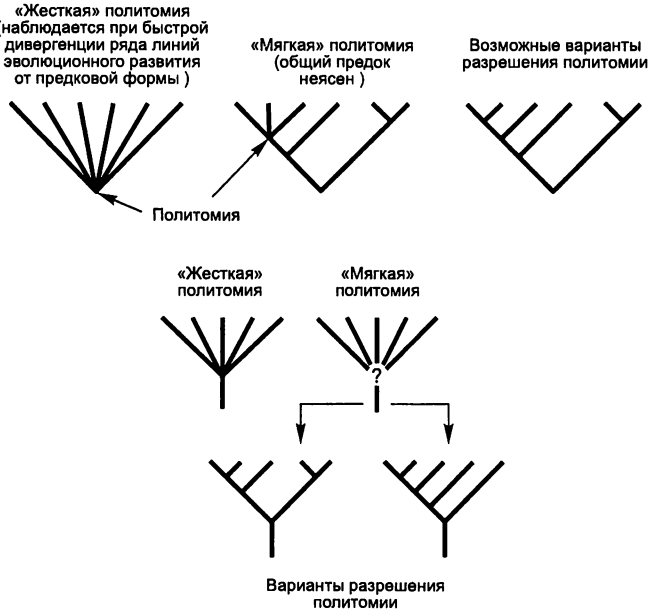


Рис. 6-12. "Жесткая" и "мягкая" политомии

ных данных. Различия в бутстреп-показателях варьируют от 0 (существование узла не подтверждается) до 100 (узел максимально вероятен). Для дальнейших оценок обычно используют узлы со значениями показателя бутстрепа более 50, но для более строгих оценок он должен быть более 80.

Впрочем, известны и исключения. Узел, поддерживаемый даже более низкими значениями бутстрепа, но на деревьях, построенных разными методами, может оказаться вполне надежным.

Применяются и другие статистические методы оценки достоверности топологии построенных деревьев. Можно использовать **«джекнайф-метод»** [Farris et al., 1996], или же Байесов метод оценки достоверности филогений, или же новейшие модификации ML-метода [Lemmon, Millinkovitch, 2002]. В работе [Mort et al., 2000] сопоставляются достоинства и недостатки этих методов.

В любом случае мы можем встретить на таких деревьях узлы, не разрешаемые тем или иным методом (политомии). Обычно это определяется недостаточностью исходных данных для полной реконструкции филогенеза. Из рис. 6-12 ясно, какие существуют разновидности политомий.

Выбор статистического метода оценки достоверности построенных деревьев крайне важен. В последние годы в этой области наблюдается быстрый прогресс. Как пишет М. Пейджел, «в биологических исследованиях наступает новая эра, в которой статистические подходы при изучении филогенеза и извлечении сведений о видах образуют независимую ветвь исторических исследований» [Pagel, 1999]. К сожалению, многие геносистематики уделяли и уделяют статистической обработке своих данных явно недостаточное внимание, что приводит к ошибкам при оценке полученных результатов.

Имеет смысл процитировать и еще один абзац из работы Пейджела: "Четыре направления историко-эволюционных исследований могут извлечь пользу при использовании новых статистических подходов. Они могут найти применение при изучении анцестральных (предковых) состояний признаков путем использования филогений в сочетании со статистическим описанием того, как эволюционировали признаки организмов для того, чтобы вскрыть наиболее вероятные признаки анцестральных видов; оценки во времени исторически-эволюционных событий; оценки темпов эволюции, которые в свою очередь позволят сопоставить пунктуалистскую и градуалистскую модели эволюции; и, наконец, сравнительных исследований, с применением корреляций и регрессий, для изучения того, какие из черт организмов подвержены изменениям в зависимости от других черт или условий среды существования, что может помочь в понимании изменений во времени при анализе пары признаков и причинно-следственной связи между ними"[Pagel, 1999].

Множество ложных филогенетических (и систематических) выводов было сделано из-за недостаточной длины анализируемого фрагмента ДНК, так как короткие фрагменты несут мало филогенетической информации, или она искажена случайным образом. Так, всего десять-пятнадцать лет тому назад филогенетические выводы пытались делать, изучая эволюцию генов малых рибосомных РНК (5S) длиною менее ста нуклеотидов. Целый ряд сделанных тогда заключений оказался справедливым, но многие не выдержали проверки результатами, полученными при изучении более протяженных последовательностей семантид.

Сегодня практически все геносистематики считают, что длина анализируемого участка должна измеряться многими тысячами и десятками тысяч нуклеотидов. Иными словами, анализ эволюции одного гена недостаточен для надежных филогенетических выводов.

Об оптимальной длине сопоставляемых участков последовательностей

Из самых общих соображений очевидно, что чем большую часть последовательностей ДНК мы определим у некоего набора видов, тем более надежные сведения могут быть получены о филогенетических связях генотипов растений. Существует несколько способов решения этой проблемы.

Так, возможно определение нуклеотидных последовательностей длинных, функционально связанных частей генотипа, например, крупных фрагментов или целых молекул хлоропластных или митохондриальных ДНК, а в последнее время и ядерных ДНК.

Исследованиями такого рода занимается **структурная геномика.** Геномика уже дает наиболее надежные сведения о сходстве генетических аппаратов растений, но обьем полученных данных пока невелик. Такой подход позволяет не только оценить близость сопоставляемых организмов, но и выделить в составе геномов гены и иные участки ДНК в наилучшей мере пригодные для решения задач фи-

логенетики и систематики [W.Martin et al., 1998]. Так, анализ белок-кодирующих генов хпДНК позволил В. Мартину и его коллегам установить,что лишь часть их пригодна для целей филогенетики. Впоследствии эти оценки были подтверждены и другими исследователями.

Возможно также искусственное объединение ("голова к хвосту") раздельно определенных последовательностей индивидуальных генов или иных участков ДНК, с дальнейшим анализом таких объединенных, «слитных» последовательностей. Правомерность и целесообразность такого подхода была обоснована в модельных экспериментах, выполненных с помощью компьютера [Cummings et al., 1995].

В настоящее время обычно реализуются три способа анализа: комбинационный (combined), консенсусный (consensus) и условно комбинационный (conditional combination approach) [Soltis, Soltis, 2000]. Поклонники первого из них склонны считать, что все последовательности надо объединять в одну до филогенетического анализа. Другие авторы, напротив, считают, что каждый из компонентов следует анализировать порознь и затем сопоставлять полученные филограммы.

Авторы, пытающиеся использовать третий подход, считают, что исходные последовательности нужно объединять, за исключением тех случаев, когда между ними существуют заметные различия.

В общем, единого алгоритма обработки данных, полученных при параллельном изучении разных генов, пока не предложено. Поскольку проблема не решена, использование только одного из трех возможных подходов вносит элемент неопределенности в филогенетические выводы.

Для укоренения деревьев важен правильный выбор внешней группы (outgroup). Если в качестве внешней группы мы выберем очень далеко отстоящий от изучаемых организмов вид, то это может привести к искажениям в топологии построенного дерева. Такие «длинные ветви» читатель легко обнаружит у деревьев, представленных в заключительных главах монографии. Речь идет о так называемом "long branch attraction – притяжении длинных ветвей. С появлением длинных ветвей на реконструированных деревьях борются, увеличивая число таксонов, близких к образующему длинную ветвь. Иногда это приводит к успеху [Hillis, 1998; Graybeal, 1998]. Если при построении деревьев берется слишком удаленная внешняя группа, то наиболее быстро эволюционирующая клада из изучаемой основной выборки как бы притягивается длинной ветвью внешней группы и приводит к артефактной топологии: такая клада ответвляется раньше положенного, что искажает филогенетическую реконструкцию.

Следует отметить, что построение филогенетических деревьев с использованием любого из предложенных методов с помощью быстродействующих компьютеров все же отнимает много времени, так как основано на анализе многочисленных вариантов в поисках одного, оптимально соответствующего исходным данным. Лишь в самое последнее время появились новинки, позволяющие существенно ускорить этот процесс [Gee, 2000].

Итак, хотя современные методы построения филогенетических деревьев не свободны от недостатков, опытные исследователи во всяком случае знают об этом, относятся к ним критически, и предпочитают строить свои выводы, анализируя деревья, построенные разными способами. Краткое описание всех этих

методов с указанием работ, в которых о них рассказывается в деталях, содержится в работах [Вейр, 1995; Eernisse, 1998; Li, 1997; Soltis, Soltis, 2000].

Редкие изменения в геномах, которые могут быть использованы в филогенетических исследованиях

Хотя малые изменения в структуре семантид (например, замены нуклеотидов в ДНК) и используются сегодня в качестве основного источника информации об их эволюции (и, в какой-то мере, об эволюции генотипов), не следует забывать, что возможности такого подхода ограничены. Вероятность конвергентной эволюции по отдельным сайтам, разная скорость накопления замен в индивидуальных сайтах и линиях эволюционного развития, перенасыщение мутациями по вариабильным сайтам, взаимозависимость замещений в разных сайтах, как и ограничения, которые накладываются отбором на молекулярном уровне – все это сказывается на надежности филогенетических заключений. Большую помощь в рещении проблем филогении может оказать анализ крупномасштабных мутаций, относительно редких изменений в структуре геномов [Rokas, Holland, 2000]. К числу таких изменений могут быть отнесены, например, появление и исчезновение интронов в генах или их разделение на дочерние интроны, структура оперонов генов рРНК, набор генов в пластидных ДНК, использование разных вариантов генетического кода в ядерных и митДНК, порядок генов в хпДНК и митДНК, степень дупликации или амплификации отдельных генов и т.п. Так, порядок генов в хпДНК у семенных растений видимо специфичен для отдельных семейств, а их наборы могут несколько отличаться у голо- и покрытосеменных растений.

Конечно, сведения о таких крупных изменениях геномов носят сегодня фрагментарный характер и для многих клад отсутствуют. Тем не менее, **отчетливо вырисовывается возможность создания молекулярного идентификатора клад растений, в котором вместо набора морфологических признаков в дихотомических ключах будут использоваться молекулярные признаки растений.** Будущее покажет, насколько такие молекулярные определители клад будут согласовываться с привычными для ботаников системами растений.

Литература

Неи М., Кумар С. Молекулярная эволюция и филогенетика. Киев: КВЩ. 20[illegible]

УЧАСТКИ ГЕНОМОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Вводные замечания

За последние годы возросло число генов и некодирующих участков ДНК, используемых в филогенетических исследованиях генотипов растений. Начались даже сравнительные исследования свойств МГСУ для целей систематики. И все же подавляющее число исследований геносистематиков ограничивается изучением эволюции отдельных генов или иных последовательностей ДНК (см. рис. 5-5), выбор которых до недавнего времени делался, в основном, исходя из удобства работы с избранным фрагментом ДНК. Лишь недавно были предприняты первые попытки оценить пригодность разных участков ДНК для филогенетических построений [Rokas et al., 2000, 2003; Kelchner, 2000; Alvarez, Wendel, 2003; Vogl et al., 2003; Goremykin et al., 2004].

Выбор подходящего участка (-ов) генома для филогенетического анализа генотипов конкретной группы организмов – нелегкая задача. Судить о достоверности таких попыток реконструкции событий эволюции трудно. До недавнего времени это, как правило, решалось методом проб и ошибок и *a posteriori*. Сегодня к выбору «правильных» участков ДНК разрабатываются более или менее обоснованные подходы. О них речь пойдет в конце этого раздела.

Подбирая участки ДНК и анализируя их структуру, мы можем сопоставлять частное строение генотипов у растений любой степени филогенетического родства и строить на этой основе филогенетические деревья. Однако обычно не рассматривается, а иногда и замалчивается вопрос о том, насколько такие деревья воспроизводят реальный ход эволюции генотипов и самих растений. Все дело в том, что количество «филогенетически информативных» сайтов в анализируемых индивидуальных последовательностях ядерной или пластидной ДНК существенно меньше необходимого для достоверной реконструкции узлов дерева. С этим борются путем анализа «слитных» последовательностей, увеличивая тем самым количество информативных сайтов, либо анализа крупных фрагментов ядерных геномов (или целых геномов) или же полных геномов пластид. Для получения достоверной информации таким путем требуется огромная по объему работа по сиквенсу, которая только начинается. В развитии таких исследований видится будущее геносистематики.

Волей-неволей сегодня геносистематики концентрируют свое внимание на сиквенсе индивидуальных последовательностей в надежде, что когда-то в будущем эти знания в сумме пригодятся для достоверной реконструкции событий молекулярной эволюции растений.

Как уже говорилось, для филогенетических целей наиболее эффективно избранный участок ДНК может быть использован только в определенном «окне» в эволюционной истории растений. Одни из них больше подходят для сопоставления близких видов, а другие – для более отдаленных. К сожалению, выполненные в последнее время исследования свидетельствуют о том, что даже при использовании индивидуальных, эволюционно консервативных последовательностей (к примеру, генов рРНК) однозначно реконструировать события эволюции генотипов, в частности, среди семенных растений, с полной достоверностью не удается [Антонов, 2000 а,б; Magallin, Sanderson, 2002; Duvall, Ervin, 2004]. То же самое справедливо и для исследований по исторической биогеографии растений (см., например, [Morley, Dick, 2003]). Этот тезис следует признать универсальным как для всех наземных растений, так и для их ближайших родственников – зеленых водорослей. Увы, даже некоторые исследователи, внесшие большой вклад в изучение эволюции последовательностей ДНК, до недавнего времени продолжали публиковать работы, в которых рассуждения о **филогенезе растений** основываются на результатах изучения эволюции строения всего **одного гена** (см., например: [Sosa, Chase, 2003]).

Рассмотрим, какие же участки ядерных ДНК и ДНК органелл (в частном случае – генные последовательности) до недавнего времени, да и сегодня, используются для более или менее надежной реконструкции филогении генотипов растений.

Анализ последовательностей ядерных ДНК

В последние годы заметно возрос интерес к изучению ядерных генов для целей систематики и филогенетики [Small et al., 2004]. Это стало возможным в результате существенного обогащения методического арсенала геносистематики (см. главы 4, 5).

Сравнительный анализ первичных структур последовательностей яДНК обычно начинают с изучения их эволюционной истории. Дело в том, что уникальных по первичной структуре участков, не имеющих в том же геноме «близких родственников», мало, а доля повторов в ядерных ДНК растений велика (см. гл. 3).

Ядерные гены эффективно «размножаются» в геномах путем амплификации (многократного увеличения их числа), а также при образовании полиплоидных форм растений.

Большую роль в понимании процессов умножения числа генов со сходной первичной структурой и роли этого процесса в эволюции видов сыграли исследования С. Оно [Ohno, 1970; русский перевод: Оно, 1973]. Этим автором была опубликована монография "Evolution by gene duplication", оказавшая большое влияние на развитие представлений об особенностях эволюции на молекулярном уровне.

В результате последовательных амплификаций–дупликаций в ходе эволюции гены образуют в ядерной ДНК семейства генов, связанные общностью происхо-

ления. Нуклеотидные последовательности генов данного семейства могут быть как практически идентичными по первичной структуре ДНК (если события амплификации-дупликации произошли недавно, если эти гены эволюционируют медленно или же подвергаются унификации), так и несколько различаться по своей нуклеотидной последовательности. «Материнские» гены в таких семействах при их сопоставлении с изофункциональными генами из других видов растений называют *ортологичными генами*, а другие члены семейств – *паралогичными*. **Для реконструкции деревьев с «правильной» топологией крайне важно, чтобы сопоставлялась первичная структура именно ортологичных генов.**

Измененные в ходе эволюции копии часто нефункциональны, но иногда способны выполнять какие-то новые функции или же реализоваться на разных стадиях онтогенеза растений. Если такие измененные последовательности окажутся нужными и полезными для организма, то они сохранятся в геномах. При этом нередко наблюдаются различия в наборе генов конкретного семейства, проявляющих свою активность в спорофитах и гаметофитах высших растений.

В качестве примера можно привести результаты исследования *HD-Zip* – генов папоротника *Ceratopteris richardii* [Aso et al., 1999], кодирующих факторы транскрипции. Они принадлежат к обширному надсемейству гомеобокс-генов. Первичная структура этих генов может заметно различаться, но самое интересное заключается в том, что часть их экспрессируется только в спорофитах папоротника, а другая – в гаметофитах. Это может служить еще одним доказательством того, что для реализации конкретного фенотипа используется лишь часть генетической информации генома организма.

В противном случае часть дуплицированных генов функционально деградирует: из них образуются «псевдогены» или же они вообще элиминируются из геномов [Wagner, 2001].

Итак, для геносистематика важно сравнивать у сопоставляемых организмов именно ортологичные гены (т.е. строго «одинаковые по происхождению» и функциям), а не паралогичные гены или псевдогены. Это особенно полезно для реконструкции филогенетических взаимосвязей генов и генотипов организмов.

При этом нельзя упускать из вида, что структура генов одного и того же семейства может несколько варьировать в разных популяциях даже одного вида. На примере генов рРНК это было детально рассмотрено в работе [Schaal, Learn, 1988]. Отсюда следует, что геносистематик должен очень ответственно подходить к отбору материалов для исследований.

Установление важной роли дупликации генов в эволюции поставило С. Оно в один ряд с такими выдающимися биологами как Шлейден, Шванн и Кольцов. В дополнение к тезисам «клетка от клетки» и «молекула–от молекулы» мы сегодня можем добавить тезис «ген от гена». Именно по этому принципу (дупликация–амплификация с дальнейшей дивергенцией по функциям) в основном и происходит усложнение геномов в ходе эволюции (см. также главу 3).

Вследствие часто встречающейся множественности структур большинства генов излюбленным объектом геносистематиков являются либо уникальные гены, либо семейства генов, структура которых подвергается унификации (ректификации, выравниванию). Первичные структуры таких генов в результате процесса унификации становятся максимально подобными. Таких генов, к сожалению,

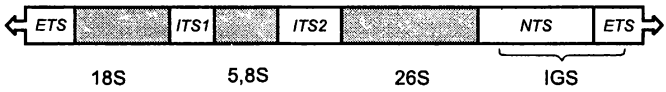


Рис. 7-1. Взаиморасположение генов и межгенных последовательностей (спейсеров) в повторяющейся последовательности (unit) оперона рРНК в ядерных геномах большинства растений

немного: к ним относятся, например, гены рРНК. Исследования генов рРНК позволили предложить ряд важных изменений в систематике водорослей и высших растений (обзор: [Антонов, 2000 б]), но судить о надежности таких рекомендаций пока трудно [Duvall, Erwin, 2004].

Интерес геносистематиков к оперону рДНК, имеющему достаточно сложную структуру, обусловлен наличием в его составе как эволюционно высоко консервативных кодирующих участков, так и быстро эволюционирующих (например, некоторых спейсерных) последовательностей. Это позволяет проводить филогенетический анализ на разном таксономическом уровне, чем и воспользовались ботаники, развернувшие широкие сравнительные исследования отдельных генов и спейсеров из оперонов рРНК.

Группы генов ядерной рибосомной РНК растений локализованы в определенном месте хромосом – в районе ядрышкового организатора и, как правило, представляют собой группы тандемно расположенных, многократно повторенных одинаковых структур (units – повторов, единиц) [Ченцов, 2004]. Структура повтора представлена на рис. 7-1. Темные участки на рисунке – это гены, кодирующие разные рРНК (18S, 26S и 5.8S рРНК). Светлые – разделяющие их "спейсерные" (от английского spacer – распорка, прокладка) последовательности.

Иногда отдельные гены рРНК или даже опероны встречаются вне ядрышковых организаторов, в других частях хромосом. Такие *гены-орфоны* (от англ. orphan – сирота) эволюционируют в основном независимо от генов, входящих в блок тандемно повторенных генов рРНК. Их анализ методом ПЦР вместо «главных», многократно повторенных генов, может приводить к неверным заключениям, так как они практически не подвергаются процессам ректификации и, в принципе, могут накапливать изменения быстрее, чем гены основного блока.

Число повторяющихся единиц – блоков индивидуальных генов рРНК– у растений весьма вариабельно. Это было установлено в 1970-х – 1980-х гг., в самом начале их изучения у высших растений оно измеряется сотнями и даже тысячами.

Каждый повтор включает в себя, помимо кодирующих участков генов 18S, 5,8S, 26S рРНК, два некодирующих спейсера (называемых внутренними транскрибируемыми спейсерами ITS1, ITS2 (см. рис. 7-1), которые разделяют три кодирующие области, а также имеет некодирующие участки перед первым (с 5'-конца) геном 18S рРНК и за последним геном 26S рРНК (эти участки называются внешними транскрибируемыми спейсерами, ETS) [Morgan,. 2003]. Единицы транскрипции рДНК разделены между собой межгенными спейсерами, IGS, включающими в себя ETS и нетранскрибируемый спейсер, NTS (рис. 7-1).

Приблизительная длина нуклеотидных последовательностей трех кодирующих участков у растений весьма сходна: 18S составляет ~1800 п.н., 26S ~ 3300 п.н., 5,8S ~ 160 п.н. Длина IGS, напротив, сильно варьирует: от 1 до 8 т.п.н. Эти

различия в длине IGS являются основной причиной вариаций полной длины повторяющихся участков рДНК у растений (8 – 15 т.п.н.).

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей «больших», 18S и 26S рРНК нашел широкое применение в геносистематике. Как уже было отмечено ранее, результаты сопоставления этих последовательностей были использованы при выделении трех основных ветвей жизни – эубактерий, архебактерий и эукариот [Woese, 1987] и при изучении разных таксонов водорослей, простейших, грибов и высших растений и животных.

Меньший размер 18S рДНК (1800 п.н.) по сравнению с 26S рДНК (3300 п.н.) делает ее более удобной для исследователя. С другой стороны, надежность филогенетических выводов, полученных при изучении эволюции гена 18S рРНК, не слишком высока [Duvall, Ervin, 2004].

Тем не менее, полные последовательности 18S рДНК давно и широко применяются при изучении молекулярной эволюции водорослей [Friedl, 1995], мхов [Mishler et al., 1992; Capesius, Bopp, 1997], папоротников [Wolf et al.,1998], голосеменных [Chaw et al., 1997, 2000] и других растений. В настоящее время структура этого гена изучена у многих сотен видов высших растений и водорослей. Примером может быть дерево, построенное по результатам изучения эволюции 18S рРНК у наземных растений (рис. 7-2).

Считается, что у 18S рДНК филогенетически информативными являются 18,4% всех нуклеотидных позиций [Nickerent, Soltis, 1995]. Низкая скорость эволюции 18S рДНК ограничивает ее использование рамками анализа филогении генотипов достаточно отдаленных групп растений. Для исследования эволюции 18S рДНК в пределах таксонов низших рангов этот ген не пригоден: он не успевает накопить изменения, пригодные для реконструкции эволюционной истории.

Изучение эволюции гена 26S рРНК в ряде случаев предпочтительнее: последовательности 26S рРНК эволюционируют в 1,6–2,2 раза быстрее и несут в 3,3 раза больше филогенетической информации, чем 18S рРНК [Kuzoff et al., 1998]. Кроме того, последовательность 26S рРНК содержит несколько участков разной длины, называемых «expansion segments» (аналогичные участки есть и в гене 18S рРНК), для которых характерна повышенная вариабельность [Bult et al., 1995]. Скорость эволюции этих сегментов в 6–10 раз превышает скорость накопления изменений в эволюционно консервативных участках 26S рДНК. Число видов, у которых была исследована структура гена этой РНК, постоянно растет.

Небольшой по размеру ген 5,8S рРНК (164–165 п.н.) также был использован для филогенетических построений. Однако этот ген, к сожалению, слишком мал и консервативен, чтобы быть информативным при изучении филогении близких таксонов растений [Troitsky, Bobrova, 1986]. Доля потенциально информативных сайтов в последовательностях 5,8S семенных растений (14%) сходна с долей, определенной для 18S (18.4 %), поэтому, в некоторых случаях (но не всегда !) наблюдается сходство в филогенетических построениях по 18S, 26S и 5,8S рДНК [Nickrent, Soltis, 1995].

Примеры достаточно успешного использования результатов сравнительного изучения ядерных генов рРНК и соответствующих спейсерных участков многочисленны. На этой основе на уровне макротаксонов предлагалась ревизия макрофилогений и систем водорослей и высших растений (обзоры: [Антонов, 2000б;

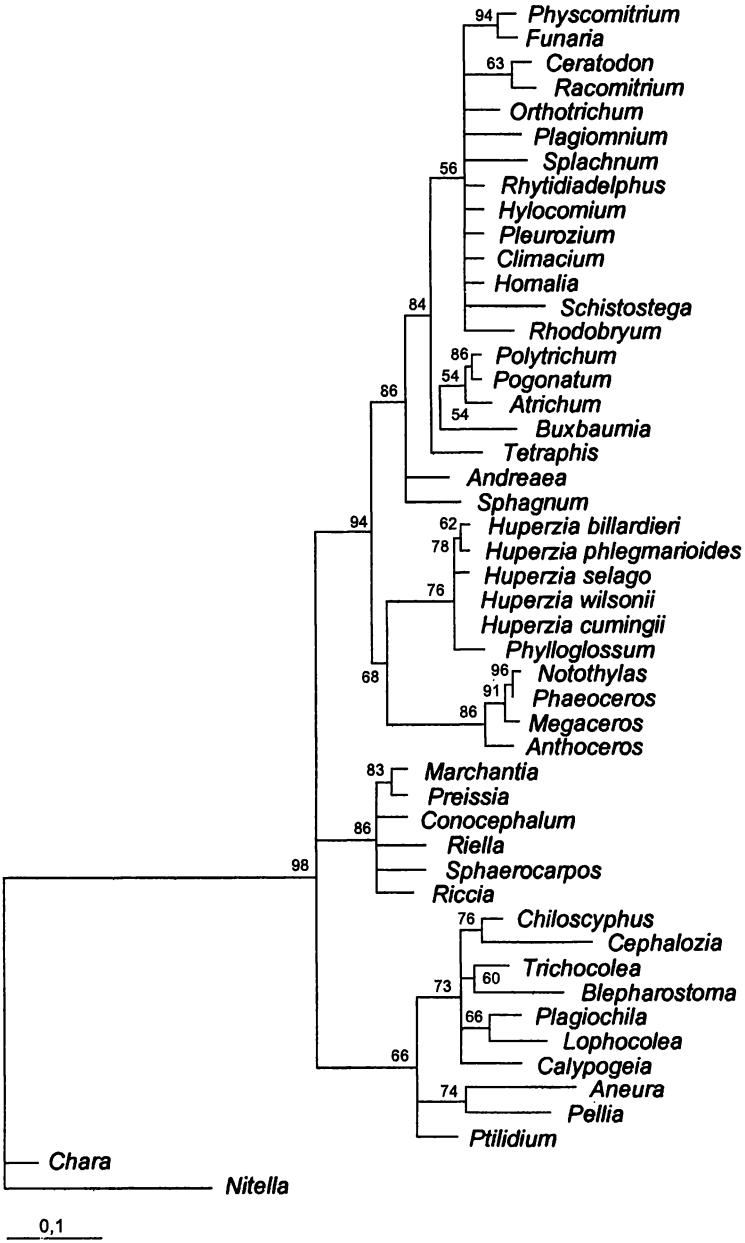


Рис. 7-2. Филогенетическое дерево, построенное по результатам изучения эволюции гена одной из рРНК

У узлов дерева приведены значения индекса бутстрепа, указывающие на его достоверность

Crawford, 2000]). Впрочем, те же гены (другие их участки) или спейсеры могут использоваться и на уровне таксонов низшего ранга. Выводы о филогении видов на основании изучения нуклеотидных последовательностей спейсеров путем ПЦР

нужно делать с осторожностью, так как нередко в пределах одного генома присутствует по нескольку их типов, различающихся по длине (см., например, [Рыкова и др., 2002]).

Сопоставления генов рРНК (а в последнее время – и их промоторных участков) было использованы для оценки уровня родства двух родов высших растений, пшениц и эгилопсов [Вахитов и др., 2003]. Эти роды включают большое число полиплоидных форм, причем во многих случаях геномы полиплоидов формировались за счет геномов диплоидных видов, нередко из разных родов.

Исследования молекулярной эволюции генотипов пшениц и эгилопсов ведутся не один десяток лет и на сегодняшний день близки к завершению. Стало более или менее ясно, какие из видов эгилопсов явились донорами геномов для генотипов мягкой пшеницы [Бикбулатова и др., 2003 б]. Эти знания уже внедрены в практику (см. Введение).

В настоящее время достаточно широкое распространение получило изучение филогенетических отношений растений на основании анализа последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS1 и ITS2) на участке 18S–26S ядерной рДНК [Alvarez, Wendel, 2003]. Хотя участок, включающий ITS1, ITS2 и находящийся между ними ген 5,8S, относительно невелик (600–700 п.н.) и приблизительно одинаков у покрытосеменных, он значительно варьирует по длине голосеменных: так, размер этого участка у Pinaceae составляет от 1550 до 3125 п.н.; самым вариабельным оказывается ITS1.

Наиболее перспективным оказалось использование последовательностей ITS1 и ITS2 для разрешения филогенетических отношений генотипов на уровне семейств, родов и видов растений, а также в популяционных и ботанико-географических исследованиях [Baldwin, 1992, Baldwin et al., 1994; 1995 Valiejo–Roman et al., 1998, 2002a,в; Ainouche, Bayer, 1999; Downie, Katz–Downie, 1996; Downie et al., 1998, 2000 а; и др.]. Вот, например, как выглядит филогенетическое древо ITS зонтичных, построенное по результатам изучения эволюции этих спейсерных последовательностей (см. рис. 7-3).

Высоким филогенетическим потенциалом для выяснения филогенетических отношений на уровне семейств, родов и видов обладает также последовательность внешнего транскрибируемого спейсера (ETS) рибосомного оперона [Linder et al., 2000]. Показано, что скорость эволюции ETS-последовательности в 2,3–2,4 раза превышает скорость эволюции участка ITS1 – ITS2. Сходное соотношение получено и для доли потенциально информативных (1,5 ETS:1 ITS) и вариабельных (1,3 ETS:1 ITS) позиций нуклеотидных последовательностей [Baldwin, Markos, 1998].

К настоящему времени накоплен обширный материал и по другим ядерным генам. Для генов фитохромов (на примере семейства Fabaceae) показана возможность их использования для понимания филогенетических связей генотипов на уровне родов и видов [Mathews et al., 1995]. Для гена *adh1*, кодирующего алкоголь–дегидрогеназу, показана возможность его использования на уровне вида у *Zea* и *Gossypium* [Small et al., 1998; Small, Wendel, 2000]. В работе A. Denton и соавт. для выяснения взаимоотношений древнейших групп покрытосеменных растений предложено использовать ген *rpb2*, кодирующий большую субъединицу РНК полимеразы II [Denton et al., 1998]. Изучается возможность использования в геносистематике растений генов *gapA* и *gapC*, кодирующих глицеральдегидфос-

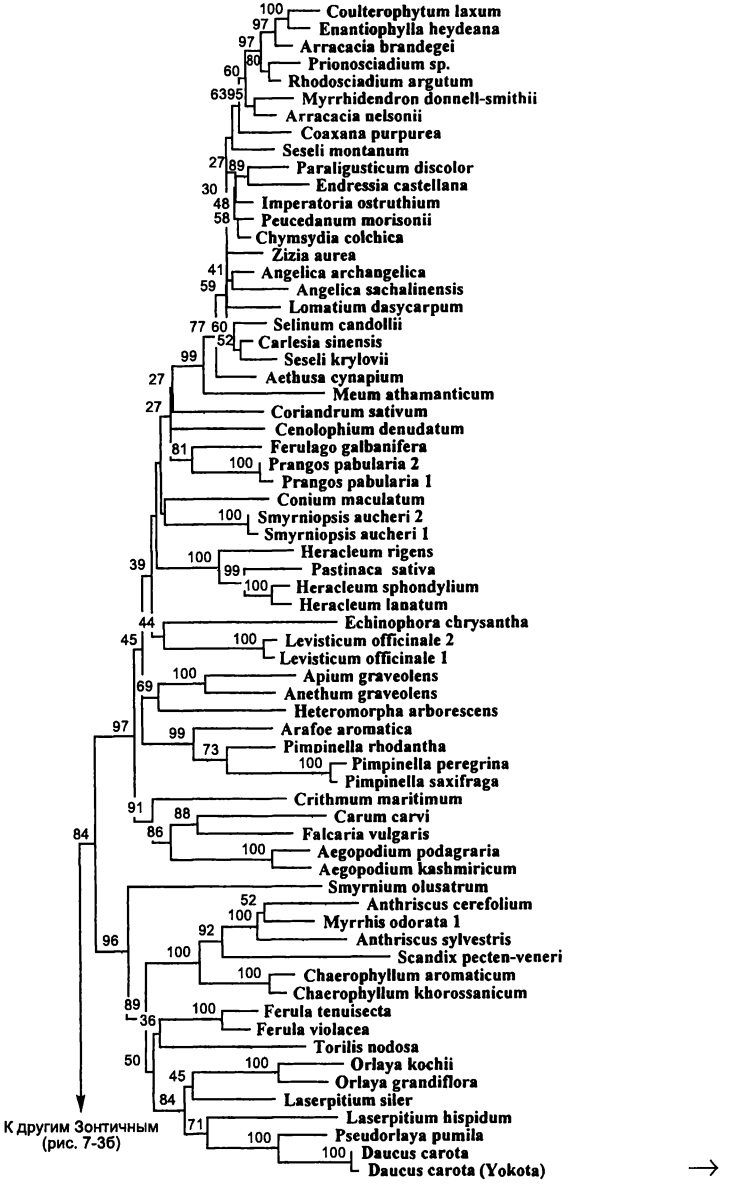


Рис. 7-3. Реконструкция эволюции ITS у Зонтичных

У узлов приведены значения бутстреп-индекса, указывающее на достоверность их реконструкции

фатдегидрогеназу [W. Martin et al., 1993; Adachi et al., 1995], кодируемого ядерным геномом гена малой субъединицы рибулозодифосфаткарбоксилазы, *rbcS* [P. Martin, Dowd, 1984, 1991 a], гена глицерол-3-фосфатацилтрансферазы [Tank, Sang, 2001], гена малатсинтазы [Lewis, Doyle, 2001], генов семейства *betv1* [Wen et al., 1997] и многих других генов.

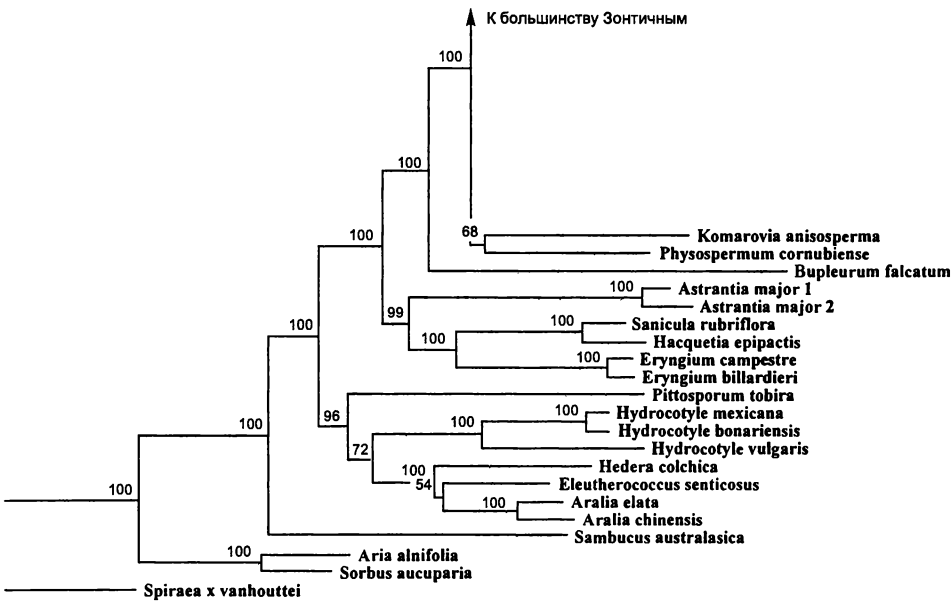


Рис. 7-3 (окончание)

Большой интерес у исследователей вызывают семейства гомеотических генов, обычно кодирующих сиквенс-специфичные, взаимодействующие с ДНК активаторы транскрипции. Семейство это подразделяют на два подсемейства, I и II. У растений структура этих генов образована специфическими доменами (MADS (M), I, K, N- и C-terminal boxes). Эти гены непосредственно связаны с процессами морфогенеза у растений. Так, MADS-box гены обнаружены у всех кариот [Theissen et al., 1998; Nam et al., 2003, 2004]. У растений большая часть генов MADS-box семейства контролирует развитие репродуктивных структур [Munster et al., 1997; Mouradov et al., 1998]. В результате филогенетического анализа MADS-box генов было подтверждено, например, что гнетовые не ближе к покрытосеменным, чем любая другая группа голосеменных растений [Winter et al., 1999]. Исследование этого семейства генов у гинкго показало, что лишь одно «-подсемейств» этого гена сходно с аналогичным подсемейством в геномах покрытосеменных. Другие члены семейства возникли уже после разделения филогенетических линий голо- и покрытосеменных растений [Jager et al., 2003]. В таких случаях критическим является анализ именно ортологичных генов у голо- и покрытосеменных.

Исследование морфогенов, определяющих развитие и строение цветка, позволяет исследовать эволюционные процессы на уровне семейства. Из недавних примеров остановимся на работу [Montieri et al., 2004], в которой проведен филогенетический анализ ряда европейских орхидных. В ней сопоставляются скорости молекулярной и морфологической эволюции. В отличие от более ранних работ, в которых указывалось на выраженное сходство этих скоростей [Purugganan, Suddith, 1998; Barrier et al., 2001], в этой работе констатируется, что в случае орхидных эти скорости даже у близкородственных видов могут существенно различаться.

Изучение эволюции MADS-box генов, как и других морфогенов (например, класса *knotted* [Bharathan et al., 1999], *flo* [Carpenter, Coen, 1990], *lfy* [Weigel et al., 1992; Carmona et al., 2002] и др.), возможно, в дальнейшем поможет глубже понять эволюцию основных линий водорослей, наземных растений и происхождение цветковых растений.

Большой интерес вызывают результаты, полученные при изучении эволюции одного из интронов уникального гена *PISTILLATA*.

Ген этот был описан в конце 1980-х – начале 1990-х гг. Его активное исследование проведено в группе Е. М. Мейеровитц. Видимо, он имеется у всех покрытосеменных и кодирует морфогенез цветка. В частности, путем секвенирования **этого интрона** была показана его важная роль в размножении доминантных аллелей путем межвидовой гибридизации в роде *Lepidium* (Brassicaceae) [Lee et al., 2002]. В этой работе отмечается, что построенные по последовательности **этого фрагмента** ДНК филогенетические деревья существенно отличаются от построенных по последовательностям ядерного ITS. Последние, в свою очередь, отличаются от деревьев, построенных по последовательностям хпДНК. В причинах этих расхождений еще предстоит разобраться.

Опираясь на полученные результаты, авторы делают вывод о высоком вкладе сетчатой эволюции в становление современных видов *Lepidium*. Не менее важный вывод, который вытекает из этой серии работ: реконструкция филогении ни по одной индивидуальной последовательности не позволяет однозначно реконструировать события эволюции организмов.

Задача заключается в разработке методов, позволяющих выносить здравые филогенетические суждения на основании изучения эволюции максимально большого числа "подходящих" ядерных генов. Исследования эволюции отдельных ядерных генов для этих целей недостаточны.

Анализ последовательностей ДНК хлоропластов

Наиболее обширный материал был получен и проанализирован при изучении гена *rbcL*, кодирующего большую субъединицу рибулозодифосфат карбоксилазы. Этот ген локализован в большой однокопийной области хлоропластного генома. Размер гена *rbcL* составляет приблизительно 1430 п.н.

Сравнение последовательностей гена *rbcL* уже давно применяется для изучения филогенетических связей водорослей [Freshwater et al., 1994], моховидных [Lewis et al., 1997], папоротников [Clegg, 1993; Hasebe et al., 1992 c, 1995; Pryer et al., 2001] и семенных растений [Chase et al., 1993].

Первые итоги исследования эволюции гена *rbcL* были подведены еще в начале 1990-х гг. Обширный материал по последовательностям этого гена (более 450 видов семенных растений) был проанализирован в результате совместной работы нескольких лабораторий. Результатам этих исследований был посвящен специальный выпуск журнала Annals of the Missouri Botanical Garden за 1993 г., обобщающая статья этого выпуска представлена 42 авторами [Chase et al., 1993]. Это была одна из первых попыток серьезных обобщений результатов, полученных

методами геносистематики при изучении генотипов высших растений. Не все выводы этой работы получили подтверждение в ходе дальнейших исследований, но в качестве первого значимого шага в исследованиях эволюции генов она представляет безусловный интерес.

К началу XXI в. строение гена *rbcL* было изучено у более чем 3000 видов покрытосеменных растений.

В ходе этих исследований было выяснено, что ген *rbcL* является не лучшим объектом для изучения генотипов в разных линиях эволюции растений, и его анализ дает не совсем надежные результаты при построении филогенетических деревьев, особенно при анализе эволюции древних групп [Goremykin et al., 1996; Kellog, Juliano, 1997]. Связано это с тем, что у давно дивергировавших видов ген оказывается перенасыщенным синонимичными заменами, и использование в анализе всех трех положений кодонов приводит к неправильным филогенетическим выводам. Исключение из анализа третьего положения кодона, где число синонимичных замен доходит до 75%, чаще всего дает более надежные результаты [Goremykin et al., 1996].

Несмотря на существующие доказательства малопригодности гена *rbcL* для реконструкции филогенеза генотипов растений и переноса выводов на эволюцию самих растений, многие и сегодня продолжают использовать его для этих целей. Достоверность выводов из этих работ, а тем более использование их для ревизии систем растений, вызывает сомнения. Не случайно с увеличением числа изученных видов *rbcL* филогенетические деревья претерпевали существенные изменения, топология их оказалась нестойкой (см., например, гл. 12).

Находящийся в хпДНК вблизи *rbcL* ген *atpB*, кодирующий β субъединицу АТФ-синтетазы, также используется для филогенетических исследований. Анализ нуклеотидных последовательностей гена *atpB* показал, что скорость эволюции этого гена сходна со скоростью эволюции *rbcL* [Hoot et al., 1995 a,b; 1998]. Ген не содержит интронов. Показана возможность и границы применимости использования данного гена при изучении филогении генотипов покрытосеменных растений [Savolainen, Chase 2003].

Широкое применение в филогенетических исследованиях нашел ген *matK*, также находящийся в большой однокопийной области хлоропластного генома [Hilu et al., 2003].

Этот ген длиной около 1550 п.н. кодирует фермент матуразу, ответственную за сплайсинг (т.е. вырезание из первичного транскрипта) интронов II группы. Среди кодирующих участков хлоропластного генома *matK* – один из наиболее быстро эволюционирующих.

По данным, полученным для семейств Saxifragaceae, Cornaceae, Cupressaceae, скорость накопления нуклеотидных замен в гене *matK* превосходит таковую в *rbcL*. в среднем, в три раза [Johnson et al., 1994, 1996; Soltis, Soltis, 1997. 2000].

Для увеличения филогенетической информативности исследуемый участок часто дополняют последовательностью *trnK*-интрона, фланкирующего ген *matK*. Показано, что у Saxifragaceae 5′-фланкирующая область менее вариабельна, чем *matK*, а 3′ – более вариабельна. Анализ возможности применения гена *matK* для филогенетических построений, проведенный K.Hilu и H. Liang, показал, что этот ген дает достаточно надежные результаты в относительно узком интервале эволюционной истории покрытосеменных при анализе от уровня триб до уровня порядков [Hilu, Liang, 1997].

Интерес для геносистематиков представляет и хлоропластный ген *rpoC*, гомологичный гену, кодирующему β′-субъединицу РНК-полимеразы *E.coli*. Область *rpoC* большинства покрытосеменных растений локализована в большой однокопийной области хлоропластного генома и разделена на два гена – *rpoC1* и *rpoC2*. Ген *rpoC1* большинства, но не у всех растений, содержит интрон. Отсутствие интрона довольно редкое событие и, наряду с инверсиями и крупными вставками/делециями, может служить индикатором родственных связей исследуемых групп [Downie et al. 1996 b]. Последовательности *rpoC1* использовали в исследованиях молекулярной филогении некоторых групп цветковых растений, и было показано, что изменчивость участка недостаточна для решения филогенетических вопросов на низком таксономическом уровне [Downie et al., 1996a, b]. Использование последовательностей *rpoC1* при изучении эволюции всех семенных растений дало хорошие результаты и позволило еще раз подтвердить гипотезу о монофилии голосеменных (включая гнетовых) и покрытосеменных [Samigullin et al., 1999].

Ген *ndhF*, также нашедший применение в исследованиях молекулярной филогении генотипов растений, локализован в малой однокопийной области хлоропластного генома, в непосредственной близости от инвертированного повтора. У табака размер гена *ndhF* составляет приблизительно 2230 п.н., что примерно в 1.5 раза больше, чем *rbcL*. Ген кодирует одну из субъединиц хлоропластной НАДН-дегидрогеназы [Kim, Jansen, 1995]. Сравнение нуклеотидных последовательностей *ndhF* риса и табака выявило, что скорость нуклеотидных замен *ndhF* примерно в два раза выше, чем *rbcL* [Olmstead, Reeves, 1995]. Изучение филогенетических связей родов семейств Acanthaceae [Scotland et al., 1995] и Asteraceae [Kim, Jansen, 1995] показало, что ген несет в три раза больше филогенетической информации, чем *rbcL*, однако в семействах Solanaceae и Scrophulariaceae разница между информативностью *ndhF* и *rbcL* составила только 60% и 50% соответственно [Olmstead, Sweere, 1994; Olmstead, Reeves, 1995].

Известно, что *ndhF* состоит из двух различающихся участков: 5′-конец гена (около 1400 п.н.) по скорости нуклеотидных замен похож на *rbcL*, в то время как 3′-конец *ndhF* более богат АТ-парами и демонстрирует высокий уровень несинонимичных замен во всех положениях кодона [Kim, Jansen, 1995]. Наличие более консервативной и вариабельной областей в *ndhF* позволяет использовать данный ген при реконструкции филогении на разном таксономическом уровне, как в древних, так и в недавно разошедшихся группах.

К настоящему времени в филогенетических исследованиях нашли применение и другие хлоропластные и митохондриальные гены: *rps4* [Nadot et al., 1994, 1995], 16S рДНК [Mishler et al., 1992; Manhart, 1995], *chlB* [Boivin et al., 1996], *psaA*, *psaB*, *psbD* [Nishiyama, Kato, 1999] и др.

Особый интерес геносистематиков вызывают некодирующие последовательности хлоропластного и ядерного геномов, которые потенциально содержат большую долю полиморфных сайтов, чем участки, кодирующие РНК и белки [Bohle et al., 1994]. Кроме того, до недавнего времени считалось, что некодирующие последовательности «удобнее» для изучения филогенеза, так как эволюционируют в основном за счет равномерного накопления нейтральных изменений. Было, однако, выяснено, что это не совсем так, и в ряде случаев трактовка таких изменений – нелегкая задача [Kelchner, 2000]. Это не помешало использовать их для реконструкции филогении генотипов растений.

Для межгенного спейсера, разделяющего гены *rbcL* и *atpB*, была показана возможность использования на низком таксономическом уровне в исследованиях покрытосеменных [Natali et al., 1995] и (для ядерного спейсера) мхов [Chiang, Schaal, 2000]. *rpl16* интрон использовали для изучения родственных связей видов *Chusquea* (Poaceae) [Kelchner, 2000], показана перспективность использования в филогенетических исследованиях *trnK*-интрона (см. выше) и *rps16* интрона.

Высоким филогенетическим потенциалом обладает *trnL* (UAA) интрон и межгенный спейсер между 3′-экзоном *trnL* (UAA) и геном *trnF* (GAA). Изучение показало, что скорость эволюции этих участков превышает скорость эволюции *rbcL* в 1–3 раза, в зависимости от исследуемой группы. Размер *trnL* интрона варьирует от 350 до 600 п.н., размер спейсера *trnL- trnF* – 90–1000 п.н. В одной из последних работ было показано, что для хлоропластного участка *trnL- trnF* соотношение транзиций/трансверсий в последовательностях покрытосеменных растений составляет 0,8–1, что отличается от наблюдаемого для ядерной и митохондриальной ДНК животных, где это соотношение больше или равно 2. Такого рода наблюдения важны для правильного выбора моделей молекулярной эволюции, используемых в алгоритмах реконструкции деревьев (см. гл. 6).

Изучение гена *trnL* помогло решить вопросы о филогенетических связях видов *Gentiana* [Gielly, Taberlet, 1994], систематике Cactaceae [Areces-Mallea et al., 1997] и Lecythidaceae [Morton et al., 1998]; весь участок *trnL* интрон-*trnL-trnF* спейсер был использован при изучении филогении Stanhopeinae и Dipetrocarpaceae [Kajita et al., 1998] и во многих других работах.

Перспективным направлением развития филогенетических исследований является изучение внутренних транскрибируемых спейсеров (рис. 7-4) хлоропластного рибосомного оперона, находящегося в области инвертированного повтора хпДНК.

В работах В. В. Горемыкина с соавт. [Goremykin et al.,1996] и J. Pahnke и соавт. [1996] на основании сравнительного анализа последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров ITS2, ITS3 и гена *rbcL* среди сосудистых растений была показана перспективность использования участка ITS2-3 хпДНК для реконструкции филогении на высоком таксономическом уровне. В работах А.В. Троицкого [1999] и Т. Х. Самигуллина с соавт. [Samigullin et al., 1998, 2002] участок ITS2-3, включающий ген 4,5S рДНК, был дополнен нуклеотидными последовательностями 5S рДНК и ITS4, и на основании полученных данных была предложена филогенетическая гипотеза, описывающая основные этапы эволюции бриофитов и близких групп наземных растений. Вот как выглядят филогенетические деревья высших растений, построенные разными методами по ре-

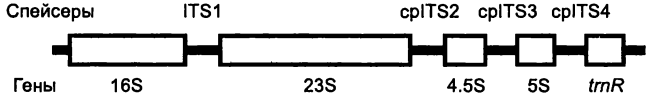


Рис. 7-4. Взаиморасположение генов рРНК и межгенных последовательностей в хпДНК растений

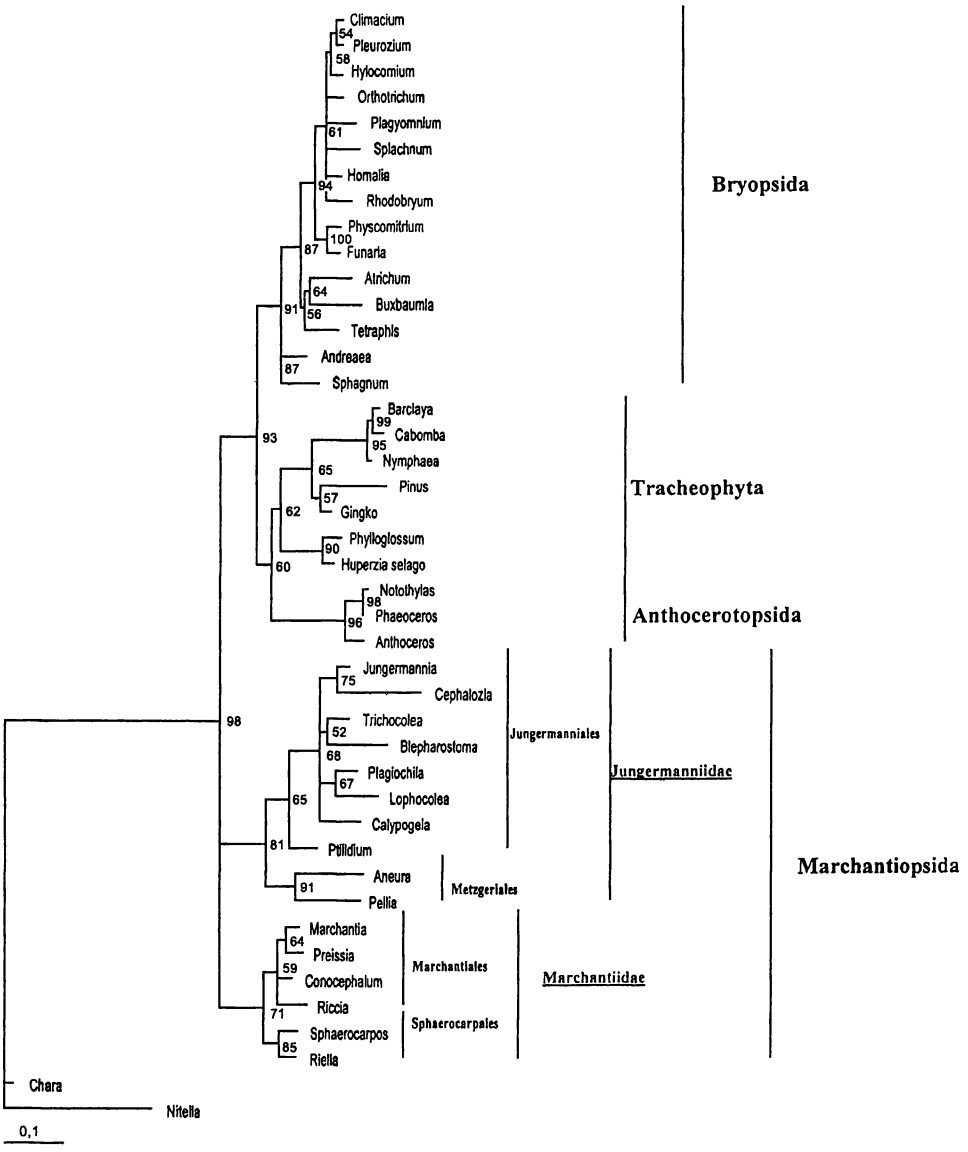


Рис. 7-5. Филогенетическое дерево, отображающее процесс эволюции межгенных спейсеров оперона генов хлоропластной рРНК у растений

зультатам сравнительных исследований спейсеров рибосомного оперона хпДНК (рис. 7-5):

В настоящее время наряду с поиском новых информативных для филогенетических исследований участков ДНК исследователи стремятся использовать комбинированные наборы данных. Этот подход был впервые использован в работах по изучению белков и рРНК П. Мартином и соавт. и А.В. Троицким и соавт. [Martin et al. 1985; Troitsky et al. 1991] и теперь, с накоплением материала по многим макромолекулам, нашел широкое применение. Вот несколько примеров.

R. Olmstead и J. Sweere, исследуя филогению Solanaceae, использовали данные рестрикционного анализа и результаты изучения генов *rbcL* и *matK* [Olmstead, Sweere, 1994]. Филогенетические взаимоотношения групп семенных растений были исследованы на основании данных по генам митохондриальной и ядерной малой субъединицы рДНК и гену *rbcL* [Chaw et al., 2000]. Исследование филогении наземных растений на основании мультигенного анализа представлено в работах C. Parkinson и соавт. [1999], D. Nickrent и соавт. [2000]. Семнадцать генов хлоропластного генома были проанализированы в работе S. Graham и R. Olmstead для выяснения филогенетических связей наиболее древних покрытосеменных [Graham, Olmstead 2000]. Сопоставление молекулярно-биологических данных, полученных при изучении разных генов, использование комбинированных наборов данных («слитных последовательностей») в сочетании с результатами классических морфологических и биохимических методов исследования растений, возможно, позволит реконструировать филогенетическую историю генотипов с более высокой достоверностью.

Весьма перспективным представляется сравнительное изучение «естественных слитных последовательностей», например, полной первичной структуры хпДНК растений. Геномика пластид обещает нам много нового в понимании эволюционных отношений таксонов растений. Она позволяет учитывать особенности эволюции многих десятков генов. Отметим, что самые последние данные об эволюции хпДНК растений во многих существенных деталях расходятся с казалось бы прочно обоснованными представлениями геносистематиков [Goremykin et al., 2003б, 2004; Nishiyama et al., 2004]. Подробнее этот вопрос разбирается в гл. 12.

Анализ последовательностей ДНК митохондрий

Митохондриальная ДНК растений (мтДНК), в отличие от мтДНК животных, не столь широко используется для целей геносистематики. Причины этого в следующем: 1) молекулы растительной мтДНК значительно крупнее и вариабельнее по размеру, чем молекулы мтДНК животных; 2) мтДНК содержит большое и различное в разных видах количество последовательностей, импортированных из ядер и хлоропластов; 3) растительная мтДНК характеризуется наличием множества коротких (50–1000 п.н.) повторов, рассеянных по всему митохондриальному геному, а часто возникающие рекомбинации между повторами создают слож-

ную структуру генома митохондрий; 4) в растительной мтДНК достаточно регулярно наблюдаются крупные перестройки, в результате чего даже у близких видов часто не сохраняется одинаковый порядок генов; 5) скорость накопления замен в мтДНК растений значительно ниже по сравнению с мтДНК животных и с ядерным и хлоропластным геномами. Бедный набор функционирующих генов также является причиной, не позволяющей широко использовать мтДНК для целей геносистематики: мтДНК кодирует всего 20 полипептидов, а также неполный набор тРНК и рРНК.

Однако некоторые участки митохондриального генома все же используются в геносистематике растений. Так, на основании исследования встречаемости двух интронов в митохондриальном гене *cox2* (*cox2.i3* и *cox2.i4*) и интрона в гене *nad1* (*nad1.i4*) были получены интересные данные о ранних этапах эволюции наземных растений [Qiu et al., 1998 a]. Было показано, что наличие или отсутствие этих интронов характерно для крупных таксонов. Так, у бриофитов их нет (см. рис. 3-15).

Для изучения филогении генотипов покрытосеменных растений исследовали редактируемые и нередактируемые участки мтДНК [Pesole et al., 1996]. В работе R. Duff и D. Nickrent показана возможность использования в исследованиях филогении высших растений последовательностей митохондриальной 19S рДНК. доля филогенетически информативных сайтов, в которых превышает таковую в ядерной 18S и хлоропластной 16S рДНК [Duff, Nickrent, 1999]. Митохондриальные гены *cox3* и *nad5* исследовали для выяснения эволюционной истории наземных растений и филогении моховидных [Hiesel et al., 1994; Malek et al., 1996; Steinhauser et al., 1999]. Анализ эволюции митохондриального гена *nad1B* использовался для выявления родственных связей семейства Polemoniaceae [Porter, Johnson, 1998]. Филогенетический анализ 50 видов голосеменных и покрытосеменных растений с привлечением гена *cox1* и 12 покрытосеменных растений с использованием гена *atpA* показал, что эти митохондриальные гены могут применяться при изучении филогении растений на широком таксономическом уровне от подсемейств до порядков и подклассов [Soltis, Soltis, 1998, 2000].

Какие же фрагменты геномов целесообразнее (и надежнее) всего использовать для реконструкции эволюции генотипов растений?

Из сказанного выше следует, что спектр нуклеотидных последовательностей, используемых для изучения эволюции генотипов растений, сегодня чрезвычайно широк. В частности, полученные данные позволяют предварительно выбрать гены, в наибольшей степени пригодные для решения конкретных проблем, но конечный результат всегда будет нести элемент субъективности.

Но как же все-таки оценить, какие последовательности в наибольшей степени подходят для филогенетических реконструкций? Одними из первых достоверность выводов из таких исследований недавно попытались определить П. Корнелли и Р. Уорд [Cornelli, Ward, 2000]. Правда, они работали с данными по

эволюции мит-генов млекопитающих, но с известной долей осторожности (см. далее) их выводы могут быть расширены на другие таксоны, в том числе на органеллы и таксоны растений.

Поскольку на сегодняшний день основная масса информации касается эволюции индивидуальных мит-генов животных, то именно эти гены использовали для сопоставления топологии филогенетических деревьев, построенных для индивидуальных генов с топологией дерева, построенного для слитной последовательности, включающей последовательности всех этих индивидуальных мит-генов, объединенных в одну последовательность «голова к хвосту».

В результате было выяснено, что топологии деревьев, построенных на основании исследования эволюции отдельных, индивидуальных генов, в разной степени совпадают с топологией "слитного" дерева.

На основании работы Корнелли и Уорда можно сделать вывод, что для млекопитающих надежные топологии не могут быть получены при изучении эволюции ни одного индивидуального гена, вне зависимости от метода построения деревьев (были использованы ML и NJ-методы, с учетом и без учета нуклеотидов, расположенных в третьих положениях кодонов анализируемых белок-кодирующих генов). Эти данные могут служить веским доказательством в пользу тезиса о недостаточности сравнительного изучения индивидуальных генов для реконструкции событий эволюции.

Более или менее хорошее совпадение получено лишь для генов, кодирующих некоторые субъединицы фермента никотинамиддинуклеотиддегидрогеназы (гены *ND1* и *ND2*). Между тем, значительная часть работ геносистематиков позвоночных животных содержит филогенетические выводы, сделанные на основании изучения эволюции совсем других генов, которые, как оказалось, в результате реконструкции процессов эволюции позволяют построить деревья, топология которых существенно отличается от топологии "слитного" дерева. Стало быть, достоверность филогенетических выводов в таких работах скорее всего невелика.

Наилучшее совпадение топологий было получено при анализе слитных последовательностей, включающих гены *cytb/ND5/ND5* (за исключением нуклеотидов в третьем положении кодонов), *ND4L* и *ND3/ND4/ND4L*. Топологии таких деревьев были идентичны топологии дерева, построенного по слитой последовательности 13 белок-кодирующих мит-генов.

С другой стороны, такие же оценки, сделанные для костистых рыб на основе MP-метода [Miya, Kawaguchi, Nishida, 2001], дали несколько отличные результаты. При сопоставлении нескольких десятков последовательностей у представителей важнейших отрядов костистых рыб наилучшее совпадение топологий было получено для генов *ND5*, *ND4*, *coIII* и *coI*, несколько худшее – для генов *coII* и *cyt b*, среднее – для генов *ND3* и *ND2*, плохое – для генов *ND1* и *ATPase 6* и совсем плохое – для генов *ND4L*, *ND6* и *ATPase 8*.

Важно, что для двух изученных классов позвоночных "самые лучшие " гены оказались разными. Поэтому мы не можем сказать, какие гены и комбинации мит-генов целесообразнее всего применять в дальнейших исследованиях филогении других классов позвоночных, а тем более растений. Это можно сделать лишь постфактум, после выполнения определенного количества исследований эволюции индивидуальных генов.

Можно предположить, что в результате аналогичных исследований эволюции генов хпДНК и митДНК растений мы получим аналогичные предварительные оценки и на их основе сможем отобрать для дальнейших реконструкций гены, несущие оптимальное количество надежной филогенетической информации. На примере генов хпДНК этот вопрос исследовал К. Фогл с соавт. [Vogl et al., 2003]. Было выяснено, что топологии деревьев, построенных для части генов хпДНК, более или менее совпадают с топологией «слитного дерева», но другие гены дают деревья, не имеющие топологического сходства со слитным деревом. И совсем не обязательно, что в число «хороших» генов попадут такие широко используемые сегодня для этих целей гены *rbcL* или 18S рРНК.

Gontcharov et al.[2004] на примере водорослей из сем. Zygnematophyceae нашли, что дерево, построенное по слитной последовательности, лучше согласуется с морфологическими данными и во многих случаях устраняет эффект притяжения длинных ветвей, часто встречающийся в деревьях, построенных по индивидуальным последовательностям. Кроме того, оказывается возможным оценить достоверность данных, полученных при анализе эволюции индивидуальных генов.

Возможен и другой путь. Он следует из данных недавно опубликованных работ [Goremykin et al., 2003 а,б; 2004], в которых сопоставлены изменения в структуре 61 белок-кодирующего гена хпДНК (характер замен) в ходе дивергенции сосны и 10 разнообразных покрытосеменных. К сожалению, была изучена эволюция всего 13 разновидностей хпДНК, а анализ малых выборок может приводить к неверным заключениям [Rydin, Kallersjo, 2002]. Надо надеяться, что в результате расширения фронта таких иследований (см., например, работу [Nishiyama et al., 2004]) достоверность выводов будет быстро увеличиваться.

Из этих работ видно, что по величине соотношения синонимических замен к несинонимическим изученные гены могут многократно отличаться друг от друга. Большинство хлоропластных белок-кодирующих последовательностей первоначально дивергировало главным образом за счет синонимических замен. Таким образом, значение синонимических и несинонимических замен для молекулярно-филогенетических построений не одинаково, и невзвешенный учет всех замен может приводить к неверным филогенетическим заключениям. И одним из рекордсменов среди генов, эволюционировавших в основном за счет синонимических замен, оказался ген *rbcL*.

Именно оптимально информативные гены целесообразно будет использовать, в дальнейшем, в Кодексе ботанической номенклатуры по способу, предлагаемому известным ботаником-хемосистематиком Б. Тернером (см. гл. 2).

Необходимо внести одно важное уточнение. Б. Тернер предлагает использовать десяток генов, исходя из их роли в метаболизме. Как следует из работы В. Горемыкина с соавт., руководствоваться надо не соображением о роли в метаболизме (ген *rbcL* очень важен для метаболизма растений), а соображениями, вытекающими из изучения молекулярной эволюции каждого гена.

Для этой цели хорошо было бы сопоставить топологии деревьев, построенных по полным нуклеотидным последовательностям хпДНК, с топологией деревьев, построенных для каждого из пригодных для целей реконструкции одного из упомянутых выше 61 гена хпДНК. Эти исследования будут аналогичными описанным выше опытам с генами митДНК животных. Таким путем можно будет отобрать те гены, эволюция которых в наибольшей степени соответствует

эволюции целого пластома. Если использовать только эти гены, объем работы по сиквенсу существенно уменьшится: ведь вместо сопоставления огромных последовательностей хпДНК для выяснения филогении пластид можно будет сопоставлять структуры всего десятка генов. Этот набор генов вполне может оказаться группоспецифичным и разным для разных линий эволюционного развития растений. С другой стороны, очевиден и большой выигрыш в объеме предстоящей работы.

ГЕНОСИСТЕМАТИКА О ПРОИСХОЖДЕНИИ И РАННИХ ЭТАПАХ ЭВОЛЮЦИИ ВОДОРОСЛЕЙ И НАЗЕМНЫХ РАСТЕНИЙ

Ранние этапы эволюции

Представления ботаников об эволюционной истории наземных растений и близкой к ним, интересующей нас группы водорослей (Viridiplantae), основаны на результатах, накопленных в основном классической ботаникой.

По мнению ботаников, Viridiplantae включают два таксона, Chlorophyta (Chlorophyceae, Trebouxiophyceae, Ulvophyceae, Prasinophyceae) и Streptophyta (Charophyceae + наземные растения).

Геносистематикам оставалось либо подтвердить, либо опровергнуть такие представления.

Попытки реконструкции ранних этапов эволюционной истории водорослей и наземных растений методами геносистематики предпринимаются как минимум последние двадцать лет, и их результаты были рассмотрены в многочисленных статьях и обзорах. Достаточно подробный список таких работ содержится в обзоре Л. Льюис и Р. МакКорта [Lewis, McCourt, 2004].

Интерес ботаников к молекулярным данным, касающимся ранних стадий эволюции растений, понятен – морфологические исследования не позволяли окончательно прояснить этот вопрос [Melkonian et al., 1995]. Впрочем, и попытки молекулярных биологов пролить свет на эту проблему не всегда были успешными (см., например, [Nishiyama, Kato, 1999; Andersen, 2004]). Это определяется древностью событий ранних этапов дивергенции как самих водорослей, так и некоторых их групп и наземных растений, произошедшей за это время глубокой дивергенцией последовательностей семантид, и, соответственно, трудностями в выравнивании их последовательностей и реконструкции на этой основе филогенетических деревьев.

Не будем, впрочем, забывать, что это не единственный молекулярный метод, позволяющий пролить свет на ранние этапы эволюции генотипов. Большую роль может сыграть анализ крупных изменений в их строении.

По оценкам М. Сандерсона, филогенетические линии растений (включая водоросли) и грибов разделились 425–490 млн лет тому назад, хотя, например, Гекман с соавт. считали это более древним событием (≈ 700 млн лет тому назад, т.е. в прекембрии) [Sanderson, 2003]. Тем не менее, предпринимались попытки, опираясь на первые результаты изучения фрагментов генотипов, реконструировать эволюцию важнейших групп водорослей и высших растений. Для этих целей исследовали начальные этапы эволюции генов, для которых на других объектах бы-

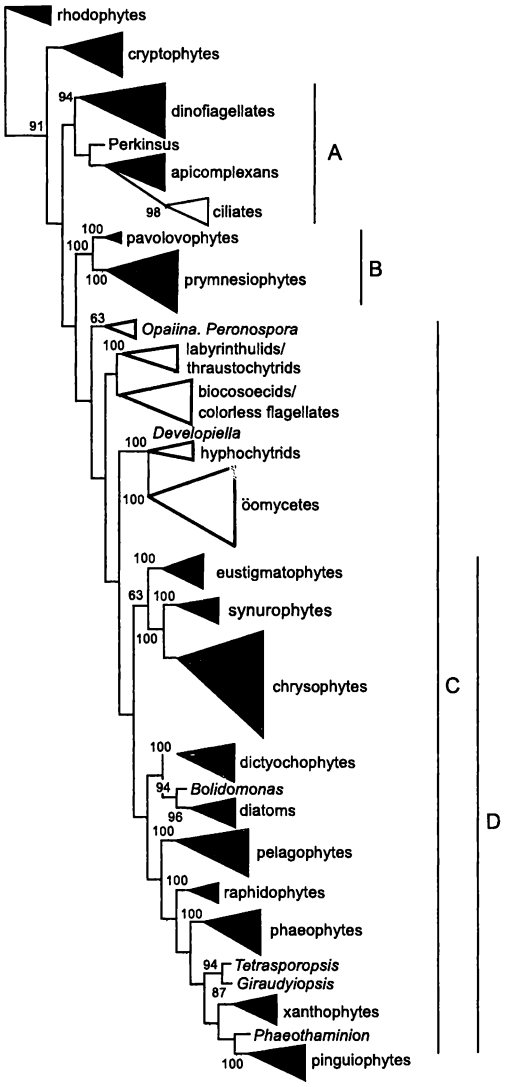


Рис. 8-1. Схема, отражающая филогенетические связи различных групп разножгутиковых (гетероконтных) и гаптофитных водорослей

Включены и ряд других групп (грибы-оомицеты, некоторые простейшие, динофлагелляты и др.) ранее к водорослям не относимые. Построена на основании изучения эволюции генов малой рибосомной РНК и гена *rbcL*. У узлов приведены значения индекса бутстрепа. A – альвеоляты, B – таксоны гаптофитов, C – все гетероконтные таксоны, D – гетероконтные водоросли. Площади треугольников пропорциональны количеству известных видов в таксоне. Черные треугольники соответствуют таксонам организмов, в клетках которых имеются пластиды. Из схемы со всей очевидностью следует, что бытовавшие до недавнего времени представления о филогенетических связях представленных на схеме таксонов не согласуются с молекулярными данными. По [Andersen, 2004]

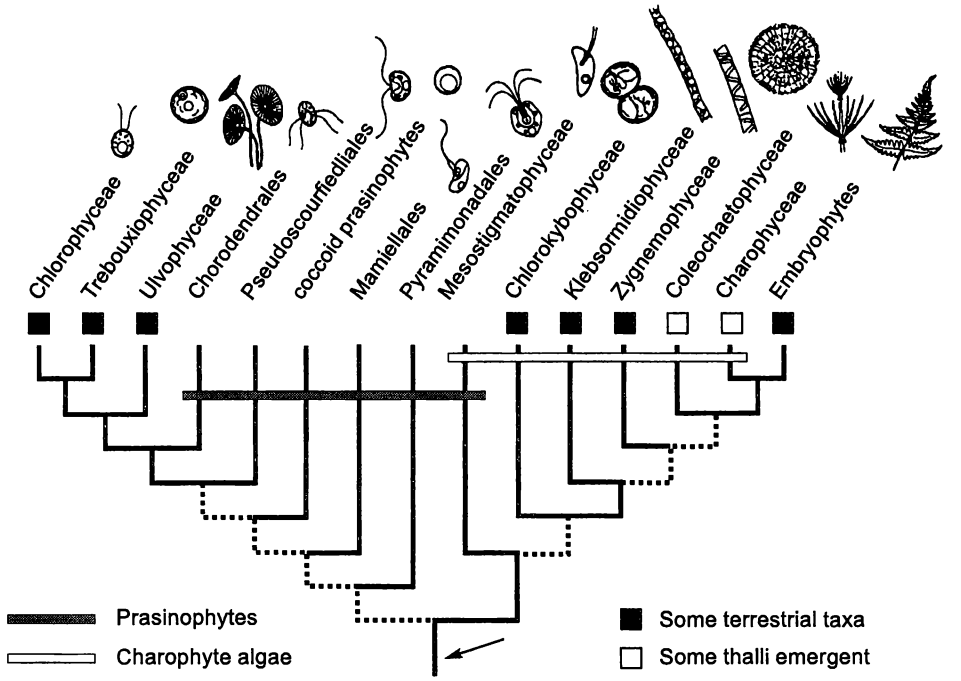


Рис. 8-2. Схема, отражающая филогенетические связи различных групп зеленых водорослей

Построена по результатам секвенирования различных участков ДНК. Ветви, данные точками, установлены с невысокой надежностью. Поперечные линии у "харовых водорослей" говорят о том же. Стрелка у основания дерева указывает на возможное положение *Mesostigma*. Черные квадраты соответствуют группам, имеющим в своем составе наземные, а белые – полупогруженные формы. Без квадратов – все виды данной группы водные. По [Lewis, McCourt, 2004]

ла показана низкая скорость накопления изменений в их структурах в ходе эволюции и возможность отдаленных сопоставлений.

Реконструкция эволюции водорослей, выполненная на основании изучения одного из таких генов, гена рРНК малой субъединицы их рибосом, показала, что водоросли в целом – весьма гетерогенная группа, и многие ее составляющие ближе к другим группам живых существ (например, грибам), чем к другим группам водорослей [Gunderson et al., 1987]. Из этих данных следовало, что зеленые водоросли, высшие растения и хлорарахниофиты относятся к одной и той же кладе. В реконструкции всех этих взамоотношений сыграли значение не только результаты сопоставления структур семантид, но и изучение истории формирования хлоропластов водорослей. Впоследствии, путем изучения эволюции других семантид и ультраструктурных исследований, удалось построить схему, отражающую эволюционные связи всех важнейших групп гетероконтных и гаптофитных водорослей и близких к ним групп организмов [Andersen, 2004] (рис. 8-1). Схема эта отражает всю глубину превращений наших представлений о филогенетических связях разных групп водорослей, произошедших в немалой

степени под влиянием результатов молекулярных исследований. В то же время, сегодня еще нельзя с уверенностью сказать, все ли части этой схемы выдержат испытание временем. Хотя значения бутстреп-поддержки или других статистических показателей, используемых для этой цели, для большинства узлов на дереве высоки, не будем забывать, что каждый из них не лишен недостатков.

Все это в конечном счете привело к тому, что сам термин «водоросли» утерял филогенетичекую компоненту и стал использоваться утилитарно для обозначения растений, существующих в основном в воде.

Одновременно была предложена и детальная схема, отражающая филогенетические связи различных групп зеленых водорослей [Lewis, McCourt, 2004] (рис. 8-2). Последние интересуют нас в особенности, так как именно у одной из групп зеленых водорослей (скорее всего, Charophyceae) и наземных растений (эмбриофитов) в прошлом существовал общий предок. Именно об этой группе водорослей и пойдет, в основном, речь в дальнейшем изложении.

Молекулярные результаты изучения связей водорослей и высших растений

Первые свидетельства в пользу представлений о близости наземных растений и некоторых зеленых водорослей молекулярные биологи получили совсем недавно [Hori et al., 1985; Perasso et al., 1989].

Так, у харовых водорослей в структуре генов хлоропластных тРНК были обнаружены интроны, характерные для хпДНК наземных растений. Позднее это наблюдение получило поддержку: специфические для высших растений интроны были обнаружены в других генах у *Coleochaete*, *Chara* и *Nitella* [Lee, Manhart, 1997b]. Кроме того, у харовых и наземных растений в хпДНК был найден специфический интрон 2 (гена *matK*). Он появился там, видимо, на ранних этапах эволюции [Sanders et al., 2003].

При изучении эволюции рРНК-оперона хпДНК были получены данные, подтверждающие гипотезу о том, что у харовых и высших растений существовал общий предок [Антонов, 1997; Samigullin et al., 1998]. В структуре хпДНК *Chara australis* был найден ген 4,5S рРНК, которого нет в хпДНК изученных в ту пору других, нехаровых зеленых водорослей, но который есть в хпДНК у всех исследованных видов наземных растений. Одновременно Дж. Ли с соавт. нашли, что общие гены есть у высших растений и *Spirogyra maxima* (Charophyceae) [Lee, Manhart, 1997a], хотя строение хлоропластного генома у этого вида заметно отличается от строения хпДНК высших растений. Тем не менее, в хпДНК спирогиры и высших растений были обнаружены гены, наличие которых можно рассматривать как синапоморфию (относительно других зеленых водорослей). У всех них были найдены гены *rpl23*, оперона *psaA* и *clpP*, ряд интронов.

Конвергентное появление целых генов (например, гена 4,5S рРНК) в геномах даже одной из эволюционных линий у водорослей и высших растений – событие в свете современных данных крайне маловероятное (разве что путем латерально-

го переноса, но возможность его между водорослями и высшими растениями невелика), так что это были весомые доказательства того, что у харовых водорослей и высших растений в далеком прошлом действительно существовал общий предок.

Таким образом, первые результаты, полученные молекулярными биологами, совпадали с построениями палеоботаников.

Молекулярная эволюция высших растений

Рассмотрим теперь пути эволюции генотипов наземных растений. Этот процесс был прослежен при изучении эволюции как самых разных последовательностей ДНК, так и путем сопоставления целых пластомов растений методами геномики. К сожалению, полученные результаты далеко не всегда соответствовали друг другу [Nishiyama et al., 2004].

Прежде всего обратимся к результатам изучения индивидуальных последовательностей ДНК. Как нам представляется в свете последних данных, к числу наиболее надежных относятся результаты сопоставления последовательностей спейсерных участков оперона рРНК в хпДНК (хп ITS 2-4).

Судя по итогам многолетнего изучения эволюции хп ITS 2-4, первыми от общего ствола дерева этих спейсерных последовательностей отходят юнгерманиевые и маршанциевые печеночники, затем мхи, антоцеротовые и плауновидные и прочие наземные растения [Samigullin et al., 2002]. Этот результат неплохо согласуется с данными, полученными при изучении эволюции других генов. О надежности этих выводов судить пока рано, но вспомним, что исследование некодирующих последовательностей нередко давало более надежные результаты и более устойчивые топологии реконструированных деревьев, чем изучение эволюции генов белков и рРНК.

Так, топология дерева, построенного по четырем генам (*rbcL* и трем генам малой рибосомной РНК из трех генетических компартментов клетки), была нестойкой [Nickrent et al., 2000] (рис. 8-3). При незначительном изменении в последовательностях (исключении нуклеотидов в третьем положении кодонов гена *rbcL*) антоцеротовые становились базальной группой, что, в общем-то, согласуется с представлениями некоторых ботаников.

Так или иначе, но скорее всего в середине ордовика (по Кенрику и Крейну) зеленые растения стали осваивать новую экологическую нишу – они вышли на сушу. Выход этот видимо происходил в тесном взаимодействии с грибами [Heckman et al., 2001]. Сходные гипотезы высказывали С.В. Мейен [Мейен, 2001, С. 31] и А. Н. Белозерский с соавт. [1972].

В конечном счете среди прочих, вымерших, групп сформировалась линия эволюционного развития эмбриофитов (наземных растений) (рис. 8-4).

По мнению некоторых палеоботаников, не согласных со схемой Кенрика–Крейна, от основного ствола развития эмбриофитов первой отделилась ветвь, ведущая к современным антоцеротовым – согласно мнению этих ученых, наиболее примитивным наземным растениям. Эта дивергенция могла произойти даже раньше ордовика, в кембрийском периоде.

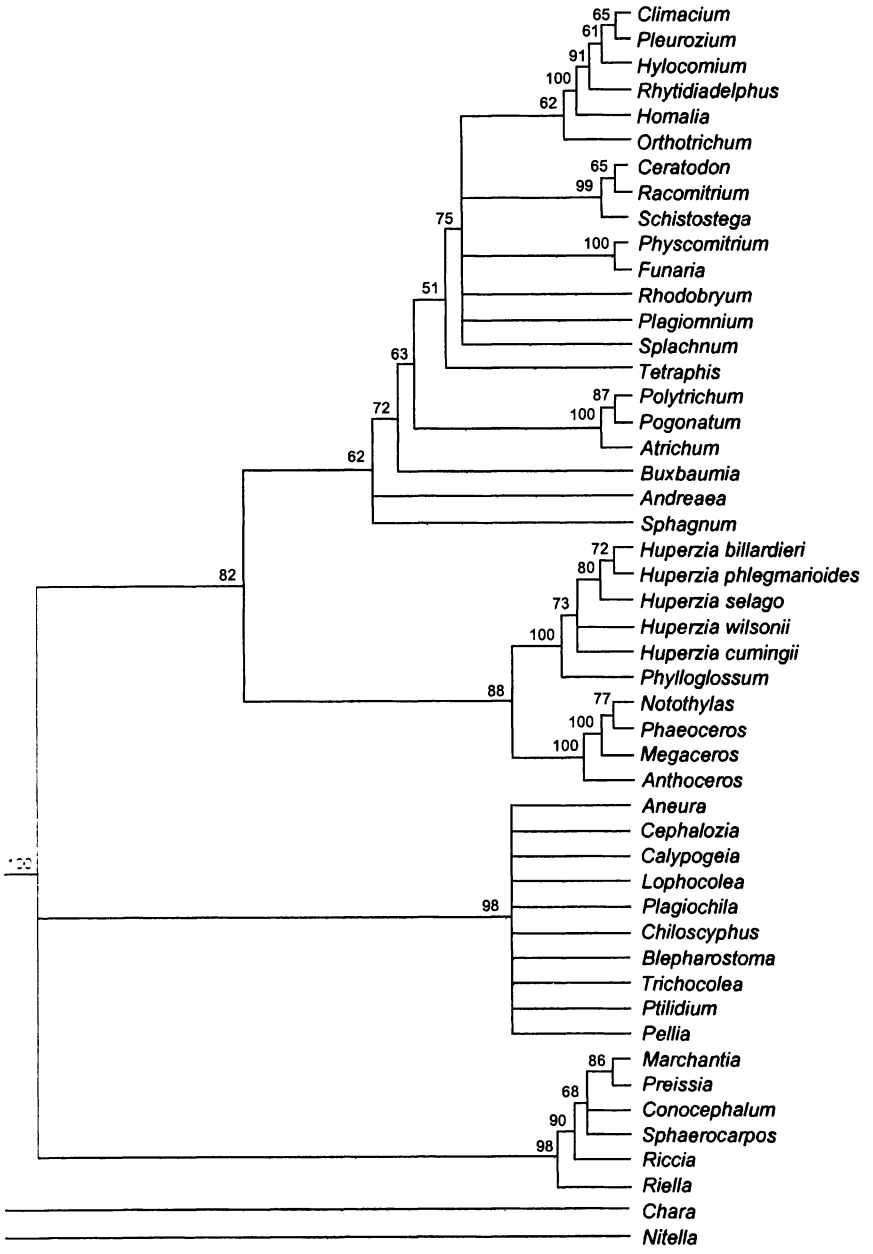


Рис. 8-3. Филогенетическое дерево, построенное по слитной последовательности из четырех генов (см. текст)

Длина ветвей соответствует количеству накопленных изменений в структурах генов. Видно, что у основания дерева наземных растений стоят спирогира и хара. Обращает на себя внимание, что антоцеротовые стоят выше мхов, но не у основания дерева. Из [Nickrent et al., 2000]

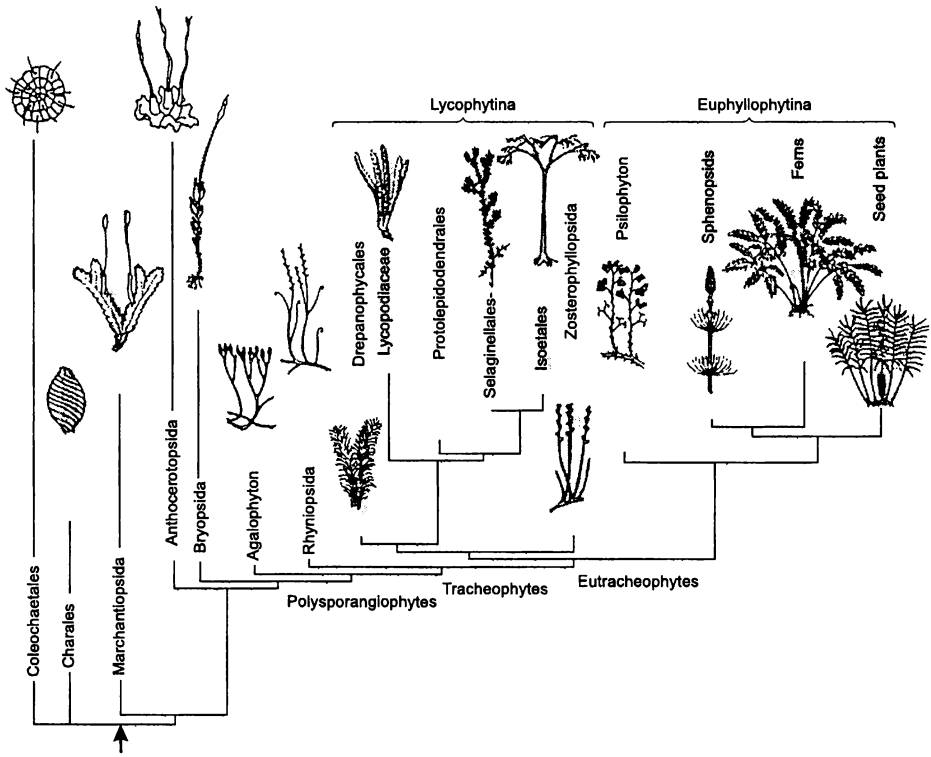


Рис. 8-4. Схема, отражающая процесс выхода растений на сушу и их дальнейшей диверсификации

Узел на схеме, соответствующий этому событию, указан стрелкой

Молекулярные данные, касающиеся положения антоцеротовых на филогенетическом дереве наземных растений, до сих пор противоречивы [Nishiyama et al., 2004]. Одни геносистематики ставили их ближе к корню дерева (см., например, [Hedderson et al., 1998; Renzaglia et al., 2000]), а другие помещают их вне печеночников, ближе к сосудистым растениям [Lewis et al., 1997; Samigullin et al., 2002; Kugita et al., 2003] (рис. 8-5).

Наиболее серьезным доводом в пользу представлений о положении на дереве клады антоцеротовых вблизи от клады сосудистых растений (вопреки мнению многих) стали результаты определения японскими исследователями полной первичной структуры хпДНК у *Anthoceros formosae* [Kugita et al., 2003]. ХпДНК этого вида обладает рядом специфических особенностей структуры, существенно отличающих ее от хпДНК других наземных растений. Тем не менее, эти данные согласуются с результатами изучения эволюции ITS 2-4 [Samigullin et al., 2002] и полных структур других хпДНК [Nishiyama et al., 2004].

Многие ботаники – геносистематики считают наиболее древней группой, отделившейся от общего ствола эволюции наземных растений, печеночники. И все же вопрос о древнейшей группе наземных растений, представленной среди ны-

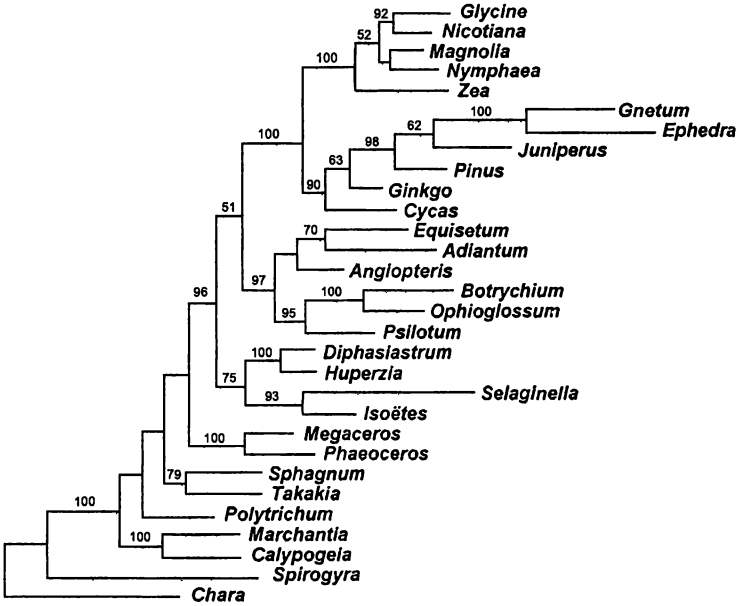


Рис. 8-5. Одно из филогенетических деревьев, построенных по результатам изучения эволюции пяти генов из разных генетических компартментов клеток растений

Топология дерева оказалась нестойкой. Это, в частности, касалось положения клады антоцеротовых

не существующих видов, сегодня окончательно не решен. С развитием исследований по геномике пластидной ДНК в дальнейшем могут быть получены более весомые доказательства в пользу одной из альтернативных точек зрения.

В результате дальнейшего усложнения в ходе дивергенции сформировались основные таксоны как вымерших, так и ныне существующих наземных растений. Существует мнение, что это произошло быстро (по представлениям палеоботаников !), за какие-то 100 млн. лет [Kenrick, Crane, 1997], и среди них первой скорее всего отделилась ветвь, ведущая к моховидным (маршанциевым и мхам), затем к плауновидным и, наконец, к Euphyllophytina, которые включают членистостебельные, папоротники и семенные растения. Одновременно усложнялось строение наземных растений. Основные события, происходившие в ходе этого процесса, представлены на следующем рисунке (рис. 8-6).

Как уже было отмечено, в самом общем виде эволюционная история наземных растений и некоторых групп водорослей первоначально была приблизительно реконструирована по результатам изучения строения гена 18S рРНК [Kranz et al., 1995; Huss, Kranz, 1997]. Из представленных на рис. 8-7 А, Б двух филогенетических деревьев, построенных разными методами, следует, что ближе всех к наземным растениям находятся колеохетовые водоросли (рис. 8-7 Б). Дерево, построенное методом максимальной экономии, кажется более «естественным», так как на нем исследованные представители моховидных образуют отдельную кладу, а не входят в состав общей клады с *Coleochaetales, Klebsormidiales, Chlorokybales* и *Zygnematales* (рис. 8-7 А).

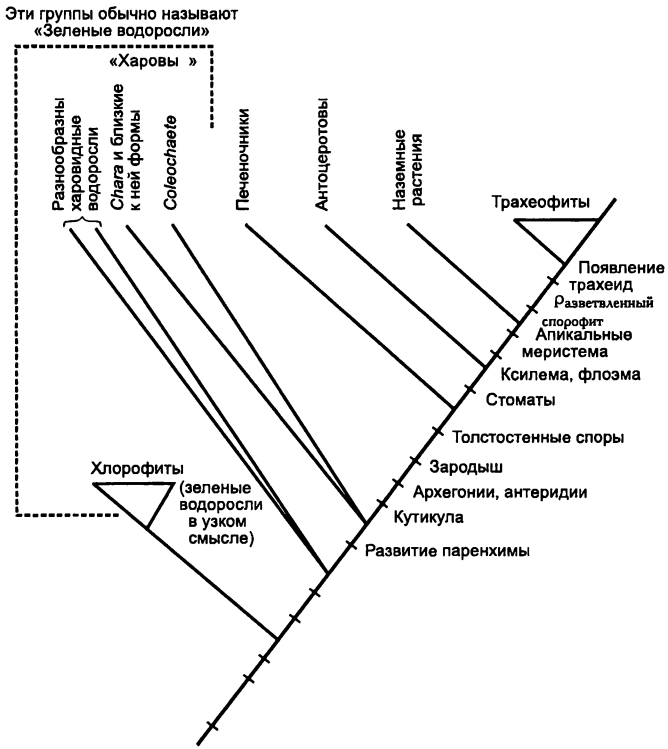


Рис. 8-6. Усложнение строения высших растений и близких к ним водорослей в ходе эволюции

Надежность таких филогенетических выводов, сделанных на основании сопоставления строения гена рРНК, как известно, невелика [Duvall, Ervin, 2004], но впоследствии общая структура молекулярно-филогенетического дерева была подтверждена в других исследованиях [Kolukisaoglu et al., 1995; Huss, Kranz, 1997; Bhattacharya, Medlin, 1998; Pryer et al., 2001].

Что касается времени выхода растений на сушу, то палеоботаники достаточно точно датируют это событие (видимо, в ордовике), однако дальнейшая история становления основных таксонов высших растений, следующая из результатов геносистематиков и палеоботаников, по ряду параметров может заметно отличаться.

Параллельно с изучением вопроса о происхождении всех наземных растений подробнее изучалась история происхождения их основных групп, до недавнего времени главным образом путем анализа эволюции генов *rbcL*, *atpB* и 18S rDNA, спейсеров [Boulter, Gilroy, 1992; Chase et al., 1993; Wolf, 1997], а также – в последнее время – многих других генных и негенных последовательностей [Kallersjo et al., 1998; Soltis et al., 1999 b; Qiu et al., 1999; Pryer et al., 2001ж; Samigullin et al., 2002];. Важный вклад внесли исследования эволюции хпДНК [Goremykin et al., 2003, 2004; Nishiyama et al., 2004].

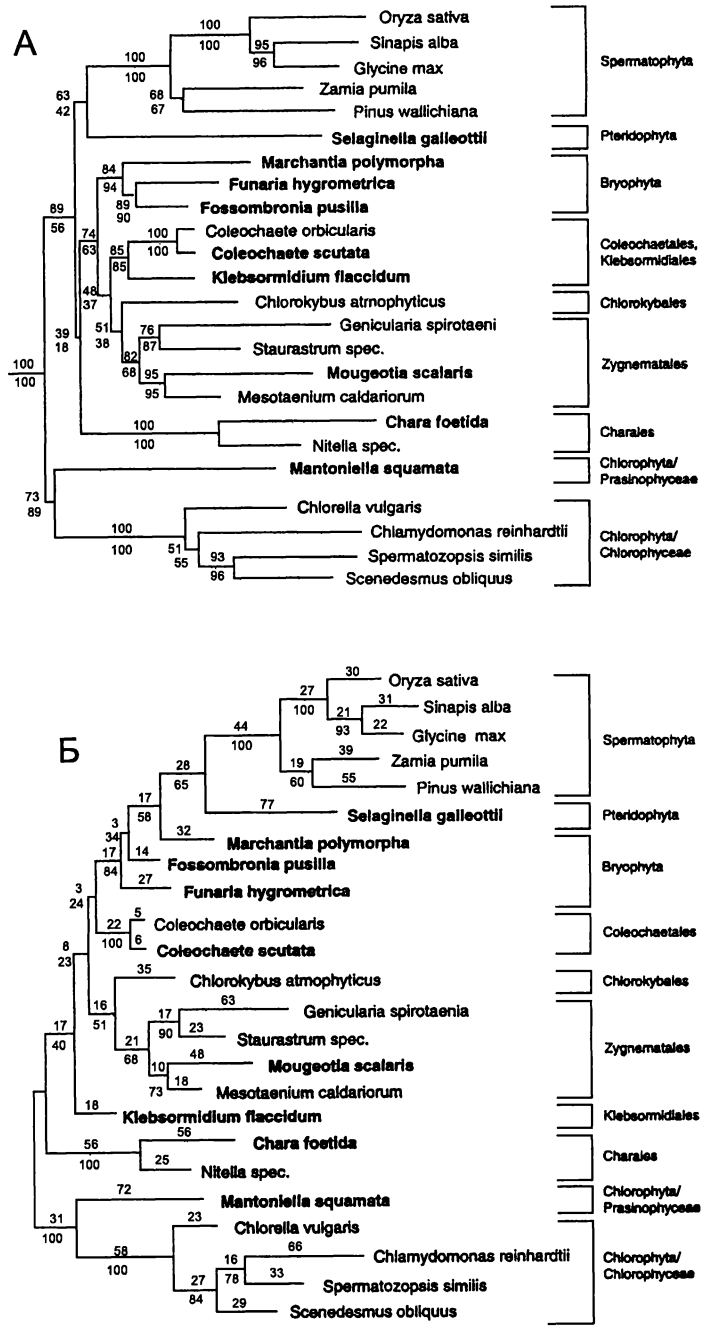


Рис. 8-7. Схема, отражающая первые попытки выявить филогенетические связи водорослей и наземных растений путем анализа эволюции 18S рРНК. Из [Kranz et al., 1995]

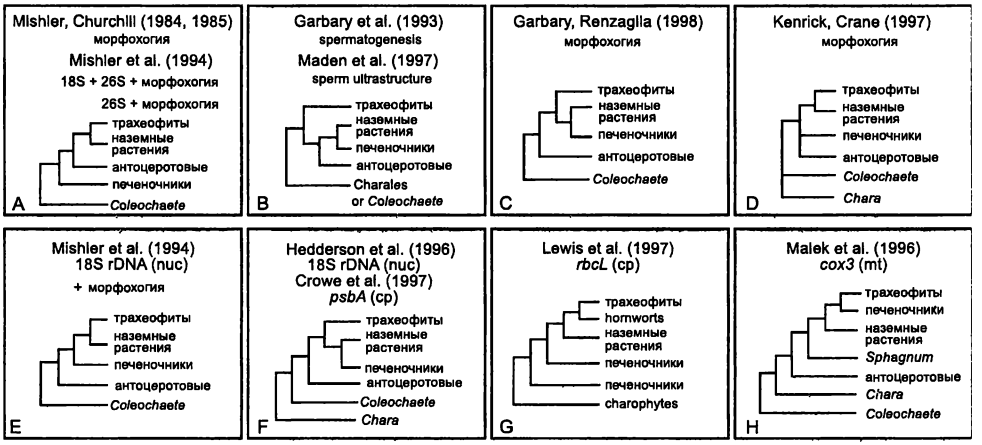


Рис. 8-8. Альтернативные топологии деревьев, отражающих порядок ветвления филогенетического дерева наземных растений, предложенные разными авторами

Они подтвердили все основные выводы работы Kranz с соавт. , хотя и не сняли всех противоречий, касающихся дивергенции крупных таксонов высших растений. О сути этих противоречий свидетельствует рис. 8-8.

Хотя положение отдельных групп высших растений на представленных на рисунке филогенетических деревьях совпадает не полностью с иными реконструкциями этих событий, не следует забывать, что по крайней мере в некоторых случаях в основу их положены результаты как анализа эволюции генов, неравнозначных по количеству хранимой филогенетически значимой информации, так и данные морфологов (хотя правомерность таких совмещений еще не доказана), а сами деревья построены с использованием разных методов и внешних групп. Как будет ясно из дальнейшего изложения, эти факторы могут оказывать существенное влияние на топологии деревьев. Тщательный анализ этих данных позволяет утверждать, что многие из представленных на рис. 8-8 различий не имеют под собой серьезных оснований. Кроме того, в силе остается вопрос о том, насколько вообще топологически сходными должны быть деревья, построенные в результате сравнительных исследований фенотипов и генотипов.

Предварительные итоги исследования эволюции генотипов растений подведены в работе [Palmer et al., 2004] (рис. 8-9). Отметим, что это только один из возможных сценариев их эволюции. На этом рисунке подчеркиваются «недоработки» геносистематиков при решении вопросов о филогенетических связях генотипов основных таксонов наземных растений. На рисунке это показано штриховыми линиями в политомии у основания дерева. Иными словами, например. маршанциевые и антоцеротовые на этой схеме в дальнейшем вполне могут поменяться местами.

Есть на ней и загадочная ветвь (указана стрелкой), ведущая от узла, соответствующего общему предку голо- и покрытосеменных (указан кружком на схеме). Каким ископаемым растениям она соответствуют ? Начиная от каменноугольного периода и вплоть до мела на Земле существовали генетические предки по-

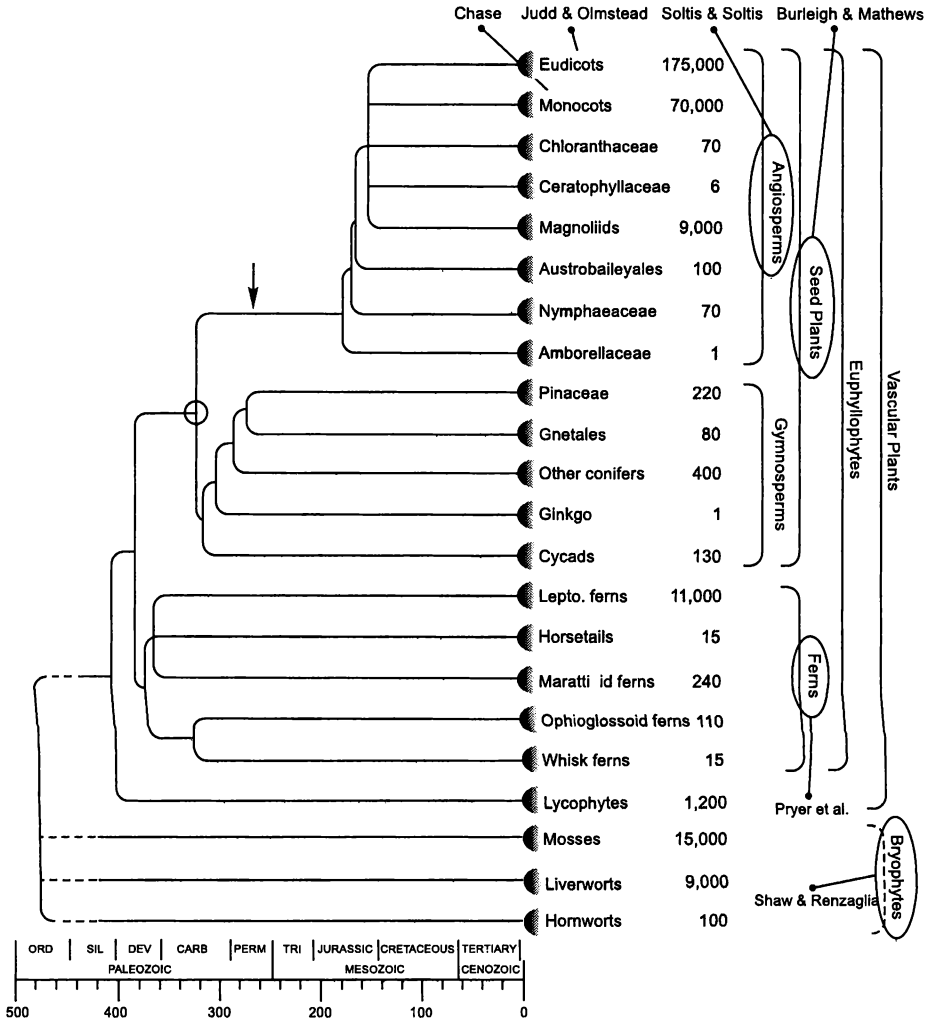


Рис. 8-9. Схема, отражающая филогенетические связи генотипов наземных растений, *соотнесенная со временем их существования на Земле*

Схема дается в том виде, как она была представлена авторами [Palmer et a., 2004], с незначительными дополнениями. Она позволяет датировать основные события эволюции генотипов. Существуют и иные, не менее достоверные (быть может, правильнее сказать, столь же вероятные) сценарии эволюции генотипов. Фамилии авторов, приведенные на схеме, соответствуют авторам обзоров, опубликованным в Amer. J. Botany. 2004. Vol. 91 (см. список литературы настоящей книги). Дабы избежать сложной работы по переводу рисунка на русский язык, названия таксонов даются как в оригинале. Приведено количество видов в каждом из изученных таксонов

крытосеменных, но палеоботаникам они неведомы. На этот счет существует несколько гипотез. Быть может, таких генетических предков следует искать среди вымерших групп? Так, с точки зрения С.В. Мейена, ими могут быть какие-то группы беннетитовых [Мейен, 1986].

Глава 9

МОХОВИДНЫЕ: АНТОЦЕРОТОВЫЕ, ПЕЧЕНОЧНИКИ И МХИ

Вводные замечания

Необходимо сразу сказать, что методами геносистематики окончательно решить вопрос об эволюционных связях генотипов таксонов моховидных (бриофитов) как между собой, так и с генотипами других высших растений до сих пор не удалось. Сегодня это доминирующая точка зрения (см., например, [Shaw. Renzaglia, 2004].

Исследования методами геномики (например, путем полного анализа ядерных геномов) для выявления путей эволюции генотипов могут показаться перспективными и многообещающими, но на этом пути еще очень много нерешенных проблем. Упомянем лишь две главные: во-первых, это огромный объем предстоящей работы по сиквенсу и, во-вторых, трудности в интерпретации полученных данных. Это было очевидно Дж. Симпсону без малого полвека тому назад (см. гл. 2).

В настоящее время альтернативой является определение и сопоставление первичных структур хлоропластной или митохондриальной ДНК, но никто пока не доказал, что получаемые в результате таких исследований деревья должны быть полностью конгруентны топологии деревьев как ядерных геномов, так и организмов.

Заманчивые возможности для выяснения взаимотношений клад дает использование так называемых крупных мутаций в геномах (см. гл. 6). К сожалению, такие данные сегодня неоправданно редко используют для уточнения филогении моховидных.

Неслучайно (но, к сожалению, далеко не всегда) заглавия статей, в которых обсуждаются эти проблемы, звучат достаточно осторожно. Так, одна из последних работ в этой области, выполненная методами геномики пластидной ДНК [Nishiyama et al., 2004] названется "Филогения хлоропластов указывает (или "позволяет говорить о" (indicates), а не "говорит" или «свидетельствует о», как это часто бывает во многих опубликованных работах – А. А.) на монофилию бриофитов" Такую осторожность в интерпретации полученных результатов можно только приветствовать.

Каковы же на сегодня результаты изучения молекулярной эволюции антоцеротовых, печеночников и мхов ?

Систематики об эволюционных связях таксонов моховидных

Среди наземных растений моховидные (антоцеротовые, печеночники, мхи) представляют собой достаточно обособленную группу, включающую около 25 тыс. рецентных видов, по численности уступающую только покрытосеменным растениям. Обособленность их в системе наземных растений связана с достаточно простой организацией, а также с особенностью чередования поколений: у них в жизненном цикле доминирует гаплоидное поколение – гаметофит.

Большинство исследователей выделяют в составе моховидных три группы – антоцеротовые (Anthocerotopsida), печеночники (Hepaticopsida) и мхи (Bryopsida). Исследования эволюции семантид у моховидных показали, что, возможно, целесообразно выделять и четвертую группу (класс ?) – тройбиевых (Treubiopsida) [Stech et al., 2000, 2001].

Хотя объемы и границы по крайней мере трех первых таксонов очерчены систематиками достаточно четко, происхождение и характер эволюционных взаимоотношений этих групп моховидных между собой и по отношению к сосудистым растениям, как уже говорилось, долгое время являются предметом споров.

Некоторые авторы интерпретируют моховидные и сосудистые растения как независимые линии эволюции древнейших примитивных архегониат. Например, Р. Шустер рассматривал антоцеротовые как особую линию моховидных и придерживался мнения о полифилетичности наземных растений [R. Schuster, 1984a], т.е. о происхождении антоцеротовых и других моховидных от разных групп водорослей. Сегодня эта точка зрения успешно оспаривается [Groth–Malonek et al., 2005]. Если же принять, что антоцеротовые действительно отделились от общего ствола наземных растений еще в кембрии, то эта точка зрения имеет право на существование.

С открытием риниофитов возникла мысль о возможной эволюции моховидных путем упрощения более сложно организованных предковых растений риниофитного уровня организации. Эту гипотезу принимают многие ботаники (см., например, [Тахтаджян, 1978; Garbary et al., 1993]).

Было осуществлено несколько попыток разрешения вопроса о филогенетических связях различных групп моховидных с помощью методов кладистики.

В качестве примера рассмотрим результаты исследований L. Parenti. Кладистический анализ морфологических данных привел автора к выводу о монофилии наземных растений и парафилии моховидных, занявших промежуточную позицию между водорослями и сосудистыми растениями. Было также показано, что все три их основные группы (Anthocerotopsida, Hepaticopsida и Bryopsida) монофилетичны, а антоцеротовые – сестринская группа по отношению к сосудистым растениям [Parenti, 1980].

Кладистический анализ, проведенный П. Кенриком и П Крейном [Kenrick, Crane , 1997] с привлечением палеоботанических данных, морфологических и ультраструктурных признаков, также подтвердил парафилию моховидных, но взаимоотношения между антоцеротовыми, печеночниками и кладой, включаю-

щей мхи и сосудистые растения, в данной работе окончательно разрешены не были.

К другим выводам, на основании изучения ультраструктуры гамет и гаметогенеза, пришли D. Garbary с соавт. [1993] и A. Maden с соавт. [1997]. Анализ полученных в этих исследованиях данных привел авторов к заключению о монофилии моховидных. Впрочем, в более поздней работе на основании анализа 132 ультраструктурных и биохимических признаков, те же авторы пришли к выводу об их парафилии. Мхи и печеночники по результатам этого исследования входят в кладу, сестринскую к сосудистым растениям, а Anthocerotopsida занимают базальное положение в дереве наземных растений [Garbary, Renzaglia, 1998].

Вряд ли стоит более подробно рассматривать многочисленные работы систематиков в этой области. Единой точки зрения на филогению моховидных на основании исследований их фенотипов как классическими, так и кладистическими методами (идеологически наиболее близкими к методам геносистематики) к настоящему времени выработать так и не удалось. Отметим лишь, что большинство авторов склонны считать печеночники парафилетической группой.

Молекулярные исследования эволюции печеночников и антоцеротовых

С начала 1960-х гг. несколько коллективов исследователей, в основном в Германии, Японии и России, а впоследствии и в США, занялись подробным изучением филогении моховидных методами геносистематики. Первоначально основным обьектом изучения были рРНК.

Вопреки надеждам, первые молекулярные данные не позволили прояснить вопрос о характере эволюционных отношений групп моховидных. В пионерских работах [Hori et al., 1985; Van de Peer et al., 1990] филогенетические выводы делались на основании изучения эволюции 5S рРНК у небольшого числа видов моховидных. По этим данным, моховидные казались монофилетичными. Напомню, однако, что филогенетические схемы, построенные по результатам анализа эволюции только 5S рРНК, как и других низкомолекулярных рРНК, взятые по отдельности, ненадежны. Другое дело, когда такого рода данные рассматриваются совокупно с данными по другим рРНК и в одном исследовании [Troitsky et al., 1991]. Из этой работы также следовало, что рибосомный оперон у всех наземных растений, видимо, имеет одинаковое строение, что позволяло проводить широкие филогенетические исследования.

Что же еще удалось установить в первых работах ?

Во-первых, геносистематикам удалось обнаружить молекулярный признак, по которому все моховидные и плауновидные отличаются от остальных высших растений: в их хпДНК есть характерная крупная (30 т.п.н) инверсия, которой нет в хпДНК сосудистых растений [Raubesson, Jansen, 1992]. Изучение встречаемости интронов II группы в митДНК растений показало, что они (за редким исключением) присутствуют в митДНК мхов, антоцеротовых и большинстве сосудистых растений, но их не нашли в митДНК печеночников, зеленых водорослей и других изученных в этом плане эукариот [Qiu et al., 1998a].

Анализ встречаемости интрона группы I гена nad5 показал, что он есть у печеночников и мхов, но отсутствует у антоцеротовых мхов [Beckert et al., 1999]. В обзоре [Downie, Palmer, 1992 b] приведен целый ряд других примеров, говорящих о группоспецифической организации хпДНК мохообразных.

Т. Х. Самигуллиным с соавт. также отмечены группоспецифические индели в структуре хп ITS 2-4 [Samigullin et al., 2002]. Среди них характерная для юнгерманниевых делеция остатков 97–135 в ITS 2, 504–528 в ITS 3. Самые значительные из инделей расположены в следующих позициях (от начала полного выравнивания): в ITS-2 делеции в позициях 110–196 и 201–241, в ITS 3 делеция 920–963, в ITS 4 – 1285–295. У мохообразных в целом вставки были обнаружены в участке 780–790 в ITS 4 и делеция в участке 1036–1039.

Иными словами, в строении ДНК были обнаружены такие особенности, которые могут считаться синапоморфными молекулярными признаками соответствующих таксонов.

Анализ частичных нуклеотидных последовательностей генов 18S и 26S рРНК двух видов антоцеротовых, трех печеночников и трех мхов, по мнению E. Waters и соавт. [1992], выявил парафилетичность мохообразных, т.е. говорил в пользу гипотез L Parenti и др.. Базальное положение на филогенетическом дереве, построенном авторами этой работы, занимают печеночники, а мхи и антоцеротовые образуют кладу, сестринскую сосудистым растениям.

В работе B Mishler и соавт. были проанализированы в разных комбинациях морфологические и молекулярные признаки (частичные последовательности 18S и 26S рРНК) у небольшого числа видов мохообразных. Топология филогенетического дерева, построенного на основе анализа сочетания морфологических признаков и данных по 26S рРНК, совпала с топологией дерева, построенного только по морфологии, согласно которой печеночники – базальная группа, а ближайшими к сосудистым растениям являются мхи. Результатом комбинации морфологических признаков с данными по гену 18S стало дерево, в котором у основания располагались антоцеротовые мхи [Mishler et al., 1994].

Более поздние исследования с привлечением полных последовательностей 18S рРНК 24 видов наземных растений [Hedderson et al., 1996] и, затем, 75 видов наземных растений [Hedderson et al., 1998] показали, что мхи и печеночники формируют кладу, сестринскую сосудистым растениям, а антоцеротовые – древнейшая группа наземных растений.

Несколько иные результаты изучения эволюции генов 18S рРНК моховидных приведены в работе M. Bopp и I. Capesius. Согласно этим данным, мхи являются сестринской группой по отношению к юнгерманниевым, а обе этих группы – сестринской кладой по отношению к маршанциевым. Авторы пришли к выводу, что печеночники нельзя рассматривать как единую группу и предлагают выделять два класса, *Marchantiopsida* и *Jungermanniopsida* [Capesius, Bopp, 1997]. К сожалению, авторы не включили в анализ в качестве внешней группы ни одного представителя сосудистых растений. Положение на филогенетическом дереве антоцеротовых как сестринской группы юнгерманниевых [Bopp, Capesius, 1996] не согласуется с результатами многих других молекулярных исследований.

Эти результаты было интересно сопоставить с данными, полученными при исследовании эволюции других генов. L. Lewis с соавт. исследовали эволюцию гена *rbcL*. Они определили первичную структуру этого гена у 24 видов наземных

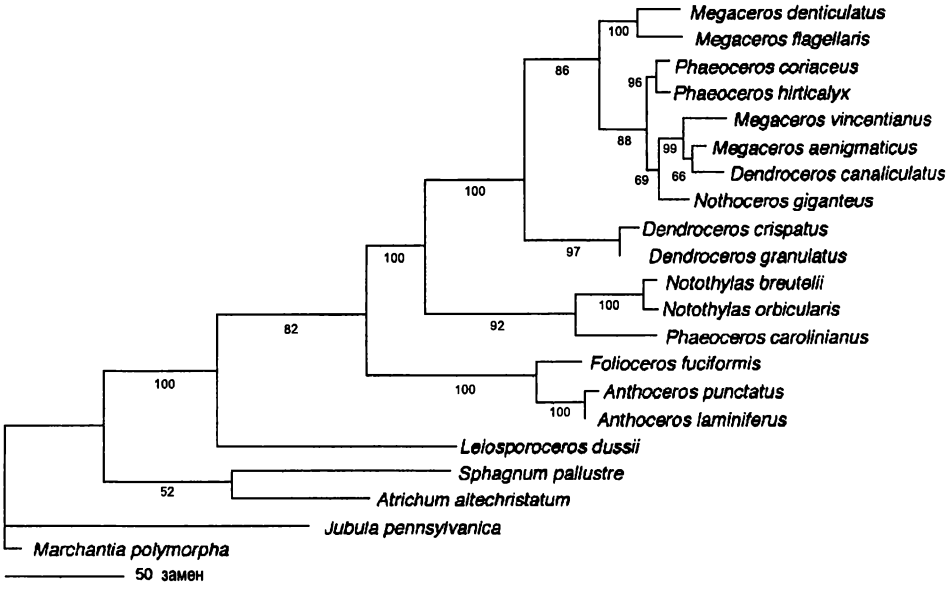


Рис. 9-1. Схема, иллюстрирующая филогенетические связи генотипов антоцеротовых
Построена МР-методом на основании изучения эволюции гена *rbcL*. У ветвей приведены значения бутстреп-индекса. Достоверность топологии этого дерева еще предстоит проверить путем анализа других последовательностей ДНК. По [Shaw, Renzaglia, 2004]

растений. На построенном ими филогенетическом дереве (с учетом замен во всех положениях кодонов) антоцеротовые оказались ближайшими родственниками сосудистых растений, а мхи и печеночники располагались у основания дерева. Если же деревья строились по первому и второму положениям кодонов *rbcL*, то антоцеротовые занимали более низкое положение на дереве [Lewis et al., 1997]. Исследования эволюции этого гена у антоцеротовых позволили реконструировать его эволюцию и построить филогенетическое дерево для 20 видов из этого таксона [Shaw, Renzaglia, 2004] (рис. 9-1).

Из этой реконструкции следует, что антоцеротовые ближе к мхам, чем к печеночникам.

В исследованиях молекулярной филогении моховидных были использованы и другие участки хлоропластной ДНК, в частности, участок ITS 2-4 оперона рРНК [Samigullin et al., 1998, 2002]. Из полученных данных следовало, что моховидные парафилетичны. Маршанциевые и юнгерманниевые образуют две монофилетические клады, соответствующие, по мнению авторов, таксонам печеночников ранга класса.

При выборе этого участка хпДНК целью было получить более надежные данные. Авторы опирались на результаты исследований, в которых было показано, что некодирующие ДНК отличаются от участков, кодирующих белки и РНК, тем, что потенциально содержат больше полиморфных сайтов в пересчете на оп-

ределенный участок ДНК (например, длиной в тысячу пар нуклеотидов) [Bohle et al., 1994]. К сожалению, наиболее активные исследователи эволюции моховидных работу Беле оставили без внимания и многие годы спустя продолжали определять последовательности гена *rbcL*, 18S rDNA и других **кодирующих** участков ДНК.

А ведь к концу 1990-х гг. анализ всех накопленных данных по эволюции кодирующих участков ДНК привел даже такого авторитета в области геносистематики, как М. Чейза, к выводу, что "некодирующие участки ДНК видимо содержат больше филогенетической информации чем гены, кодирующие белки, а последние – больше, чем рибосомные локусы, возможно, в результате ограничений, накладываемых их функциями" [Chase et al., 1997].

Так или иначе, но вопрос о связях антоцеротовых с какой-либо крупной кладой высших растений все же до конца не решен: так, по результатам исследования эволюции митохондриального гена *nad5*, клада антоцеротовых отходит от основания дерева мохообразных [Steinhauser et al., 1999; Beckert et al., 1999; Nickrent et al., 2000]. С другой стороны, проведенное позже исследование эволюции эксон-интронной структуры этого мит-гена не подтвердило такого вывода. Антоцеротовые оказались ближе к сосудистым растениям, чем даже мхи [Groth-Malonek et al., 2005].

Отметим, как нам кажется, важное обстоятельство: в одной из упомянутых выше работ авторы пишут, что между последовательностями *nad5* гена у двух видов *Anthoceros – A. punctatus* и *A. husnotii*, были обнаружены исключительно большие различия. Более того, в последовательностях изученных генов найдено до шести стоп-кодонов (аналогичные стоп-кодоны отмечены и в митохондриальных генах некоторых папоротников) [Malek et al., 1996]. Хотя транскрипты этих генов подвергаются, в дальнейшем, активному редактированию (это нашло подтверждение в недавней работе японских исследователей [Kugita et al., 2003], закрадывается все же сомнение, не с псевдогенами ли имели дело авторы. Кроме того, длина ветвей, ведущих к изученным видам антоцеротовых, очень велика, что, как известно, также может сказываться на достоверности топологии деревьев. Таким образом, выводы этой работы требуют серьезной проверки, хотя и находят поддержку в работе Нишияма и Като, построивших ML-методом филогенетическое дерево по результатам изучения генов *rbcL* и 18S рРНК (как известно, далеко не лучших для решения вопросов такого рода) [Nishiyama, Kato, 1999].

Анализ частичной последовательности гена *cox3* с высоким уровнем поддержки бутстрепа поместил в основание дерева наземных растений антоцеротовые [Malek et al., 1996]. В то же время в результате изучения эволюции гена мит-19S рРНК не удалось однозначно определить, какая из групп – антоцеротовые или печеночники, является базальной [Duff, Nickrent, 1999].

Базальное положение антоцеротовых на дереве наземных растений следовало из результатов мультигенного анализа. В работе [Nickrent et al., 2000] филогения была реконструирована по объединенным последовательностям генов *rbcL* и трех рибосомных РНК – ядерной, митохондриальной и хлоропластной. Сходные результаты были получены и в результате комплексного анализа хлоропластных генов *psaA*, *psaB*, *psbD*, *rpoC2*, *rbcL* и ядерной 18S рРНК [Nishiyama, Kato, 1999].

Эти реконструкции в целом говорили о нестабильности топологий деревьев, построенных на небольшом объеме разнокачественных (морфология и молекулы) исходных данных и разных индивидуальных последовательностях.

Какая же группа моховидных – печеночники, мхи или антоцеротовые – на самом деле представляют самый древний таксон наземных растений? Qiu и Palmer [1999] в своей работе приводят несколько факторов, оказывающих влияние на разрешение этого вопроса: 1) большое число различий между внешней группой (харовые водоросли) и анализируемой группой (наземные растения) – т. н. "эволюционный разрыв" по морфологическим и молекулярным признакам; 2) существенно различающиеся по длине ветви внешней и анализируемой групп, что уменьшает достоверность филогенетических реконструкций; 3) исчезновение, вымирание некоторых таксономических групп; 4) быстрое расхождение линий моховидных от основания дерева наземных растений, оставившее недостаточный филогенетический сигнал.

Согласно С. П. Яцентюк [2001], самыми древними из ныне живущих наземных растений следует считать печеночники. Этот вывод согласуется, в частности, с выводами, полученными B.Mishler, S. Churchill [1984] на основании кладистического анализа морфологических признаков, а также с результатами изучения эволюции гена *rbcL* моховидных, проведенного [Lewis et al.,1997]. Особенности метаболизма ауксина у печеночников, мхов и сосудистых растений также свидетельствуют о расположении печеночников в основании дерева наземных растений. Об их дальнейшей эволюции мы можем судить, опираясь на результаты комплексного анализа четырех генов печеночников (в основном, олиственных: (рис 9-2) [Lewis, Renzaglia, 2004].

Вопрос о монофилии или парафилии печеночников до сих пор остается дискуссионным. B.Mishler и S.Churchill [1985] говорят о монофилии печеночников на основании трех синапоморфий: присутствия в клетках у 90% видов печеночников масляных телец, развития в споровой массе стерильных клеток – элатер и широкого распространения среди печеночников лунуляриевой кислоты, отсутствующей у мхов и антоцеротовых. Комплексное исследование морфологических признаков, проведенное P. Kenrick и P. Crane [1997], подтвердило монофилетичность печеночников. В то же время, филогенетический анализ моховидных на основании изучения структуры гена 18S рРНК показал, что печеночники формируют кладу, базальной группой в которой оказываются маршанциевые, а юнгерманниевые являются сестринской группой по отношению к мхам [Capesius, Bopp, 1997]. Надо сказать, что и построенные С.П. Яцентюк филогенетические деревья все же не позволяют однозначно ответить на вопрос о монофилии или парафилии печеночников. Возможно, анализ большего числа видов подскажет путь к решению этой проблемы.

Среди исследованных С. П. Яцентюк видов Marchantiidae наблюдается подразделение на порядки Sphaerocarpales и Marchantiales. Два порядка Jungermanniidae (Jungermanniales и Metzgeriales) также формируют клады, поддержанные достаточно высокими значениями бутстрепа. Можно отметить, что в пределах Jungermanniales базальное положение занимает *Ptilidium*, одну кладу с высокой надежностью образуют Jungermannia и Cephalozia, объединяются два представителя подпорядка Geocalycinae – *Plagiochila* и *Lophocolea*, объединяются также представители Herbetinae – *Trichocolea* и *Blepharostoma*.

Из числа работ в этой области упомянем исследование Т. Х. Самигуллина с соавт. [Samigullin et al., 2002], выполненное с использованием значительного числа видов наземных растений. Ими была сопоставлена структура участка

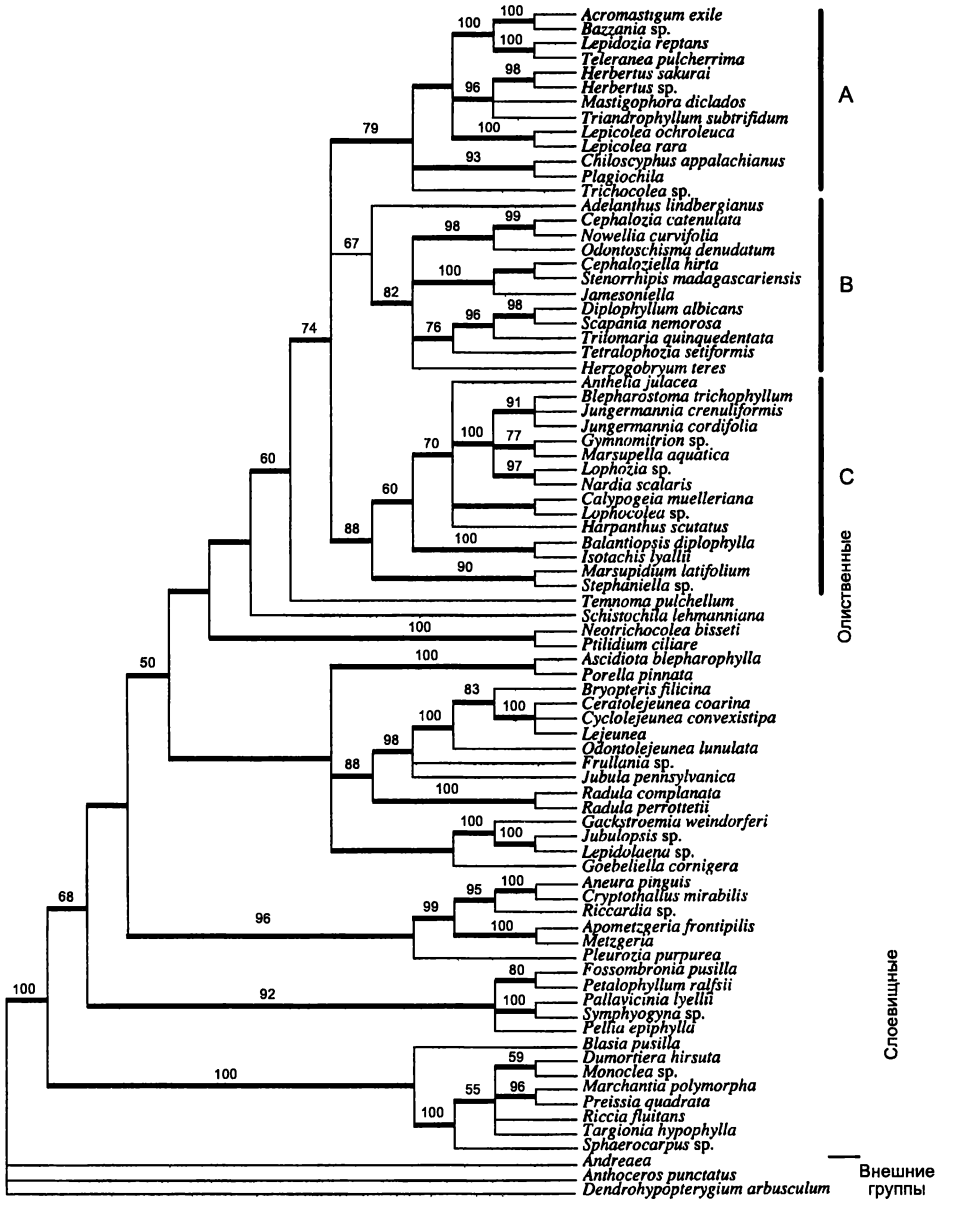


Рис. 9-2. Схема, иллюстрирующая филогенетические связи генотипов некоторых печеночников

Построена по результатам изучения эволюции четырех генов Байесовым методом. Толстые ветви имеют особенно высокий уровень поддержки, вычисляемой этим методом (> 95%). Из [Shaw, Renzaglia, 2004]

хпДНК ITS 2-4 у 14 видов печеночников, четырех видов антоцеротовых, 20 видов мхов, семи плауновидных и двух видов водорослей. Деревья строили MP, ML и NJ методами. Полученные данные говорят о том, что наиболее древней группой являются все же печеночники. Мхи представляются монофилетической кладой и являются сестринской группой по отношению к плаунам и антоцеротовым. Таким образом, была подтверждена гипотеза о близости антоцеротовых к сосудистым растениям.

Резюмируя вышесказанное, нельзя не признать, что молекулярными методами надежно вскрыть филогенетические отношения между печеночниками и антоцеротовыми пока не удалось.

Молекулярные исследования эволюции мхов

Первые же опыты показали, что успех исследования молекулярной филогении мхов в немалой степени зависит от выбора метода исследований. По ряду причин на первый план вышли исследования некодирующих последовательностей – ядерных и хлоропластных спейсеров оперона генов рРНК.

Развернутые сведения характера молекулярной эволюции спейсерных участков ITS 2-4 как печеночников, так и мхов имеются в работах С. П. Яцентюк [2001], Т. Х. Самигуллина с соавт. [Samigullin et al., 2002] и некоторых других. Из этих работ следует, что анализ спейсеров полезен для выявления родственных связей на всех уровнях, от видового (см., например, [A. Shaw, 2000 a] до наивысших в этой группе. На примере этих работ рассмотрим некоторые особенности современного геносистематического анализа, выполняемого на уровне индивидуальных последовательностей ДНК.

Филогенетические деревья в этих работах авторы строили с помощью нескольких методов реконструкции – NJ, MP, ML и Байесова метода– это был разносторонний подход, о котором речь шла ранее. Сравнение полученных деревьев показало, что при работе с ITS все эти методы дают деревья, обычно достаточно сходные по топологии. Некоторые отличия касаются расположения на филогенетическом дереве «внешних групп» – маршанциевых и юнгерманниевых печеночников.

Был проанализирован полиморфизм участка ITS 2-4 у моховидных и сопоставлен с таковым у других высших растений [Яцентюк, 2001].

Оказалось, что секвенированные к тому времени внутренние транскрибируемые спейсерные последовательности оперона рРНК в разных группах моховидных заметно различаются по длине (рис. 9-3), что, понятно, не облегчает их выравнивание и сопоставление нуклеотидных последовательностей.

Следует также отметить и значительные различия между таксономическими группами по нуклеотидному составу анализируемого участка хпДНК: у маршанциевых и мхов последовательности ITS 2-4 более богаты АТ-парами. В крайних случаях выраженные различия (тест на гомогенность) не позволяют проводить реконструкций (рис. 9-4).

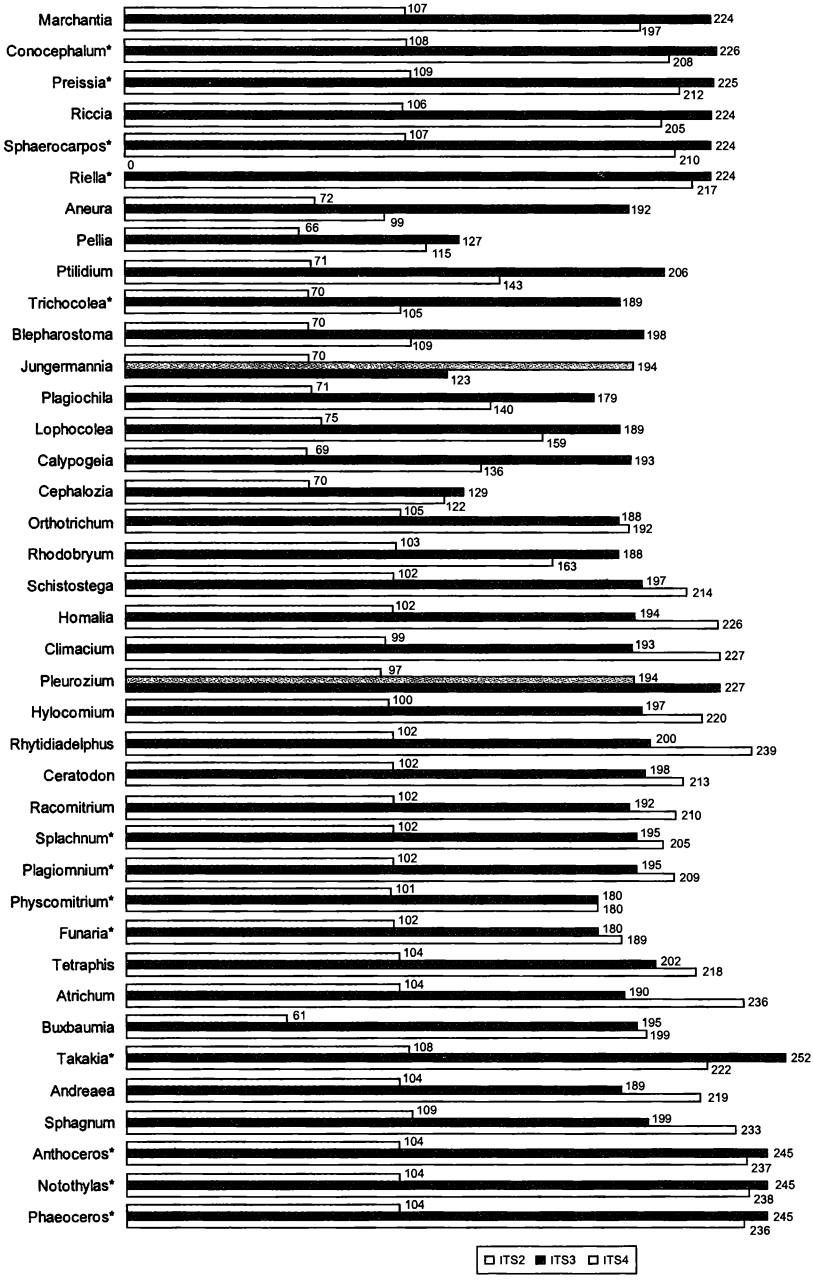


Рис. 9-3. Длина отдельных спейсерных последовательностей (ITS 2, 3 и 4) оперона рРНК хпДНК у печеночников и мхов (в п.н.)

Видны существенные различия среди проанализированных видов. Из [Яцентюк, 2001]

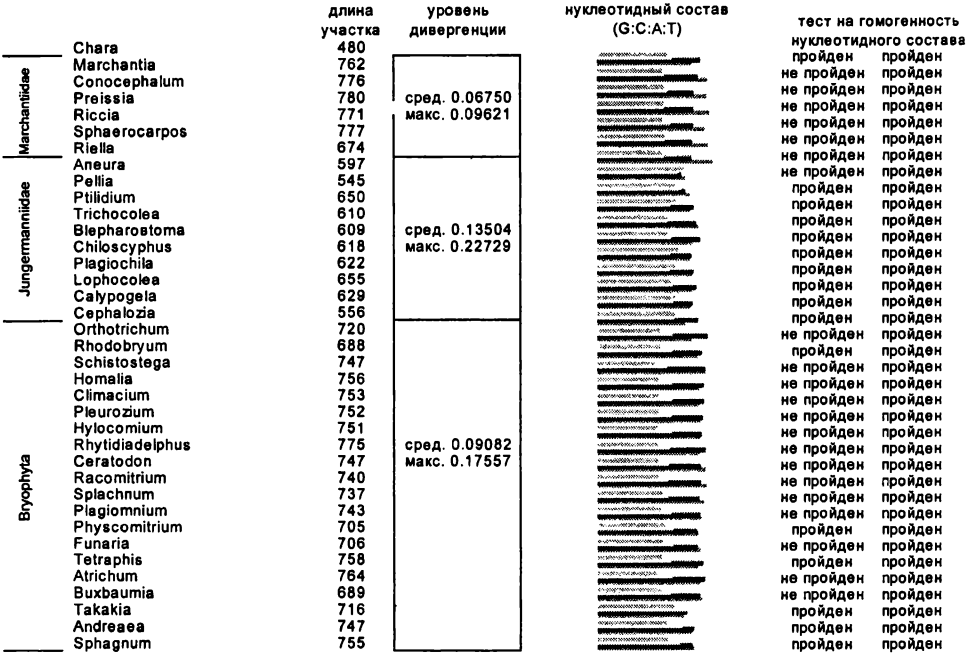


Рис. 9-4. Нуклеотидный состав и длина участка ITS 2-4 у печеночников и мхов. Из [Яцентюк, 2001]

Проведенный анализ показал, что спейсерные ITS-последовательности исследуемых видов еще не достигли предела, за которым наблюдается насыщение нуклеотидными заменами, и, следовательно, они более подходят для установления филогенетических связей, чем ряд других изученных в этом плане последовательностей ДНК.

Гетерогенность нуклеотидного состава, наблюдаемая в некоторых группах, в значительной степени объясняется особенностями молекулярной эволюции спейсерных последовательностей – наличием значительного числа делеций и вставок. Для изученного участка хпДНК оказались характерны три типа вставок: тандемные дупликации участков из 2-4 п.н., возникновение которых, вероятно, связано с механизмом "проскальзывания" при репликации, удлинение прилегающих гомополимерных участков и, несколько реже, вставки олигонуклеотидных участков, отличающихся от прилегающих последовательностей.

Гетерогенность нуклеотидного состава ITS как следствие независимой эволюции разных клад растений в течение сотен миллионов лет вынудила С.П. Яцентюк при построении деревьев идти по пути компартментализации, т.е. вначале определить наиболее вероятные монофилетические группы, а затем провести локальный анализ в пределах этих групп, выбрав в качестве внешней филогенетически ближайшую группу.

В пределах группы, включающей печеночники, мхи и антоцеротовые, тест на гомогенность нуклеотидного состава был пройден, поэтому оказалось возмож-

ным провести анализ этой выборки, взяв в качестве внешней группы харовые водоросли.

Для чего были предприняты эти меры ?

Важным достоинством такого подхода является снижение влияния гомоплазий – конвергентных и параллельных нуклеотидных замен, возникающих в быстро эволюционирующих участках ДНК организмов, принадлежащих к отдаленным таксонам.

Подробный анализ спейсерных последовательностей хлоропластной рДНК 39 видов моховидных показал, что филогенетически информативными являются 420 позиций. Это составляет 22% общего числа позиций, что несколько выше, чем, например, в генах рРНК.

Было выяснено, что длина ITS2 моховидных варьирует от 62 до 110 п.н., длина ITS3 от 127 до 252 п.н., ITS4 от 99 до 238 п.н.

В спейсерных последовательностях выявляются фрагменты значительного сходства. С другой стороны, было показано, что многие делеции и вставки имеют неслучайное распределение. Выяснение этого обстоятельства стало важным дополнением к первым результатам изучения крупных изменений в структуре хпДНК.

С. П. Яцентюк [2001] NJ-методом было построено дерево для 20 видов мхов (рис. 9-5). Согласно этому дереву, мхи формируют монофилетическую группу, сестринскую к кладе антоцеротовых. Этот вывод был подтвержден в работе [Cox et al., 2004]. Монофилетичность, следующая из молекулярных исследований мхов, соответствует представлениям традиционной систематики и подтверждается современными исследованиями [Kenrick, Crane, 1997; Cox et al., 2004].

На приводимом С. П. Яцентюк филогенетическом дереве можно отметить разделение мхов на две крупные клады, существование которых не вполне отражено в современной систематике: одну формируют *Schistostega*, *Ceratodon*, *Racomitrium* и представители Funariales – *Funaria* и *Physcomitrium*, другую – *Splachnum*, *Orthotrichum* и представители бриевых (по [Vitt et al., 1998]), которые, по данным С. П. Яцентюк оказываются не монофилетическими. Надо сказать, что сходные результаты были получены при изучении филогении той же группы мхов на основании анализа структуры митохондриальных генов *nad2* и *nad5* [Beckert et al., 2001]: по данным этих авторов, они формируют на филогенетическом дереве две монофилетических подгруппы, названные авторами "Dicrananae" и "Hypnanae"

Интерес исследователей давно привлекают сфагновые и андреэевые мхи. В работе, опубликованной в 2000 г. в журнале Bryologist в результате комплексного анализа морфологических (41 признак) и молекулярных (4 участка ДНК) данных авторы сделали вывод о базальном положении сфагновых мхов в филограмме бриофитов [Newton et al., 2000].

Изучение эволюции структуры гена 16S рРНК показало, что представители андреэевых мхов формировали сестринскую кладу по отношению к кладе, образованной другими мхами (включая *Sphagnum*), печеночниками и сосудистыми растениями [Mishler et al., 1992]. Анализ комбинированного набора данных, включающий результаты изучения структуры генов 16S и 23S рРНК, привел к иной топологии: *Sphagnum* оказался сестринской группой к кладе, включающей *Andreaea, Polytrichum* и *Tetraphis*. *Andreaea* и *Sphagnum* были включены в рассмотрение и при реконструкции филогении по *rbcL*-последовательности, однако по-

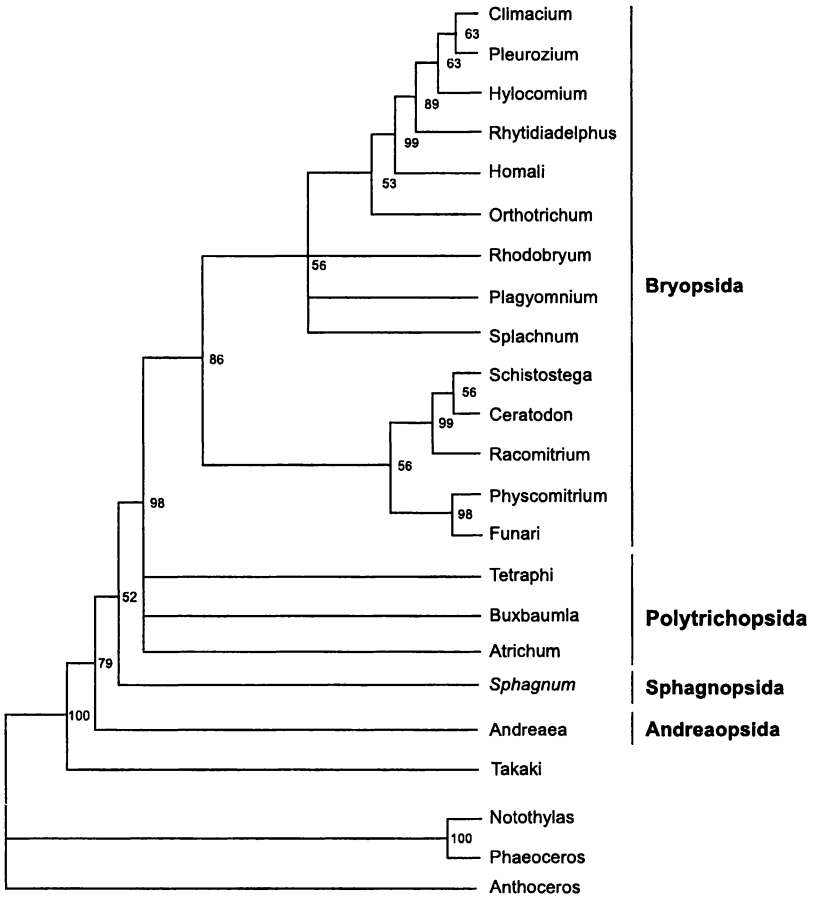


Рис. 9-5. Схема, иллюстрирующая филогенетичекие связи таксонов мхов

Дерево построено NJ-методом по результатам сравнительного анализа первичных структур ITS 2-х. Приведены значения бутстреп-индекса. Из [Яцентюк, 2001]

лученные результаты также оказались противоречивыми [Manchart, 1994]. В работе [A. Newton et al., 2000] на основании комплексного анализа морфологических (41 признак) и молекулярных (4 участка ДНК) данных авторы сделали вывод о базальном положении сфагновых на дереве мхов.

В недавней работе A. Shaw et al. [2003] также приводятся сведения об эволюции сфагновых. Анализ слитных последовательностей длиной в 16 т.п.н., включающих по 16 участков геномов из всех трех клеточных компартментов у 24 видов из рода *Sphagnum*, позволил высказать достаточно обоснованную гипотезу о ходе эволюции генотипов в этом таксоне. Достоверность этой гипотезы определяется тем, что реконструкция деревьев велась тремя разными методами (MP, ML и Байесовым).

В качестве внешних групп были взяты роды *Takakia* и *Andreaea*. У основания дерева располагаются два тропических вида, *S. sericeum* и *S. lapazense*, сильно ди-

вергировавших от остальных видов рода, которые формируют две клады. К первой относятся виды из секций *Sphagnum*, *Rigida* и *Cuspidata*, а ко второй – все прочие. Роды *Andreaea* и *Sphagnum* также формируют монофилетические ветви и в основании филогенетического дерева, представленного в работе С. П. Яцентюк.

Особого внимания заслуживает положение на филогенетическом дереве рода *Takakia*. Этот род интересен с точки зрения морфологии. Долгое время его относили к печеночникам (порядок Calobryales, подпорядок Takakiineae, по системе [Schuster, 1984b]). Однако по данным С. П. Яцентюк *Takakia* принадлежит к кладе листостебельных мхов. Изучение строения спорофита *Takakia* подтверждает правильность такого предположения.

Род *Takakia* по морфологическим признакам относят к андреэевым [Vitt et al., 1998], но по результатам анализа нуклеотидных последовательностей 18S рРНК, *rbcL*, *trnL-trnF*, *rps4*, *nad2*, *nad5* – скорее к сфагновым [Hedderson et al., 1998; Newton et al., 2000; Beckert et al., 2001]. Однако по результатам анализа последовательностей ITS 2-4 этот вид (или же такакия + сфагнум [Cox et al., 2004] занимает базальное положение на филогенетическом дереве мхов [Яцентюк, 2001].

Есть также еще один важный признак, согласно которому *Takakia* может занимать собственное обособленное положение в иерархии мхов. Этим признаком является довольно протяженная вставка (позиции 615–812 от начала полного выравнивания), которая присутствует в ITS 3 у всех листостебельных мхов, за исключением *Takakia* (рис. 9-6). Представляется крайне маловероятным случайное появление у *Takakia* в этом фрагменте вставки из 27 п.н., имеющей большое сходство с соответствующим фрагментом других изученных видов наземных растений, поэтому С. П. Яцентюк рассматривает эту делецию у остальных мхов как синапоморфный признак, свидетельствующий против отнесения *Takakia* как к андреэевым, так и к сфагновым.

Проведены исследования родственных отношений разных групп мхов, традиционно объединяемых по морфологическим признакам, основанные на сравни-

```
                        416                                                                600
Chara                   ---------AC---------- … CAGAA----TCAAAAG-------------------------
Nitella                 --------------------- … CAAAA----TCAA-A-------------------------
Marchantia              AACAACTTTACCCTGC----- … CAGGG-TT-TCAA-AGGGG--------TTT---TTTT--CC
Ptilidium               AACAGTTTAGCCCTGCC---- … CAGGG-C-AT-GAGAGGG---------TC----ATTTC---
Calypogeia              ---------GCCCTGCC----   CGGGG-T-AT-AAGAGG----------TT--------C-TT
Orthotrichum            AACAG----------------   ---------------------------TT----CTCTG-CC
Rhodobryum              AACAG----------------   ---------------------------TT----CTAAT-TC
Schistostega            AACAG----------------   ---------------------------CT----CTAAT-TC
Buxbaumia               AACAA----------------   ---------------------------CT----CTCTG-CC
Andreaea                AACAG----------------   ---------------------------------CTCTG-CC
Sphagnum                AATAG----------------   ---------------------------------CTCTG-CC
Takakia                 AAAAGCTCCGCCCCGCC----   CAGGG------CGGAGG-AGGG-----TT----CTCTG-CC
Anthoceros              AACAAGTCCGCCCTGAC----   CAGCGG------AGAG-AAGGG-----TT----CTCTG-CC
Phylloglossum           AAAAGCTCCGCCCTGCC----   CAGGG------CATAGG-AGGG-----TT----CTGTG-CC
Psilotum                AAGAGCTTCGCCCTGCC----   CA-GGT-----C---GG-AGGAAGG--TT----CTCTG-TC
Pinus                   AAAAGCTCTGCCCTCCC----   CA--GT------GGAGGGA--------T-----CTCTA-CC
Cycas                   AAAAGCTCTGCCCCGCC----   CAGGG------CGGAGG-AGGG-----TT----CTCTA-CC
Ephedra                 AAAA-------CCTGCC----   T------------GA---AGGG-----TTCTCCCTCTA-CC
Nymphaea                AAAAGCTCTGCCCTACA----   CA-----------GAGGGAGG------TT------------
```

Рис. 9-6. Результат выравнивания нуклеотидных последовательностей участка 4,5S – 5S ITS 3 хпДНК

Видна характерная для такакии вставка. Из [Яцентюк, 2001].

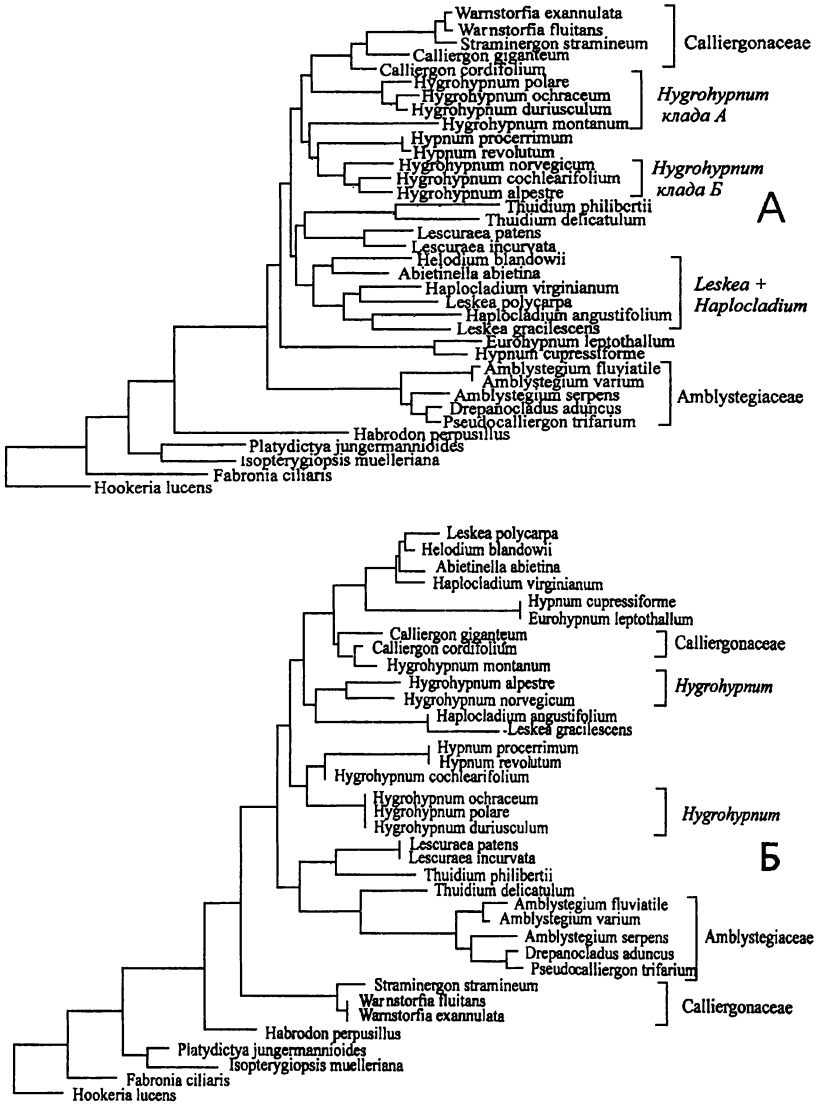


Рис. 9-7. А – Схема, отражающая филогенетические связи некоторых таксонов мхов Дерево построено NJ-методом по результатам изучения эволюции первичных структур ITS 2. Б – то же, но дерево построено по результатам сопоставления вторичных структур спейсера. Из [Budyakova et al., 2003].

тельном анализе еще ряда генов: *rps4*, *trnL-F*, *rbcL*, 18S рРНК и др.[De Luna et al., 2000; Cox et al., 2000; Goffinet, Cox, 2000; Newton et al., 2000], *psbT*, *rpl16*, *trnL*, ITS, 26S рРНК [Shaw, 2000 b], *trnL-F*, 26S рРНК, ITS, *rpl16* [Shaw, Goffinet, 2000; Cox et al., 2004; Schneider et al., 2004].

Если на уровне крупных таксонов наблюдается неплохое соответствие существующим классификациям, то на уровне родов и видов дело нередко обстоит хуже. Порядок Orthotrichales довольно подробно изучен Б. Гоффине с соавт. [Goffinet et al., 1998]. MP и NJ-методами были сопоставлены структуры гена *rbcL* у 37 видов, представителей 27 таксонов Orthotrichales и построены филогенетические деревья, отражающие эволюционные связи исследованных таксонов. Оба метода показали, что этот порядок полифилетичен. В нем обнаружены две основные линии развития, в одной из которых доминируют акрокарпные, а в другом кладокарпные мхи. Что касается семейства Orthotrichaceae, то оно, видимо, монофилетично, но этот вывод следует только из результатов, основанных на использовании дистанций, вычисленных по методу Тамуры и Нея. Авторы считают, что примененный ими подход позволяет решать важные вопросы о таксономическом положении групп, утративших перистом – структуру, играющую важную роль в установлении филогенетических отношений.

Другим примером могут быть результаты изучения филогении и системы недавно выделенного семейства Vittiaceae (Bryopsida). При комбинированном анализе эволюции ряда последовательностей хлоропластной и ядерной ДНК был сделан вывод, что это семейство вряд ли может претендовать на самостоятельное существование: на построенных кладограммах все его виды укладывались в кладу сем. Amblystegiaceae s. str. [Vanderpoorten et al., 2003].

Анализ родственных отношений артродонтных мхов позволил предположить, что Funariaceae являются сестринской группой ко всем прочим таксонам этой группы мхов. Это исследование было построено на сравнительном анализе ряда участкв ДНК (*trnC-trnF*, *rps4*, 18S rDNA) у 56 видов и результаты его кажутся поэтому весьма надежными. Правда, авторы отмечают, что между деревьями, построенными разными методами, существуют небольшие, но труднообъяснимые различия [Cox, Henderson, 1997].

Филогенетические отношения между основными таксонами мхов исследовались также путем анализа эволюции гена *psbA*, LS rDNA и интронов гена *trnL* [Wheeler, 1997]. В результате были получены интересные данные о филогенетическом положении проблемного рода *Takakia* (см. выше).

После того, как у видов *Takakia* были открыты антеридии и спорофиты этот род стали сближать со мхами. В ходе дальнейших исследований были получены данные, что их ближайшие родственники – сфагновые [Nickrent et al., 2001]. Аналогичные результаты одновременно были получены и при изучении эволюции ITS 2-4 хп ДНК [Яцентюк, 2001].

Выводы этих работ интересно сопоставить с результатами новейших исследований С. Кокс с соавт. [Cox et al., 2004]. Эти авторы строили свои заключения на результатах изучения эволюции восьми ядерных, хлоропластных и митохондриальных генов (nuc 18S, nuc 26S, интроны mit.*nad5*, *nad 7*, ср *rps4*, части *trnL*, *psbA*, *rbcL*) у 30 видов мхов и нескольких внешних групп из числа печеночников. На сегодня это одно из наиболее солидных исследований молекулярной филогении мхов.

Реконструкции проводили ML, MP и Байесовым методами. Все проанализированные мхи, включая *Sphagnum* и *Takakia*, оказались в одной монофилетической кладе. *Andreaea* и *Andreaeobryum* формируют монофилетическую группу. Мхи с нематодонтным перстомом парафилетичны и занимают базальное положение по отношению к артродонтным мхам. По мнению авторов, полученные

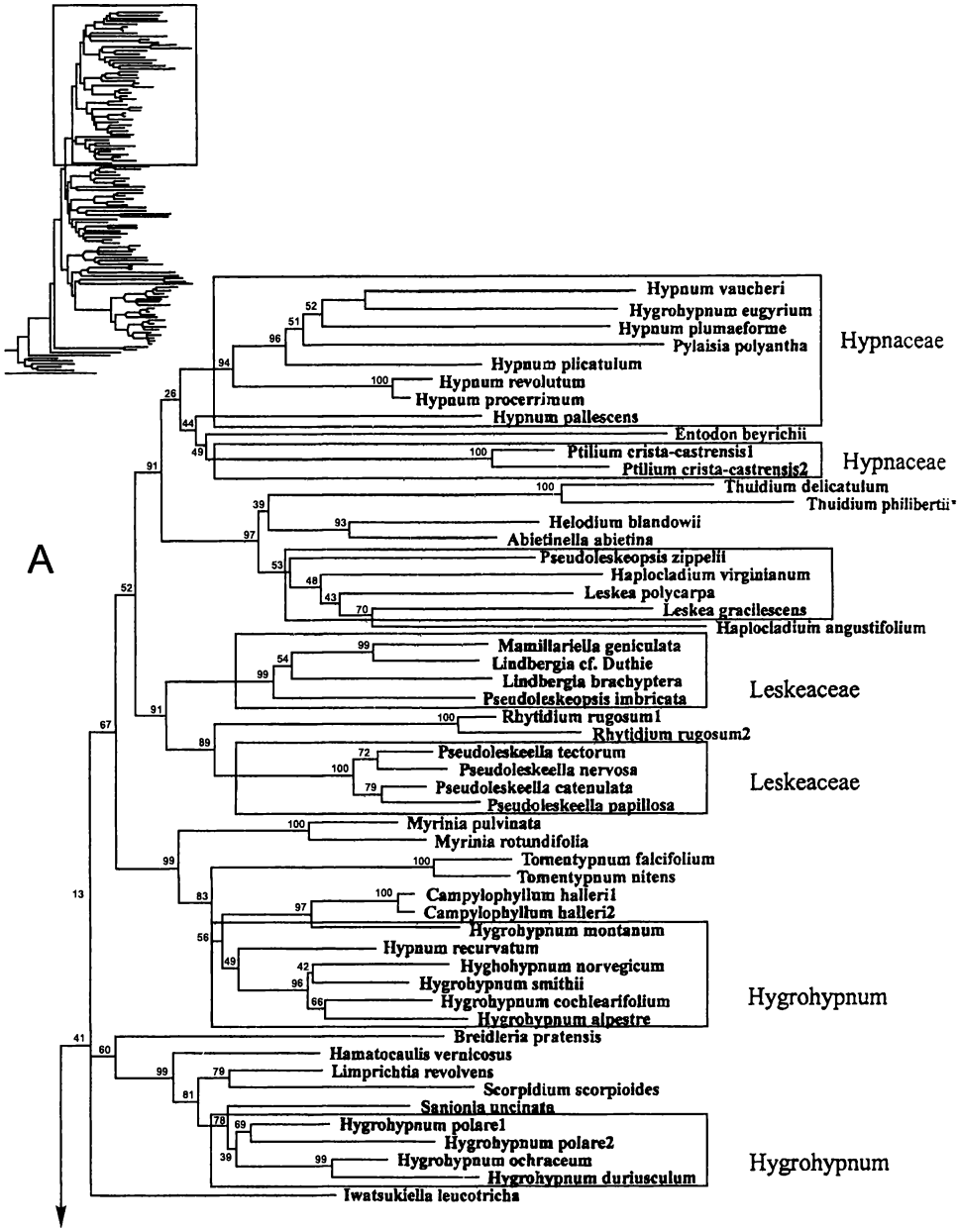
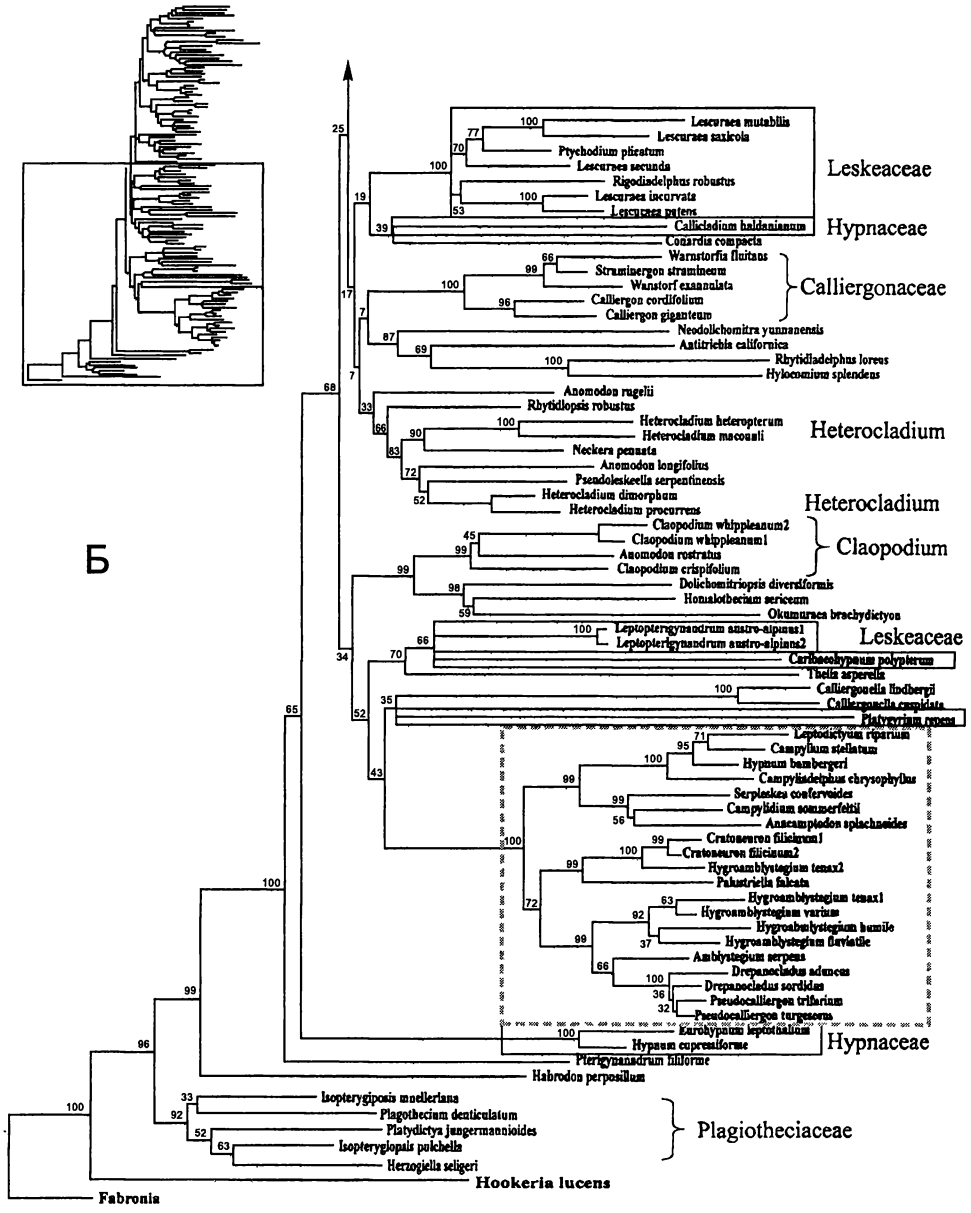


Рис. 9-8 А, Б. Схемы, отражающие филогенетические связи таксонов мхов (в основном. бокоплодных)

Слитные деревья А, Б построены NJ-методом по результатам изучения эволюции ядерных рДНК – участка хлоропластной ДНК *trn L-F*. Из-за громоздкости дерева его пришлось разделить на две час



ти. Деление показано в верхней левой части рисунка. Указаны значения бутстреп-индекса. Видно, что далеко не все узлы имеют высокую статистическую поддержку. Из [Гардинер, 2004]

данные позволяют предположить, что псевдоподии возникли независимо у сфагновых и андреэевых мхов, а mucilage-волоски у андреэевых мхов и такакии – не гомологичные образования. Устьца сфагновых не гомологичны этим структурам у других мхов. У предков всех мхов их не было.

В целом, филогенетические деревья, построенные С. П. Яцентюк и. С. Кокс с соавт. топологически весьма сходны.

Среди мхов есть немало родов, положение которых в системе остается предметом дискуссий. К их числу относится, например, род *Habrodon*. Разные исследователи относили его то к сем. Habrodontaceae, то к Myriniaceae, Leskeaceae, Fabroniaceae или другим семействам. Исследования эволюции участка *trn L-F* и яд. ITS 1-2 [Budyakova et al., 2003] показали, что сближение этого рода с *Leskea* и *Myrinia* скорее всего неправомерно (рис. 9-7 А, Б). Эти данные получены путем анализа как первичной (*а*), так и вторичной структуры (*б*) анализируемого спейсера. Дальнейший анализ выявил целесообразность выделения этого рода в отдельное семейство.

Из этих данных следует, что сем. Hypnaceae, как и род *Hypnum*, полифилетично, что согласуется с представлениями некоторых ботаников. Сем. Leskeaceae и Pterigynandraceae также видимо полифилетичны.

Глубокие исследования филогении семейства Dicranaceae, и в особенности подсемейства Dicraniidae, путем сопоставления последовательностей хпДНК *trn L–F* и *rps4* у представителей большинства родов семейства было выполнено К. ЛаФарж с соавт. [LaFarge et al., 2002]. Были вскрыты существенные расхождения между существующими представлениями о филогении и системе семейства и молекулярными данными. Само семейство, видимо, полифилетично, а, в случае признания его монофилетичности, из него нужно исключить ряд подсемейств, некоторые из которых в свою очередь парафилетичны. Монофилетический таксон может быть сформирован из четырех клад: Dicranoideae, Mesotoideae, группа видов *Dicranoloma* + *Wardia* и группа видов *Leuccoloma*. Этот таксон и следует, видимо, рассматривать как сем. Dicraniaceae s. s.. При этом из него исключается 18 родов, ранее относимых к этому семейству.

Большинство из сделанных ранее выводов было подвергнуто критическому пересмотру в работе З. Магомбо [Magombo, 2003]. Для этой цели автор использовал результаты исследования эволюции генов *rbcL*, *rps4* и интрона гена *trnL* (UAA). Всего было изучено 46 таксонов мхов. Деревья строились по 619 филогенетически информативным сайтам MP-методом.

Исходя из полученных результатов следует, что семейства Tetraphidaceae, Polytrichaceae и Buxbaumiaceae парафилетичны. Сестринскими группами предлагается считать: 1) Tetraphidaceae и все мхи с перистомом, 2) Polytrichaceae и кладу, включающую Buxbaumiaceae, Diphysciaceae, дипло- и гаплолепидные мхи, и.т.п. Интересно было бы узнать, к каким выводам автор пришел бы, если бы использовал иные методы реконструкции ? В дискуссии автор отмечает, что его выводы во многом противоречат заключениям других исследователей молекулярной эволюции мхов.

Недавно А. А. Гардинер построила NJ-методом филогенетическое дерево для 124 видов мхов, в основном, бокоплодных. Она основывалась на результатах сиквенса двух участков ДНК (ядерной рДНК и хп *trnL-trnF*). Для удобства анализа на рис. 9-8 **А,Б** это дерево разбито на две части.

Анализируя этот рисунок, можно придти к выводу, что в целом наблюдается выраженное расхождение во взглядах геносистематиков и морфологов на систему бокоплодных мхов.

ГЕНОСИСТЕМАТИКА ПЛАУНОВИДНЫХ

История изучения таксона

Следующей группой высших растений, которая, согласно гипотезам как палеоботаников, так и геносистематиков, отделилась от эволюционного ствола их развития, являются плауновидные. Таким образом, "эволюционный возраст" плауновидных существенно меньше, чем у моховидных. Можно предполагать, что, по крайней мере, некоторые их семантиды дивергировали менее глубоко, чем в случае моховидных и, стало быть, их последовательности легче выравнивать, а затем на этой основе строить филогенетические деревья.

О достоверности выводов можно судить по результатам анализа крупных изменений в геномах плауновидных, произошедших в них за время их независимой эволюции.

МГСУ плауновидных на сегодня практически не изучены и основная информация об их молекулярной эволюции получена путем сопоставления отдельных участков ядерных и пластидных ДНК. Лишь недавно определена полная первичная структура хпДНК у первого представителя плауновидных, *Huperzia lucidula* [Wolf et al., 2005].

Плауновидные известны с силура. Они появились на Земле около 390 млн лет тому назад. В карбоне плауновидные составляли заметную часть наземной флоры и включали почти половину всех известных сегодня видов ископаемых растений этого периода. В наше время плауновидные составляют лишь малую часть биоразнообразия сосудистых растений и представлены сравнительно небольшим числом видов (по разным данным, 700 – 1250).

В современных системах плауновидные обычно выделяют в отдел Lycopodiophyta включающего классы плауновых (Lycopodiopsida или Lycopsida с порядком Lycopodiales) и полушниковых (Isoetopsida) Последний разделяют на порядки Selaginellales и Isoetales. В других системах плауновидные делят на порядки Lycopodiales, Isoetales и Selaginellales.

Согласно данным палеоботаники, разные плауновидные видимо развивалась как достаточно обособленные линии эволюции сосудистых растений. Есть мнение, что линия Rhyniopsida – Zosterophyllopsida привела к Lycopodiales, тогда как Selaginellales и Isoetales являются развитием линии Rhyniopsida – Protolepidodendrales [Stewart, Rothwell, 1993] (рис.10-1).

Некоторые авторы на основании изучения морфологии апикальной меристемы придерживаются гипотезы о независимом от других плауновидных растений

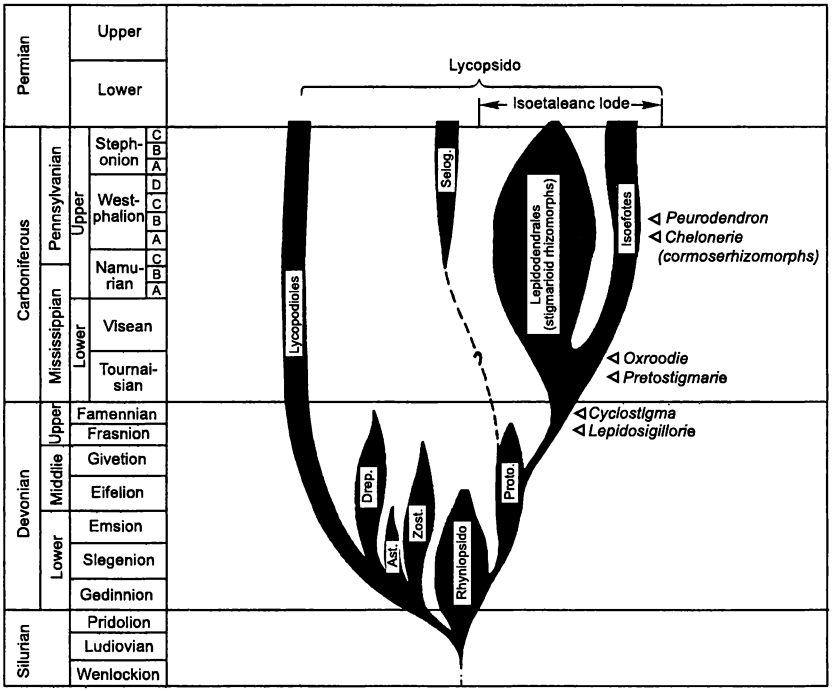


Рис. 10-1. Схема эволюции плауновидных, построенная на основании изучения их морфологичеких признаков. Из [Stewart, Rothwell, 1993]

происхождении Selaginellales. В работе D. Garbary и соавт. [1993] на основании изучения структуры гамет и гаметогенеза высказано предположение о парафилии плауновидных. В то же время, кладистический анализ морфологических признаков 9 современных и 11 вымерших плауновидных, проведенный Kenrick и Crane [1997], говорит в пользу гипотезы о монофилии Lycopsida, хотя более ранние работы не позволили выявить синапоморфных признаков данного семейства [Wagner, Beitel, 1992] или показать, что Lycopodiaceae является сестринской группой по отношению к кладе разноспоровых плауновидных, включающей Isoetaceae, Selaginellaceae и вымерших предков [Bateman, 1992].

Таким образом, общепринятой точки зрения на эволюцию плауновидных ботаники до сих пор не выработали, что создает предпосылки для использования других подходов к изучению их филогенеза.. Не исключено, что одним из них станет использование методов геносистематики.

Молекулярные исследования плауновидных

Исследования молекулярной эволюции плауновидных были начаты с исследований эволюции генов их рРНК. J. Manhart [1995], изучая эволюцию ми-

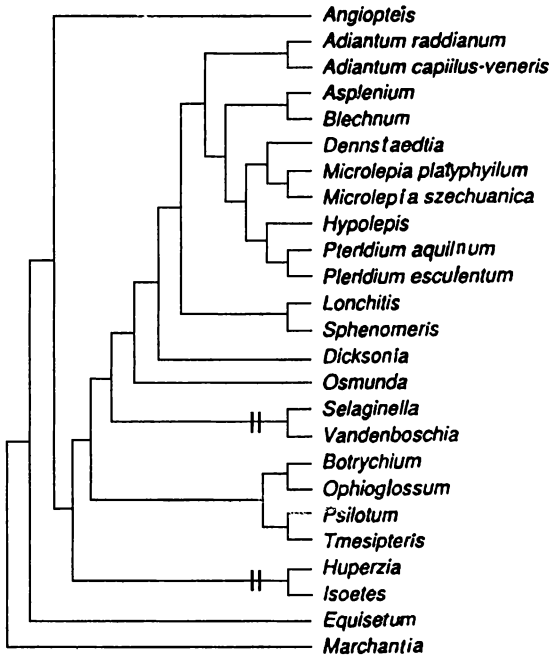


Рис. 10-2. Результаты реконструкции эволюции плауновидных и папоротников, выполненой по результатам изучения двух генов, *atpB* и *rbcL*

Видно, что таксоны плауновидных (отмечены черточками на ветвях дерева) далеко отнесены друг от друга. Из [Wolf, 1997]

тохондриального гена 16S рРНК плауновидных и других высших растений, столкнулся с определенными сложностями: включение в анализируемую матрицу *Selaginella* приводило к резкому изменению топологии филогенетического дерева. Им был получен весьма необычный результат: плауновидные не находились в основании дерева сосудистых растений и не формировали монофилетическую кладу: *Selaginella* объединялась с *Lycopodium*, а Isoetes входил в одну кладу с семенными растениями. При исключении *Selaginella* из анализа, *Lycopodium* становился сестринской группой по отношению к остальным сосудистым растениям, а положение *Isoetes* не изменялось.

Позже, в результате сопоставления структуры гена 18S рРНК H. Kranz, V. Huss [1996] пришли к выводу о том, что плауновидные, а не псилотовые, лежат у основания клады сосудистых растений.

В одной из последующих работ анализ последовательностей генов *atpB* и *rbcL* показал полифилетичность плауновидных, что заставляло еще раз обратиться к этой проблеме (рис. 10-2).

Вскоре в работе по сопоставлению структуры гена *rbcL* было показано, что плауновидные – это все же монофилетическая группа, дивергирующая на две линии эволюционного развития, – в одну входят Lycopodiaceae, а другая объединяла Selaginellaceae и Isoetaceae [Wikstrom, Kenrick, 1997] (рис. 10-3). Различия в положении видов плауновидных на деревьях, представленных на рис. 10-2

и 10-3 определяются скорее всего тем, что при их построении были использованы разные методы реконструкции.

К сожалению, все эти исследования филогении плауновидных, как правило, были ограничены изучением фрагментов ДНК небольшого числа видов, и комплексный анализ путем сопоставления последовательностей многих генов до недавнего времени вообще не проводился. Между тем, именно такой подход (на примере цветковых растений) является весьма эффективным.

Более активное изучение плауновидных методами геносистематики началось в последние годы. Было установлено, что геномы плауновидных и более сложно организованных высших растений несут ряд важных синапоморфных признаков, отличающий их от геномов по крайней мере некоторых изученных на сегодня бриофитов. Так, в их хлоропластных геномах, как и в геномах прочих сосудистых растений, есть характерная инверсия длиной порядка 30 т. п. н. [Raubeson, Jansen, 1992]. Трудами японских исследователей было выяснено, что формирование этой филогенетической линии сопровождалось важными изменениями в расположении в геномах некоторых генов рРНК [Sone et al., 1999]: у всех высших растений (кроме маршанциевых) 5S рРНК располагаются в хромосомах отдельно от генов 18S, 5,8S и 26S рРНК, а у маршанциевых они находятся в одном блоке с другими генами рРНК. С другой стороны, было показано, что строение хпДНК у первого из изученных представителей плауновидных, *Huperzia lucidula*, более сходно с таковым у мхов, печеночников и антоцеротовых, чем со строением хпДНК у сосудистых растений [Wolf et al., 2005].

На примере спейсеров (ITS) между генами рРНК в хпДНК у плауновидных изучалась и эволюция некодирующих последовательностей. Было выяснено, что их спейсерные последовательности содержат значительное число делеций и вставок, вследствие чего длина ITS 2 варьирует у них от 98 до 102 п.н., ITS 3 – от 202 до 250 п.н., а длина ITS 4 – от 214 до 263 п.н. у Lycopodiaceae и от 164 до 170 п.н. у Isoetaceae.

Эти индели оказались кладоспецифичными. Для *Huperzia* найдено 3 такие индели, для *Phylloglossum* – 3, *Huperzia* + *Phylloglossum* – 3, *Lycopodiella* – 4, *Lycopodium* – 1, *Isoetes* – 21. В опубликованной недавно работе Р. Бриттена с соавт. [Britten et al., 2003] указывается, что именно индели вносят главный вклад в межвидовые различия в строении ДНК. Об инделях как синапоморфных признаках писали А. Рокас и П. Холланд [Rokas, Holland, 2000].

Уровень дивергенции спейсеров хлоропластной рДНК внутри выделяемых на дереве групп плауновидных возрастает в направлении *Isoetaceae* → *Huperzia* → *Lycopodium* → *Lycopodiella*. Так как эти делеции и вставки группоспецифичны, они могут быть использованы при разработке молекулярных систем группы [Яцентюк, 2001].

Филогенетические связи между плауновидными, реконструированные по результатам анализа гена *rbcL*, описываются в работе N. Wikstrom, P. Kenrick [2000 a] (Lycopodiaceae) и P. Korall с соавт. [1999, 2002] (Selaginellaceae). Полушниковые стали исследовать позже [Hoot, Taylor, 2001; Taylor et al., 2004; Wolf et al., 2005] (рис. 10-3).

Анализируя эволюцию гена *rbcL*, П. Коралл с соавт. существенно расширили количество частично изученных генотипов у видов плауновидных и уточнили характер их молекулярной эволюции.

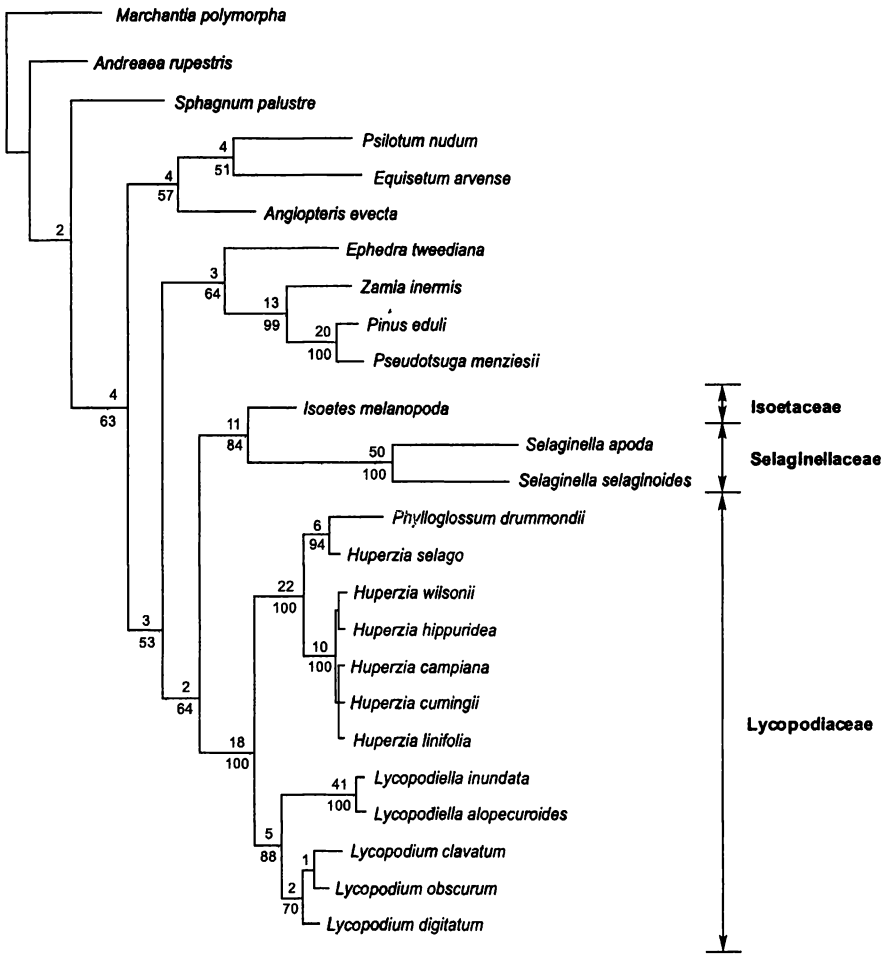


Рис. 10-3. Результаты реконструкции эволюции плауновидных, выполненной по результатам сопоставления строения гена *rbcL*

Дерево построено МР-методом. Длина ветвей соответствует количеству накопленных изменений в первичной структуре гена. Сверху ветвей приведены значения индекса Бремера, внизу – значения индекса бутстрепа. Из [Wikstrom, Kenrick, 1997]

Гены *rbcL* у видов из семейства Lycopodiaceae оказались чрезвычайно схожими, особенно у видов рода *Huperzia*, что говорило либо об относительной эволюционной «молодости» этих таксонов, либо о низких темпах эволюции гена в этом семействе [Wikstrom, Kenrick, 1997]. Последнее предположение согласуется с данными, полученными в результате развернутого исследования этой группы С. П. Яцентюк [2001 б] (табл. 10-1).

В поисках дальнейших путей к пониманию проблем молекулярной филогенетики Lycopodiophyta С.П.Яцентюк были проанализированы ITS-последовательности на участке 23S-*trnR* хлоропластной рДНК 25 видов из семейства Lycopodiaceae, двух видов семейства Isoetaceae и двух видов Selaginellaceae [Яцентюк, 2001].

Таблица 10-1

Темпы молекулярной эволюции участка ITS 2-4 хпДНК у плауновидных [Из Яцентюк, 2001 б]

Род	Максимальное *p*-расстояние (в %) (виды одного рода)	Эволюционный возраст таксона (млн лет)	Кол-во различий в последовательности ($\times 10^{-2}$) за 1 млн лет
Huperzia	2,78	267	1,04
Lycopodiella	0,87	208	4,75
Lycopodium	7,32	267	2,74
Isoetes	0,69	309	0,22

Отметим значительные различия в темпах молекулярной эволюции спейсеров хлоропластной рДНК в пределах выявляемых методами геносистематики клад растений, что для других групп растений отмечались и ранее. Так, среди голосеменных выраженное увеличение числа замен наблюдалось у гнетовых, темпы эволюции спейсеров хлоропластной рДНК крайне велики и у папоротников. Такое ускорение темпов эволюции было показано и для нескольких генов Selaginellaceae [Nickrent et al., 2000; Pryer et al., 2001].

С.П. Яцентюк также были отмечены значительные различия между последовательностями ITS 2 у двух изученных видов *Selaginella:* длина ITS 2 у *S. doederleinii* составила 153 п.н., тогда как длина ITS2 у *S. caulescens* – 28 п.н. Включение в анализируемую матрицу данных о первичной структуре нуклеотидных последовательностей спейсерных участков Selaginellaceae в связи с неоднозначностью выравнивания приводило к снижению достоверности филогенетических реконструкций, поэтому последовательности ITS 2-4 Selaginellaceae были С. П. Яцентюк исключены из филогенетического анализа. В причинах такого влияния последовательностей селягинелл еще предстоит разобраться. Отметим, однако, что последовательности селягинелл существенно затрудняли реконструкцию эволюционных связей плауновидных и в ранней работе Дж. Манхарта [Manhart, 1995].

В дальнейшем С.П. Яцентюк исследовала 27 выровненных последовательностей ITS у представителей Lycopodiaceae и Isoetaceae и на этой основе были построены филогенетические деревья (в целом, по 1001 филогенетически значимой позиции).

Использование при построении дерева расстояний Кимуры (*p*-расстояний) привело лишь к небольшим изменениям во взаимоотношениях видов *Lycopodiella* и значениях бутстрепа. Исключение из анализа пробелов выражалось в снижении величин бутстрепа при сохранении общей топологии дерева. Такую же топологию имеет и филогенетическое дерево, построенное только по 27 последовательностям плауновидных, без внешних групп.

На рис. 10-4 изученные плауновидные представлены в основном двумя семействами – Lycopodiaceae и Selagenellaceae, которые образуют две клады с высокими значениями бутстрепа. Эти клады объединяются, в свою очередь, в кластер, ограничивающий изученных представителей Lycopodiophyta от остальных сосудистых растений.

Выполненные одновременно широкие исследования эволюции ядерных ITS, спейсерного участка между генами *atpB* и *rbcL* и второго интрона ортолога гена

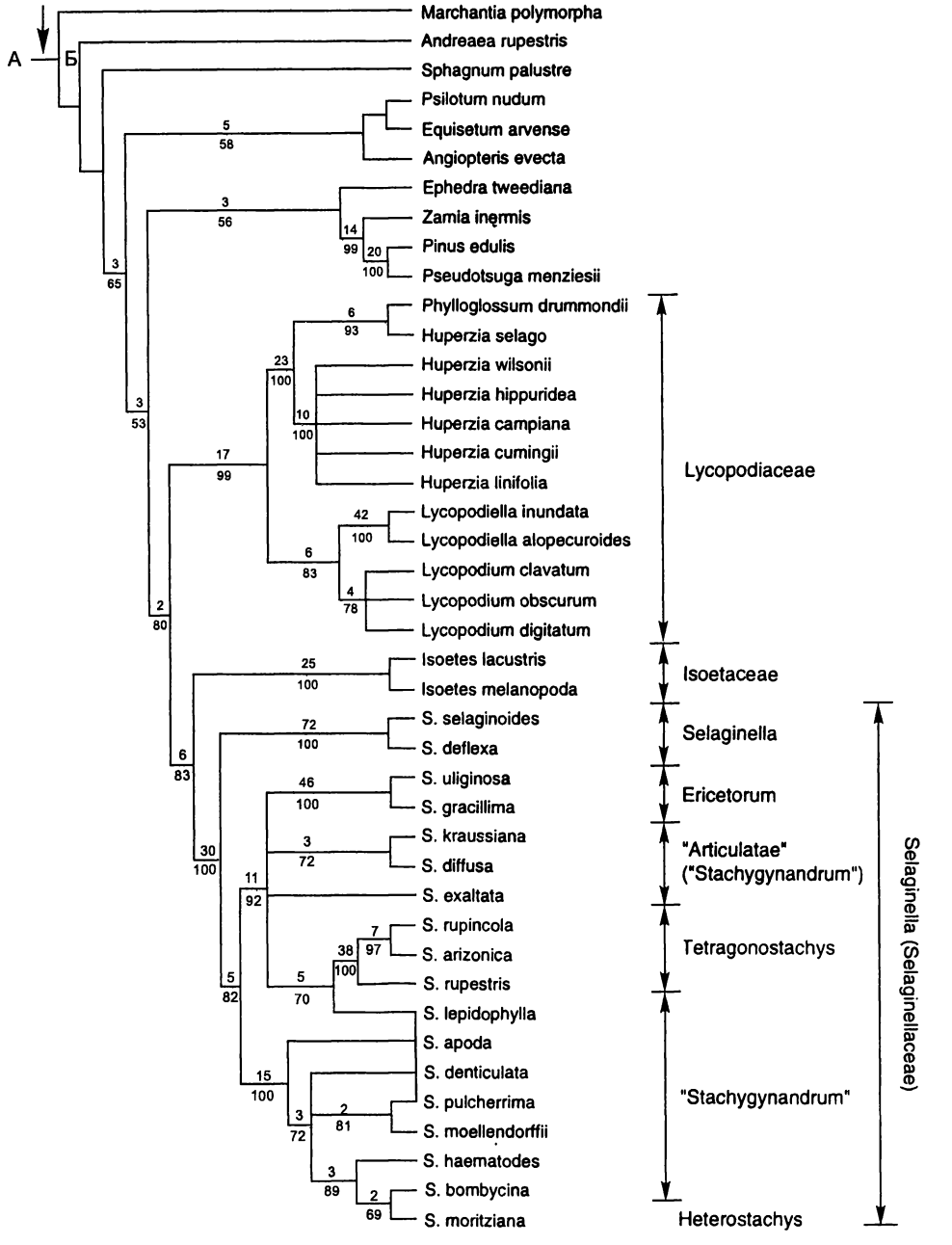


Рис. 10-4. Схема, отражающая взаимосвязи плауновидных, на которой более подробно, чем на рис. 10-3, отражена эволюция селягинелл. Все обозначения – как на предыдущем рисунке

leafy [Hoot, Taylor, 2001] у 27 видов *Isoetes* позволили существенно уточнить темпы и формы эволюции генотипов у видов этого рода полушниковых. Задача реконструкции существенно осложнялась тем, что ряд видов легко образует межвидовые гибриды, которые нередко описывались в качестве самостоятельных видов, а также наличием в анализируемой выборке видов полиплоидных форм. В некоторых случаях молекулярными методами удается выяснить их происхождение, например, для некоторых видов из Китая [Taylor et al., 2004]. При анализе нуклеотидных последовательностей особенно ярко проявилось значение инделей для характеристики отдельных клад полушниковых.

Совместный анализ эволюции ITS и спейсеров у диплоидных видов показал, что при реконструкции формируются три клады. Первая включает виды из Старого Света и Калифорнии, вторая – виды из Азии, а третья – из Северной Америки. В целом североамериканские виды монофилетической клады не формируют. Виды из Калифорнии группируются с видами из Европы (Испании) и Африки. Реконструировать филогенетические связи североамериканских видов достоверно не удалось. Авторы видят прчину в быстром видообразовании видов этой группе.

Совместный анализ ITS и гена *leafy* позволил несколько прояснить взаимосвязи генотипов в пределах этой группы видов и даже описать некоторые виды-двойники.

Какие же предварительные выводы, интересные для систематиков, можно сделать, если исходить из топология представленных выше деревьев ? Создается впечатление, что она соответствует выделению 4 родов в семействе Lycopodiaceae. Вначале в результате ветвления происходит разделение рассматриваемых видов на две группы родов (клады) – *Lycopodium* + *Lycopodiella* и *Phylloglossum* +*Huperzia* с достаточно высокими уровнями поддержки бутстрепом. Каждая из клад в свою очередь включает по две дочерних, условно соответствующих вышеупомянутым родам. Аналогичные заключения могут быть сделаны и на основании изучения эволюции ряда последовательностей у полушниковых [Hoot, Taylor, 2001].

Возраст таксонов, рассчитанный путем анализа последовательностей гена *rbcL* методом непараметрического сглаживания скоростей в общем согласуется с палеоботаническими данными [Wikstrom, Kenrick, 2001].

Поскольку существуют значительные межродовые вариации в скоростях молекулярной эволюции спейсерного участка (у Lycopodiaceae они различаются в 4,6 раза) такие различия, возможно, сказываются на достоверности реконструкции событий эволюции и их датировке среди плауновидных.

Самое низкое внутриродовое различие (0,69%) было отмечено между видами рода *Isoetes,* а самая высокая скорость эволюции спейсеров хпДНК отмечена у *Lycopodiella*. Она оказалась существенно выше наблюдаемого уровня дивергенции между некоторыми родами и даже семействами семенных растений, что может служить хорошей иллюстрацией к проблеме эквивалентности рангов таксонов высших растений [Antonov et al., 1988]. Согласно развиваемым нами в этой работе представлениям, ранг таксона должен коррелировать с глубиной его генетической дивергенции.

Интересно, что ранее при сопоставлении структуры гена *rbcL* и *trnL* интрона между видами рода *Lycopodiella* был также отмечен высокий уровень дивергенции [Wikstrqm, Kenrick, 2000b].

Итак, изучение эволюции спейсерных участков хпДНК плауновидных позволило составить достаточно определенное представление об их эволюционной истории и соотнести полученные данные с гипотезами ботаников. Однако известно, что надежность данных, полученных при использовании результатов изучения эволюции небольшого числа генов, ограничена.

В последнее время появилась возможность использовать для филогенетических реконструкций не моно-, а «полигенные» сравнения, «слитные последовательности» (concatenated sequences). Результатом такого подхода в ряде случаев, но не всегда, становится более полная и достоверная реконструкция филогении [Roikas et al., 2003].

Тем не менее не надо забывать, что отнюдь не все гены являются подходящими маркерами для решения филогенетических задач. Речь об этом шла ранее.

Различные пути и особенности эволюции отдельных генов позволяют предположить существование целого спектра последовательностей ДНК, имеющих неодинаковую степень пригодности для решения филогенетических проблем для таксонов разного таксономического уровня.

В работе С. П. Яцентюк [2001] была сделана попытка проанализировать, каким образом расширение базы данных путем включения в анализ дополнительных последовательностей ITS и использование нескольких различных методов филогенетических реконструкций скажется на конечном результате анализа.

Для этой цели были проанализированы четыре набора данных:

- нуклеотидные последовательности ITS 2-4,
- ITS 2-4 в сочетании с данными по гену *rbcL*,
- ITS 2-4 в сочетании с данными по *trnL* интрону,
- сочетание данных по трем участкам хпДНК – ITS 2-4+ *rbcL*+*trnL* интрон.

Для исследования каждого набора данных были применены три метода реконструкции филогении: (NJ), (MP) и (ML). В анализ были включены 25 видов Lycopodiaceae и, в качестве ближайшей внешней группы – *Isoetes*.

Полученное консенсусное филогенетическое дерево оказалось сходным с деревом, реконструирующим филогению Lycopodiaceae по последовательности ITS2-4 (см. рис. 10-4). Основные различия касаются ветвей с поддержкой ниже 50%, что не удивительно. Лишь два отличия было обнаружено для ветвей с высокой поддержкой: положение *L. annotinum* и *H. verticillata*.

Было проведено сравнение значений бутстрепа, поддерживающих существование каждого узла на филогенетических деревьях, построенных разными методами. Основная выявленная и ожидаемая тенденция – увеличение поддержки при добавлении дополнительной последовательности к рассматриваемой базе данных. Наиболее выраженным этот эффект был при добавлении последовательности *trnL*.

Однако в некоторых случаях комбинирование данных по гену *rbcL* и ITS2-4 приводило к понижению значений бутстрепа по сравнению с филогенетическими деревьями, построенными только по ITS 2-4. Это служит дополнительным подтверждением того, что ген *rbcL* не всегда пригоден для филогенетических реконструкций [Goremykin et al., 1996; Kellog, Juliano, 1997].

Как же соотносятся выводы ботаников, фено- и геносистематиков, относительно филогении и системы плауновидных ?

Как известно, к типовому семейству современных плауновидных – Lycopodiaceae – относят около 400 видов. Основными трудностями при изучении филогении плауновидных по данным морфологии является сравнительная простота организации этих растений. До сих пор подразделение и взаимоотношения таксонов внутри семейства Lycopodiaceae остаются дискуссионными. В частности, это касается монотипного рода *Phylloglossum*.

Одни авторы включали виды Lycopodiaceae в один крупный род *Lycopodium*, при этом по комплексу признаков виды, входящие в этот род, объединяли в подроды, например, в три подрода: *Urostachys*, *Lepidotis* и *Lycopodium*. Другие авторы выделяли от четырех до двенадцати родов и даже два семейства Lycopodiaceae и Huperziaceae.

Последние исследования более согласованно выделяют несколько таксономических групп внутри Lycopodiaceae, кроме того, как обычно бывает, в системах наблюдаются две тенденции – к объединению и разукрупнению таксонов. Таким образом, единой точки зрения на систему плауновидных к настоящему времени еще не выработано.

В своей работе С.П. Яцентюк [2001] придерживалась системы, предложенной B. Øllgaard [1987], согласно которой выделяют четыре рода: *Huperzia*, *Lycopodium*, *Lycopodiella* и *Phylloglossum*. Выбор этот был сделан на основании ранее полученных молекулярных данных.

Растения из монотипного рода *Phylloglossum* внешне заметно отличаются от других представителей Lycopodiaceae. Некоторые авторы считают этот род сильно редуцированной формой, а наличие у растения подземного клубня объясняют приспособлением к существованию в местах с периодически повторяющимися пожарами. Часть исследователей предполагает наличие родства между *Phylloglossum* и *Lycopodiella*, находя у отдельных представителей последних структуры, напоминающие клубень *Phylloglossum*. Однако результаты изучения морфологии спор и эпидермиса спорангия, а также кариологические и биохимические исследования сближают *Phylloglossum* и *Huperzia*.

Согласно данным, полученным при изучении ITS 2-4 участка, *Phylloglossum drummondii* в филогенетическом дереве объединяется с видами рода *Huperzia* в один кластер с максимально высоким значением бутстрепа (100%) и занимает при этом базальное положение. Этот результат не согласуется с выводами, полученными на основании кладистического анализа большого набора морфологических признаков, согласно которым *Phylloglossum* объединяется в кладу с *Lycopodium* и *Lycopodiella*, сестринскую *Huperzia* [Kenrick, Crane, 1997]. Однако данные по гену *rbcL* [Wikström, Kenrick, 1997] хорошо соответствуют результатам анализа спейсеров хлоропластной рДНК. Имеется лишь одно различие – в *rbcL* – дереве *Phylloglossum* объединяется с *Huperzia selago*, образуя сестринскую группу по отношению к другим видам *Huperzia*. Филогения, реконструированная по *trnL* интрону [Wikström et al., 1999; Wikström, Kenrick, 2000a], полностью соответствует отмеченному С.П. Яцентюк положению *Phylloglossum* как сестринской группы *Huperzia*.

Методы геносистематики были использованы для изучения проблемы происхождения эпифитных и наземных форм рода *Huperzia* [Wikstrom et al., 1999; 2000 a]. Было выяснено, что переход к эпифитному образу жизни у тропических *Huperzia* в эволюции произошел лишь однажды, но возврат к наземному образу жизни происходил неоднократно.

Базальное положение в кладе *Huperzia* на филогенетическом дереве занимает *H. selago*. Этот вид входит в состав большой (70 видов) группы *H. selago*, широко распространенной в умеренном и арктическом поясах северного полушария, включая альпийскую зону. Они встречаются также в альпийской зоне тропиков и умеренном поясе южного полушария. Представители группы *H. selago* хорошо отличимы от остальных видов *Huperzia* по морфологии спор и наличию побегов с выводковыми луковичками.

Совокупность молекулярных, морфологических и биогеографических данных позволяет предположить необходимость выделения группы *H. selago* в отдельный род. Для вынесения окончательного вывода, однако, необходим молекулярный анализ большего числа видов из этой группы и других последовательностей ДНК, так как это может повысить надежность филогенетических гипотез.

Остальные изученные в работе С. П..Яцентюк виды *Huperzia* по результатам анализа эволюции спейсерных участков хпДНК показывают строгое разделение видов по биогеографическому признаку на палеотропические и неотропические виды. Таким образом, они хорошо согласуются как с данными по изучению последовательностей гена *rbcL* и *trnL* интрона [Wikstrцm et al., 1999; Wikstrцm, Kenrick, 2000a], так и с результатами анализа комбинированного набора данных. Молекулярные данные, в то же время, показывают, что виды *H. campiana* и *H. phlegmarioides*, относящиеся к одной группе видов *H. phlegmaria* [Øllgaard, 1987], считающейся пантропической, скорее всего парафилетичны и имеют независимое происхождение в нео- и палеотропиках. Таким образом, наблюдаемое сходство в строении стробил и морфологии стеблей у представителей неотропической и палеотропической групп является, по-видимому, результатом конвергентной или параллельной эволюции [Wikström et al., 1999].

Филогенетический анализ морфологии североамериканских видов, проведенный Wagner и Beitel [1992], показал монофилию *Lycopodium* и *Lycopodiella*. Эти два рода легко различимы по нескольким признакам, таким как анатомия стебля, морфология гаметофита и расположение слизевых каналов, структура спородермы и эпидермиса спорангия. Полученные молекулярные данные также подтверждают, что *Lycopodium* и *Lycopodiella* являются сестринскими группами. Виды этих родов характеризуются значительно большей вариабельностью спейсерных последовательностей, чем виды *Huperzia*.

Среди *Lycopodium* базальное положение на филогенетическом дереве занимает *L. casuarinoides*. По морфологическим данным этот вид был выделен в монотипную секцию Lycopodiastrum. Среди остальных видов *Lycopodium*, представляющих 9 секций *sensu Øllgaard* [1987], с наибольшей поддержкой бутстреп-анализом выявляется клада *L. fastigiatum* (секция Magellanica) – *L. volubile* (секция Pseudodiphasium). Родственные отношения этих секций подтверждаются как морфологическими данными [Øllgaard, , 1987], так и результатами сравнительного анализа гена *rbcL* и *trnL* интрона [Wikström, Kenrick, 2000b], и результатами анализа комбинированного набора данных. Объединение *L. deuterodensum* на филогенетическом дереве с кладой L. fastigiatum – L. volubile также согласуется с результатами изучения гена *rbcL* и *trnL* интрона [Wikstrцm, Kenrick, 2000b]. Кроме того, такой признак, как отсутствие слизевых каналов у этих трех видов *Lycopodium* [Øllgaard, 1987], подтверждает полученную группировку.

На филогенетическом дереве, построенном по результатам анализа комбинированного набора данных, нашли отражение отмеченные Øllgaard, [1987] родственные отношения секций Lycopodium (*L. clavatum*) и Annotina (*L. annotinum*), в то время как морфологическое сходство между видами секций Lycopodium и Obscura [Øllgaard, , 1987] не подтвердилось молекулярными данными. Необходимо также отметить, что на полученных С.П. Яцентюк филогенетических деревьях не нашла подтверждения высказываемая некоторыми систематиками необходимость выделения секции Complanata sensu Øllgaard, [1987], представленной в ее работе *L. alpinum*, в отдельный род *Diphasiastrum*.

Надежное выявление деталей эволюционных взаимосвязей видов в роде *Lycopodiella* пока невозможно. На полученных филогенетических деревьях два представителя секции Lycopodiella – *L. alopecuroides* и *L. inundata* образовали кладу, поддержанную высокими значениями бутстрепа. Группировка *L. cernua* (секция Campylostachys) и *L. lateralis* (секция Lateristachys), полученная на результирующем филогенетическом дереве, согласуется с результатами изучения морфологии спорангия. Взаимосвязи *L. caroliniana* (секция Caroliniana), полученные филогенетические деревья точно определить не позволяют. *L. caroliniana* занимает базальное положение по отношению к остальным видам *Lycopodiella* или группируется с кладой *L. alopecuroides* + *L. caroliniana*. Полученные результаты также не подтверждают необходимость выделения секций Caroliniana и Campylostachys *sensu* Øllgaard, [1987] в отдельные роды *Pseudolycopodiella* и *Palhinhaea*, как это предлагали некоторые систематики. Возможно, включение в рассмотрение новых видов *Lycopodiella* в дальнейшем позволит найти новые подходы к решению сложных вопросов систематики этого рода.

В заключение отметим, что исследования молекулярной эволюции ликоподиевых оказались успешнее, чем аналогичные исследования молекулярной эволюции моховидных и, в ряде случаев, помогли избрать наиболее достоверную из альтернативных филогенетических гипотез морфологов.

ГЕНОСИСТЕМАТИКА ПАПОРОТНИКОВИДНЫХ И ХВОЩЕЙ

Общие сведения о таксонах

Папоротниковидные (отдел Polypodiophyta) представляют вторую по численности группу наземных растений: всего их насчитывается порядка 9000 видов. Появились примитивные папоротниковидные на суше достаточно рано, скорее всего в раннем девонском периоде. Исследования палеоботаников показывают, что в их эволюционной истории наблюдались периоды как интенсивной радиации, так и столь же интенсивного вымирания сформировавшихся таксонов. В результате в ряду сопоставляемых таксонов папоротниковидных трудно отыскать промежуточные формы, что затрудняет построение филогенетических гипотез. Впрочем, это не останавливало исследователей классической школы, предлагавших все новые варианты таких гипотез. Исключением является лишь малочисленная группа хвощей, система которых кажется вполне устоявшейся. Обычно их выделяют в отдел Equisetophyta, и поэтому они заслуживают отдельной главы в книге, но пока изучены методами геносистематики слабо, и мы рассмотрим имеющиеся относительно этих растений данные вместе с результатами изучения папоротниковидных.

Первые системы папоротниковидных были основаны исключительно на результатах анализа их морфологических признаков (морфологии спорангиев, сорусов и.т.п.).

Эти системы отличаются друг от друга по ряду важных деталей. Понятно, что интересно было бы применить методы геносистематики для уточнения систем папоротниковидных, для выявления филогенетических связей их достаточно далеко дивергировавших таксонов.

Методами геносистематики отдельные группы папоротниковидных изучены в разной степени, а некоторые стали объектом исследования лишь в самое последнее время.

Папоротники и близкие к ним таксоны

Первые результаты, которые можно использовать для понимания путей эволюции папоротников, были получены методом рестрикционного анализа при изучении характера реорганизации структуры хпДНК в ходе эволюции [Stein et

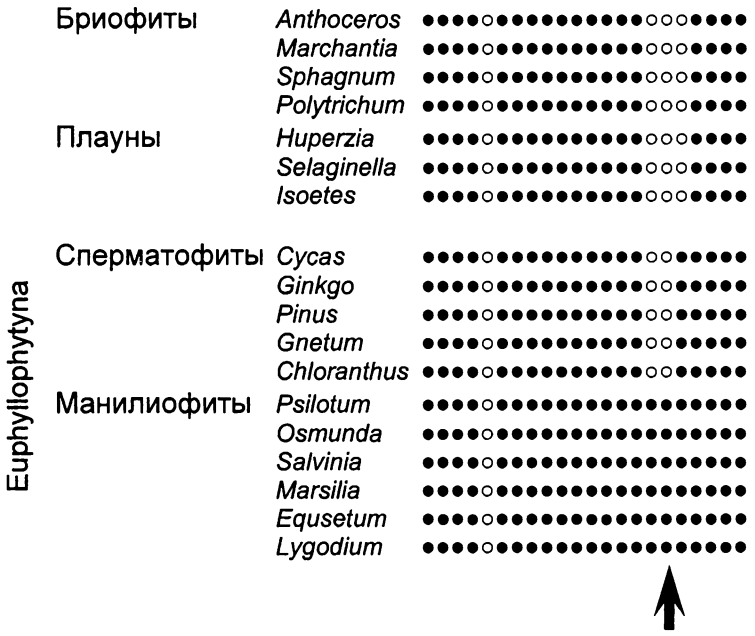


Рис. 11-1. Строение участка гена *rps4* у некоторых наземных растений

Видно, что у папоротников и хвощей в нуклеотидной последовательности гена имеется характерная вставка, отличающая генотипы этих таксонов от генотипов всех изученных семенных растений, плауновидных и моховидных. Последовательности многих других генов папоротников и хвощей также имеют аналогичные группоспецифичные индели

al., 1992; Raubeson, Jansen, 1992]. Показано, что в процессе эволюции в структуре хпДНК возникали группоспецифические характерные делеции, вставки (индели) и прочие изменения структуры ДНК, многие из которых были типичны для определенных линий эволюционного развития папоротниковидных. На рис. 11-1 приведен один из примеров таких инделей. К сожалению, число видов папортниковидных, у которых иссследована в деталях структура хпДНК, еше слишком мало для того, чтобы с уверенностью утверждать, что такие группоспецифические индели действительно маркируют ту или иную кладу папоротниковидных.

Из рис. 11-1 следует, что в хлоропластный ген *rps4* папоротниковидных в ходе эволюции высших растений произошла вставка короткой нуклеотидной последовательности. Если рассматривать структуру этого гена в пределах группы Euphyllophytina, то у семенных растений в этом месте вставки нет. Такое же отсутствие вставки наблюдается у бриофитов и плауновидных. Очевидно, вставка появилась после отделения части группы эуфилинофитин, включающей псилотов, хвощей, "типичных" папоротников и семенных растений , от общего ствола эволюции наземных растений. Событие это произошло после отделения клады плауновидных (вставки нет). Видимо, это специфическое приобретение папоротниковидных.

Таким образом, создается впечатление, что изучение эволюции хпДНК позволяет выявить синапоморфные изменения в структурах ДНК (генотипов) па-

```
  480        490        500        510        520        530
                .          .          .                  .
----GGATAG-AGGAAGAAGCGGGTCAGGAGATTGTTT--------GGAAAGTGCAT Phyllitis     Aspleniaceae     Le
-AAGGGATAG-CGGGAGAAGCGGGTTAGCAGATTGCTT--------GGAAGGTGCAT Polypodium   Polypodiaceae
-AAGGGATAG-AGGGAGAGGCGGGTTAGCAGATTGCTT--------GGAAGGTGCAT Davallia     Davalliaceae
-AGGGGATAG-AGGAAGAAGCGCCTCAGGAGATTGTTT--------GGAAAGTGCAT Athyrium     Dryopteridaceae
--AAGGATGG-ACGGAGAAGCGGTCCAGGAGATTATTT--------GGGAGGTGCAC Ceratopteris Pteridaceae
----GGATGT-ACGGAGAAGCAGTCCAAGAAAGAGATA----GTTCGGGAGGTGCAC Adiantum          "
--------GG-ACGGAGAAGCGGTCCAGGAGATTGTTC--------GGGAGGTGCAC Pteris
---AGGATAG-ACAGAGGAGCGGGTCAGGGGATTGTTC-TCTACCTGGAAGGTGCAC Dicksonia    Dicksoniaceae
----GGATAG-ACAGAGAAGCGGGTCAGGGGATTGTTC-TTTACCCGGAAGGCGCAC Pilularia    Marsileaceae
-AAGGGATGG-ACGGAGAAGCGGGTCAGGGGATTGTTC-TCTACCTGGAAGGTGCAC Cyathea      Cyatheaceae
-AAGGGATGG-ACGGAGAAGCGAGTCACGGGATTGTTT-CTTACCTGGAAGGCGCGC Azolla       Salviniaceae
-AAGGGATGG-----AAGGGCGGGTCAGAGGAATATTC-TCTGCCTGGAAGGTATAC Osmunda      Osmundaceae
AAGGGAATGG-----AAACCTGGGTCATAATAATGTTC-TCTGCCTGGAAGGTACAC Trichomanes  Hymenophyllaceae
-AAGGGATGG-----AAGGGCAAGTCAGAGGGATGTTC-TCTGCTTGGAGGG-ACAC Angiopteris  Marattiaceae      Eu
-AAGGGATGGGATGGAAGGGCAGGTCGGAGGAAGGTTC-TCTGTCTGGAAGGTGCAC Psilotum     Psilotaceae      Ps
GAAGGGATGG-----AAGGGCAGGGCATAGGAGGGTTC-TGTGCCTGGAAGGTACAC Lycopodium                    Ly
-----------------GGGCAGGGTTTCAAAGGGGTTTTTTTCCTGGAAGGGACAC Marchantia                    Br
                        <<cpITS3>>
```

Рис. 11-2. Первичная структура фрагмента последовательности ITS 3 хпДНК у некоторых папоротников
Видно, что положение инделей в последовательности хпДНК таксон-специфично

поротниковидных. В рассматриваемом случае синапоморфия – это появление последовательности из десятка нуклеотидов в гене rps4 хпДНК.

Другой пример специфических делеций или вставок был получен при сопоставлении строения ITS -3 в кластере генов хп рРНК. Видно, что для отдельных клад папоротников характерно особое строение этого участка хпДНК (рис. 11-2).

Исследования эволюции индивидуальных последовательностей ДНК (в основном, хлоропластных) в пределах этой клады высших растений ведутся давно. Начаты они были с изучения эволюции гена *rbcL* [Clegg, 1993; Hasebe et al., 1995; Manhart, 1994; Wolf et al., 1994; Pryer et al., 1995; Wolf et al., 1994; Gastony, Rollo, 1995] и 16S хп-рДНК [Manhart, 1995]. Увы, как и в случае бриофитов [см. работу Duff, Nickrent, 1998] полученные в ходе этих исследований результаты оказались во многом противоречивыми и не позволяли воссоздать в деталях пути молекулярной эволюции папоротниковидных.

Как показали позднейшие исследования [Pahnke et al., 1996; Pryer et al., 2001], сделанные в этих работах выводы были не свободны от недостатков (а, может быть, просто отражали специфику эволюции исследованных генов). Работа Панке с соавт., с нашей точки зрения, выгодно отличается от исследований, выполненных путем анализа гена *rbcL* или *16S* рРНК, так как в ней филогенетические выводы были сделаны после изучения эволюции некодирующей последовательности, и она поэтому заслуживает более подробного рассмотрения. Представленные в этой работе схемы филогенетических отношений разных групп папортниковидных представлены на рис. 11-3.

Авторы сопоставляли структуру того же участка хпДНК (ITS 2 и 3), что и в работе [Goremykin et al., 1996], и привлекали для анализа опубликованные данные по гену *rbcL*.

Прежде всего, авторы отмечают, что построенное филогенетическое дерево папоротниковидных имеет менее "звездообразный" характер, чем в случае семенных и, особенно, покрытосеменных растений [Goremykin et al., 1996]. "Звездообразный" характер дерева последних скорее всего отражает достаточно быстрое формирование основных линий их эволюционного развития за относительно короткое время эволюции в меловом периоде.

Были отмечены большие расхождения между деревьями, построенными по всем заменам в *rbcL* и по ITS 2–3. Авторы находят этому вполне разумное объяснение: для анализа филогенетической истории давно дивергировавших таксонов ген *rbcL* не подходит, так как перенасыщен заменами нуклеотидов. Если отбросить замены по третьему положению кодонов (а именно там происходит большинство синонимических, нейтральных замен), где чаще всего наблюдаются явления молекулярной конвергенции, и включить в анализ лишь замены в первом и втором положении кодонов, то данные по *rbcL* вполне сопоставимы с данными по ITS 2-3. Дерево, построенное по слитной последовательности ITS 2,3 + *rbcL* (1 и 2 положения кодонов), топологически совместимо с деревом, построенным исключительно по последовательности спейсера (см. рис. 11-4).

Что касается самого дерева, то, анализируя его топологию, можно сделать вывод о близости клад Marsileaceae, Dicksoniaceae и Cyatheaceae между собой, но не с Salviniaceae. Это может говорить об их филогенетической близости. Непосредственно от основания дерева отходят Hymenophyllaceae, Marattiaceae и Osmundaceae, что указывает на относительную древность этих филогенетических

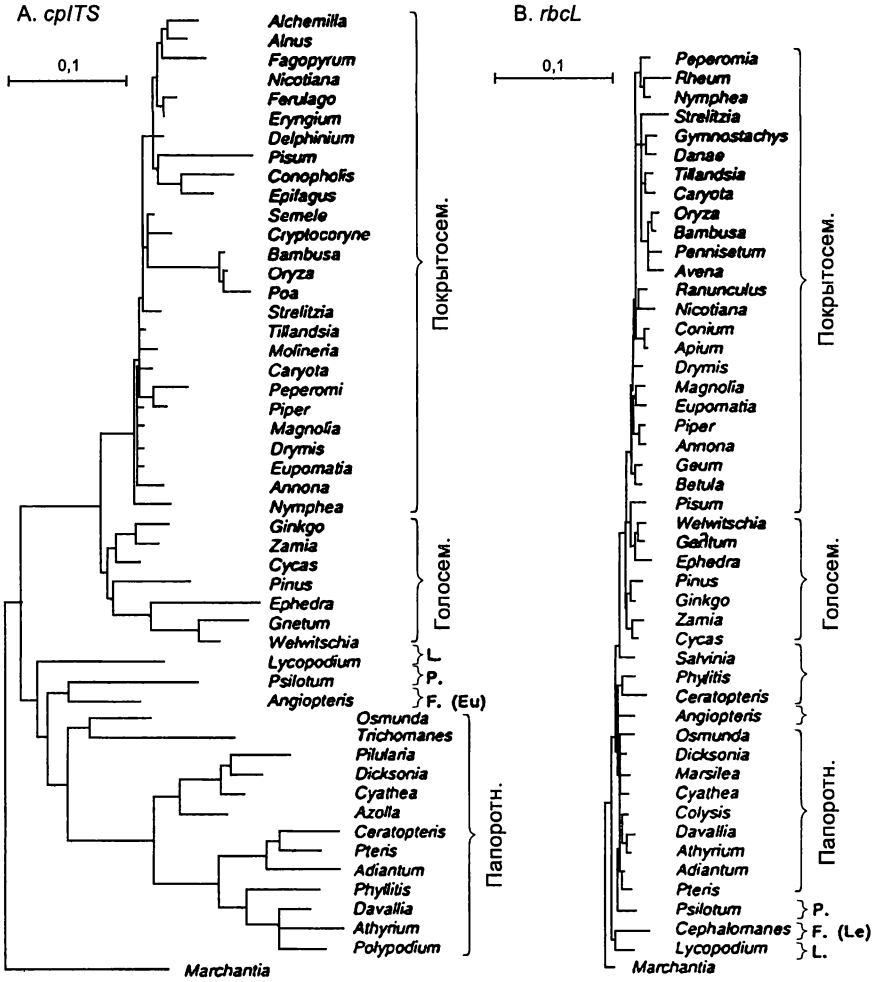


Рис. 11-3. Результаты сопоставления характера эволюции ITS хпДНК (А) и гена *rbcL* (В)
Дерево А обладает лучшим разрешением, чем Б. Видно, что темпы накопления изменений в первичной структуре двух сопоставляемых последовательностей во времени были существенно различными. В случае покрытосеменных наблюдается особенно быстрое формирование таксонов

линий. Сомнения вызывает относительное положение *Psilotum*, *Angiopteris*, *Osmunda* и *Trichomanes*, которое предполагалось уточнить путем более широкого исследования древних таксонов. В кладе папоротников видно четкое разделение на эуспорангиатных и лептоспорангиатных папоротников и отношение разных в этих кладах таксонов друг к другу.

Об исследовании эволюции гена *atpB* папортниковидных сообщается в работе Вольфа [Wolf, 1997]. По набору изученных видов работа эта в значительной степени дублирует работу Панке с соавт. и отличается удачным выбором зонда.

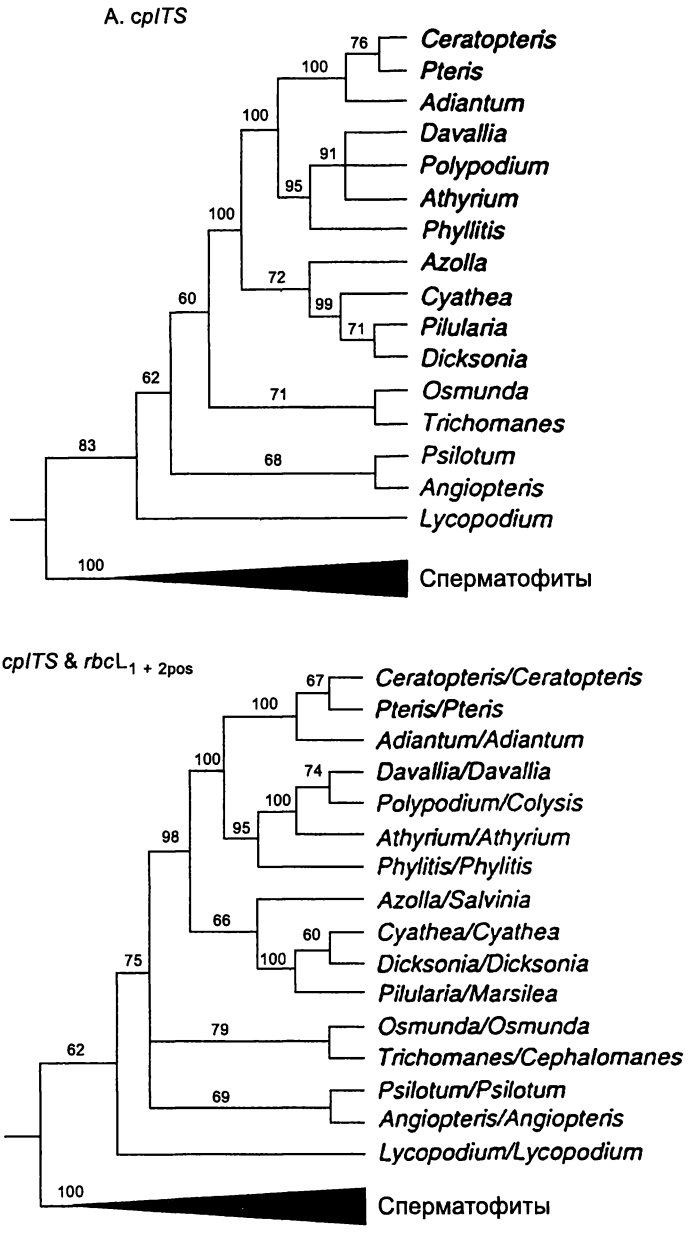


Рис. 11-4. Схема, иллюстрирующая преимущества анализа некодирующих последовательностей ДНК по сравнению с кодирующими

На рис. 11-4 (А) дана схема эволюционных отношений, следующих из анализа спейсерной последовательности хп ДНК. Если из последовательности *rbcL* исключить третьи положения кодонов и построить слитную последовательность ITS+*rbcL* (В), то ее топология будет практически идентичной топологии, построенной на основании изучения одного спейсера

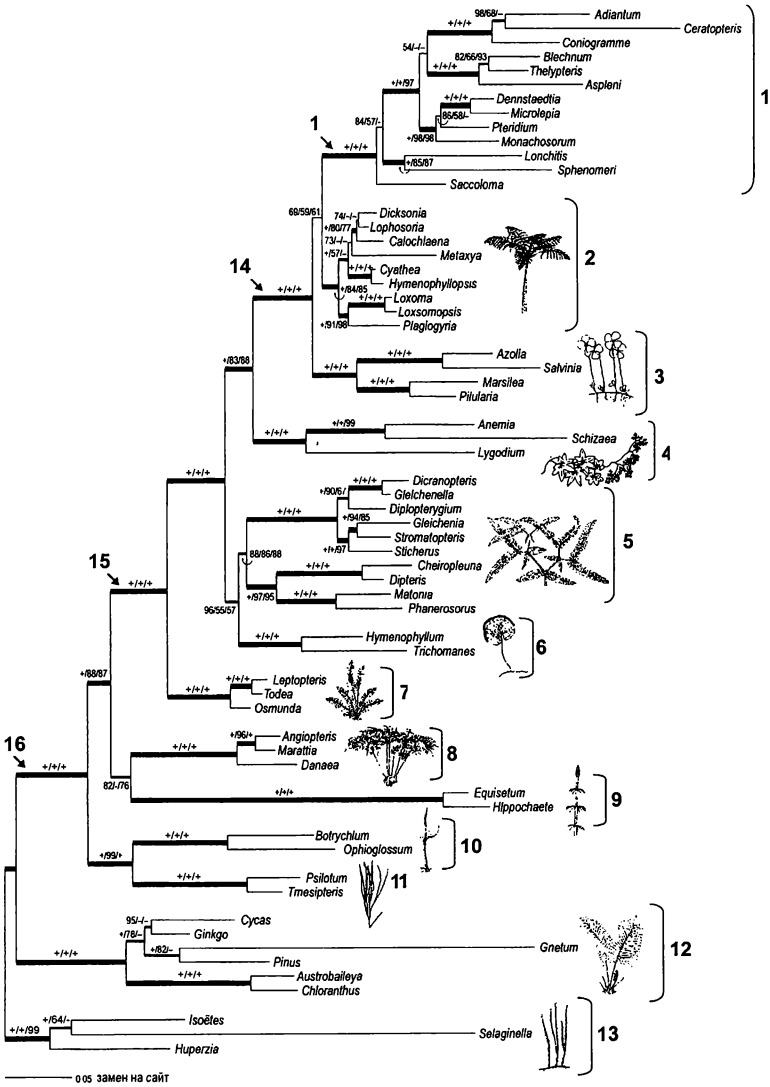


Рис. 11-5. Схема, иллюстрирующая филогенетические связи разнообразных монилиофитов и сестринских к ним таксонов

Дерево построено Байесовым методом по результатам изучения эволюции последовательностей четырех генов (*rbcL*, *atpB*, *rps4* и nuc 18S rDNA). Крестиками обозначены ветви с высокой (100%) статистической поддержкой. В иных случаях указываются поддержки, вычисленные по методу Байеса, ML- MP- индексы бутстрепа. Знаком (-) обозначены поддержки менее 50%. Толстые ветви соответствуют максимальным поддержкам по всем трем параметрам. Из [Pryer et al., 2004]

1 – полиподиопсиды; 2 – древовидные папоротники; 3 – разноспоровые папоротники; 4 – схезейные; 5 – глейхениевые; 6 – гименофилловые; 7 – осмундовые; 8 – марратиопсиды; 9 – хвощи; 10 – ужовниковые; 11 – псилотовидные; 12? – семенные растения; 12? – плауновидные; 13 – клада полиподиопсид; 14 – «коровые» лептоспорангиевые; 15 – лептоспорангиевые папоротники; 16 – монилиофиты (папоротниковидные)

Проведенный анализ показал, что полученные данные могут быть использованы для кладистического анализа эволюции птеридофитов. В ней построены филогенетические деревья как по гену *atpB*, так и по сумме данных по *atpB+rbcL*. На обоих деревьях базальное положение среди папортниковидных занимает *Angiopteris*, что говорит о древности этой группы. Создается впечатление, что молекулярная эволюция видов из этой клады шла медленнее, чем в других кладах папоротников. Известно, что это находит подтверждение и в результатах изучения морфологии у видов из этой группы папоротников. Все это позволяет предположить возможность существования «молекулярных живых ископаемых» среди папоротников [P. Soltis et al., 2002]. Далее от ствола дерева отходит группа, включающая *Psilotum*, и.т.д.

К недостаткам этой работы сам П. Вольф относит то обстоятельство, что гены *atpB* и *rbcL* расположены в хпДНК бок о бок, и процессы их эволюции скорее всего тесно взаимосвязаны, что, по его мнению, уменьшает ценность этих генов для филогенетического анализа.

В кратком сообщении Ранкера с соавт. обсуждаются результаты изучения семейств Polypodiaceae и Grammitidaceae путем сравнительного анализа гена *rbcL*. По их данным, Grammitidaceae монофилетичны, а Polypodiaceae парафилетичны. Последние четко распадаются на группы видов Старого и Нового Света, что еще раз говорит о перспективности использования методов геносистематики в географии растений. Среди изученных родов отмечены как монофилетические, так и парафилетические таксоны [Ranker et al., 1997].

Обзор этих ранних работ, сделанный Вольфом с соавт. [Wolf et al., 1998], подводит предварительные итоги исследования эволюции папоротниковидных.

Недавно появились работы [Pryer et al., 2001, 2004], в которых филогенетические суждения делаются на основании изучения эволюции сразу нескольких генов (*rbcL*, *atpB*, *rps4* и *SSU* rDNA) с учетом данных по морфологии этих растений, что делает выводы этих работ наиболее достоверными по сравнению с ранее выполненными исследованиями. В целом они не противоречат заключениям, сделанным в работе Pahnke et al. [1996], и подтверждают, что ближайшими родственниками семенных растений являются папоротники и хвощи (рис. 11-5). Вероятная филогения последних, вытекающая из анализа эволюции гена *rps4* и прилегающих некодирующих участков хпДНК, обсуждается в работе [Guillon, 2004].

Возвращаясь к рис. 11-4 видим, что первыми от общего ствола монилиофитов отделились наиболее примитивные по морфологии группы – псилотовидные и ужовниковые. На следующем этапе дивергенции разделились клады, включающие марратиопсиды, хвощи и клада, включающая все прочие лептоспорангиевые папоротники. Ход дальнейшей эволюции ясен из рисунка. Из числа наиболее просто устроенных монилиофитов молекулярными методами лучше всего изучены хвощи.

Хвощи

Ископаемые остатки растений, сходные с современными хвощами, известны с позднего девонского периода. Наибольшего расцвета эта группа достиг-

ла в каменноугольном периоде и была представлена как древесными, так и травянистыми видами, но уже с кайнозоя все известные ископаемые хвощи – травы.

Морфология травянистых хвощей в ходе эволюции изменялась настолько незначительно, что было даже предложено считать род *Equisetum* – древнейшим среди родов сосудистых растений на Земле [Arnold, 1947].

По комплексу морфологических признаков род *Equisetum* обычно подразделяют на два подрода, *Equisetum* и *Hippochaete*.

Проверку всех этих представлений осуществил недавно J-M. Guillton [2004]. Полученные им молекулярные данные практически полностью подтвердили представления морфологов. Об их достоверности говорит тот факт, что топологии деревьев, построенных разными методами (MP, ML и Байесовым методом), очень сходны или даже идентичны.

В этих опытах получили подтверждение представления ботаников о подразделении рода на два подрода. Удалось выявить взаимоотношения видов в их пределах. Они оказались не совсем такими, как представлялось морфологам. Впрочем, этим расхождениям не следует придавать большого значения, так как речь идет о молекулярном исследовании, выполненном по результатам изучения эволюции всего одного гена.

Единственное существенное расхождение молекулярных и морфологических данных заключается в том, что по данным геносистематики базальное положение на деревьях занимает *E. bogotense*, а не *E. giganteum*. Анализ всех этих расхождений позволил уточнить таксономический вес признаков, используемых в систематике хвощей.

Полученные в этой работе молекулярные данные не совсем согласуются с результатами еще одного молекулярного исследования филогении хвощей [DeMarais et al., 2003]. В этой работе филогенетические выводы делаются на основании изучения эволюции двух генов, *rbcL* и *trn L-F*.

В частности, различия касаются базального положения *E. bogotense*. Если на MP-деревьях он занимал то же положение, что и в работе J-M. Guillon, то при ML-способе реконструкции он выступал в роли сестринской группы к подроду Hippochaete.

К сожалению, исследования молекулярной эволюции ядерных генов хвощей практически не проводились, за исключением спейсеров генов рРНК. Результаты этих исследований согласуются с приведенными выше данными.

Таким образом, использование методов генсистематики позволяют в какой-то мере уточнить систему монилиофитов (папоротниковидных) и выбрать из сосуществующих филогенетических гипотез наиболее вероятную.

ГЕНОСИСТЕМАТИКА СЕМЕННЫХ РАСТЕНИЙ

О происхождении семенных растений

Семенные растения сегодня являются наиболее заметным и массовым компонентом флоры Земли. Они представлены голо- и покрытосеменными растениями и являются, по мнению многих, сестринской группой папоротникам, с которыми они имели в прошлом общего предка.

Согласно данным палеоботаники, из числа семенных прежде всего на Земле появились голосеменные растения [Мейен, 1987; Красилов, 1989; Crane et al., 2004]. Их ископаемые останки находят в отложениях девона. Лишь в меловом периоде началось взрывообразное становление основных таксонов покрытосеменных растений [Crepet et al., 2004].

Возможно, первые покрытосеменные существовали в воде. Это вывод был сделан на основании исследования раннемелового ископаемого (скорее всего, водного вида) *Arahaefructus* sp., оказавшегося (по морфологии) сестринским по отношению ко всем покрытосеменным, в том числе нимфейным и амборелле [Gandolfo et al., 2004].

Ископаемые останки предположительно покрытосеменных, по мнению некоторых ботаников, присутствуют и в отложениях юрского периода [Crepet, 1998].

Почему же мы не находим покрытосеменных в более древних слоях? По этому вопросу представления геносистематиков и морфологов существенно расходятся: геносистематики считают покрытосеменные более древней группой, чем это представляется морфологам. Одним из возможных объяснений может быть такое: морфология **генетических** предков покрытосеменных настолько существенно отличалась от современных форм, что мы просто не отличаем их среди ископаемых останков семенных растений. Нам **кажется**, что долгое время на Земле доминировали только голосеменные растения. Эту ситуацию хорошо иллюстрирует рис. 12-1.

Этот кажущийся временной разрыв в появлении на Земле голо- и покрытосеменных индуцировал возникновение многочисленных гипотез, согласно которым покрытосеменные имеют с какой-то группой рецентных голосеменных или даже плауновидных (см., например, [Курбатский, 1993]) общего предка. Сегодня на этот счет сосуществуют, по крайней мере, четыре гипотезы [Burleigh, Mathews, 2004] (рис. 12-1). На эту роль претендовали в разное время и у разных авторов практически все группы современных голосеменных и лишь немногие искали их среди вымерших таксонов голосеменных. Дискуссия на эту тему среди ботаников продолжается многие годы, но так и не позволила однозначно решить этот вопрос.

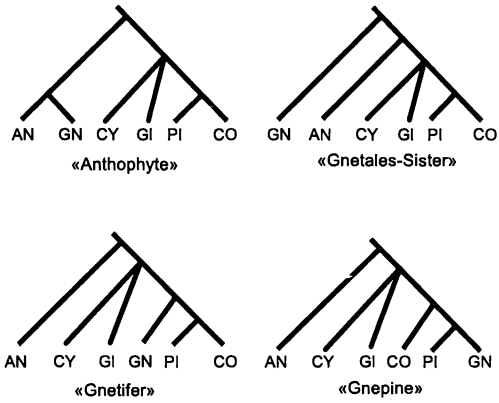


Рис. 12-1. Четыре схемы, иллюстрирующие возможные филогенетические связи голо- и покрытосеменных растений

На схеме приняты следующие обозначения: AN – покрытосеменные, CY – цикасовые, GI – Ginkgo, GN – гнетовые, PI – Pinaceae, CO – другие хвойные (не – Pinaceae). Соответствующие гипотезы названы как в оригинале. Из [Burleigh, Mathews, 2004]

С.В. Мейен писал, что разнобой взглядов по этому поводу потрясает гораздо больше, чем любой из выводов относительно возможных эволюционных предков покрытосеменных. В этой роли уже перебывали практически все основные группы высших растений и даже красные водоросли.

В последнее время наибольшей популярностью (среди прочих) стала пользоваться гипотеза, согласно которой таким таксоном среди рецентных голосеменных являются гнетовые (см. рис. 12-1).

Но, как справедливо отмечал С. В. Мейен, наши нынешние взгляды – не вершина научной мысли, а преходящий этап, пройдут годы, и самые прочные убеждения могут подвергнуться сомнению, будут отброшены и забыты. И чем сложнее проблема, тем меньше шансов у господствующих взглядов удержаться надолго и тем более навсегда.

Все это в полной мере относится и к гипотезам относительно эволюционного прошлого покрытосеменных растений. В этой связи уместно вспомнить парадокс, автором которого является один из выдающихся палеонтологов современности – О. Шиндевольф. Будучи сторонником представлений о важнейшей роли макромутаций в эволюции, он считал, что «первая птица вылетела из яйца рептилии». Не так ли первые покрытосеменные появились в результате серии макромутаций у их голосеменного (или праголосеменного) предка ? Не может ли эволюция покрытосеменных быть описана в терминах широко известной гипотезы прерываемого равновесия Н. Олдриджа и С. Гоулда ?

Впрочем, перейдем от гипотез к фактам. Рассмотрим, как развивались исследования молекулярной эволюции семенных растений.

Эволюция генотипов семенных растений

Первые эксперименты в области геносистематики растений были выполнены в России под руководством А.Н. Белозерского в конце 50-х годов. XX в. В Институте биохимии им А.Н. Баха АН СССР С. О. Урысон и на кафедре биохимии растений МГУ Б.Ф. Ванюшиным был проведены первые сравнительные

определения состава ДНК голо- и покрытосеменных растений, а Г. П. Серенковым и М.В. Пахомовой – водорослей. В последующие годы эти исследования были расширены, и в них принимали участие студенты, аспиранты и сотрудники кафедры: Н. С. Владычанская, Н. А. Кокурина, А. Г. Слюсаренко, Е. И. Маринова и др. Итоги были подведены в 1972 г. [Антонов и др., 1972].

Целью этих экспериментов было определение состава ДНК, пределов его варьирования у растений и сопоставление с таковым у животных, грибов и микроорганизмов. Было выяснено, что состав изменяется в существенно более узких пределах, чем у бактерий, особенно у семенных растений, и специфичность организации генетического материала реализуется, видимо, на уровне нуклеотидной последовательности [Белозерский, 1959].

О значимости этих работ говорило приглашение выступить с докладом на 11-м Сольвейевском конгрессе (1959) и 5-м МБК [Белозерский, 1976].

В начале 1960-х годов, когда этот цикл работ под руководством А. Н. Белозерского был завершен определением пределов варьирования состава ДНК у позвоночных и беспозвоночных животных [Антонов, Белозерский, 1961], стало возможно (с привлечением полученных к тому времени данных других авторов, например, данных Ф. Арриджи (США), изучившей состав ДНК у нескольких десятков видов млекопитающих) сопоставить пределы варьирования состава ДНК у покрытосеменных растений и у таксона приблизительно того же (как тогда считалось) «эволюционного возраста» млекопитающих. Было показано, что они сильно различаются, что не согласовывалось с модной в то время «гипотезой молекулярных часов эволюции». Это был, пожалуй, один из самых важных выводов, сделанных в то время из результатов сравнительных исследований состава ДНК высших эукариот. Было высказано предположение, что генотипы растений эволюционировали с повышенной скоростью [Маринова и др., 1969 а,б; Antonov, 1971].

В начале 1960-х гг. в институте Карнеги в Вашингтоне (США) был разработан метод гибридизации ДНК микроорганизмов, который в 1964 г. был адаптирован для изучения сходства в строении ДНК эукариот. Отечественные геносистематики растений немедленно стали использовать разные варианты этого метода для изучения сходств и различий в ДНК растений. Первые же опыты подтвердили вывод о высоких темпах их эволюции.

Так начиналась геносистематика растений. В то время геносистематики еще не претендовали на описание всей «картины мира» растений. Тем не менее, полученные геносистематиками результаты сразу привлекли внимание ботаников.

В 70-х годах XX в. А. Кронквист рассмотрел результаты, полученные молекулярными биологами, пытавшимися сформировать собственную систему взглядов на проблему происхождения покрытосеменных [Cronquist, 1976]. Он подверг весьма обоснованной критике результаты сопоставления аминокислотных последовательностей белков [Boulter et al., 1972]. В то время считалось, что таким путем можно подойти к разгадке проблемы происхождения основных таксонов семенных растений. К сожалению, на этом пути много сложностей и позже об ограниченности возможностей, открываемых путем сиквенса белков, писал К. Бремер [K. Bremer, 1988].

Так или иначе, но переход от определения состава семантид к определению их первичных структур (например, аминокислотных последовательностей) знаменовал важный этап в развити геносистематики.

На основе полученных результатов Д. Боултер и его коллеги попытались реконструировать филогению растений. Они пришли к парадоксальному выводу: оказалось, что покрытосеменные гораздо древнее, чем это предполагали палеоботаники. По предварительным расчетам, их эволюционный возраст превышал 400 млн лет.

В критике этих работ А. Кронквист был во многом прав: действительно, при определении последовательностей белков (как и любых других семантид) могли быть допущены ошибки (последующие исследования показали, что так оно и есть: см., например [D. Soltis et al., 1997a]. Верно, что для оценки времени возникновения таксона, руководствуясь гипотезой "молекулярных часов", которая сама не лишена недостатков, некорректно использовать данные о темпах эволюции этого же белка, полученные при изучении совсем другой группы организмов (грибов): они могут существенно различаться. Число изученных видов было невелико. Возможности компьютерных методов построения филогенетических деревьев были тогда ограничены.

В общем, результаты, полученные в этих исследованиях, носили, конечно же, предварительный характер.

И все же парадоксальный результат, полученный Д. Боултером и его коллегами, заставил еще раз задуматься над проблемой происхождения покрытосеменных.

Сразу отметим, что основной вывод исследований Д. Боултера и его коллег в дальнейшем неоднократно получал подтверждения.

Из несравненно более надежных данных, полученных в основном методами геномики пластид [Goremykin et al., 1997, 2003a,b, 2004], следует, что два главных таксона семенных растений, голо- и покрытосеменные, видимо действительно дивергировали около 350 млн лет тому назад, что вполне согласуется с предварительными оценками, данными еще в работе Г. Рахимовой с соавт. [1989].

Незначительно различающиеся оценки времени их дивергенции приведены в работе П. Кенрика [Kenrick, 1999] и в недавно опубликованной работе М. Донахью и Дж. Дойла [Donaghue, Doyle, 2000].

Несмотря на эти совпадения, отношение к этим оценкам все же должно быть осторожным, тем более что существенно отличающиеся датировки этого события содержатся в работе П.Солтис с соавт. [P. Soltis et al. 2002], В. Крепет с соавт. [Crepet et al., 2004] и ряде других работ. Подробно этот вопрос рассматривается в недавно опубликованном обзоре [Sanderson et al., 2004].

На каких же фактах основан сегодня оптимизм поклонников ранней дивергенции голо- и покрытосеменных ?

Дело в том, **что обоснованность вывода о древней дивергенции клад голо- и покрытосеменных подтверждают вполне независимыые от датировок молекулярные данные.** При сопоставлении топологии построенных молекулярных деревьев становится ясно, что дивергенция этих двух клад произошла до того, как стали формироваться **рецентные** классы голосеменных [Рахимова и др., 1989; Troitsky et al., 1991; Hasebe et al., 1992 aa, б] (рис. 12-2). Эти выводы находят поддержку и в результатах исследований белков методами иммунохимии (см., например, [Семихов и др., 2004]). Но не могли ли в этой роли выступать вымершие таксоны голосеменных? В пользу этого предположения говорит ряд недавно опубликованных работ [Соколов, Тимонин, 2006; Taylor et al., 1994].

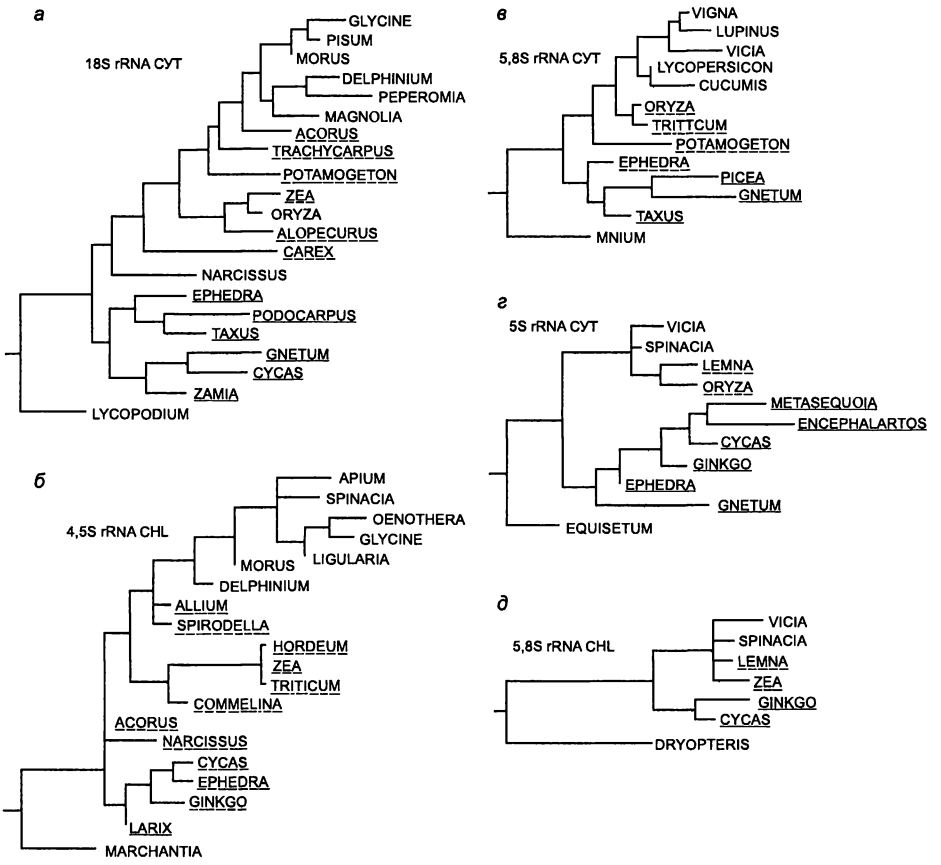


Рис. 12-2. Филогенетические деревья из работы Г. Рахимовой с соавт. [1989]
В этой работе на основании молекулярных данных впервые сделан вывод о монофилии голо- и покрытосеменных и ранней дивергенции этих двух линий эволюционного развития семенных растений

Рассмотрим теперь более подробно события молекулярной эволюции семенных растений. Во-первых, что же сегодня нам известно о путях эволюции генотипов голосеменных растений ?

Молекулярная эволюция голосеменных растений

Переломным рубежом в геносистематике голосеменных, да и всех других высших растений, стали 1980–1990 гг., когда были опубликованы работы, в которых для изучения покрыто- и голосеменных растений были впервые в широком масштабе использованы данные об эволюции отдельных нуклеотидных

последовательностей некоторых участков ядерных геномов и пластомов [Jansen, Palmer, 1987; Рахимова и др., 1989; Wolfe et al., 1989; Martin et al., 1989; Zimmer et al., 1989, Troitsky et al., 1991]. Они были выполнены в развитие публикаций [Stocklein et al., 1983; P. Martin et al., 1985; Hori et al., 1985; Боброва и др., 1987; Niesbach–Klosgen et al., 1987], в которых были проанализированы структуры небольшого числа генов фермента халкон-синтетазы у ряда видов растений и сопоставлены частичные структуры 18S рРНК, низкомолекулярных рРНК (5S, 4,5S и др.) и некоторых белков. Результаты всех этих исследований стали важным дополнением и своего рода контролем результатов, полученных параллельно методом RFLP.

Последующие работы П. Мартина с соавт. и А. В. Троицкого с соавт. существенно углубили наши знания об эволюции генотипов голо- и покрытосеменных растений: филогенетические выводы в них были сделаны на основании сопоставления филогенетических деревьев, полученных не для одного, а путем компиляции данных, полученных сразу для нескольких типов семантид. Эти работы явились предтечей современных исследований слитных последовательностей. Такой подход увеличивал достоверность выводов, в чем вскоре имели возможность убедиться геносистематики.

Вот, в частности, какой логике следовали в своей работе А.В. Троицкий и его коллеги. Они применили способ визуального сопоставления топологий молекулярных деревьев, построенных на основании изучения эволюции структуры нескольких разных типов рРНК, ядерных и хлоропластных. Сами по себе, взятые по отдельности, эти деревья были малоинформативны, так как для их построения в каждом случае было использовано по малому числу видов, но в их топологиях удалось обнаружить сходства (рис. 12-2).

Из этих сопоставлений следовал ряд важных выводов. Во-первых, можно было предположить, что голо- и покрытосеменные монофилетичны, и, во-вторых, что покрытосеменные – это древняя группа семенных растений, гораздо более древняя, чем это следовало из данных палеонтологии. Последний вывод сегодня кажется поспешным. Более детально эти и другие, более поздние данные, мы обсудим ниже.

Появление такого рода работ вызвало и взрывообразный рост числа публикаций по молекулярной филогенетике семенных растений вообще и голосеменных в частности. Они наконец-то пробудили интерес у ботаников классической школы. К тому же параллельно для тех же целей стали активно использовать иммунохимические методы анализа белков, еще более интенсивно стал применяться рестрикционный анализ хпДНК (метод RFLP и производные от него: см., например, [Davis, 1995]), а впоследствии и частичный или полный сиквенс хпДНК.

К сожалению, в большей части первых работ по секвенированию приводятся результаты изучения эволюции всего одного, реже двух-трех генов, что явно недостаточно для обоснованных филогенетических заключений (см. [Bowe, DePamphilis, 1998; Porter, Johnson, 1998; Alverson et al., 1998, 1999]). В этих работах речь идет об эволюции генов, а не генотипов, а уж тем более не организмов, и все же результаты исследований в целом ряде случаев являлись как основанием для предложений по пересмотру филогений и систем изучаемых таксонов, так и критического рассмотрения результатов таких исследований [Buckler et al., 1997 a, b].

Количество «филогенетически значимых» (т.е. учитываемых при реконструкции деревьев) нуклеотидов в таких последовательностях обычно не превышает

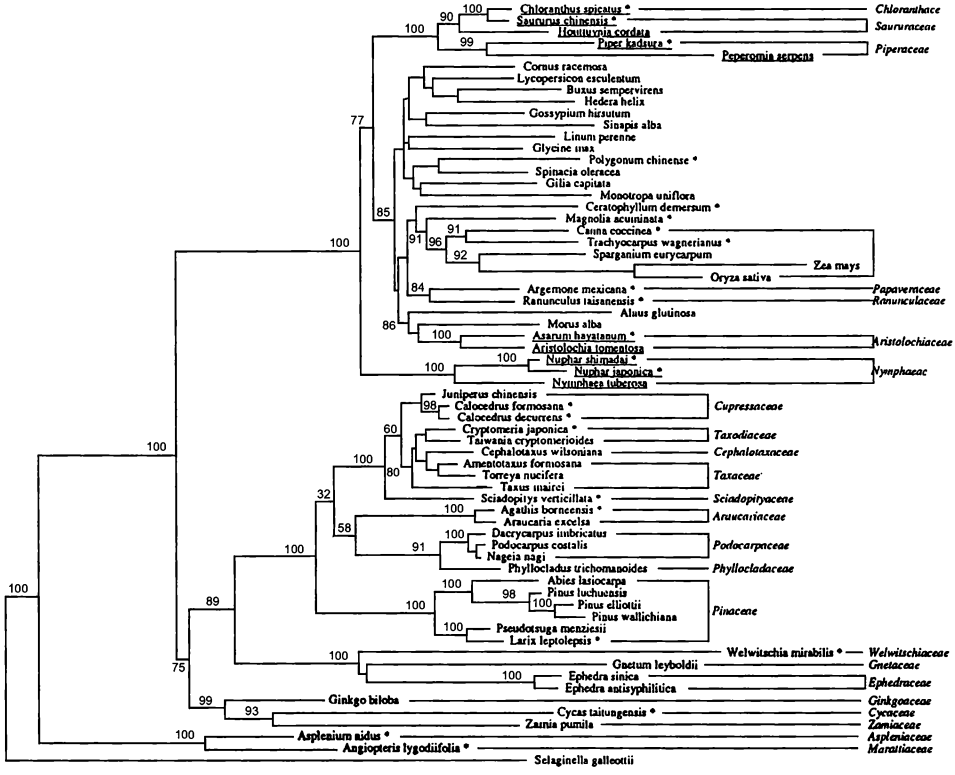


Рис. 12-3. Выводы работы Г. Рахимовой с соавт. спустя год получили продтверждение в работе С.Чоу с соавт. [Chaw et al., 2000], отсеквенировавших полные нуклеотидные последовательности гена 18S рРНК у многих видов голо- и покрытосеменных растений

первых сотен. Понятно, что при анализе больших выборок (а к этому стремятся исследователи, изучавшие эволюцию индивидуальных последовательностей ДНК) на каждый узел реконструируемого дерева может просто не хватать филогенетически значимых замен, выступающих в роли синапоморфий, даже при условии их равномерного распределения по всем узлам. На самом деле они должны распределяться случайным образом.

Прошло всего несколько лет, и стало ясно, что достоверность таких предложений, сделанных по результатам сопоставления отдельных нуклеотидных последовательностей, невелика (а некоторые из них носили прямо-таки революционный характер, что вызывало негативную реакцию ботаников классической школы).

Не отрицая ценности такого рода данных для понимания закономерностей молекулярной эволюции, попытки анализа филогенеза фенотипов растений на основании столь скудной информации об эволюции их генотипов нужно считать сугубо предварительными и недостаточно обоснованными. В то же время, цен-

ность этих наблюдений (по мере накопления данных об особенностях эволюции все новых генов) со временем будет возрастать.

В результате всех этих исследований генотипов был все же сделан ряд существенных выводов, имеющих самое непосредственное отношение к систематике и филогенетике семенных растений. Во-первых, были получены молекулярные данные, говорящие о том, что и голосеменные, и покрытосеменные растения **монофилетичны**, т.е. действительно формируют естественные таксоны. При этом ни один из ныне существующих классов голосеменных, включая гнетовые, не мог претендовать на роль сестринской группы по отношению к покрытосеменным [Bobrova et al., 1987; Рахимова и др., 1989; Troitsky et al., 1991]. Эти результаты были подтверждены на основании изучения эволюции генов *rbcL* [Hasebe et al., 1992a], 25S рРНК [Suhua et al., 1993; Shi et al., 1994], *rps4* [Nadot et al., 1994, 1995 б], генов фитохромов [Schmidt, Schneider–Poetsch ., 2002], интрона гена *nad1* [Gugerli et al., 2001] и целых комплексов генов [Rydin et al., 2002]. Кроме того, анализ полных первичных структур хпДНК некоторых голо- и покрытосеменных, выполненный в ряде работ, выявил **качественную разницу** в наборе образующих их генов. Так, в хпДНК всех изученных на сегодня покрытосеменных не найдено генов *chlB*, *chlL*, *chlN*, *psaM* и *ycf12*, типичных для хпДНК сосны [Goremykin et al., 2003a]. Если в ходе дальнейших анализов это наблюдение будет подтверждено, то такие различия в наборе генов хпДНК могут оказаться важным молекулярным признаком, различающим голо- и покрытосеменные растения.

Вывод о том, что голо- и покрытосеменные монофилетичны, мог быть сделан и ранее, на основании работы [Hori et al., 1985], но в ней при построении дерева был использован простой кластерный метод, что делало такой вывод недостаточно надежным.

Результаты анализов, выполненных методами двойной иммунодиффузии, иммуноферментным методом или путем аминокислотного анализа белков в целом неплохо согласовывались с такими представлениями, но достоверность заключений, сделанных на основании таких сопоставлений белков отдаленных таксонов (см., например, [Семихов и др., 2004]), по ряду причин оставляет желать лучшего.

Впрочем, некоторые авторы высказывали и иные точки зрения (обзор: [Doyle J. A., 1998 a]), согласно которым ближе всех к покрытосеменным растениям из голосеменных оказываются гнетовые. В последние годы наиболее активным пропонентом этой гипотезы (антофитной) был американский эмбриолог У. Фридман.

Путь к решению этих противоречий скорее всего был намечен лишь в 1996–1997 гг., когда появились работы [Goremykin et al., 1996;Chaw et al., 1997], и др., в которых авторы указывали на ряд существенных недостатков в работах оппонентов молекулярной гипотезы о монофилии голо- и покрытосеменных. Тем не менее, на сегодня проблемы молекулярной эволюции этих групп все же окончательно не решены [Rydin et al., 2002], хотя новейшие открытия как палеоботаников, так и молекулярных биологов все более определенно говорят в пользу монофилии этих таксонов [Crepet, 1998; Samigullin et al., 1999; Bowe et al., 2000; Qiu et al., 1999, Frohlich, 1999; Barkman et al., 2000; Schmidt, Schneider–Poetsch, 2002; Rydin et al., 2002]. Исследования эволюции гена митохондриальной 19S рРНК также говорят в пользу монофилии голо- и покрытосеменных [Duff, Nickrent, 1999].

Окончательные выводы делать сегодня все же еще рано. Ведь об эволюции таксонов семенных растений большинство из перечисленных выше авторов судят по результатам изучения ничтожно малых участков геномов растений. Несравненно более надежные результаты может дать лишь структурная геномика растений (structural genomics) [Свердлов, 1999]. Именно о таких исследованиях мечтал Ф. Добржанский (см. раздел "Геносистематика и феносистематика"). Работа в этом направлении только начинается, но даже первые результаты [Graham, Olmstead, 2000] и, в особенности планы геносистематиков, обнадеживают.

Приведем примеры. В Японии давно приступили к осуществлению проекта по полному сиквенсу генома *Cryptomeria japonica* [Kusumi et al., 2000]. В США недавно группой ученых был получен крупный грант в несколько миллионов долларов, по заявленной программе которого предполагается в ближайшее время завершить определение полных первичных структур хпДНК около сотни видов голо- и покрытосеменных. Когда этот проект будет завершен, видимо, можно будет точнее датировать время дивергенции голо- и покрытосеменных. В этой работе с американцами успешно конкурирует и ряд европейских, японских и других лабораторий (см., например, [Goremykin, 2003 a,b; 2004; Nishiyama et al., 2004]).

Как уже упоминалось выше, исследования по геносистематике голосеменных начались в конце 1980-х гг. [Troitsky et al., 1991; Hasebe et al, 1992a,b; Suhua et al., 1993, Shi et al., 1994], но в этих первых работах изучалось небольшое число видов, и они содержали мало интересной для ботаников информации. Поэтому рассмотрение взаимосвязей разных таксонов голосеменных целесообразно вести начиная с работы [Chaw et al., 1997], в которой было сопоставлено строение генов 18S рРНК у многих видов растений (рис. 12-3).

В более поздних исследованиях геносистематики голосеменных перешли от развернутого анализа эволюции индивидуальных генов (см., например, [Chaw et al., 2000]) к анализу их комплексов [Barkman et al., 2000; Rydin et al., 2002]. Такой подход несколько повысил надежность филогенетических выводов (рис.12-4).

По мнению многих ботаников классической школы класс голосеменных следует подразделять на четыре порядка: Coniferales, Cycadales, Ginkgoales и Gnetales. Эволюционные связи между ними ботаниками классической школы до сих пор твердо не установлены. Одни исследователи (L. Parenti, P. Crane, J. Doyle, M. Donoghue, C. Page) склонны сближать Coniferales с Ginkgoales. Их точку зрения оспаривали H. Loconte и D. Stevenson.

L. Savard, опираясь на результаты первых исследований хлоропластных и ядерных последовательностей ДНК, предположил, что среди голосеменных растений первой отделилась клада, включающая Coniferales и Cycadales [Savard et al., 1994].

Сопоставив строение генов 18S рДНК, S.-M. Chaw с соавт. [1997] пришли к выводу, что среди голосеменных можно выделить три клады, Cycadales + + Ginkgoales, Gnetales и Coniferales. В отличие от L. Savard, они предположили, что в ходе эволюции в первую очередь разделились ветви, ведущие к Cycadales + Ginkgoales и Gnetales + Coniferales. Исследования эволюции спейсеров хпДНК (ITS 2, 3 и 4), генов 28S рРНК и митохондриального гена *coxI* подтверждают эту гипотезу [Goremykin et al., 1996; Stefanovic et al., 1998; Bowe, Depamphilis, 1998]. Анализ по четырем генам также говорит в пользу таких представлений [Rydin et

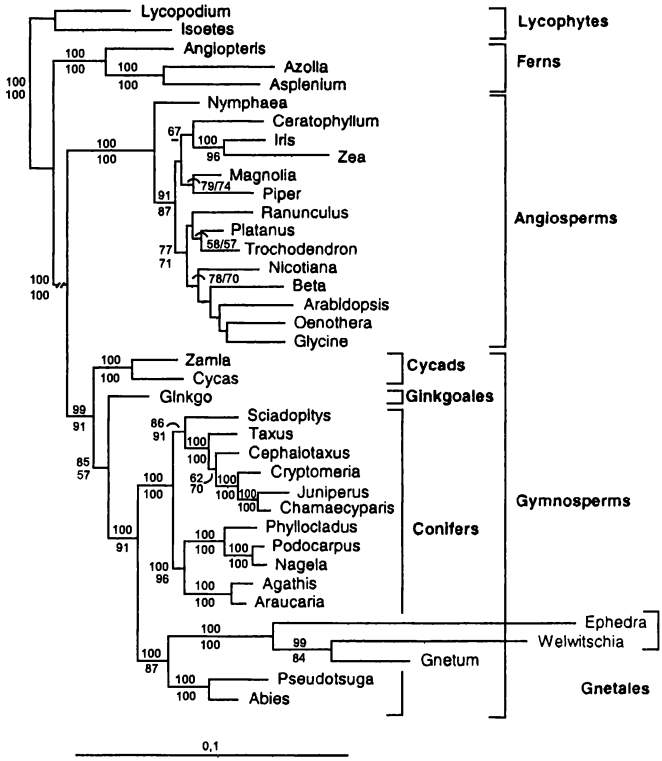


Рис. 12-4. Одно из последних молекулярно-филогенетических деревьев, иллюстрирующих близость гнетовых и хвойных

al., 2002]. Последние молекулярные данные говорят о близости цикадовых и гинкговых и относительной удаленности их от клады, включающей хвойных и гнетовых (рис. 12-4).

Отметим, что датировка событий дивергенции на основании молекулярных и морфологических данных нередко существенно не совпадает. Иллюстрацией могут служить результаты изучения рода *Ephedra*.

Изучение ископаемой «эфедроидной» пыльцы привело некоторых ботаников к выводу о большой древности этого рода. Отделение его от ствола голосеменных они относили к ранней юре (≈ 200 млн лет тому назад). Оценка глубины молекулярной дивергенции видов рода показала, что она несравненно ниже ожидаемой и соответствует «эволюционному возрасту» рода всего в 8–2 млн лет [Huang, Price, 2003].

При сопоставлении структур хпДНК гнетовых и хвойных получены разнообразные данные, указывающие на их родство. Оказалось, что ген *psbA* у всех гнетовых и части хвойных дуплицирован, что не отмечено для хпДНК покрытосеменных. Кроме того, и у хвойных, и у гнетовых (но не у покрытосеменных) дуплицирован участок между генами *trnH* и *psbA* [Raubesson, 1998]. В работе М. Шмидта и К. Шнейдер–Потша по результатам анализа эволюции генов цитохро-

мов гнетовые вообще помещают в базальное положение на эволюционном дереве голосеменных [Schmidt, Schneider–Poetsch, 2002]. С другой стороны, исследования эволюции ядерных генов фитохромов предлагают иной сценарий эволюции, согласующийся с данными Л. Раубесона и Р. Янсена (цит. по [Schmidt, Schneider–Poetsch, 2002]).

К выводу о том, что гнетовые не ближе к покрытосеменным, чем любая другая группа голосеменных, пришли на основании изучения эволюции генов *rpoI* и II [Denton et al., 1998; Samigullin et al., 1999], а также MADS-box-генов [Winter et al., 1999). Подробно состояние проблемы недавно разбиралось М. Фролихом [Frohlich, 1999] и Дж. Бурлейем и С. Метью [Burleigh, Mathews, 2004]. В работе последних приведено филогенетическое дерево, построенное по результатам сопоставления 13-ти участков ДНК и отражающее современное состояние проблемы.

Гипотеза о близости гнетовых и покрытосеменных была существенно дискредитирована еще С.-М. Чоу с соавт. [Chaw et al., 2000] путем сравнительного анализа эволюции генов из всех трех компартментов растительных клеток (ядер, хлоропластов и митохондрий). Они показали, что гнетовые относятся к кладе голосеменных.

Таким образом, накопленные в самое последнее время данные заставляют признать, что генетические линии, ведущие к современным голосеменным и покрытосеменным представляют собой две отдельные клады, которые сформировались несколько сот миллионов лет тому назад. С другой стороны, эти результаты показывают нам, что многие ключевые признаки, используемые при построении филогенетических деревьев на основании анализа морфологии (в широком смысле), в ходе эволюции могли возникать параллельно в достаточно далеко отстоящих друг от друга линиях эволюционного развития. Это особенно ясно видно на примере гнетовых.

Известно, что у гнетовых и покрытосеменных обнаруживается сходство в жилковании листьев, строении сосудов и. т. д. Для некоторых голосеменных было описано даже нечто, напоминающее процесс двойного оплодотворения, столь типичного для покрытосеменных [Friedman, 1990].

И все же некоторые работы, выполенные как в нашей, так и в ряде зарубежных лабораторий [Hansen et al., 1999; Samigullin et al., 1999; Winter et al., 1999; Chaw et al., 2000; Barkman et al., 2000; Schneider, Poetsch, 2002ж; Rydin et al., 2002], достаточно уверенно говорят о том, что гнетовые не являются сестринской группой по отношению к покрытосеменным растениям. Сегодня сестринскую группу к покрытосеменным все более настойчиво ищут среди вымерших голосеменных растений.

Что касается филогенетических отношений таксонов более низких рангов, то по данным [Raubesson, Jansen, 1987; Chaw et al., 2000] и других авторов, как хвойные, так и, видимо, все прочие изученные семейства Coniferales, оказались монофилетичными, как и все изученные роды сем. Pinaceae. В пределах этого семейства можно выделить две клады, включающие, в частности, роды *Pseudotsuga* + + *Larix* и *Abies* + *Pinus*. Среди хвойных можно также с уверенностью выделить клады Phyllocladaceae + Podocarpaceae и Araucariaceae + обширная клада, включающая Sciadopityaceae, Taxaceae, Cephalotaxaceae, Taxodiaceae и Cupressaceae, причем Sciadopityaceae занимают на дереве базальное положение.

В работе [Chaw et al., 1997] показано, что для структуры ядерной 18S рРНК у представителей ряда таксонов характерно наличие специфических инделей, которые видимо могут служить надежными таксономическими признаками. Хорошим таксономическим маркером у голосеменных могут служить также специфические, относительно короткие индели в структуре хпДНК. Так, все изученные хвойные, включая Taxaceae, либо полностью, либо почти полностью утеряли один из обращенных повторов хпДНК. Как уже отмечено ранее, хпДНК других изученных голосеменных (гинкго, гнетум), некоторых печеночников и папоротников, а также подавляющего большинства покрытосеменных имеют "нормальную" структуру с двумя обращенными повторами [Strauss et al., 1988; Raubesson, Jansen, 1989].

Недавно появилась работа [Kusumi et al.,2000], в которой подробно анализируется филогения семейств Taxodiaceae и Cupressaceae. Филогенетические выводы, основанные на частичном изучении генотипов, в ней делаются по результатам сравнительного анализа четырех различных участков ДНК и сопоставляются филогенетические деревья, построенные двумя разными методами. Это, конечно, существенно повышает достоверность выводов. В качестве внешней группы в этой работе была взята Cunninghamia.

Анализ показал, что первым от общего ствола дерева дивергировал род *Taiwania*, затем *Athrotaxis*, а затем уже дивергировали остальные роды. Показано, что в одну из "поздних" клад входят роды *Metasequoia*, *Sequoia* и *Sequoiadendron*, в другую – *Taxodium* и *Glyptostrobus* (сестринским таксоном к ним является Cryptomeria). Самое интересное, что Cupressaceae s.s. оказались внутри дерева таксодиевых; они наиболее близки к кладе *Cryptomeria/Taxodium/Glyptostrobus*. Авторы отмечают, что их данные неплохо согласуются с результатами сравнительно-морфологического анализа, но иногда противоречат данным Чоу с соавт. [Chaw et al., 2000]. Очевидно, что эти результаты заставят задуматься систематиков голосеменных, предлагающих иные сценарии их эволюции.

Сравнительный анализ семантид позволяет оценить таксономический вес признаков, используемых систематиками. Так, изучение хпДНК видов *Pinus* указывает на неожиданно большой таксономический вес такого признака как мягкая и жесткая хвоя. В тех же исследованиях было показано, что некоторые из выделяемых секций этого рода полифилетичны [Strauss, Doerksen, 1990; цит. по Шнеер, 1991].

Активно ведутся исследования полиморфизма ДНК в пределах низших таксонов голосеменных. Для этой цели, например, применяют метод RAPD [Nkongolo et al., 2003].

Важные результаты были получены при изучении генов запасных белков гнетовых, гинкговых и хвойных. Все они в той или иной степени отличаются друг от друга, но сильнее всего – от генов покрытосеменных [Shutov et al., 1998]. В последние годы отношения между различными группами голосеменных исследовались также методами имммунохимии В.Ф. Семиховым с сотр.[2004].

Исследования геносистематиков голосеменных вызвали неоднозначную реакцию ботаников. Так, в одной из работ [Axsmith et al., 1998] выводы работы S. Chaw с соавт. [1997] резко критиковались, как и более ранняя работа А.В. Троицкого с соавт. [Troitsky et al., 1991].

Авторам этой критики кажется просто невероятным, что поиски общего предка голо- и покрытосеменных следует отнести не к меловому периоду, а ко

времени существования прогимносперм, т.е. к позднему девону. Оставляя в стороне эмоции, отметим лишь, что критиковать все же лучше метод, а не полученные с его помощью результаты. Как уже говорилось ранее, последние данные палеоботаники говорят о том, что голо- и покрытосеменные вполне могли сосуществовать в юрском периоде [Crepet, 1998]. К тому же результаты, полученные геносистематиками и представленные в работах [Goremykin et al., 1997; Hansen et al., 1999; Samigullin et al., 1999; Duff, Nickrent, 1999 и др.], с выводами работы Троицкого с соавт. полностью согласуются.

Рассмотрим теперь, что на сегодня известно о молекулярной филогении покрытосеменных растений. Объем полученной информации об их молекулярной эволюции чрезвычайно велик, но неоднозначен по уровню достоверности филогенетических заключений и может послужить основой для отдельной монографии, посвященной этому вопросу. Перед автором такой задачи не стояло.

Молекулярная эволюция покрытосеменных растений

Оценим, прежде всего, насколько совместимы представления ботаников об эволюции и макросистеме семенных растений и схемы геносистематиков, построенные до конца 2004 г. в результате изучении эволюции их макромолекул.

В настоящее время геносистематики оперируют сведениями о преобразовании в ходе эволюции первичных структур целого ряда генов, локализованных как в ядрах, так и в органеллах растительных клеток у многих тысяч видов покрытосеменных. Немногим хуже исследованы другие, некодирующие участки ядерных ДНК и, в меньшей мере, целые ДНК органелл. Данные эти обычно используются для анализа эволюции генотипов на разных таксономических уровнях. Так, главной отличительной особенностью генома митохондрий растений является его выраженный полиморфизм, проявлющийся даже при анализе индивидуальных растений из одной популяции одного и того же вида, например, губоцветного *Thymus vulgaris* L. Геном хлоропластов у тех же растений устроен одинаково [Belhassen et al., 1993].

Обсуждать весь этот массив данных нет необходимости. Если читателя заинтересуют результаты исследования семантид в конкретной группе (таксоне) растений, будь то зеленые водоросли или высшие растения, то (имеющий такую возможность) может получить их с помощью Internet. В предыдущей монографии [Антонов. 2000 б] автор попытался помочь читателям, опубликовав в ней обширную таблицу со списком изученных таксонов. После этого, по мере накопления все новых данных, автор включал их в эту таблицу на предмет последующего опубликования, но, как оказалось, недооценил темпы их накопления. Уже в 2003–2004 гг. стало практически невозможно отслеживать все публикации, так как они стали появляться во всех национальных ботанических журналах, просматривать которые у автора не было ни времени, ни возможностей. Тем не менее, таблицу автор продолжал пополнять, не претендуя на полноту содержащихся в ней сведений. Дело в том, что в отзывах ботаников на таблицу в монографии

2000 г. указывалось на полезность такой таблицы для начинающих. Учтя это, **автор публикует таблицу в виде приложения к настоящей монографии.** Из этой таблицы, сопоставив время публикации работ, читатель может получить представление о динамике развития исследований ДНК растений. Ясно, что в последние годы количество таких публикаций росло в геометрической прогрессии. Остается лишь принести извинения авторам, чьи результаты не отражены в приложении.

На основе полученных данных и разными методами были построены «молекулярные» деревья, якобы отражающие филогенетические связи важнейших таксонов покрытосеменных. Вот одно из первых таких деревьев (рис. 12-5), а на

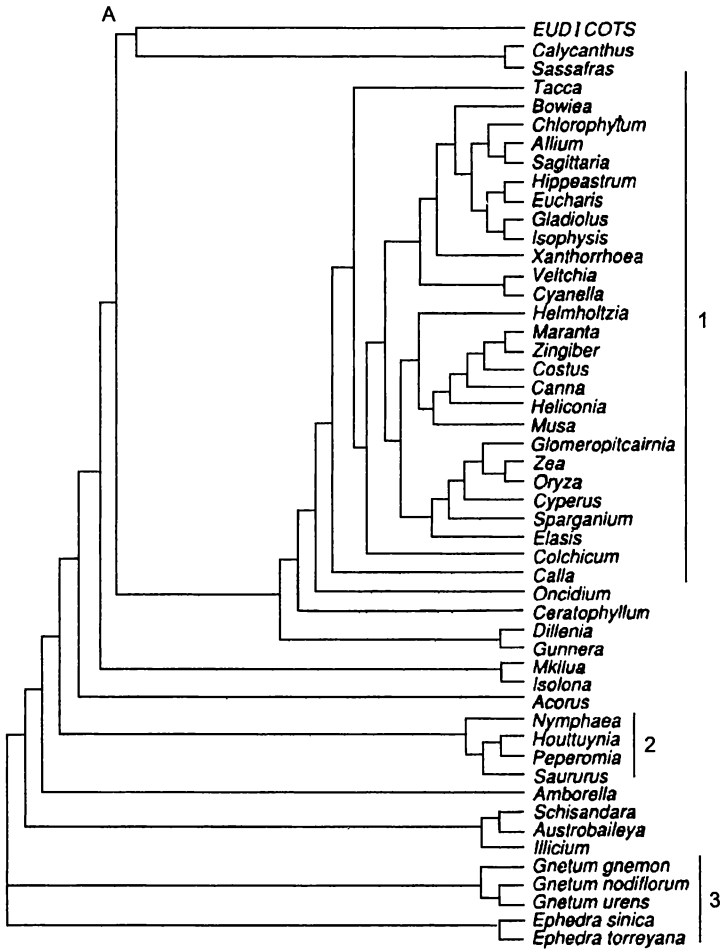


Рис. 12-5. Устаревшая схема, отражающая филогенетические связи таксонов покрытосеменных (внешние группы – гнетумы и эфедры); построена по результатам изучения эволюции гена *rbcL*

1– в основном высшие двудольные, 2 – от нимфейных и ниже, до голосеменных – ANITA-группа примитивных двудольных, 3 – голосеменные. Из [Chase et al., 1993]

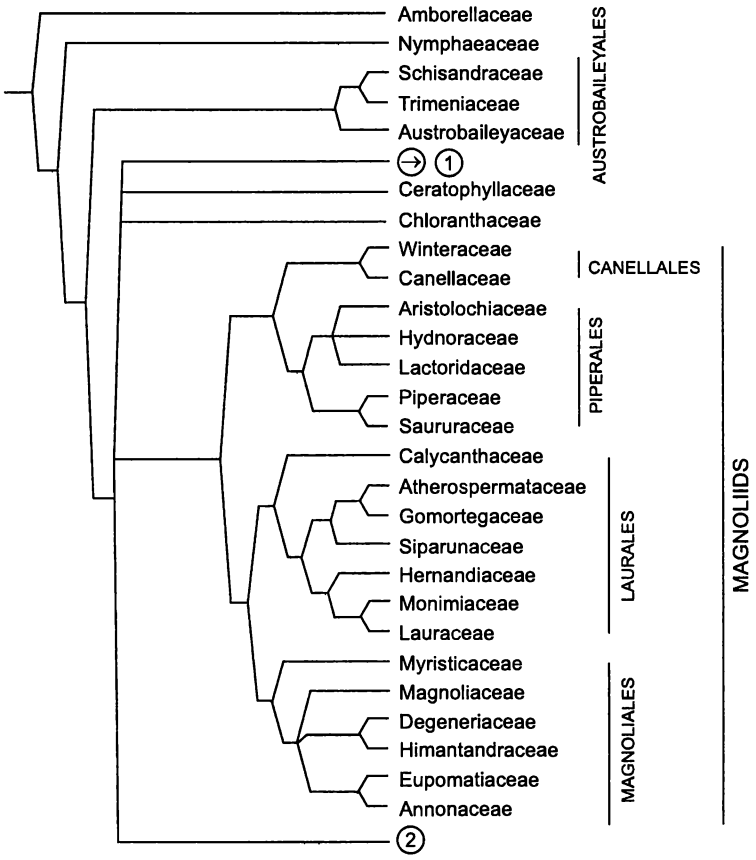


Рис. 12-6. Одна из последних схем, отражающих эволюцию генотипов покрытосеменных

1 – однодольные, 2 – высшие двудольные

рис. 12-6 изображено одно из последних [Zanis et al., 2002].

С точки зрения ботаников, структура этих деревьев не совсем обычна и иногда противоречит сложившимся представлениям. На предлагаемых ботаниками схемах эволюции покрытосеменных из проангиосперм сразу выводятся две основные клады – однодольных и двудольных растений. Такие схемы находят поддержку в некоторых исследованиях геносистематиков, и эти представления лежат в основе части современных систем покрытосеменных растений: их делят на два таксона, одно- и двудольных.

Между тем, выводы, которые следуют из большого цикла работ геносистематиков, были несколько иными. Судя по некоторым результатам реконструкции эволюции отдельных типов генных и негенных последовательностей, а также образованных из них коротких слитных последовательностей, первыми от общего ствола эволюции покрытосеменных якобы отделяются клады некоторых порядков и семейств «примитивных» двудольных, т. н. «палеотрав» [D. Soltis et al.,

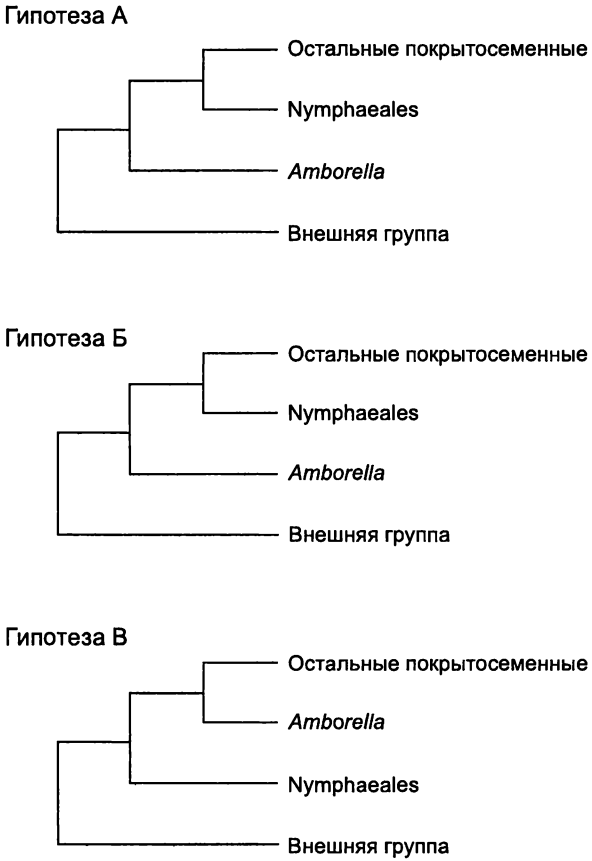


Рис. 12-7. Три гипотезы, отражающие возможные филогенетические связи «прикорневых» таксонов покрытосеменных

К сожалению, на конец 2004 г. ни одна из них не может считаться полностью доказанной и достоверной

1997; Antonov et al., 1998, P. Soltis et al., 1999a; Soltis, Soltis, 2000 и др.] . К их числу относятся амбореллиевые, нимфейные, иллициевые, аустробэйлиевые, лимонниковые и ряд других таксонов (ANITA-group таксонов). До недавнего времени такая схема молекулярной эволюции доминировала и даже попала в учебники (см., например, [Judd et al., 1998, 2002].

Порядок отделения этих клад от общего ствола эволюции покрытосеменных до сих пор окончательно не решен. Так, одни исследователи, основываясь на данных по секвенированию отдельных классов ядерных и хлоропластных последовательностей, считает базальной группой амбореллиевые, а другие – нимфейные (рис. 12-7).

Недавно опубликованы результаты определения полной первичной структуры хпДНК амбореллы [Goremykin et al., 2003a]. Строение **нескольких десятков** генов хпДНК амбореллы было сопоставлено с гомологичными генами других растений.

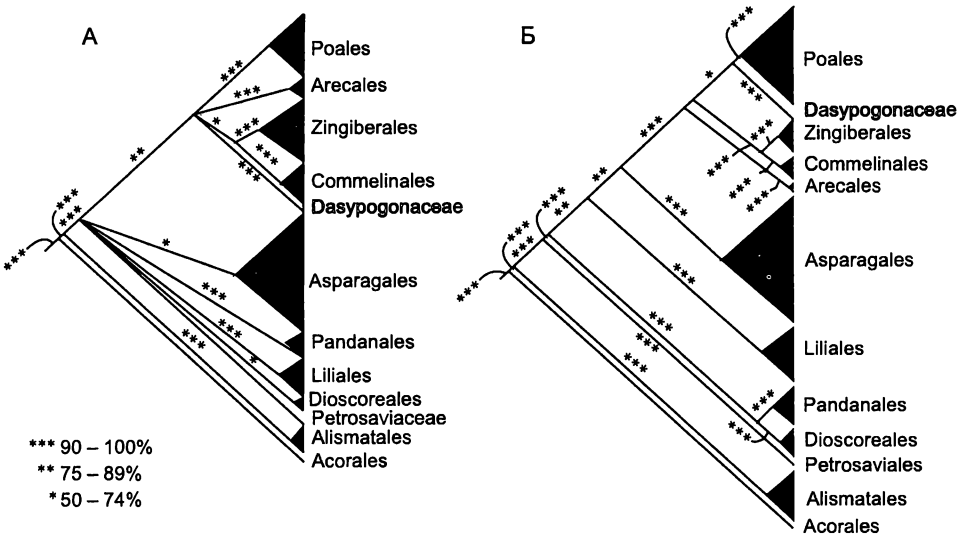


Рис. 12-8. Две схемы, отражающие филогенетические отношения таксонов однодольных растений

Левая схема (А) построена в 2000 г. по результатам исследований эволюции трех генов: *atpB*, *rbcL* и *nuc* 18S rRNA. Правая схема (Б) построена недавно, всего четыре года спустя после первой, на основании изучения эволюции уже семи генов: *atpB*, *rbcL*, *matK*, *ndhF*, *mit atpA*, *nuc* 18S и 26S rRNA. Видно, что увеличение числа генов привело к повышению значений индекса бутстрепа, но до сих пор некоторые из линий установлены с невысокой достоверностью (количество звездочек у ветвей схемы указывает на границы значений бутстреп-индекса). Уменьшилось число политомий на схеме. В то же время, увеличение числа изученных генов привело к тому, что многие таксоны свое положение на схеме существенно поменяли. Остается надеяться, что в недалеком будущем и на основании результатов изучения эволюции новых семантид, топология молекулярного дерева окончательно стабилизируется. Размер треугольников приблизительно соответствует количеству видов в каждом из представленных таксонов. Из [Chase, 2004]

Результаты этой работы, во-первых, заставляют усомниться в базальном положении амбореллиевых на эволюционном дереве покрытосеменных растений. Во-вторых, они находятся в противоречии со всеми исследованиями, из которых следовала парафилетичность двудольных, в том числе выполненными в последнее время [Barkman et al., 2000; Samigullin et al., 2002].

Чтобы утвердиться в правильности своей точки зрения, согласно которой как однодольные, так и двудольные монофилетичны, В. В. Горемыкин с соавт. определили полную первичную структуру хпДНК нимфеи [Goremykin et al., 2004]. Результаты также довольно определенно свидетельствуют о том, что изучение эволюции индивидуальных генов или коротких слитных последовательностей видимо не может служить основой для окончательных молекулярно-филогенетических выводов.

О нестабильности предлагаемых реконструкций эволюционных событий говорят, например, две схемы, приведенные в работе М. Чейз [Chase, 2004] (рис. 12-8). На левой схеме представлено дерево, построенное в 2000 г. по последовательностям трех генов, а на правой – предлагаемое в 2004 г. по семи генам.

Различия между ними очевидны. Так, резко уменьшилось число политомий. И все же отметим, что надежность (судя по приводимым значениям индекса бутстрепа) определения положения некоторых ветвей до сих пор невелика. Интересно, как будет выглядеть эта схема еще через несколько лет.

И раньше некоторые исследователи указывали на нестабильность топологии основания дерева покрытосеменных [Barkman et al., 2000; Graham, Olmstead, 2000], однако эти работы захлестнул вал "традиционных" публикаций. Существование ANITA-группы семейств казалось твердо доказанным.

Подробно этот вопрос рассматривается в работах [Антонов, 1999, 2000 а; Rydin, Kalllersjo, 2002]. Авторы подчеркивают, что при небольшом числе анализируемых таксонов, разном числе внешних групп и, в зависимости от метода реконструкции филогении, топология реконструированного дерева оказывается нестабильной, что, кстати, вполне может случиться и в случае топологии, представленной в работах [Goremykin et al., 2003 а, б; 2004]. Другие авторы также критически отнеслись к выводам работ В. В. Горемыкина [Degtjareva et al., 2004; D. Soltis, P. Soltis, 2004].

«Масла в огонь» подлила недавняя работа А. Дрискелла. Использовав метод построения супердеревьев он показал, что базальной группой покрытосеменных является не амбрелла, а однодольные [Driskell et al., 2004]. Остается лишь согласиться в выводами работы В. Мартина и его коллег, согласно которой вопрос о базальной группе покрытосеменных не решен и требует дальнейших исследований [W. Martin et al., 2005].

Между тем, такой вывод В. В. Горемыкина и др. будет явно по вкусу некоторым ботаникам «классической школы», но не будем забывать, что он сделан в результате исследования эволюции хпДНК, а отнюдь не целых ядерных геномов покрытосеменных растений, основы построения их МГСУ. Подчеркнем, что именно ядерные геномы содержат подавляющее большинство генов, определяющих фенотип растения. Помимо этого, вопрос о том, насколько схемы эволюции хпДНК конгруентны схемам эволюции самих растений до сих пор специально никем не исследовался.

Таким образом, в настоящее время вопрос окончательно не решен.

В те же годы были проведены многочисленные исследования эволюционных взаимоотношений порядков и семейств в пределах отдельных подклассов и порядков покрытосеменных [APG, 1998, 2002]; которые нашли свое отражение в серии обзоров, опубликованных недавно в American J. of Botany [2004,V. 91, N 10]. В них рассматриваются свежие данные о молекулярной филогении высших двудольных [Judd, Olmstead, 2004], однодольных [Chase, 2004], вопросы происхождения и диверсификации покрытосеменных [Soltis, Soltis, 2004; Sanderson et al., 2004; Crepet et al., 2004] Из этих последних обзоров со всей очевидностью следует, что мы только приближаемся к пониманию филогенетических связей отдельных исследованных молекулярными методами таксонов. Так, В. Джадд и Р. Олмстед приводят схему отношений таксонов высших двудольных, «эудикот» [Judd, Olmstead, 2004] (рис. 12-9). На этой схеме множество политомий, которые означают, что молекулярными методами решить ряд вопросов филогенетики двудольных пока не удалось.

В целом же объем полученного материала настолько велик, что мы ограничимся рассмотрением всего нескольких примеров.

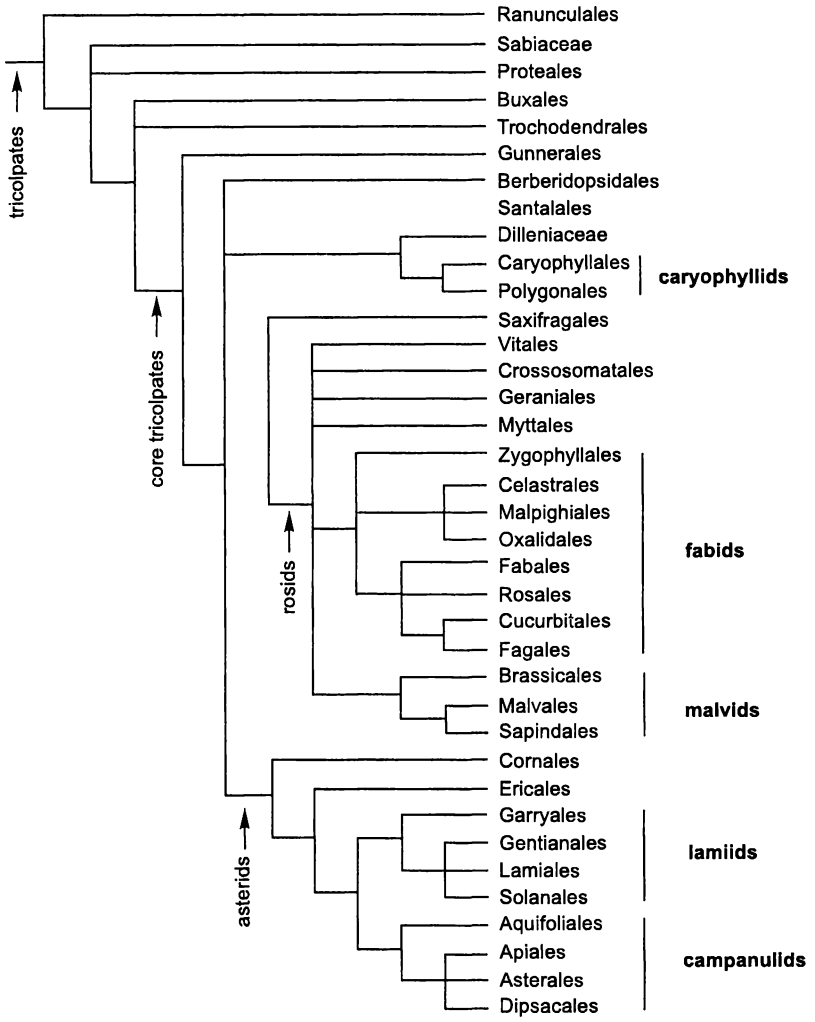


Рис. 12-9. Новейшая схема, отражающая филогенетические связи генотипов таксонов двудольных

В ее основу положен весь массив данных, полученных путем сопоставления множества разных фрагментов ДНК (см. APG 2). Даже на этой схеме видно много политомий, не позволяющих однозначно реконструировать процесс эволюции генотипов двудольных. Из [Judd, Olmstead, 2004]

На рис. 12-10 показано филогенетическое дерево, отражающее эволюцию и филогенетические связи генотипов семейств одного из хорошо изученных порядков, Мальпигиевых (Malpighiales).

Из рисунка очевидно, что целый ряд семейств покрытосеменных этого порядка изучен достаточно, чтобы сопоставлять их с семействами, выделяемыми

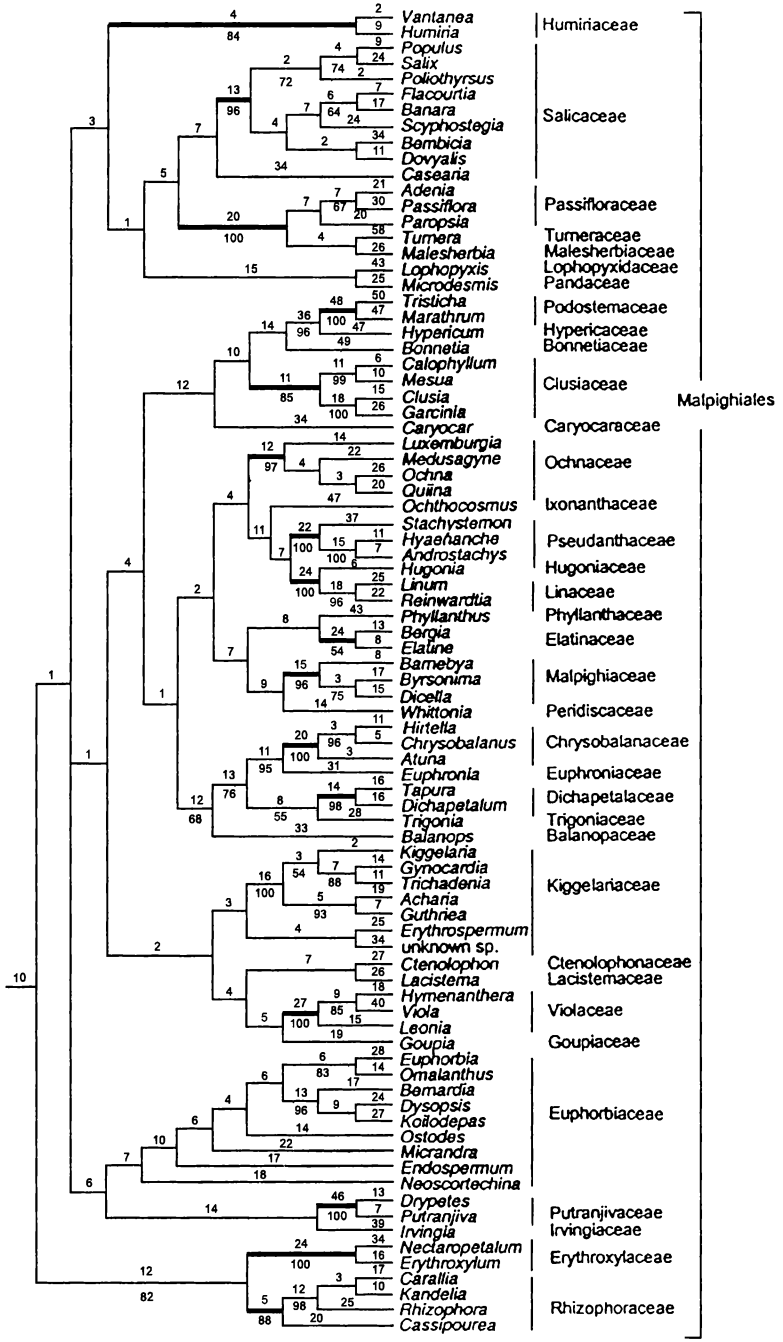


Рис. 12-10. Схема, отражающая эволюционные связи генотипов большинства семейств порядка Мальпигиевых

Она дает представление об объеме работы, выполненной геносистематиками, занимавшимися изучением этого порядка покрытосеменных. Из [Chase et al., 2000b]

на основании классических методов. Более того, для целого ряда других семейств определены сестринские таксоны того же ранга, что создает предпосылки для их объединения в порядки, некоторые из которых по данным геносистематики могут оказаться парафилетическими.

Анализ, выполненный недавно М. Чейз с соавт. [Chase et al., 2000b], показал, что около 2/3 всех клад уровня семейства, выделяемых геносистематиками, являются монофилетическими и отлично согласуются с семействами, выделяемыми исходя из морфологических признаков.

Ряд семейств выделяется менее достоверно, т.е. их монофилетичность с точки зренния геносистематиков сомнительна, а относительно небольшое их число (по данным М. Чейза с соавт., двенадцать: Columelliaceae, Dipterocarpacae, Euphorbiaceae, Flacourtiaceae, Icacinacee, Loasaceae, Myrsinaceae, Papaveraceae, Phytoilaccaceae, Rhamnaceae, Scrophulariaceae, и Verbenaceae) **оказались не монофилетическими.** В чем же причина этих расхождений ?

Понятно, что семантиды таких семейств требуют более глубокого изучения, и вывод этот носит предварительный характер. Быть может, в будущем ряд противоречий между построениями морфологов и геносистематиков будет снят. Не исключено, однако, что **причина расхождений лежит глубже и обоснована существенными различиями в механизмах, определяющих направления и темпы организменной и молекулярной эволюции.**

В пределах порядков достаточно глубоко исследована молекулярная эволюция почти всех важнейших семейств покрытосеменных. Рассмотрим в качестве примера эволюцию семейства Зонтичных (Apiaceae). Эти работы были выполнены в основном в МГУ М. Г. Пименовым с соавт. и в США под руководством С. Дауни [Downie, Katz–Downie, 1996 a,b; Valiejo–Ronan et al., 1998; Plunkett, Downie, 1999; Katz–Downie et al., 1999; Downie et al., 1998, 2000 a,b; Valiejo–Roman et al., 2002 a,b]. Эволюцию этого семейства исследовали главным образом путем сопоставления строения спейсеров оперона ядерных рРНК (ITS 2, 3, 4), но топология полученных деревьев была верифицирована путем анализа других последовательностей. Однако использование таких спейсерных последовательностей все же не позволяет делать однозначных выводов о филогенетических связях генотипов изученных растений [Coleman, 2003].

Результаты изучения эволюции фрагментов ДНК были спроецированы на эволюцию самих растений. Как пишет в одной из последних работ К. М. Вальехо–Роман с соавт. проведенные исследования позволили вскрыть ряд неожиданных филогенетических связей между близкими к Зонтичным семействами, родами семейства и поместить на дереве ряд «проблемных» родов (в англоязычной литературе – orphan genera, родов-сирот).

Отмечено, что относительно положения некоторых родов существуют серьезные противоречия между гипотезами морфологов и молекулярных биологов. Эти роды требуют особенно углубленного изучения. Это касается, в частности, родов азиатских Apioideae из флор Китая, Непала, Ирана и других регионов. Виды из этих родов ботаники обычно включали в состав уже описанных родов Старого Света, но на молекулярном дереве они нередко занимают отдельное положение. К аналогичным выводам пришли А. Митчел с соавт. при изучении эндемиков из сем. Brassicaceae из Новой Зеландии [Mitchell, Heenan, 2000].

Вообще среди Brassicales известно достаточно много родов, которые систематики затрудняются отнести к какому-то из семейств этого порядка. Попытки решения этих проблем предпринимаются геносистематиками. В результате сопоставления строения генов *rbcL*, *ndhF* и *matK* роды-«сироты» *Emblingia*, *Forchhammeria* и *Tirania* нашли свое место в системе порядка [Hall et al., 2004].

Вернемся, однако, к Зонтичным. Другой важный вывод из всего этого цикла работ: нет четкой границы между Зонтичными и близким к ним семейством Аралиевых.

На сегодня эволюция спейсеров ядерных рРНК изучена у сотен видов как зонтичных, так и многих других семейств покрытосеменных. Отметим, что к этим данным нужно относиться с осторожностью: темпы эволюции спейсеров в разных ветвях дерева могут быть существенно различными [Yang et al., 2003], а отсюда и возможные искажения топологии филогенетических деревьев. К неверным выводам можно придти даже если не учитывать различия в "образе жизни" растений. Например, скорость эволюции генов может изменяться у растений-паразитов [Nickrent, Colwell, 1994; Nickrent, Duff, 1997; Wolfe, DePamphilis, 1998]. Большое влияние могут оказывать изменения климата, приводя к ускорению темпов эволюции генов и диверсификации видов у целых семейств и порядков растений [Davies et al., 2004; Flintoft, 2004 b].

На сегодня получены сведения об эволюционных отношениях видов в пределах многих родов покрытосеменных. Число работ, в которых описываются результаты таких исследований, измеряется многими сотнями. Рассматривать эти результаты в данной книге нецелесообразно по причинам, изложенным в ранее опубликованной монографии [Антонов, 2000б]. Если кого-то все же заинтересует, что сделано геносистематиками при изучении того или иного таксона низшего ранга, то поиск результатов таких исследований целесообразнее всего проводить при помощи Internet.

* * *

Итак, покрыто- и голосеменные – это наиболее исследованные методами геносистематики таксоны высших растений. К сожалению, окончательного и достоверного ответа на вопрос о филогенетических связях как между этими основными таксонами семенных, так и между составляющими их таксонами еще не получено. Имеющаяся на этот счет информация до сих пор в значительной мере противоречива. Причина заключается в том, что **сегодня о строении генотипов растений мы знаем гораздо меньше, чем знали о фенотипах растений первые "классические" систематики, тот же Карл Линней.**

И все же открытия геносистематиков имели большой резонанс. Основано это на том, что первые же "филогенетические деревья", построенные геносистематиками, имели удивительно много сходств, по крайней мере, с некоторыми аналогичными построениями ботаников. Этот факт находил простое обоснование: ведь генотип определяет фенотип растения. На самом деле это – кажущаяся простота [Медников, 1971].

Возбужденные открывшимися перспективами ботаники-геносистематики стали постоянно нарушать основной закон экспериментальных работ, выводы из

которых должны соответствовать возможностям и границам использованного метода исследований. О верификации сделанных выводов, например, путем изучения эволюции других генов, на первых порах забывали. Сегодня ситуация плавно меняется, так как выводы делаются уже на основании параллельного изучения ряда генов или некодирующих участков ДНК. И все же даже в самых последних работах сопоставляются ничтожно малые части геномов растений.

Эйфория еще далеко не прошла, о чем свидетельствуют названия многих последних публикаций геносистематиков и тех ботаников, которые пытаются использовать молекулярные данные для ревизии существующих филогений и систем растений (см., например, [Шипунов, 2003]).

Пессимист увидит в этом выводе свидетельство непригодности методов геносистематики для решения проблем ботаники. Оптимист, оглядываясь на тот путь, который прошла геносистематика за короткий срок своего существования, с еще большим энтузиазмом продолжит решение стоящих перед геносистематикой проблем. При этом движении вперед **геносистематик должен всегда помнить, что любое молекулярное дерево – это лишь математическая гипотеза, весьма приблизительное описание характера эволюционных взаимоотношений генотипов исследуемых им растений.** Вольная или невольная торопливость в использовании молекулярных данных для ревизии филогений и систем, предложенных ботаниками на основании изучения фенотипов растений, лишь дискредитирует геносистематику.

Быстрый прогресс в области таких исследований невозможен, но накопленный опыт позволяет надеяться, в конечном счете, на положительный результат в изучении эволюции генотипов растений. Со временем эти данные можно будет надежно соотнести с построениями феносистематиков. На этом пути нам предстоит решить кардинальную проблему свертывания частных знаний о генотипе в форму, пригодную для межтаксонных сопоставлений. Исследователь, сопоставляющий "на глаз" фенотипы двух растений, в результате работы "мозгового компьютера" сразу может вынести суждение (бывает, и ошибочное) об уровне их сходства. Взглянуть так на генотип растения мы еще не умеем. В решении этой проблемы видится одна из основных задач современной биоинформатики.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Читатель, знакомый с зарубежными монографиями и учебными пособиями по геносистематике (молекулярной филогенетике) растений не может не отметить, что эта книга по своему содержанию во многом от них отличается. Причин тому несколько.

Во-первых, необходимо было написать книгу, доступную русскоязычному читателю-ботанику, в массе своей практически не знакомому с геносистематикой. Целью было ознакомить читателя с идеологией современной геносистематики (такой, какой она видится автору).

Во-вторых, созрела потребность включить в круг рассматриваемых вопросов те из них, которые обсуждались в основном в работах отечественных геносистематиков, и анализ которых в зарубежных изданиях практически не проводился. Удивительно, например, что в монографии В. Ли «Молекулярная эволюция» [Li, 1997] в огромном списке литературы (37 стр. текста) содержатся ссылки всего на две работы российских авторов ! Впрочем, автору настоящей книги еще повезло – обе цитированные работы выполнены в МГУ.

Основные причины того две: языковый барьер и сознательное игнорирование части зарубежных (по отношению к авторам этих книг) работ. Такое отношение ко многим европейским, японским, китайским, и, в особенности, не-англоязычным публикациям, один их моих зарубежных (американских !) коллег метко назвал «американским империалистическим шовинизмом».

На этот счет весьма едко высказывался еще на заре развития геносистематики один из основоположников нового направления исследований, Э. Чаргафф. Вот что он писал по этому поводу: «Совсем недавно было сравнительно легко открывать новые области деятельности и возделывать их: никто не опасался, что его немедленно ограбят, как это почти неминуемо происходит сейчас.... Библиографические ссылки составлялись сравнительно честно, в то время как сейчас целые блоки ссылок перетаскиваются путем своеобразной трансдукции из одной статьи в другую, так что если на какую-то работу перестают ссылаться, то уж навсегда. Такой разрыв преемственности традиций – вероятно, одно из самых разрушительных последствий массовости научного сообщества, в котором мы сейчас живем. «Что ново, то истинно» – эта иллюзия исказила сам смысл научного исследования. Стремление быть всегда «на гребне волны» несовместимо с поисками истины о природе, а эти поиски и есть наука. Когда говорят «теперь это уже не истина», – истины нет вообще». В другой своей работе он пишет еще резче: «Стало очень трудно различать, где пылкие поиски истины, а где энергичная кампания по деланию карьеры. То, что начиналось как смелое предприятие сильных

духом, превратилось в выживаемость наиболее ловких и быстрых». [Chargaff, 1963; Чаргафф, 1976].

Слабым оправданием такому поведению некоторых коллег служит лишь необходимость бороться за гранты для дальнейшего проведения исследований, а тут уж (с их точки зрения) не до научной этики. Система грантов погубила многие направления в науке.

В-третьих, автору хотелось изложить в этой книге собственные взгляды на актуальные проблемы современной геносистематики растений.

Круг задач, решаемых сегодня геносистематикой, в основе своей ничем не отличается от сформулированных много лет тому назад задач классической систематики. Сменился лишь объект исследований.

Известно, что первой задачей систематика является **описание биоразнообразия,** и геносистематика отличается от классической систематики только тем, что занимается описанием биоразнообразия генотипов, а не фенотипов растений. Процесс этот далеко не завершен и потребуются многие годы для того, чтобы достигнуть даже той полноты описания биоразнообразия генотипов, которую достигла к началу XXI века классическая систематика в результате изучения фенотипов растений. Остается уповать на быстрое развитие геномики растений.

Этой работой гено- и феносистематики могут заниматься параллельно и совместно, но здесь сразу возникает ряд трудноразрешимых проблем. Часть из них изложена во Введении (проблема гено- и феновидов Рейвена, и др.), а часть все еще нуждается в разработке. Прежде всего, это извечная проблема систематики – что такое вид у растений ?

Не будем углубляться во все тонкости этой проблемы. Ясно одно – геносистематикам нужно убедиться, что «хорошие» виды растений обладают «хорошо различимыми МГСУ» и действительно отделяются друг от друга явно выраженными хиатусами, разрывами в выраженности анализируемых молекулярных признаков. Поскольку виды образуются и существуют во времени, возможны и все промежуточные варианты неполноты таких хиатусов. Для оценки их значимости необходимо доскональное знание степени варьирования этих признаков в пределах эталонных, «хороших» видов растений, их молекулярно-популяционной структуры.

Следующей задачей геносистематики является поиск естественных конгломератов генотипов таксонов ранга генорода (аналогов рода в классической систематике), что обычно достигается путем применения методов молекулярной филогенетики. Такие конгломераты (клады), включающие виды только одного «рода» (или таксоны более высокого ранга) классических систематиков, достоверно обнаружить удается далеко не всегда. При этом систематики классической школы склонны весьма скептически относиться к результатам, говорящим о неестественности признаваемых ими таксонов.

Между тем, несмотря на значительные успехи геносистематиков, до сих пор (на начало 2005 г.) не удалось доказать монофилетичность некоторых семейств и порядков растений, не вызывающих особых сомнений в своей «естественности» у ботаников классической школы.

Что же, надо признать, что сегодня достоверность выделения «генотаксонов» действительно пока невелика, но с увеличением количества изученных генотипов и методов построения молекулярных филогенетических деревьев со временем будет только возрастать.

Новые возможности открывает и связь крупных изменений в МГСУ и их компонентах с выделяемыми кладами растений. Так, например, считается, что порядок генов в хпДНК у видов из разных семейств покрытосеменных таксонспецифичен, т.е. по этому признаку семейства легко различимы. Показано, что локализация генов некоторых малых рРНК у моховидных и прочих таксонов наземных растений группоспецифична. Группоспецифичным является число и расположение интронов во многих генах у растений, и. т. п.

На этом этапе своего развития геносистематика вступила в кажущиеся непреодолимыми противоречия с классической систематикой. Суть этих противоречий заключается в том, нужно ли выделяемым конгломератам генотипов присваивать какой-то ранг из числа принятых в систематике Линнея.

В настоящее время эта проблема обсуждается всеми систематиками. Одни считают, что ранги системы Линнея нужно отбросить и переходить на филогенетические системы без рангов, т. н. ФилоКод [Cantino, deQueiros, 2000]. Другие ищут некие промежуточные варианты, а третьи остаются приверженцами систем, построенных по принципам Линнея. В дискуссии принимают участие ученые всех континентов. Одни издают свою монографию в Кембридже и называют «Нищета линнеевской иерархии: философское исследование биологической систематики» [Ereshefsky, 2001], другие разумно критикуют эту книгу [Павлинов, 2004].

Как мне кажется, потребности практической работы с системами сегодня требуют, чтобы **достижения молекулярной систематики (геносистематики) в первую очередь использовались бы для коррекции уже существующих, линнеевских систем растений.** Особенно, если речь идет о тех случаях, когда между построениями гено- и феносистематиков выявляются существенные расхождения. Именно такую мысль высказывал в свое время А. Кронквист [Cronquist, 1988)].

Целесообразность и возможность коррекции линнеевской системы определяется исключительно надежностью используемых для этих целей молекулярных данных. В этом свете многие сделанные в этом направлении попытки вряд ли можно признать удачными. Многие сегодня продолжают страдать «детской болезнью» геносистематики: они не учитывают ограничений, накладываемых редукционистским подходом при решении проблем биологии. Использование кладистического подхода геносистематиками также вызывает нарекания.

Параллельно и независимо от этой работы должны продолжаться попытки создания и дальнейшей разработки ФилоКода (или Филокодекса) , построенного совсем на других принципах, или даже более радикальные решения (например, введение штрих-кодов для обозначения сортов, разновидностей, видов и.т.п.). Эффективность такого подхода для различения видов животных, птиц и бабочек обсуждается в заметке [Flintoft, 2004 a]. К сожалению, как пишет И. Я. Павлинов [2004], «с этим едва ли согласятся практикующие систематики, не принимающие сердцем кладистическую парадигму». Далее он пишет: «всякая система (в том числе и сообщество систематиков) «боится новизны», и чем радикальнее новизна, тем большее неприятие она вызывает ... Поэтому, если вглядываться в будущее таксономической иерархии и номенклатуры не сквозь «розовые очки» революционного романтизма, а с более реалистических позиций, то, наверное, более приемлемой окажется не столь радикальная послелиннеевская система...».

Розовые очки и революционный романтизм не помешали, однако, создать в одной из цитаделей отечественной зоологической систематики, Зоологическом институте РАН, Центр коллективного пользования «Таксон», где ведутся исследования по молекулярной систематике самых разнообразных животных [Абрамсон и др., 2004]. Аналогичные Центры создаются в других институтах РАН (и даже в Ботаническом !), на биологическом факультета МГУ и в целом ряде других учреждений.

Что касается замечаний И. Я. Павлинова о Филокодексе, то они удивительно сходны по духу с высказываниями А. Л. Тахтаджяна о геносистематике тридцатилетней давности [Takhtajan, 1973].

К последней из перечисленных выше идей все более склоняются исследователи, использующие методы геносистематики для решения чисто практических задач, например, селекции новых разновидностей растений. Идея генотипирования видов растений (выдачи им «молекулярных паспортов») с годами приобретает все больше сторонников.

При всей привлекательности этих идей, модификация существующих систем – это очень сложный и даже опасный путь, как и идея о создании «интегративной систематики» (см., например, [Семихов, 1999]). Но еще не определено, какие из полученных молекулярных данных могут быть использованы для этой цели – обоснованной ревизии существующих систем. Можно ли их действительно использовать для этих целей ? Если да, то достаточно ли для этого уже накопленных молекулярных данных ? Какие особенности организации МГСУ растений наиболее пригодны для решения таких задач ?

«Горячие геносистематические головы» сегодня склонны использовать **любые** молекулярные данные для решения этой проблемы [APG 1998; 2002]. Редкие попытки оценить пригодность тех или иных молекулярных данных для решения проблемы игнорируются. Это не удивительно: будь они в ходу, от предлагаемых ревизий скорее всего пришлось бы отказаться за их недостаточной обоснованностью.

Ревизии систем таксонов любого ранга, которые предлагаются сегодня исходя из свежих результатов работы геносистематиков, переполняют страницы зарубежных ботанических журналов. Первые ласточки появились и в отечественной периодике [Шипунов, 2003]. Не удивительно – как известно, «дурные примеры заразительны». Наиболее предприимчивые даже прорываются со своими идеями в такие казалось бы солидные журналы, как Nature и Science (впрочем, см. гл.7). При этом их авторов нимало не смущает, что сегодняшняя ревизия может существенно отличаться от предложенной теми же авторами всего год-два тому назад, о чем в свежей статье, как правило, даже не упоминается. Обычно речь не идет о том, насколько предлагаемая ревизия соотносится с другими аналогичными предложениями, но сделанными на основании иного набора исходных молекулярных данных. О такой поспешности остается только пожалеть, так как она дискредитирует геносистематику.

Вернемся, однако, к началу. Итак, что же нового предложила геносистематика для изучения биоразнообразия ?

О важности этой проблемы говорят многие. Вот что пишут по этому поводу М. Донохью и В. Альверсон: "Биоразнообразие отражает не просто множество видов на кончиках ветвей дерева, но и само древо жизни. Филогенетические исследования следует поэтому рассматривать как ценное дополнение, а не как кон-

курирующий способ оценки разнообразия видов.» [Donoghue, Alverson, 2000]" Им вторит Е. Вильсон: "Филогенетические реконструкции, на которых сегодня сконцентрировано внимание систематиков, безусловно, достойное занятие..." [E. Wilson, 2000].

Эти призывы нашли отклик. Новые методы анализа биоразнообразия растений уже получили широкое распространение. Тем не менее, не будем забывать, что все эти данные касаются хорошо изученных видов, имеющих в основном «макроскопические» размеры. Это позволяет различать у них множество фенотипических признаков, используемых для понимания их филогенеза и построения систем. Изменения в существующие филогении и системы вносятся в основном в результате изучения растений из ранее мало изученных регионов Земли.

Если же речь идет о мелких и особенно об одноклеточных или примитивно устроенных формах, у которых число анализируемых и поддающихся сопоставлению признаков невелико, либо о глубоко дивергировавших формах, то здесь классические методы не дают результата. Хорошей иллюстрацией может быть работа по филогении рясок, мелких покрытосеменных растений с бедной морфологией [Les et al., 2002].

Наши представления о филогении и системе таких групп, в том числе и тех из них, которые содержатся в наиболее популярных среди российских читателей учебниках и монографиях, сегодня полного доверия не вызывают. Так, использование методов геносистематики буквально взорвало предсуществовавшие филогении и системы водорослей.

Использование методов геносистематики дает результаты и убеждает нас в том, что наши представления о биоразнообразии далеко не полные. Геносистематики буквально «открывают Америки» новых фактов (видов живых организмов), точно так же, как в свое время открытие американских континентов или исследования Африки и Австралии существенно обогатили и до сих пор обогащают представления биологов о многообразии жизни на Земле). Эти открытия явились результатом использования универсального геносистематического метода изучения биоразнообразия в основном мелких форм жизни, например, водорослей планктона. С другой стороны, они пригодны и для установления видового статуса таксона в других группах, в частности, у высших растений. Например, они могут помочь в выявлении видов-двойников у растений, подтвердить или опровергнуть видовой статус таксонов, относительно которых ботаники не выработали общепринятой точки зрения.

Можно уверенно утверждать, что число описанных видов одноклеточных водорослей явно занижено и на самом деле вполне сопоставимо с числом видов образующих многие крупные таксоны высших растений. Изучение семенных растений молекулярными методами в целом ряде случаев также способствовало выделению новых их видов и родов. Впрочем, оставим на совести авторов проблему достоверности и надежности таких ревизий.

Вот в чем суть этого универсального метода. Для анализа мелких форм жизни берутся образцы субстрата, в котором они существуют. Нет необходимости выделять, подбирать для них условия культивирования в лаборатории и анализировать последовательно все организмы, в этих образцах присутствующие. Это могут быть образцы почвы, пробы планктона и другие объекты исследования.

Такие образцы вмещают в себя многие формы жизни, и во всех их ДНК имеются гены рибосомных РНК. Опыты с микроорганизмами показали, что весьма

надежные филогении и системы могут строиться, исходя из результатов сопоставления последовательностей рРНК. Такой подход в известной мере вынужденный и определяется удобствами работы с генами рРНК. Не будем забывать, однако, что ранее мы уже писали об ограниченности метода сопоставления первичных структур рРНК для целей филогенетики и систематики.

Но доля таких последовательностей в геномах анализируемых организмов мала. Чтобы увеличить их долю, используют метод полимеразной цепной реакции (ПЦР).

На следующем этапе амплифицированные последовательности встраивают в плазмиды и размножают бактерии, их несущие.

Далее выделяют отдельные клоны и определяют частичные последовательности вставок в плазмиды – генов рРНК. С помощью компьютеров сопоставляют вновь выделенные последовательности со всеми известными последовательностями рРНК изучаемой группы организмов. Если это известные последовательности ранее изученных организмов, то такие последовательности интереса не представляют и в дальнейшем анализе не используются. Остается, однако, значительная часть **новых** последовательностей. Часть из них может соответствовать организмам уже известным, но у которых структура рРНК ранее не была определена. Это обогащает банк данных о структуре генов рРНК и поощряет исследования изучаемой группы «классическими методами» в поисках ранее не идентифицированных видов.

Научные журналы последних лет выпуска, как отечественные, так и зарубежные, содержат уже множество статей, описывающих эксперименты, выполненные этим методом.

К удивлению биологов, применение нового метода оценки биоразнообразия со всей очевидностью доказало, что наши представления о биоразнообразии растений серьезно недооценивались. В результате проведенных исследований существенно расширен видовой состав уже известных таксонов, обитающих в почве и торфе, в озерах и океанах, в водах термальных источников и других биотопах.

Таким образом, в обозримом будущем можно ожидать новых крупных открытий в изучении биоразнообразия жизни на Земле.

Нельзя не признать, что использование методов геносистематики вдохнуло новую жизнь в классические биологические дисциплины – филогенетику и систематику живых организмов.

Признавая важную роль геносистематики в дальнейшем развитии систематики в широком смысле этого термина, не будем забывать, что история ее становления еще очень коротка, а сумма и достоверность накопленных знаний несравнимо меньше, чем у «классической» систематики. Образно говоря, геносистематика сегодня находится в эмбриональной стадии своего развития. По этой причине геносистематик в своих исследованиях еще долго будет опираться на достижения классической ботаники. И все же анализ первых полученных геносистематиками результатов позволяет надеяться на ее плодотворное будущее.

Напоследок скажу, что автор не питает надежд, что эта книга немедленно повернет отечественную ботанику на новые рельсы (мировая наука на них, слава Богу, уже стоит). Что ж, и вода камень точит.

ЛИТЕРАТУРА

Абрамсон Н. И., Ананьева Н. Б., Подлипаев С. А., Пугачев О. Н. Коллекции ДНК – новый путь изучения и сохранения биологического разнообразия. В сб. Фундаментальные зоологические исследования: теория и методы. KMK Sc. Press. М.: С.-П. 2004. Стр. 273–282.

Азаркина М. А., Панкратова Г. Н. Периодические издания как источник информационного обеспечения исследований по филогении растений. // XI международн. совещ. филог. раст., тезисы докл., М.: Изд. Центра охраны дикой природы, 2003. С. 5–11.

Амерханова М. Б., Федотов Ф. Р., Шиян А. Н., Винецкий Ю. П. Расщепление ДНК высших растений рестрикционной эндонуклеазой EcoR1. //Докл. АН СССР. 1976. Т. 227. С. 746–749.

Антонов А .С. Экспериментальное обоснование некоторых концепций геносистематики: Дис. д-ра биол. наук. М: МГУ. 1973. 297с.

Антонов А. С. Геносистематика: достижения, проблемы и перспективы. // Успехи соврем. биологии. 1974. Т. 77. С. 31–47.

Антонов А. С. Существуют ли молекулярные предпосылки ревизии филогении и системы высших растений ? // Журн. общ. биологии. 1999. Т. 60, N 3. С. 245–276.

Антонов А. С. О возможных причинах расхождений взглядов фено- и геносистематиков на филогению и систему высших растений // Бот. журнал. 2000а. Т. 85(1). С. 3–11.

Антонов А. С. Основы геносистематики высших растений. М.: Наука-Интерпериодика. 2000б. 135 с.

Антонов А. С., Белозерский А. Н. Сравнительное изучение нуклеотидного состава дезоксирибонуклеиновых кислот некоторых позвоночных и беспозвоночных животных // Докл. АН СССР. 1961. Т. 138. С. 1216–1220.

Антонов А. С., Мирошниченко Г. П., Слюсаренко А. Г. Данные о первичной структуре ДНК в систематике растений // Успехи соврем. биологии. 1972. Т. 74. С. 247–261.

Антонов А .С., Троицкий А. В. Результаты изучения эволюции рРНК растений заставляют усомниться в универсальности гипотезы "молекулярных часов" // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 1986. Т. 22. С. 343–350.

Банникова А. А. Молекулярные маркеры и современная филогенетика млекопитающих // Журн. Общ. Биол. 2004. Т. 65(4). С. 278 – 305.

Белозерский А. Н. Нуклеопротеиды и нуклеиновые кислоты растений и их биологическое значение. Доклад на 14-м ежегодном Баховском чтении. 1959. М. Изд-во АН СССР.

Белозерский А. Н. Биохимия нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов. М.: Наука. 1976 а, С. 28–51.

Белозерский А. Н. Нуклеиновые кислоты и эволюция растений. М.: Наука, 1976 б, С. 275 – 294.

Белозерский А. Н. Нуклеиновые кислоты и их связь с эволюцией, филогенией и систематикой организмов // IV Международный биофизический конгресс. Тезисы симп. докладов. М. Изд. АН СССР. 1972.

Белозерский А. Н., Медников Б. М. Нуклеиновые кислоты и систематика организмов. // Природа. 1971. № 8. С. 9–12.

Белозерский А. Н., Спирин А. С. Состав нуклеиновых кислот и систематика // Изв. АН СССР. Сер. биол.1960. N 1. С. 64–72

Беридзе Т . Г. Сателлитные ДНК высших растений // Изв. АН ГССР. Сер. биол. 1976. Т. 2. С. 259–271.

Беридзе Т. Г. Сателлитная ДНК. М.: Наука. 1976. 120 С.

Бикбулатова С. М., Куликов А. М., Гималов Ф. Р. и др. Использование полимеразной цепной реакции при оценке качества сырья для производства макаронных изделий и готовой продукции // Хранение и переработка сельхозсырья. 2003а. Т. 7. С 48–50.

Бикбулатова С. М., Сабиржанов Б. Е., Куликов А. М. и др. Гены *WAXY* и филогения пшенично-эгилопсного альянса // Сб. тезисов докл. 4-й Международной конф. «Геном растений», Одесса, ЮБЦ в растениеводстве (Украина), 2003б. С. 12.

Благовещенский А. В., Александрова Е. Г. Биохимические основы филогении высших растений. М.: Наука, 1974.

Боброва В. К., Горемыкин В. В., Троицкий А. В., Вальехо-Роман К. М., Антонов А. С. Молекулярно-биологические исследования происхождения покрытосеменных растений // Журн. общ. биологии. 1995. Т. 56. С. 645–661.

Боброва В. К., Троицкий А. В., Мелеховец Ю. Ф. Нуклеотидные последовательности хлоропластных 4,5S рРНК *Mnium rugicum* и *Marchantia polymorpha* : различия в скорости эволюции у мохообразных и покрытосеменных растений. // Докл. АН СССР. 1985. Т. 281. С. 193–195.

Бородовский М. Ю., Певзнер П. А. Статистические методы анализа генетических текстов. В сб. «Компьютерный анализ генетических текстов», Ред. М. Д. Франк-Каменецкий, М., Наука: 1990. С. 36 – 80.

Брик А. Ф., Сиволап Ю. М. Молекулярно-генетическая идентификация и паспортизация сортов сои (*Glycine max L.*) // Генетика. 2001. Т. 37(9). С. 1266–1273.

Вальехо-Роман К. М. Гибридизация ДНК. В сб. «Молекулярные основы геносистематики». М.: Изд. МГУ, 1980.

Вальехо-Роман К. М., Антонов А. С., Пименов М. Г. Гомологии в ДНК зонтичных подсемейства Apioideae // Докл. АН СССР. 1979. Т. 245. С. 1021–1024.

Вальехо-Роман К. М., Антонов А. С., Камалетдинова М. А. Анализ филогенетических отношений некоторых родов зонтичных методом гибридизации ДНК // Докл. АН СССР. 1982. Т. 262. С. 749–753.

Ванюшин Б. Ф., Огаркова О. А. Отсутствие содержащих метилированный аденин GmбATC-последовательностей в хлоропластных и ядерных ДНК бобовых растений // Биохимия. 1990. Т. 55. N 5. С. 946–950.

Васильева Л. Н. Возможна ли система без рангов ? // X моск. совещ. по филогении растений. М.: МОИП, МГУ, 1999, С. 46–48.

Вахитов В. А., Чемерис А. В., Сабиржанов Б. Е. и др. Филогенетические взаимоотношения родов *Triticum L.* и *Aegilops L.* и нуклеотидные последовательности промоторных областей рДНК их отдельных представителей // Генетика. 2003. Т. 39(1). С. 5–17.

Вейр Б. Анализ генетических данных. Дискретные генетические признаки. М.: Мир. 1995.

Волькештейн М. В. Теория информации и эволюция. Кибернетика живого// Биология и информация. М.: Наука. 1984. С.45–53.

Воронцов Н. Н. Развитие эволюционных идей в биологии. М.: «КМК». 2004.

Гардинер А. А. Молекулярная филогения бокоплодных мхов (Bryopsida, Musci) по результатам анализа ядерных и хлоропластных последовательностей ДНК. Автореф. дисс. канд. биол.наук М.: 2004.

Гасфилд Д. Строки, деревья и последовательности в алгоритмах. С.-П., Невский проспект, 2003.

Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития. 3-й ВОГИС (тезисы докладов) М., 2004.

Геном растений. Сб. тезисов 4-й межд. конф. Одесса, Украина, 2003. 83 с.

Гиббс У. «Теневая» часть генома: сокровища на свалке. // В мире науки. 2004. N 2. С. 21–27.

Гостимский С. А., Кокаева З. Г., Боброва В. К. Использование молекулярных маркеров для анализа генома растений // Генетика. 1999. Т. 35, N 11. С. 1538–1549.

Гречко В. В. Молекулярные маркеры ДНК в изучении филогении и систематики // Генетика. 2002. Т. 38, N 8. С. 1013–1033.

Ежова Т. А., Склярова О. А. Гены, контролирующие структуру соцветия, и их возможная роль в эволюции // Онтогенез. 2001. Т. 32, N 6. С. 462–470.

Ежова Т. А., Солдатова О. П., Пенин А. А., Шестаков С. В. Молекулярно-генетическое картирование геномов растений. М.: МАКС Пресс. 2002. 70 с.

Журавлев Ю. Н., Артюкова Е. В., Козыренко М. М., Реунова Г. Д. Изучение генетических связей между дальневосточными видами семейства Araliaceae методом RAPD // Генетика. 2003. Т. 39, N 1. С. 57–63.

Инге-Вечтомов С. Г. Блочный принцип в теории эволюции. Перспективы и парадоксы. В сб. Фундаментальные зоологические исследования: теория и методы. КМК SC. Press. М—С.-П. 2004. С. 74–87.

Кержнер И. М., Коротяев Б. А. Прошлое, настоящее и будущее таксономии. В сб. Фундаментальные зоологические исследования: теория и методы. КМК Sc. Press, М–С.-П. 2004. С. 10–19.

Кимура М. Молекулярная эволюция: теория нейтральности. М.: Мир. 1985.

Корогодин В. И. Информация и феномен жизни. Пущино, 1991. 202 с.

Корочкин Л. И. Связь онто- и филогенеза в генетическом освещении Проблема макромутаций (морфологический и молекулярный аспекты) // Генетика. 2002. Т. 38. С. 727–738.

Кочиева Е. З. Геномный полиморфизм представителей сем. Solanaceae (род *Solanum*, род *Lycopersicon*, род *Capsicum*). Автореф. дисс. доктора биол. наук. М.: ТСХА, 2004.

Кочиева Е. З., Горюнова С. В., Поморцев А. А. RAPD-маркирование геномов представителей рода *Hordeum* .// Генетика. 2001. Т. 17, N 8. С. 1088–1094.

Кочиева Е. З., Рыжова Н. Н., Храпалова И. А., Пухальский В. А. Определение генетического полиморфизма и филогенетических связей у представителей рода *Lycopersicon* (Tourn.) Mill. методом маркирования микросателлитных последовательностей (ISSR) // Генетика. 2002. Т. 38. С. 1133–1142.

Красилов В. А. Происхождение и ранняя эволюция цветковых растений. М.: Наука, 1989, 263 с.

Кудрявцев А. М., Мартынов С. П., Броджио М., Буятти М. Оценка полиморфизма по микросателлитным локусам у сортов яровой твердой пшеницы (*Triticum durum Desf.*). // Генетика. 2004. Т. 40, N 10. С. 1343–1351.

Курбатский В. И. Происхождение покрытосеменных (новые взгляды на решение проблемы). Томск, 1993. 183 с.

Лутова Л. А., Проворов Н. А., Тиходеев О. Н. и др. Генетика развития растений. С.-П.: Наука, 2000. 539 с.

Любищев А. А. Значение и будущее систематики. // Природа. 1971. N 2.С. 15–18.

Майр Э. Принципы зоологической систематики. М.: Мир, 1971. 454 с.

Максам А. М., Гилберт У. Метод определения последовательности ДНК (секвенирование) после введения метки в конец молекулы и расщепления ее по основаниям // Молек. биология. 1986. Т. 20. С. 581–637.

Маринова Е. И., Антонов А. С., Белозерский А. Н. Гомологии в первичных структурах ДНК некоторых однодольных растений // Докл. АН СССР. 1969 а. Т. 184. С. 483–486.

Маринова Е. И., Владыченская Н. С., Антонов А. С. Нуклеотидный состав ДНК некоторых однодольных растений // Там же, 1969, Т. 185 С. 945–948.

Медников Б. М. Онтогенез и теория информации // Природа. 1971. N 7. С. 25.

Мейен С. В. Следы трав индейских // М.: Мысль, 1981. С. 159.

Мейен С. В. Гипотеза происхождения покрытосеменных от беннетитов путем гамогетеротомии // Журн. общ. биол. 1986. Т. 68, N 3. С. 291–308.

Мейен С. В. Основы палеоботаники. М.: Недра, 1987

Мейен С.В. Листья на камне // М.: Геос, 2001.

Миронов А.А. Поиск гомологий. В сб. «Компьютерный анализ генетических текстов», Ред. М. Д. Франк-Каменецкий, М.: Наука. 1990. С. 11–35.

Мирошниченко Г. П., Дьяченко Л. Ф. Современные методы выделения ДНК из высших растений // Успехи совр. биол. 1981. Т. 91. С. 49–60.

Неи М., Кумар С. Молекулярная эволюция и филогенетика. КВЩ, Киев, 2004.

Оганисян А. С., Кочиева Е. З., Рысков А. П. Маркирование видов и сортов картофеля с помощью метода RAPD-PCR // Генетика. 1996. Т. 32, N 3. С. 448–451.

Одинцова М. С. ДНК хлоропластов и митохондрий. М.: ВИНИТИ, 1976. (Итоги науки и техники, Биол. химия, Т. 10).

Оно С. Генетические механизмы прогрессивной эволюции. М.: Мир, 1973

Павлинов И. Я. Рецензия на книгу М. Ерешевского "Нищета линнеевской иерархии: философское исследование биологической систематики" // Журн. общ. биол. 2004. Т. 65, N 5. С. 442–448.

Пахомова М.В. Нуклеотидный состав и содержание метилированных оснований в ДНК водорослей Белого моря // Вестник МГУ (биол.). 2002. N 1. С.18–21.

Певзнер П. А. Физическое (рестрикционное) картирование молекул ДНК. В сб. «Компьютерный анализ генетических текстов». Ред. М. Д. Франк-Каменецкий. М.:Наука, 1990. С. 154 – 188.

Петров Н. Б. Денатурация и реассоциация ДНК. В сб. «Молекулярные основы геносистематики», М.: Изд. МГУ, 1980.

Полетаев И. А. К определению понятия «информация».1. Семантический аспект. Об «информации по смыслу» // Исследования по кибернетике, А.А. Ляпунов. Ред. М.: Сов. радио, 1970. С. 211–227.

Ратнер В. А. Генетические управляющие системы. Новосибирск. Наука, 1966. С. 91–92.

Ратнер В. А. Концепция молекулярно-генетических систем управления. Новосибирск: Наука, 1993.

Ратнер В. А. Генетика, молекулярная кибернетика. Личности и проблемы. Новосибирск: Наука, 2002. С. 172– 175.

Рахимова Г. М., Троицкий А. В., Кликунова И. Н., Антонов А. С. Филогенетический анализ частичных нуклеотидных последовательностей 18S рРНК 14 видов растений // Молекуляр. биология. 1989. Т. 23. С. 830–842.

Рыжова Н. Н., Горюнова С. В., Томилов А. А., Кочиева Е. З. Выявление двух типов внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS) рДНК в геноме представителей рода *Capsicum* // Докл. Акад. наук. 2002. Т. 387, N 2. С. 282–285.

Рыжова Н. Н., Кочиева Е. З. Анализ микросателлитных локусов хлоропластного генома перца (род *Capsicum*) // Генетика. 2004. Т. 40, N 8. С. 1093–1098.

Сазонова И. Ю, Козыренко М. М. и др. ДНК из разных органов дальневосточных лиственниц и ее пригодность для RAPD-аназиза // Изв. АН. Сер. биол. 2001,N 2. С. 243–248.

Свердлов Е. Д. Микрокосм генома // Молек. биология. 1999. Т. 33. С. 917–940.

Семихов В. Ф. О необходимости перехода к интегративной систематике растений // X Моск. совещ. по филогении растений, М.: МОИП, МГУ. 1999, С. 151–154.

Семихов В. Ф., Арефьева Л. П., Новожилова О. А., и др. Систематическое положение порядков Podocarpales, Cephalotaxales и Taxales по данным сравнительной анатомии и биохимии семян // Изв. РАН. Сер. биол. 2001. N5. С. 544–556.

Семихов В. Ф., Арефьева Л. П., Золкин С. Ю. и др. Оценка отношений голосеменных и покрытосеменных растений на основе использования биохимических методов // Там же. 2004. N 1, с. 26–41.

Скворцов А. К. Вид в систематике сегодняшнего дня. Эволюционная биология: материалы конференции «Проблемы вида и видообразования». Ред. В. Н. Стегний, Томск: Томский гос. университет, 2001. Т. 1, с. 122–127.

Слюсаренко А. Г. Первичная структура ДНК как таксономический признак у высших растений // В сб. «Строение ДНК и положение организмов в системе». Ред.: А. Н. Белозерский и А. С. Антонов. М.: Изд-во МГУ, 1972. С. 196–210.

Соколов Д.Д. Морфология и система трибы Loteae D.C. семейства Leguminosae. Автореф. дис. доктора биол. наук. М.: МГУ, 2003.

Соколов Д.Д., Тимонин А.К. О преимущественно мужской теории происхождения цветка покрытосеменных и монофилии современных голосеменных растений // Журн. общ. биол. 2006 (в печати).

Стегний В. Н. Архитектоника генома. Системные мутации и эволюция. Новосибирск. Изд-во Новосибирского ун-та. 1991.

Строение ДНК и положение организмов в системе. Сб. статей под ред. А.Н. Белозерского и А.С. Антонова. М.: Изд. МГУ, 1972.

Тахтаджян А. Л. Наука о многообразии живой природы // Природа. 1973. N 6, С. 2–9.

Тахтаджян А. Л. Происхождение моховидных // Жизнь растений. Т. 4. Ред.: Грушвицкий И. В., Жилин С. Г. М.: Просвещение. 1978. С. 54–55.

Тахтаджян А. Л. Макроэволюционные процессы в истории растительного мира // Бот. журнал. 1983. Т. 68, N 12. С. 1593–1603.

Тахтаджян А. Л. Система магнолиофитов. Л.: Наука. 1987. 439 с.

Тахтаджян А. Л. Principia tectologica. Принципы организации и трансформации сложных систем: эволюционный подход. С.-П.: СПХВА. 2001. с. 56.

Тимофеев-Ресовский Н. В., Циммер К. Г., Дельбюк М. О природе генных мутаций и структуре гена // Н.В. Тимофеев-Ресовский. Избранные труды. Ред. О.Г. Газенко, В.И. Иванов. М.: Медицина, 1996. С. 105–153.

Тихомиров В. Н. Хемосистематика и эволюционная биохимия высших растений. М.: ГБС АН СССР, 1979. С. 37–38.

Троицкий А. В. Исследования по молекулярной филогенетике растений: от внутривидового полиморфизма до макросистематики. Автореф. дисс. доктора биол. наук. М.: МГУ. 1999. 64 с.

Тугучева Е. М., Кочиева Е. З. Использование микросателлитных последовательностей (STR) при анализе филогенетических отношений и маркировании генотипов злаков // Сельхоз. биотехнология. 2000. Т. 1. С. 32–38.

Уотермен М. С. Выравнивание последовательностей. В сб. «Математические методы для анализа последовательностей ДНК». Ред. М. С. Уотермен. М.: Мир. 1999.

Филокодекс: http://www.ohiou.edu/phylocode.

Фортэ А. В., Игнатов А. Н., Пономаренко В. В., и др. Филогения видов яблони рода *Malus* на основе оценки морфологических признаков и молекулярного анализа ДНК // Генетика. 2002. Т. 38. С. 1357–1359.

Чаргафф Э. Белибердинское столпотворение // Химия и жизнь. 1976. N 7. С. 45–49.

Чемерис А. В., Ахунов Э. Д., Вахитов В. А. Секвенирование ДНК. М.: Наука. 1999.

Ченцов Ю. С. Введение в клеточную биологию. М.: ИКЦ "Академкнига", 2004. С. 50 –211.

Шипунов А. Б. Система цветковых растений: синтез традиционных и молекулярно-генетических подходов. // Журн. общ. биол. 2003. Т. 64, N 6. С. 501–509.

Шмальгаузен И. И. Кибернетические вопросы биологии. Новосибирск: Наука. 1968. 223 с.

Шнеер В. С. Иммунохимический метод сравнения белков в систематике растений. // Бот. Журнал. 1988. Т. 73, N 8. С. 1073–1085.

Шнеер В. С. Хлоропластная ДНК как источник информации для систематики и филогении высших растений. // Ботан. журн. 1991. Т. 76. С. 17–32.

Шнеер В. С. Филогенетические отношения таксонов в семействах Iridaceae и Apiacae по результатам серологического анализа. // Автореф. дисс. доктора биол. наук, БИН РАН. С.-П. 2000. 45 с.

Шредингер Э. Что такое жизнь ? М. Атомиздат, 1972.

Юрина Н. П., Одинцова М. С. Сравнительная характеристика структурной организации геномов хлоропластов и митохондрий растений // Генетика. 1998. Т. 34. С. 5–22.

Яцентюк С. П. Молекулярная филогения моховидных и плауновидных по результатам анализа некоторых последовательностей хлоропластной ДНК // Дисс. канд. биол. наук, М.: МГУ, 2001а.

Яцентюк С. П., Вальехо-Роман К. М., Самигуллин Т. Х. и др. Эволюция Lycopodiaceae по результатам секвенирования спейсерных последовательностей генов хлоропластной рРНК // Генетика. 2001б. Т. 37, N 9. С. 1274–1280.

Aagesen L., Sanso A. M. The phylogeny of Alstroemeriaceae, based on morphology. *rps16* intron, and *rbcL* sequence data // Syst. Botany. 2003. Vol. 28, N 1. P. 47–69.

Ablett E. M., Playford J., Mills S. The use of rubisco DNA sequences to examine the systematic position of *Hernandia albiflora* (C.T.White) Kubitzki (Hernandiaceae), and relationships among the Laurales // Austrobaileya. 1997. Vol. 4. P. 601–607.

Adachi, J., Kosuge K., Denda T., Watanabe K. Phylogenetic relationships of the Berberidaceae based on partial sequences of *gapA* gene // Plant Syst. Evol. 1995. Vol 9. suppl. P. 351–353.

Adachi J., Waddell P. J., Martin W., Hasegawa M. Plastid genome phylogeny and a

model of amino acid substitution for proteins encoded by chloropast DNA // J. Mol. Evol. 2000. Vol. 50, N 4. P. 348–358.

Adams K. L., Song K., Roessler P. G., et al. Intracellular gene transfer in action: Dual trasncription and multiple silencing of nuclear and mitochondrial *cox2* genes in legumes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. Vol. 96. P. 13863–13868.

Adams K. L., Cronn R., Percifield R., et al. Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organ-specific reciprocal silencing // Ibid. 2003. Vol. 100. P. 4649–4654.

Akashi H., Kreitman M. Molecular evidence for natural selection // Annu. Rev. Ecol. Syst. 1995. Vol. 26. P. 403–422.

Albach D. C., Soltis P. S., Soltis D. E., Olmstead R. G. Phylogenetic analysis of the Asteridae s.l. based on sequences of four genes // Amer. J. Bot. 1998. Vol. 85, N 6. P. 92.

Alfaro M. E., Zoller S., Lutzoni F. Bayes or bootstrap ? // Mol. Biol. Evol. 2003. Vol.20, N 2. P. 255 – 266.

Alvarez I , Wendel J. F. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference // Mol. Phylogenet. Evol. 2003. Vol. 29. P. 417–434.

Alverson W. S., Karol K. G., Baum D. A. et al. Circumscription of the Malvales and relationships to other rosidae: evidence from *rbcL* sequence data. // Amer. J. Bot. 1998. Vol. 85. P. 876–887.

Alverson W. S., Whitlock B. A., Nyffeler R. et al. Phylogeny of core Malvales: evidence from *ndhF* sequence data. // Ibid. 1999. Vol. 86. N 10. P. 1474–1486.

An S. S., Mopps B., Weber K. et al., The origin aand evolutionof green algal and plant actins. // Mol. Biol. Evol. 1999. Vol. 16, N 2. P. 275–285.

Anderberg A. A., Rydin C, Kallersjo M. Phylogenetic relationships in the order Ericales s.l.: analysis of molecular data from five genes from plastid and mitochondrial genomes // Amer. J. Bot. 2002. Vol. 89. P. 677–687.

Anderberg A. A., Stahl B., Lallersjo M. Phylogenetic relationships in the Primulales inferred from *rbcL* sequence data // Plant Syst. Evol. 1998. Vol. 211. N 1/2. P. 76–84.

Andersen R. A. Biology and systematics of heterocont and haptophyte algae // Amer. J. Bot. 2004. Vol. 91, N 10. P. 1508–1522.

Andreasen K., Bremer B. Combined phylogenetic analysis in the Rubiaceae-Ixoroideae: morphology, nuclear and chloroplast DNA data // Ibid. 2000. Vol. 87. P. 1731–1748.

Anfinsen C. The molecular basis of evolution. N.Y.: Wiley, 1959.

Antonov A. S. DNA: origin, evolution, and variability // Chemical evolution and the origin of life. Ed. R. Buvet, C. Ponnamperuma. Amsterdam: North-Holland, 1971. P. 420–424.

Antonov A. S. Molecular analysis of plant DNA genomes: conserved and diverged DNA sequences. In: DNA systematics: Plants. S. K. Dutta. Ed. Boca Raton. CRC press, 1986a. Vol. 2. P. 172–184.

Antonov A. S. Plant DNA: Structure and evolution. In: Sov. Sci. Rev., ser. D. 1986b. Vol. 6 P. 1–32.

Antonov A. S. Is Darwin's abominable mystery solved ? / In "Evolutionary biochemistry and related areas of physico-chemical biology", Eds. B. F. Poglazov et al., Bach instiute of biochemistry and ANKO. Moscow. 1995. P. 273–282.

Antonov A. S., Valiejo-Roman K. M., Pimenov M. G, Beridze N. A. Non-equivalency of genera in Angiospermae: evidence from DNA hybridization studies // Plant Syst. Evol. 1988.Vol. 161. P. 155–168.

Antonov A. S., Troitsky A. V., Samigullin T. H. et al. Early events in the evolution of angiosperms deduced from chloroplast rDNA ITS 2-4 sequence comparisons / Intern. symp. fam. Magnoliaceae: Abstracts. Guangzhou (China), 1998. P. 41.

APG, 1998. An ordinal classification for the families of flowering plants // Ann. Missouri Bot. Gard. 1998. Vol. 85, N 4. P. 531–553.

APG II. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants // Bot. Journ. Linn. Soc. London. 2003. Vol. 141. P. 399 – 436.

Applequist W. L., Wallace R. S. Phylogeny of Madagaskar endemic family Didiereaceae // Plant Syst. Evol. 2000. Vol. 221, N 3–4. P. 157–166.

Applequist W. L., Wallace R. S. Deletions in the plastid trnT-trnL intergenic spacer define clades within Cactaceae subfamily Cactoideae // Ibid. 2002. Vol. 231, N 1–4. P. 153–162.

Atchambault A., Bruneau A. Phylogenetic utilityof the leafy/floricaula gene in the Caesalpinioideae (Leguminosaae): gene duplication and novel insertion // Syst. Botany. 2004. Vol. 29, N 3. P. 609–626.

Areces-Mallea A. E., Santiago V., Albert V. A. Molecular systematics of Cactaceae based on the noncoding *trnL* intron of the chloroplast genome // Amer. J. Bot. 1997. Vol. 84, N 6. P. 173.

Arnold C. A. An introduction to paleobotany. New-York: Mc-Graw-Hill, 1947.

Atchison B. A., Whitfeld P. R., Bottomley W. // Mol. Gen. Genet. 1976. Vol. 148. P. 263–269. Цит. по *Kossel H, Edwaeds K., Fritzshe E.* et al. Phylogenetic significance of nucleotide sequence analysis. In "Proteins and nucleic acids in plant systematics", U.Jensen, D.E. Fairbrothers, Eds. Springer. 1983. P. 36–57.

Aso K., Kato M., Banks J. A., Hasebe M. Chracterization of homeodomain-leucine zipper genes in the fern *Ceratopteris richardii* and the evolution of the homeodomain-leucine zipper gene family in vascular plants // Mol. Biol. Evol. 1999. Vol. 16, N 4. P. 544–552.

Avise J. C. Phylogeography: the histoiry and formation of species. Cambridge, Mass. : Harvard Univ. Press. 2000.

Axsmith B. J., Taylor E. L., Taylor T. M. The limitations of molecular systematics: a paleobotanical perspective // Taxon. 1998. Vol. 47. P. 105–107.

Ayliffe M. A., Scott N. S., Timmis J. N. Analysis of plastid DNA-like sequences within the nuclear genomes of higher plants // Mol. Biol. Evol. 1998. Vol. 15, N 6. P. 738–745.

Azuma H., Garcia-Franco J. G., Rico-Gray V., Thien L.B. Molecular phylogeny of the Magnoliaceae: The biogeography of tropical and temperature disjunctions // Amer. J. Bot. 2001. Vol. 88, N 12. P. 2275–2285.

Backlund M., Bremer B. Phylogeny of the Asteridae s.str. based on *rbcL* sequences, with particular reference to the Dipsacales // Plant Syst. Evol. 1997. Vol. 207. P. 3–4.

Backlund M., Oxelman B., Bremer B. Phylogenetic relationships within the Gentianales based on *ndhF* and *rbcL* sequences, with particular reference to the Loganiaceae // Amer. J. Bot. 2000, Vol. 87. P. 1029–1043.

Bailey I. W., Swamy B. Amborella trichopoda Bail. A new morphological type of vesselless dicotyledon // J. Arnold Arbor. 1948. Vol. 29. P. 245–254.

Baker W. J., Asmussen C. B., Barrow S. et al. A molecular phylogeny for the palm family (Arecaceae) based on chloroplast DNA sequence data // Amer. J. Bot. 1997. Vol. 84, N 6. P. 176.

Baldwin B. G. , 1992. Цит. по *Baldwin B.G.* et al. 1994.

Baldwin B. G. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae // Mol. Phylogenet. Evol. 1992. Vol. 1. P. 3–16; Compositae Systematics: Proc. intern. Compositae conf. Kew, 1994.

Baldwin B. G., Sanderson M. J., Porter J. M. et al. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny // Ann. Missouri Bot. Gard. 1995. Vol. 82. P. 247–277.

Bancroft I. Duplicate and diverge: the evolution of plant genome microstructure // Trends in Genet. 2001. Vol. 17. N 2. P. 89–93.

Barker N. P., Linder H. P., Harley E. H. Polyphyly of Arundinoideae (Poaceae): evidence from *rbcL* sequence data // Syst. Biol. 1995a. Vol. 20. P. 423–435.

Barker N. P., Linder H. P., Harley E. H. Phylogeny of Poaceae based on *rbcL* sequences // Syst. Bot. 1995 b. Vol. 20. P. 423–435.

Barker N. P., Linder H. P., Harley E. H. Sequences of the grass-specific insert in the chloroplast *rpoC2* gene elucidate generic relationships of the Arundinoideae (Poaceae) // Syst. Bot. 1999. Vol. 23. P. 327–350.

Barkman T. J., Chenery G., McNeal J. R. et al. Independent and combined analyses of sequences from all three genomic compartments converge on the root of flowering plant phylogeny // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. Vol. 97. P. 13166–13171.

Barrier M., Robichaux R., Puruggaman M., 2001. Цит. по *Montieri S.* et al., 2004.

Basu D., Debesh K., Schneider-Poetsch H.-J. et al. Rice PHYC gene: structure, expression, map position and evolution // Plant Molec. Biol. 2000. Vol. 44. P. 27–42.

Bateman R. M. Morphometric reconstruction, paleoecology and phylogeny of Lycopods from Oxroad Bay, SE Scotland // Paleontographica. 1992. Vol. 228. P 29–103.

Bateman R. M., Crane P. R., Di Michele W. A. et al. Early evolution of land plants: phylogeny, physiology, and ecology of the primary terrestrial radiation // Annu. Rev. Ecol. Syst. 1998. Vol. 29. P. 263–292.

Baur E. , 1909; цит. по *Hageman*, 2000.

Baulcombe D. An RNA microcosm // Science. 2002. Vol. 297. P. 2002.

Bayer C., Fay M. F., De Bruijn A. Y. et al. Support for an extended family concept of Malvaceae within a recircumscribed order Malvales: a combined analysis of plastid *atp*B and *rbc*L DNA sequences // Bot. J. Linnean Soc. 1999. Vol. 129. P. 267–303.

Bayer C., Starr J. M. Tribal phylogeny of the Asteraceae based on two non-coding chlorolast sequences, the *trnL* intron and *trnL/trnF* intergenic spacers// Ann. Missouri Bot. Gard. 1998. Vol. 85. P. 242–256.

Bayer R. J., Hufford L., Soltis D. E. Phylogenetic relationships in Sarraceniaceae based on *rbc*L and ITS sequences // Syst. Bot. 1996. Vol. 21. P. 121–134.

Beardsley P. M., Olmstead R. G. Redefining Phrymaceae: the placcment of Mimulus, tribe Mimuleae and Phryma // Amer. J. Bot. 2002, Vol. 89. P. 1093–1102.

Becker A., Winter K.-U., Meyer B. et al. MADS-box gene diversity in seed plants 300 million years ago // Mol. Biol. Evol. 2000. Vol. 17. P. 1425–1434.

Beckert S., Steinhauser S., Muhle H., Knoop V. A molecular phylogeny of bryophytes based on nucleotide sequences of the mitochondrial *nad5* gene // Plant Syst. Evol. 1999. Vol. 218. P. 179–192.

Beckert S., Muhle H., Pruchner D., Knoop V. The mitochondrial *nad2* gene as a novel marker locus for phylogenetic analysis of early land plants: a comparative analysis in mosses // Molec. Phylogenet. Evol. 2001. Vol. 18, N 1. P. 117–126.

Beier B.A., Chase M.W., Thulin M. Phylogenetic relationships and taxonomy of subfamily Zygophylloideae (Zygophyllaceae) based on molecular and morphological data // Plant Syst. Evol. 2003. Vol. 240. P. 11–39.

Bell C. D., Edwards E. J., Kim S.-T., Donoghue M. Dipsacales phylogeny based on chloroplast DNA sequences // Harvard Papers in Botany. 2001. Vol. 6, N 2. P. 481–499.

Belhassen E., Atlan A., Couvet D., et al. Mitochondrial genome of *Thymus vulgaris L.*

(Labiate) is highly polymorphic between and among natural populations // Heredity. 1993. Vol. 71. P. 462–472.

Belozersky A., Kiesel A., 1934 (цит. по: Белозерский А.Н. Биохимия нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов. М.: Наука, 1976. С. 28–34) // Hoppe-Seylers Zeitschrift fur physiologische chemie. 1934. Bd. 229, N 4–6. S. 160–166.

Bendich A. J. Plant mitochondrial DNA: unususal variation on a common theme. Genetic flux in plants, Ed. B. Hohn, E.S. Dennis. N.Y.: Springer. 1985. P. 111–138.

Bendich A. J. Why do chloroplasts and mitochondria contain so many copies of their genome ? // BioEssays. 1987. Vol. 6. P. 279–282.

Bendich A. J., Bolton E. T. Relatedness among plants as measured by the DNA-agar technique // Plant Physiol. 1967. Vol. 42. P. 959–967.

Bennett M. D., Smith J. B. Nuclear DNA amounts in angiosperms. // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.. 1976. Vol. 274. P. 227–274.

Bennetzen J. L. The structure and evolution of angiosperm nuclear genomes // Curr. Opin. Plant Biol. 1997. Vol. 1. P. 103–108.

Bergthorsson U., Richardson A. O., Young G. J., et al. Massive horizontal transfer of mitochondrial genes from diverse plant donors to the basal angiosperm *Amborella* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. Vol. 101. P. 17247–17252.

Bharathan G., Janssen B.J., Sinha N., Kellog.A. Phylogenetic relationships and evolution of the KNOTTED class of plant homeodomain proteins // Mol. Biol. Evol. 1999. Vol. 16, N 4. P. 553–563.

Bhattacharaya D., Medlin L. Algal phylogeny and the origin of land plants // Plant Physiol. 1998. Vol. 116. P. 9–15.

Blaxter M. Counting angels with DNA // Nature. 2003. Vol. 421. P. 122–124.

Bobrova V. K., Troitsky A. V., Ponomarev A. G., Antonov A. S. Low-molecular-weight rRNAs sequences and plant phylogeny reconstructions: nucleotide sequences of chloroplast 4.5S rRNAs from *Acorus calamus* (Araceae) and *Ligularia calthifolia* (Asteraceae) // Plant. Syst. Evol. 1987. Vol. 156. P. 13–27.

Bohle U.-R., Hilger H. H., Cerff R., Martin W. Non-coding chloroplast DNA for plant molecular systematics at the infrageneric level // Molecular ecology and evolution: Approaches and applications. Ed. B. Schierwater et al. Basel:Birkhauser. 1994. P. 391–403.

Boivin R., Richard M., Beausiegle D. et al. Phylogenetic inference from chloroplast *chlB* gene sequences of *Nephrolepis exaltata* (Filiicopsida), *Ephedra altissima* (Gnetopsida), and diverse land plants // Mol. Phylogenet. Evol. 1996. Vol. 6. P. 19–29.

Bopp M, Capesius I., New aspects of bryophyte taxonomy provided by molecular approach // Bot. Acta. 1996. Vol. 199. P. 368 – 372.

Boulter D., Gilroy J.S. Partial sequences of 18S ribosomal RNA of two genera from each of six flowering plant families // Phytochemistry. 1992. Vol. 31. P. 1243–1246.

Boulter D., Ramshaw J. A. M., Thompson E. W. et al., A phylogeny of higher plants based on the amino acid sequences of cytochrome C and its biological implications // Proc. Roy. Soc.. London B. 1972. Vol. 181. P. 441–455.

Bousquet J., Strauss S.H., Doerksen A.H., Price R.A. Extensive variation in evolutionary rate of *rbcL* gene sequences among seed plants // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1992a. Vol. 89. P. 7844–7848.

Bousquet J., Strauss S. H., Li P. Complete congruence between morphological and *rbcL*-based molecular phylogenies in birches and related species (Betulaceae) // Mol. Biol. Evol. 1992 b. Vol. 9. P. 1076–1088.

Bowe L. M., Coat G., dePamphilis C. W. Phylogeny of seed plants based on all three plant genomic compartments: extant gymnosperms are monophyletic and Gnetales are derived conifers // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2000. Vol. 97. P. 4092–4097.

Bowe L. M., de Pamphilus C. W. Conflict and congruence among the three plant genetic compartments: phylogenetic analysis of seed plants from gene sequences of *cox1, rbcL* and 18S rDNA // Amer. J. Bot. 1997. Vol. 84, N 6, abstracts, P. 517–518.

Bowe L. M., de Pamphilis C. W. Evolution of the ancient extant conifers-evidence from the mitochondrial gene, *coxI* // Ibid. 1998. Vol. 85, N 6. P. 124.

Bradford J. C., Barnes R. W. Phylogenetics and classification of Cunoniaceae (Oxidiales) using chloroplast DNA sequences and morphology // Syst. Botany. 2001. Vol. 26, N 2. P. 354 – 385.

Bremer B., Andreasen K., Olsson D. Subfamilial and tribal relationships in the Rubiaceae based on *rbcL* sequence data // Ann. Missouri Bot. Gard. 1995. Vol. 82. P. 383–397.

Bremer B., Jansen R. K. Comparative restriction site mapping of chloroplast DNA implies new phylogenetic relationships within Rubiaceae // Amer. J. Bot. 1991. Vol. 78. P. 198–213.

Bremer B., Jansen R. K., Oxelman B, et al. More characters or more taxa for a robust phylogeny – case study for the coffee family (Rubiaceae) // Syst. Biol. 1999. Vol. 48. P. 413–435.

Bremer B., Olmstead R.. G., Olsson D. et al. *RbcL* sequences support exclusionof *Retzia, Desfontainia*, and *Nicodemia* from Gentianales // Pl. Syst. Evol. 1994. Vol. 190. P. 213–230.

Bremer B., Struwe L. Phylogeny of the Rubiaceae and the Loganiaceae: congruence or conflict between morphological and molecular data // Amer. J. Bot. 1992. Vol. 79. P. 1171–1184.

Bremer K. The limits of amino acid sequence data in angiosperm phylogenetic reconstruction // Evolution. 1988. Vol. 42. P. 795 – 803.

Bremer K., Backlund A., Sennblad B. et al. A phylogenetic analysis of 100+ genera and 50+ families of euasterids based on morphological and molecular data with notes on possible higher level morphological synapomorphies // Plant Syst. Evol. 2001. Vol. 229, N 3–4. P. 137–169.

Briggs B. G., Johnson L. A. S. Hopkinsiaceae and Lygianaceae, two new families of Poales in Western Australia, with revisions of *Hopkinsia* and *Lygnia* // Telopea, 2000. Vol. 8. P. 477–502.

Britten R. J. Rates of DNA sequence evolution differ between taxonomic groups // Science. 1986. Vol. 231. P. 1393–1398.

Britten R. J., Rowen L., Williams J., Cameron R .A. Majority of divergence between closely related DNA samples is due to indels // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. Vol. 100. P. 4661–4665.

Brunn A. Y., Chase M. W., Cox A. V. et al. Phylogenetics of Asphodelaceae (Asparagales): an analysis of plastid *rbcL* and *trnL*-F DNA sequences // Ann. Bot. 1999.

Brunsfeld S., Soltis P., Soltis D, et al., Phylogenetic relationships among genera of the conifer families Taxodiiiiaceae and Cupressaceae: evidence from *rbcL* sequences // Syst. Bot. 1994. Vol. 19. P. 253–262.

Bryant D., Moulton V. Neighbor-net: an agglomerative method for the construction of phylogenetic networks // Mol. Biol. Evol. 2004. Vol. 21, N 2. P. 255–265.

Buckler E. S., Ippolito A., Holtsford T. P. The evolution of plant ribosomal DNA: divergent paralogues, pseudogenes, and phylogenetic implications // Amer. J. Bot. 1997a. Vol. 84, N 6. P. 1.

Buckler E. S. 4th., *Ippolito A., Holtsford T. P.* The evolution of ribosomal DNA: divergent paralogues and phylogenetic implications // Genetics. 1997b. V. 145, N 3. P. 821–832.

Budyakova A. A., Ignatov M. S., Yatsentyuk S. P., Troitsky A. V. Systematic position of Habrodon (Habrodontaceae, Musci) as inferred from nuclear ITS1 and ITS2 and chloroplast *trnL* intron and *trn* L-F spacer sequence data // Arctoa. 2003. Vol. 12. P. 137 – 150.

Bukhari Y. M., Koivu K., Togerstedt P. M. A. Phylogentic analysis of *Acacia* (Mimosaceae) as revealed from chloroplast RFLP data // Theor. Appl. Genetics. 1999. Vol. 98. P. 291 – 298.

Bult et al., 1995; цит. по Kuzoff et al., 1998.

Califano A. Advances in sequence analysis // Curr. Opinion Struct. Biol. 2001. Vol. 11. P. 330–333.

Cameron K. M., Chase M. W., Sullivan S. et al. Systematics of Petrosaviaceae: an achlorophyllous, mycotrophyc monocotyledon of problematic phylogenetiic affinity // Amer. J. Bot. 1998. Vol. 85, N 6, abstracts. P. 28.

Cameron K.M., Chase M.W., Whitten W.M. et al. A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: evidence from *rbcL* nucleotide sequences // Amer. J. Bot.. 1999. Vol. 86. P. 208–224.

Cantino P. D., de Queiroz K. PhyloCode: A phylogenetic code of biological nomenclature // http//www. Ohiou.edu/phylocode/printable.html., 2000.

Capesius I., Bopp M. New classification of liverworts based on molecular and morphological data // Plant Syst. Evol. 1997. Vol. 207. P. 87–97.

Carmona M. J., Cubas P., Martinez-Zapater J. M. VFL, the grapevine FLORICAULA/LEAFY ortolog, is expressed in meristematic regions independently of their fate // Plant Physiol., 2002. Vol. 130. P. 68–77.

Carpenter J. M. Uninformative bootstrapping // Cladistics. 1996. Vol. 12. P. 177–181.

Carpenter R., Coen E. S. Floral homeotic mutations produced by transposon mutagenesis in *Antirrhium majus* // Genes Dev. 1990. Vol. 4. P. 1483–1493.

Catalan P., Kellog E., Olmstead R. Phylogeny of Poaceae subfamily Pooideae based on chloroplast *ndhF* gene sequences // Mol. Phylogenet. Evol. 1997. Vol. 8. P. 150–166.

Cattolico R. A. Chloroplast biosystematics: chloroplast DNA as a molecular probe // BioSystems. 1985. Vol. 18. P. 299–306.

Chapman R. L., Buchheim M. A. Ribosomal RNA gene sequences: analysis and significance in the phylogeny and taxonomy of green algae // Crit. Rev. Plant Sci., 1991. Vol. 10. P. 343–368.

Chapman R. L., Buchheim M. A. Green algae and the evolution of land plants: inferences from nuclear-encoded rRNA gene sequences // BioSystems. 1992. Vol. 28. P. 127–137.

Chapman R. L., Waters D. A. Green algae and land plants – an answer at last ? // J. Phycol. 2002. Vol. 38. P. 237 – 240.

Chargaff E. Structure and function of nucleic acids as cell constituents // Feder. Proc. 1951. Vol. 10. P. 654–659.

Cnargaff E. Essays on nucleic acids. Elsevier: Amstrerdam.-L.-NY, 1963.

Chase M. W. Monocot relationships: an overview // Amer. J. Bot. 2004. Vol. 91. P. 1645–1655.

Chase M. H., Cameron K. M., Hillis H. G., Jarrell D. Molecular systematics of the Orchidaceae and other lilioid monocots. In "Proc. 14th World Orchid Conf.", Pridgeon A., Ed., L. 1994. P .61–73.

Chase M. W., De Bruijn A. Y., Cox et al. Phylogenetics of Asphodelaceae (Asparagales): An analysis of plastid *rbcL* and *trnL*-F plastid DNA sequences // Ann. Bot.- London. 2000 a. Vol. 86 N 5. P. 935–951.

Chase M. W., Fay M. F., Savolainen V. High-level classification in the angiosperms: new insights from the perspective of DNA sequence data // Taxon. 2000 b. Vol. 49. P. 685–704.

Chase M. W., Lledo M. D., Crespo M. B., Swenson S. M. When in doubt, put in Flacourtaceae: molecular systematics of Flacourtaceae // Amer. J. Bot. 1996a. S83. Abstract 411.

Chase M. H., Soltis D. E., Olmstead R. G. et al. Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequence from the plastid gene *rbcL* // Ann. Missouri Bot. Gard. 1993. Vol. 80. P. 528–580.

Chaw S.- M., Long H., Wang B., Zharkikh A. The phylogenetic position of the Taxaceae based on 18S rDNA sequences // J. Molec. Evol. 1993. Vol. 37. P. 624–630.

Chaw S.-M., Zharkikh A., Sung H.-M., Lau T.-C., Li W.-H. Molecular phylogeny of gymnosperms and seed plant evolution: analysis of 18S rRNA sequences // Molec. Biol. Evol. 1997. Vol. 14. P. 56–68.

Chaw S.-M., Parkinson C. L., Cheng Y., et al. Seed plant phylogeny inferred from all three plant genomes: monophyly of extant gymnosperms and origin of Gnetales from conifers // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 2000. Vol. 97, N 8. P. 4086–4091.

Chen Z.-D., Manchester S. R., Sun N.-Y. Phylogeny and evolution of the Betulaceae as inferred from DNA sequences, morphology, and paleobotany // Amer. J. Bot. 1999. Vol. 86. P. 1168 – 1181.

Cheng C., Motohashi R., Tsuchimoto S., et al. Polyphyletic origin of cultivated rice: based on the interspersion pattern of SINEs // Mol. Biol. Evol. 2003. Vol. 20, N 1. P. 67–75.

Chiang T.-Y., Schaal B.A. The internal transcribed spacer 2 region of the nuclear ribosomal DNA and the phylogenyof the moss family Hylocomiaceae // Plant Syst. Evol. 2000. Vol. 224, N 3–4. P. 127–137.

Cho Y., Qiu Y.-L., Kohlman P., Palmer J. Explosive invasion of plant mitochondria by a group 1 intron // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1998. Vol. 95. P. 14244-14249.

Civeyrel L., Le Thomas A., Ferguson K., Chase M. W. Critical re-examination of palynological characters used to delimit Asclepiadaceae in comparison to the molecular phylogeny obtained from plastid *matK* sequences // Mol. Phylogenet. Evol. 1997.

Clapham D. H., Kolukisaoglu H. U., Larson C. T. et al. Phytochrome types in *Picea* and *Pinus*. Exression patterns of PHYA-related types // Plant Molec. Biol. 1999. Vol. 40. P. 669–678.

Clark L. G., Clegg M. T. Phylogenetic comparisons among *rbcL* sequences in the Bromeliaceae // Amer. J. Bot. 1990. Vol. 77. P. 115.

Clark L. G., Gaut B. S., Duvall M. R., Clegg M. T. Phylogenetic relationships of the Bromeliiflorae-Commeliniflorae-Zingiberiflorae complex of monocots based on *rbcL* sequence comparisons // Ann. Missouri Bot. Gard. 1993. Vol. 80. P. 987–998.

Clark L. G., Zhang W., Wendel J. E. A phylogeny of the grass family (Poaceae) based on *ndhF* sequence data // Syst. Bot. 1995. Vol. 20. P. 436–460.

Clarke H. D., Downie S. R., Seigler D. S. Implications of chloroplast DNA restriction site variation for systematics of *Acacia* (Fabaceae,Mimosoideae) // Syst. Botany. 2000. Vol. 25, N 4. P. 61228 – 61632.

Clegg M. T. Chloroplast gene sequences and the study of plant evolution // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1993. Vol. 90. P. 363–367.

Clevinger C. C., Panero J. L. Phylogenetic relatioships of North American Celastraceae based on *ndhF* sequence data // Amer. J. Bot. 1998. Vol. 85, N 6. P. 132.

Coleman A. W. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons / Trends in Genetics. 2003. Vol. 19, N 7. P. 370 – 375.

Conran J. G., Chase M. H., Rudall P. J. Two new monocotyledon families Anemarrheniaceae and Behniaceae (Lilianae: Aspargales) // Kew Bull. 1997. Vol. 52. P. 995–999.

Conti E., Fishbach A., Sytsma K. Tribal relationships in Onagraceae: implications from *rbcL* sequence data // Ann. Missouri Bot. Gard. 1993. Vol. 80. P. 672–685.

Conti E., Graham A., Litt A. et al. Interfamilial relationships in Myrtales: molecular phylogeny and patterns of morphological evolution // Syst. Botany. 1997 [1998]. Vol. 22. P. 629–647.

Conti E., Litt A., Sytsma K. Circumscription of Myrtales and their relationship with other rosids: evidence from *rbcL* data // Amer. J. Bot. 1996. Vol. 83. P. 221–233.

Cooper A., Poinar H. N. Ancient DNA: Do it right or not at all // Science. 2000. Vol. 289. P. 1139.

Cornelli P. S., Ward R. G. Mitochondrial genes and mammalian phylogenies: increasing the reliability of branch length estimation // Mol. Biol. Evol., 2000, Vol. 17, N 2, P. 224–234.

Corriveau J. L., Coleman A. W. Rapid screening method to detect potential biparental inheritance of plastid DNA and results for over 200 ahgiosperm tissues // Amer. J. Bot. 1988. Vol. 75, N 10. P. 1443–1458.

Cox C. J., Henderson T. Phylogenetic relationships among the ciliate arthrodontous mosses: evidence from nuclear and chloroplast DNA nucleotide sequences // Ibid. 1997. Vol. 84, N 6. P. 14.

Cox C. J., Goffinet B., Newton A. E. et al., Phylogenetic relationships among the diplolepideous-alternate mosses (Bryidae) inferred from nuclear and chloroplast DNA sequences // Bryologist. 2000. Vol. 103. P. 224 – 241.

Cox C. J., Goffinet B., Shaw A. J., Boles S. B. Phylogenetic relationships among the mosses based on heterogeneous Bayesian analysis of multiple genes from multiple genomic compartments // Syst. Botany. 2004. Vol. 29, N 2. P. 234–250.

Crane P. R., Kenrick P. Problems in cladistic classification: Higher-level relationships in land plants // Aliso. 1997. Vol. 15, N 2. P. 87–104.

Crane P. R., Herendeen P., Friis E. M. Fossils and plant phylogeny // Amer. J. Bot. 2004. Vol. 91, N 10. P. 1683–1699.

Crawford D. J. Plant macromolecular systematics in the past 50 years: one view // Taxon. 2000. Vol. 49. P. 479–501.

Crawford D. J., Kimball R. T., Tadesse M. The generic placement of a morphologically enigmatic species in Asteraceae: evidence from ITS sequences // Plant Syst. Evol. 2001. Vol. 228, N 1–2. P. 63–69.

Crepet W. L. The abominable mystery // Science. 1998. Vol. 282. P. 1653–1654.

Crepet W. L., Nixon K. C., Gandolfo M. A. Fossil evidence and phylogeny: the age of major angiosperm clades based on microfossil and macrofossil evidence from Cretaceous deposits // Amer. J. Bot. 2004. Vol. 91, N 10. P. 1666–1682.

Cronquist A. The taxonomic significance of the structure of plant proteins: a classical taxonomist view // Brittonia. 1976, Vol. 28. P. 1–14.

Cronquist A. An integrated system of classification of flowering plants. 1981. N. Y.: Columbia Univ. Press. 1262 p.

Cronquist A. The evolution and classification of flowering plants // N. Y.: N. Y. Bot. Gard. 1988. 555 p.

Crow C. T., Pike L. M., Cross K. S., Renzaglia K. S. The *psbA* gene sequence can be used to infer phylogenetic relationships among the major lineages of bryophytes // Amer. J. Bot. 1997. Vol. 84, N 6, P. 14.

Cullersjo M., Bergquist C., Anderberg A. Generic realignement in primuloid families of the Ericales s.l.: A phylogenetic analysis based on DNA sequences from three chloroplast genes and morphology // Ibid. 2000. Vol. 87. P. 1325–1341.

Cummings M. P., Otto S. P., Wakeley J. Sampling properties of DNA sequence data in phylogenetic analysis // Mol. Biol. Evol. 1995. Vol. 12. P. 814 – 822.

Cutler D. J. Understanding the overdispersed molecular clock // Genetics. 2000. Vol. 154. P. 1403–1417.

Dahlgren R. M. A revised system of classification of flowering plants // J. Linn. Soc., Bot. 1980. Vol. 80. P. 91–124.

Dang L. H., Pring D. R. A physical map of the sorghum chloroplast genome // Plant Molec. Biol. 1986. Vol. 6. P. 119 – 123.

Davies T. J., Barraclough T. G., Chase M. W., et al. Darwin's abominable mystery: insights from a supertree of the angiosperms // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. Vol. 101, N 7. P. 1904–1909.

Davis, C. C., Bell C. D., Mathews S., Donoghue M. J. Laurasian migration explains Gondwanan disjunctions: Evidence from Malpighiaceae //Ibid. 2002. Vol. 99, N 10. P. 6833–6837.

Davis J. I. A phylogenetic structure of the monocotyledons , as inferred from chloroplast DNA restriction site variation, and a comparison of measures of clade support // Syst. Botany. 1995. Vol. 20. P. 503–527.

Davis J.I., Simmons M.P., Stevenson D.W., Wendel J.W. Data decisivness, data quality, and incongruence in phylogenetic analysis: an example from the monocotyledons using mitochondrial *atpA* sequences // Syst. Biol. 1998, Vol. 47. P. 282–310.

Davis J. L., Stevenson D. W., Petersen G., et al. A phylogeny of monocots, as inferred from *rbcL* and atpA sequence variation, and a comparison of methods of calculating jacknife and bootstrap values // Syst. Botany. 2004. Vol. 29,N 3. P. 467–510.

Dean C., Schmidt R. Plant genomes: a current molecular description // Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol. 1995. Vol. 46. P. 395–418.

Degtjareva G. V., Samigullin T. H., Sokoloff D. D., Valiejo-Roman K. M. Gene sampling versus taxon sampling: is *Amborella* (Amborellaceae) a sister group to all other extant angiosperms ? // Бот. Журнал. 2004. Т. 89. С. 896 – 907.

DeHeij H. Chloroplast DNAs of *Spinacia, Petunia* and *Spirodela* have a similar gene organization // Curr. Genet. 1987. Vol. 7. P. 1–6.

De Luna E., Buck W. R., Akaiwa T. et al. Original phylogeny within the hypnobryalean pleurocarpous mosses inferred from cladistic analyses of three chloroplast DNA sequence data sets: *trnL-F, rps4,* and *rbcL* // Bryologist. 2000. Vol. 103. P. 242 – 256.

Delwiche C. F., Palmer J. D. The origin of plastids and their spread via secondary symbiosis. In "Origins of algae and their plastids", Bhattacharya D., Ed. , Springer, Wien. N.Y. 1995. P. 53–86.

DeMarais D. L., Smith A. R., Britton D. M., Pryer K. M. Phylogenetic relationships and evolution of extant horsetails,I, based on chloroplast DNA sequence data (*rbcL* and *trn L-F*) // Intern. J. Plant Sc. 2003. Vol. 164. P. 737 – 751(цит. по Guillon, 2004).

Denton A. L., McConaughy B. L., Hall B. D. Land plant phylogeny: estimation using RNA polymerase II sequences // Amer. J. Bot. 1998. Vol. 85, N 6. P. 116.

Diamond J. M. Taxonomy by nucleotides // Nature. 1983. Vol. 305. P. 17 – 18.

Dimitry P., Junakovich N. Revising the selfish DNA hypothesis: new evidence on accumulation of transposable elements in heterochromatin // Trends Genet. 1999. Vol. 15, N 4. P. 123–124.

Doebley J, Durbin M., et al. Evolutionary analysis of the large subunit of the carboxylase (*rbcL*) nucleotide sequence among the grasses // Evolution. 1990. Vol. 44. P. 1097–1108.

Donoghue M. J., Alverson W. S. A new age of discovery // Annals Missouri Bot. Garden. 2000. Vol. 87. P. 110 – 126.

Donoghue M. J., Doyle J. A. Seed plant phylogeny: demise of the anthophyte hypothesis // Curr. Biology. 2000. Vol. 10, P. R106–R109.

Donoghue M. J, Eriksson T., Reeves P., et al. Phylogeny and phylogenetic taxonomy of Dipsacales, with special reference to Sinadoxa and Tetradoxa (Adoxaceae) // Harvard Papers in Botany. 2001 Vol. 6, N 2. P. 459–479.

Donoghue M., Olmstead R., Smith J., Palmer J. Phylogenetic relationships of Dipsacales based on *rbcL* sequences // Ann. Missouri Bot. Garden. 1992. Vol. 79. P. 333–345.

Doolittle W. F. Lateral genomics // TIG. 1999. Vol. 15, N 12. P. M5–M8.

Douady C. J., Delsuc F., Boucher Y. et al. Comparison of Bayesian and maximum likelihood bootstrap measures of phylogenetic reliability // Mol. Biol. Evol. 2003. Vol. 20, N 2. P. 2488–254.

Downie S. R., Katz-Downie D. S. A molecular phylogeny of Umbelliferae subfamily Apioideae: evidence from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences // Amer. J. Bot. 1996a. Vol. 82. P. 234–251.

Downie S. R., Katz-Downie D. S , Cho K-Y. Phylogenetic analysis of Apiaceae subfamily Apioideae using nucleotide sequences from the chloroplast *rpoC1* intron // Mol. Phylogenet. Evol. 1996b. Vol. 6. P. 1–18.

Downie S. R., Katz-Downie D. S., Cho K-J. Relationships in the Caryophyllales as suggested by phylogentic analysis of partial chloroplast DNA ORF2280 homolog sequence // Amer. J. Bot. 1997. Vol. 84, N2. P. 253–273.

Downie S. R., Ramanath S., Katz-Downie D. S., Llanas E. Molecular systematics of Apiaceae subfamily Apioideae: Phylogenetic analyses of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer and plastid *rpoC1* intron sequences // Ibid. 1998. Vol. 85. P. 563–591.

Downie S. R., Katz-Downie D. S., Spalik K. A phylogeny of Apiaceae tribe Scandiceae: evidence from nuclear ribosomal DNA internal trasncribed spacer sequences // Ibid. 2000a. Vol. 87, N 1. P. 76–95.

Downie S. R., Katz-Downie D. S, Watson M. F. A phylogeny of the flowering plant family Apiaceae based on chloroplast DNA *rpl16* and *rpoC1* intron sequences: towards a suprageneric classification of subfamily Apioideae.// Ibid. 2000b, Vol. 87. P. 273–292.

Downie S. R., Palmer J. D. Restriction site mapping of the chloroplast DNA inverted repeat a molecular phylogeny of the Asteridae // Ann. Missouri Bot. Gard. 1992a. Vol. 79. P. 266–283.

Downie S. R., Palmer J. D. Use of chloroplast DNA rearragements in reconstructing plant phylogeny. Molecular Systematics of Plants. N. Y.: Chapman and Hall. 1992b. P. 14–35.

Downie S. R., Plunkett G. M., Watson M. F. et al. Tribes and clades within Apiaceae subfamily Apioideae: the contribution of molecular data // Edinb. J. Bot. 2001. Vol. 58(2). P. 301–330.

Downie S. R., Ramanath S., Katz-Downie D. S., Llanas E. Molecular systematics of Apiaceae subfamily Apioideae: phylogenetic analysis of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer and plastid *rpoC1* intron sequences // Ibid. 1998. Vol. 85. P. 563–591.

Doyle J. A., Molecules, morphology, fossils and relationships of angiosperms and Gnetales // Mol. Phylogenet Evol. 1998a. Vol. 9, N 3. P. 448–462.

Doyle J.A. Phylogeny of vascular plants // Ann. Rev. Ecol. Syst. 1998b. Vol. 29. P. 567–599.

Doyle J. A., Donoghue M. A., Zimmer E. A. Integration of morphological and ribosomal RNA data on the origin of angiosperms // Ann. Missouri Bot. Garden. 1994. Vol. 81. P. 419–450.

Doyle J. A., Endress P. K. Morphological phylogenetic analysis of basal angiosperms: comparison and combination with molecular data // Intern J. Plant Sc. 2000. Vol. 161, N 6. P. S121–S153.

Doyle J. J. Gene trees and species trees: molecular systematics as one-character taxonomy // Syst. Bot. 1992. Vol. 17. P. 144–163.

Doyle J. J. Phylogeny of the legume family: an approach to understanding the origins of nodulation // Annu. Rev. Ecol. Syst. 1994. Vol. 25. P. 325–349.

Doyle J. J. Evolution of a plant homeotic multigene family: Towards connecting molecular systematics and molecular developmental genetics // Syst. Biol. 1994. Vol. 43. P. 307–328.

Doyle J. J., Davis J. I., Soreng R. J., et al. Chloroplast DNA inversions and the origin of the grass family (Poaceae) // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1992. Vol. 89. P. 7722–7726.

Doyle J. J., Doyle J. L. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue // Phytochem. Bull. 1987. Vol. 19. P. 11–15.

Doyle J. J. et al. The distribution and phylogenetic significance of a 50-kb chloroplast DNA inversion in the flowering plant family Leguminosae // Mol. Phylog. Evol. 1996. Vol. 5. P. 429–438.

Doyle J. J., Doyle J. L., Ballenger J. A., et al. A phylogeny of the chloroplast gene *rbcL* in the Leguminosae: taxonomic correlations and insights into the evolution of nodulation // Amer. J. Bot. 1997. Vol. 84, N 6. P. 541–554.

Drabkova L., Kirschner J., Seberg O., et al. Phylogeny of Juncacceae based on *rbcL* sequences, with special emphasis on *Lusula* D.C. and *Juncus* L // Plant Syst. Evol. 2003. Vol. 240. P. 133–147.

Driskell P. G. et al., 2004. Цит по W. Martin et al., 2005.

Drummond R. S. M, Keeling D. J., Richardson T. E. et al. Genetic analysis and conservation of 31 surviving individuals of a rare New Zealand tree, *Metrosideros bartlettii* (Myrtaceae) // Mol. Ecology. 2000. Vol. 9. P. 1149–1157.

Dubuisson J.-Y., Hebant-Mauri R., Galtier J. Molecules and morphology: conflicts and congruence within the fern genus *Trichomanes* (Hymenophyllaceae) // Mol. Phylogenet. Evol. 1998. Vol. 9. P. 390–397.

Duff R. J., Nickrent D. L. Characterization of mitochondrial SS (19S) rDNA from holoparasitic plants // Amer. J. Bot. 1997. Vol. 84, N 6. P. 189.

Duff R. J., Nickrent D. L. Phylogenetic relationships of land plants using mitochondrial small-subunit rDNA sequences // Ibid. 1999. Vol. 86. P. 372–386.

Dujon B., Sherman D., Fischer G. et al. (всего более 50 соавторов) Genome evolution in yeasts // Nature. 2004. Vol. 430. P. 35 – 44.

Duvall M. R., Ervin A. B. 18S gene trees are positively misleading for monocot/dicot phylogenies // Mol. Phylogenet. Evol. 2004. Vol. 30. P. 97 – 106.

Eckardt N. A. Everything in its place: conservation of gene order among distantly related plant species // Plant Cell. 2001. Vol. 13. P. 723 – 725.

Eddy S. R. Non-coding RNA genes and the modern RNA world // Nature Revs. Genetics. 2001. Vol. 2. P. 919 – 929.

Eldenas P. K., Linder H. P. Congruence and complementarity of morphological and *trnL–trnF* sequence data and the phylogeny of African Restionaceae // Syst. Botany. 2000. Vol. 25, N 4. P. 692 – 707.

Ellegren H. Microsatellite mutations in the germline: Implications for evolutionary inference // TIG. Vol. 16. 551–558.

Endress M., Sennblad B., et al. A phylogentic analysis of Apocynaceae s.str. and some related taxa in Gentianales: a multidisciplinary approach // Opera Bot. Belg. 1996. Vol. 7. P. 59–102.

Endress M. E., Stevens W. D. The renaissance of the Apocynaceae s.l.:Recent advances in systematics, phylogeny, and evolution: Introduction // Annals Missouri Bot. Gard. 2001. Vol. 88, N 4. P. 517–522.

Ereshefsky M. The poverty of the Linnean hierarcy: A philosophical study of biological taxonomy // Cambridge Univ. Press. 2001. 328 p.

Evans T. M., Systsma K. J., Faden R. B., Givnish T. J. Phylogenetic relationships in the Commelinaceae: a cladistic analysis *of rbcL* sequences and morphology // Syst. Botany. 2003. Vol. 28, N 2. P. 270–292.

Fabre J. H. The life of the fly. L.: Hodder and Stronghton, 1947.

Fan C., Xiang Q-Y. Phylogenetic analysis of Cornales based on 26S rRNA and combined 26S rDNA – *matK-rbcL* sequence data // Amer. J. Bot. 2003. Vol. 90. P. 1357–1372.

Farris J. S., Albert V. A., Kallersjo M., et al. Parsimony jacknifing overperforms neighbour joining // Cladistics. 1996. Vol. 12. P. 99–124.

Fay M. F., Chillean T. P, Chase M. W. "Dendronology"– a molecular approach to monogeric families of uncertain taxonomic affinities // Amer. J. Bot. 1997a. Vol. 84, N 6. P. 191.

Fay M. F., Zaman F. Q., Chase M. W. Molecular systematics of Alliaceae sensu tricto: a combined analysis of *rbcL* and *trnL-F* sequence data // Ibid. 1997b. Vol.84, N 6. P. 191.

Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap // Evolution. 1985. Vol. 39. P. 783 – 791.

Fernando E. S., Gadek P. A., Crayn D. M., Quinn .J. Rosid affinities of Surianaceae: molecular evidence // Mol. Phylogenet. Evol. 1997. Vol. 2. P. 344–350.

Feschotte C., Jiang N., Wessler S. R. Plant transposable elements: where genetics meets genomics // Nature Rev. Genetics. 2002. Vol. 3. P. 329–341.

Fishbein M., Hibsch-Jetter C., Soltis D.E., Hufford L. Phylogeny of Saxifragales (angiosperms, eudicots): analysis of a rapid, ancient radiation // Syst. Biol. 2001. Vol. 50, N 6. P. 817–847.

Flavell R. B., Bennett M. D., Smith J. B., Smith D. B. Genome size and proportion of repeated nucleotide sequences in plants // Biochem. Genet. 1974. Vol. 12. P. 257–269.

Flintoft L. A barcode for life? // Nature Revs. Genetics. 2004a. Vol. 5. P. 805.

Flintoft L. Genes feel the heat // Ibid. 2004 b. P. 810.

Florkin M. Biochemical evolution. N. Y.:Acad. Press, 1949. 627 p.

Fluhr R., Edelman M. Conservation of sequence arrangement among higher plant chloroplast DNAs: molecular cross hybridization among the Solanaceae and between *Nicotiana* and *Spinacia* // Nucl. Acids Res. 1981. Vol. 9. P. 6841–6853.

Foster P. G., Hickey D. A. Compositional bias may affect both DNA-based and protein-based phylogenetic reconstructions // J. Mol. Evol. 1999. Vol. 48. P. 284–290.

Francisco-Ortega J., Jansen R. K., Santos-Guerra A. Chloroplast DNA evidence of colonization, adaptive radiation, and hybridization in the evolution of the Macaronesian flora // Proc. Nat Acad. Sci. US.1996. Vol. 93. P. 4085–4089.

Frankel N., Hasson E., Iusem N., Rossi M. Adaptive evolution of the water stress-induced gene *Asr2* in *Lycopersicon* species dwelling in arid habitat // Mol. Biol. Evol. 2003. Vol. 20, N 2. P. 1955–1962.

Frascaria-Ortega J., Maggia L., Miichaud M., Bousquet J. The *rbcL* gene sequence from chestnut indicates a slow rate of evolution in the Fagaceae // Genome. 1993. Vol. 36. P. 161–188.

Freudenstein J. V., Senyo D. M., Chase M. W. Evolution and phyloenetic significance of a mitochondrial intron in Orchidaceae // Amer. J. Bot. 1998. Vol. 85, N 6. P. 158.

Freudenstein J.V., van den Berg C., Goldman D.H. et al. An expanded plastid DNA phylogeny of Orchidaceae and analysis of jacknife branch support strategy // Amer. J. Bot. 2004. Vol. 91. P. 149–157.

Friedl T. The evolution of green algae. In "Origins of algae and their plastids" Bhattacharaya D., Ed. , Springer: Wien @ N.Y., 1995. P. 87–102.

Friedman W. E. Double fertilization in *Ephedra*, a nonflowering seed plant: its bearing on the origin of angiosperms // Science, 1990. Vol. 247. P. 951–954.

Friedman W. E., Floyd S. K. The origin of flowering plants and the reproductive biology -A tale of two phylogenies // Evolution. 2001. Vol. 55. P. 217–231.

Friedman W. E., Moore R. C., Purugganan M. D. The evolution of plant development // Amer. J. Bot. 2004. Vol. 91, N 10. P. 1726–1741.

Friesen N., Brandes A., Heslop-Harrison J. S. Diversity, origin and distribution of retrotransposons (*gypsy* and *copia*) in conifers // Mol. Biol. Evol. 2001. Vol. 18, N 7. P. 1176–1188.

Frohlich M. W. MADS about Gnetales // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1999. Vol. 96. P. 8811–8813.

Frohlich M. W. An evoltionary scenario for the origin of flowers // Nature Revs. Genetics. 2003. Vol. 4. P. 559–566.

Frohlich M. W., Parker D.S. The mostly male theory of flomer evolutionary origins: from genes to fossils. Syst. Botany. 2000. Vol. 25. P. 155–170.

Frye A. S. L., Kron K. A. RbcL phylogeny and character evolution in Polygonaceae // Syst. Botany. 2003. Vol. 28, N 2. P. 326–332.

Fu C., Qiu Y.-X. Phylogenetic analysis of Cornales based on 26S rRNA and combined 2S rDNA-*matK-rbcL* sequence data // Amer. J. Bot. 2003. Vol. 90. P. 1357–1372.

Fu H., Dooner H. K. Intraspecific violation of genetic colinearity and its implications in maize // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. Vol. 99. 9573–9578.

Fuse S., Tamura M. N. A phylogenetic analysis of the plastid *matK* gene with emphasis on Melanthiaceae sensu lato // Plant Biol. 2000. Vol. 2. P. 415–427.

Gaddick L. R., Rudall P. J., Wilkin P. et al. Phylogenetics of Dioscoreales based on combined analyses of morphological and molecular data // Bot. J. Linnean Soc. 2002. Vol. 138, N 2. P. 123–144.

Gadek P., Alpers D., Quinn C. Combined morphological and molecular analysis of Cupressaceae s.l // Amer. J. Bot. 1997. Vol. 84, N 6. P. 195–196.

Gadek P., Alpers D., Heslewood M., Quinn J. Relationships within Cupressaceae sensu lato: a combined morphological and molecular approach // Ibid. 2000. Vol. 87. P. 1044–1057.

Gadek P. A., Fernando E. S., Quinn C. J. et al. Sapindales: molecular delimitation and infraordinal groups // Ibid. 1996. Vol. 83. P. 802–811.

Gadek P., Quinn C. An analysis of relationships within the Cypressaceae sensu stricto based on *rbcL* sequences // Ann. Missouri Bot. Gard. 1993. Vol. 80. P. 581–586.

Gadek P., Wilson P. G., Quinn C. .. Phylogenetic reconstruction in Myrtaceae using *matK*, with particular reference to the position of *Psiloxylon* and *Heteropyxis* // Austr. Syst. Bot. 1996. Vol. 9. P. 283–290.

Gandolfo M. A., Nixon K. C., Crepet W. L. Cretaceous flowers of Nymphaeaceae and implcations for complex insect entrapment pollination mechanisms in early angiosperms // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. Vol. 101(21). P. 856 – 860.

Garbary D. J. Renzaglia K. S., Duckett J. G. The phylogeny of land plants: a cladistic analysis based on male gametogenesis // Plant Syst. Evol. 1993. Vol. 188. P. 237–269.

Garbary D. J., Renzaglia K. S. Bryophyte phylogeny and evolution of land plants: evidence from development and structure // Bryology of the twenty-first century, Bates J. et al., Eds. Leeds,UK: Maney and Son, Ltd., 1998. P. 45–63.

Gastony G. J., Rollo D. R. Phylogeny and generic circumscriptions of cheilanthoid ferns (Pteridaceae: Cheilanthoiideae) inferred from *rbcL* nucleotide sequences // Amer. Fern J. 1995. Vol. 85. P. 341–360.

Gastony G. J., Ungerer M. C. Molecular systematics and revised taxonomy of the onocleoid ferns (Dryopteridaceae: Onocleeae) // Amer. J. Bot. 1997. Vol. 84, N 6. P. 840–849.

Gaut B., Clark L. et al. Comparison of the molecular evolutionary process at *rbcL* and *ndhF* in the grass family (Poaceae) // Mol. Biol. Evol. 1997. Vol. 14. P. 769–777.

Gaut B. S., Peek A. S., Morton B. R., Clegg M. T. Patterns of genetic diversification within the *Adh* gene family in the grasses (Poaceae) // Ibid. 1999. Vol. 16, N 8. P. 1086–1097.

Gauthier J., Kluge A., Rowe T. Amniote phylogeny and the importance of fossils. Cladistics. 1988. Vol. 4. P. 105–209.

Gee H. Homegrown computer roots out phylogenetic nerworks // Nature. 2000. Vol. 404. P. 214.

Gengler K. M. ITS phylogeny and biogeography of Malesherbiaceae, an endemic of the South American Pacific coastal desert // Amer. J. Bot. 1997. Vol. 84, N 6. P. 196–197.

Gengler-Nowak K. M. Molecular phylogeny and taxonomy of Malesherbiaceae // Syst. Botany. 2003. Vol. 28, N 2. P. 333–344.

Gianassi D. E., Zurawski G., et al. Evolutionary relationships of the Caryophyllidae based on comparative *rbcL* sequences // Syst. Bot. 1992. Vol. 17. P. 1–15.

Gielly L., Taberlet P. The use of chloroplast DNA to resolve plat phylogenies: Noncoding versus *rbcL* sequences // Molec. Biol. Evol. 1994. Vol. 11. P. 769–777.

Giraffa G. Protein coding gene sequences: alternative phylogenetic markers or possible tools to compare ecologocal diversity of bacteria ? // Curr. Genomics. 2001. Vol. 2. P. 243–251.

Givnish T. J., Evans T. M., Pires J. C., Sytsma K. J. Polyphyly and convergent morphological evolution in Commelinales and Commelinidae: evidence from *rbcL* sequence data // Mol. Phylogenet. Evol. 1999. Vol. 12, N 3. P. 360–385.

Givnish T. J., Sytsma K. J., Smith J. F. A re-examination of phylogenetic relationships among bromeliad subfamilies using cpDNA restriction site variation // Amer. J. Bot. 1990. Vol. 77. P. 133.

Givnish T. J., Zihra M. L., Pattersson T. B. et al. Molecular evolution, adaptive radiation, and geographic diversification in the amphiatlantic family Rapateaceae: evidence from *ndhF* sequences and morphology // Evolution, 2000. Vol. 54. P. 1915–1937.

Glulini A., Wang G., Jackson D. Control of phylotaxy by the cytokinin-inducible response regulator homologue, *ABPHYL-1* // Nature. 2004. Vol. 430. P. 1031–1034.

Goff S. A., Ricke D., Lan T.-H., et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. Japonica) // Science. 2002. Vol. 296. P. 92–100.

Goffinet B., Bayer R., Vitt D. Circumscription and phylogeny of the Orthotrichales (Bryopsida) inferred from *rbcL* sequence analyses // Amer. J. Bot. 1998. Vol. 85, N 9. P. 1324–1337.

Goffine B, Cox C. J. Phylogenetic relationships among basal-most arthrodontous mosses with special emphasis on the evolutionary significance of the Funariineae // Bryologist. 2000. Vol. 103. P. 212 – 223.

Goffinet B., Cox C. J., Shaw A. J., Hedderson T. A. The Bryophyta (mosses): systematic and evolutionary inferences from an *rps4* gene (cpDNA) phylogeny // Annals of Bot. 2001. Vol. 87. P. 191–208.

Goldberg R. B. From Cot curves to genomics. How gene cloning established new concepts in plant biology // Plant Physiol. 2001. Vol. 125. P. 4 – 8.

Golenberg E. M., Giannasi D. E., Clegg M. T., et al. Chloroplasr DNA sequence from a Miocene magnolia species // Nature. 1990. Vol. 344. P. 656–658.

Gontcharov A., Marin B., Melkonian M. Are combined analyses better than single gene phylogenies ? A case study using SSU rDNA and *rbcL* sequence comparisons in the Zygnematophyceae (Streptophyta) // Mol. Biol. Evol. 2004. Vol. 21, N 3. P. 612 – 624.

Goremykin V., Bobrova V., Pahnke J. et al. Noncoding sequences from slowly evolving chloroplast inverted repeat in addition to *rbcL* data do not support gnetalean affinities of angiosperms // Mol. Biol. Evol. 1996. Vol. 13. P. 383–396.

Goremykin V. V., Hansmann S., Martin W. Evolutionary analysis of 58 proteins encoded in six completely sequenced chloroplast genomes: revised molecular estimates of two seed plant divergence times // Plant Syst. Evol. 1997. Vol. 206. P. 337–351.

Goremykin V. V., Hirsch-Ernst K. I., Wolfl S., Hellwig F. H. Analysis of *Amborella trichopoda*: chloroplast gene sequence suggests that *Amborella* is not a basal angiosperm // Mol. Biol. Evol. 2003a. Vol. 20, N 9. P. 1499–1505.

Goremykin V. V., Hirsch-Ernst K. I., Wollf S., Hellwig F. H. The chloroplast genome of the basal angiosperm *Calycanthus fertili* – structural and phylogenetic analysis // Plant Syst. Evol. 2003б. Vol. 242. P. 119–135.

Goremykin V. V., Hirsch-Ernst K. I., Wolfl S., Hellwig F. H. The chloroplast genome of *Nymphaea alba*: whole-genome analyses and the problem of identifying the most basal angiosperm // Mol. Biol. Evol. 2004. Vol. 21, N 7. P. 1445–1454.

Graham L. E. Green algae to land plants: An evolutionary transition // J. Pant. Res. 1996. Vol. 109. P. 241–251.

Graham L. E., Cook L. E., Busse J. S. The origin of plants: body plan changes contributing to a major evolutionary radiation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. Vol. 97. P. 4535–4540.

Graham L. E., Delwiche C. F., Mischler B. D. Phylogenetic connections between the "green algae" and the "bryophytes" // Adv. Bryol. 1991. Vol. 4. P. 213–244.

Graham S. W., Barrett S. C. H. The local position of Pontederiaceae in the monocotyledons and the location ot its root // Amer. J. Bot. 1997. Vol. 84, N 6. P. 199.

Graham S.W., Kohn J.R., Morton B.R., et al. Phylogenetic congruence and discordance among one morphological and three molecular data sets from Pontederiaceae // Syst. Biol. 1998. Vol. 47, N 4. P. 545–567.

Graham S. W., Olmstead R. G. Utility of 17 chloroplast genes for inferring the phylogeny of the basal angiosperms // Amer. J. Bot. 2000. Vol. 87. P. 1712–1730.

Graham S. W., Olmstead R. G. Evolutionary significance of an unussual chloroplast DNA inversion found in two basal angiosperm lineages.// Curr. Genet. 2000. Vol. 37, N 3. P. 183–188.

Graham S. W., Reeves P. A., Burns A. C. E., Olmstead R. G. Mictostructural changes in noncoding chloroplast DNA: interpretation, evolution, and utility of indels and inversions in basal angiosperm phylogenetic inference // Int. J. Plant Sc. 2000. Vol. 161 (suppl.). P. 883–896.

Grant V. Plant speciation. 2nd ed. N.Y.: Columbia Univ. press. 1981. 385 p.

Grant V. Primary classification and phylogeny of the Polemoniaceae, with comments on molecular cladistics // Amer.J. Bot. 1998. Vol. 85. P. 741–752..

Grant V. Incongruence between cladistic and taxonomic systems // Amer. J. Bot. 2003. Vol. 90. P. 1263–1270.

Graybeal A. Is it better to add taxa or characters to a difficult phylogenetic problem? Syst. Biol. 1998. Vol. 47. P. 9–17.

Greenwood A. D., Capelli C., Possnert G., Paabo S. Nuclear DNA sequences from late Pleistocene megafauna // Mol. Biol. Evol. 1999. Vol. 16. P. 1466–1473.

Groth-Malonek M., Pruchner D., Grewe F., Knoop V. Ancestors of trans-splicing mitochondrial introns support serial sister group relationships of hornworts and mosses with vascular plants // Mol. Biol. Evol. 2005. Vol. 22. P. 117–125.

Gugerli F., Sperisen C., Buchler U. et al. The evolutionary split of Pinaceae from other conifers: evidence from an intron loss and a multigene phylogeny // Molec. Phylogenet. Evol. 2001. Vol. 21, N 2. P. 167–175.

Gugerli F., Senn J., Anzidei M., et al.. Chloroplast microsatellites and mitochondrial itron 2 sequence indicate congruent phylogenetic relationships among Swiss stone pine (*Pinus cembra*), Siberian stome pine (*Pinus sibirica*), and Siberian dwarf pine (*Pinus pumila*) // Mol. Ecology. 2001. Vol. 10. P. 1489–1497.

Guillon J. M. Phylogeny of horsetails (*Equisetum*) based on the chloroplast *rps4* gene and adjacent noncoding sequences // Syst. Botany, 2004. Vol. 29, N 2. P. 251–259.

Gunderson J. H., Elwood H., Ingold A., et al. Phylogenetic relationships between chlorophytes, chrysophytes and oomycetes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. Vol. 84. P. 823–827.

Gunter L. E., Kochert G., Gianassi D. E. Phylogenetic relationships in the Juglandaceae // Plant Syst. Evol. 1994. Vol. 192. P. 11–29.

Gutell R. R. et al,Comparative anatomy of 16S-like ribosomal RNA // Progr. Nucleic Acids Res. Mol. Biol. 1985. Vol. 32. P. 155–215. Цит. по Coleman, A. W., 2003.

Hagemann R. Erwin Baur or Carl Correns: who really created the theory of plastid inheritance ? // J. Heredit. 2000. Vol. 91. P. 435–444.

Hall J. C., Iltis H. H., Sytsma K. J. Molecular phylogenetics of core Brassicales, placement of orphan genera *Emblingia, Forchhammeria, Tirania,* and character evolution // Syst. Botany. 2004. Vol. 29, N 3. P. 654–669.

Hall J., Sytsma K. J., Iltis H. H. Phylogeny of Capparaceae and Brassicaceae based on chloroplast sequence data // Amer. J. Bot. 2002. Vol. 89. P. 1826–1842.

Ham R. C. H. J. van, t'Hart H., Mes T. H. M., Sandbrink J. M. Molecular evolution of non-coding regions of the chloroplast genome in Crassulaceae and related species // Curr. Genet. 1994. Vol. 25. P. 558–566.

Hamby R. K., Issel L. E., Zimmer L. A. Nuclear and organelle evolution in higher plants – ribosomal RNA as a marker molecule // Genetics. 1987. Vol. 116. P. 20.

Hamby R.K., Zimmer E.A. Ribosomal RNA sequences for inferring phylogeny within the grass family (Poaceae) // Plant Syst. Evol. 1988. Vol. 160. P. 29–37.

Hamby R. K., Zimmer E. A. Ribosomal RNA as a phylogenetic tool in plant systematics. Molecular systematics of pants. Ed. P.S. Soltis et al. N. Y.: Chapman and Hall, 1992. P. 50–91.

Hansen A., Hansmann S., Samigullin T. Antonov A., Martin W. Gnetum and the angiosperms: molecular evidence that their shared morphological characters are convergent, rather that homologous // Molec. Biol. Evol. 1999. Vol. 16, N 7. P. 1006–1009.

Hardig T. M., Soltis P. S., Soltis D. E. Diversification of the North American shrub genus *Ceanithus* (Rhamnaceae): conflicting phylogenies from nuclear ribosomal DNA and chloroplast DNA // Amer. J. Bot. 2000. Vol. 87, N 1. P. 108–123.

Hartl D. L. Molecular melodies in high and low C // Nature Rev. 2000. Vol. 1. P. 145–149.

Hasebe M., Ito M., Kofugi R., Iwatsuki K., Ueda K. Phylogenetic relationships in Gnetophyta deduced from *rbcL* gene sequences // Bot. Mag. Tokyo. 1992a. Vol. 105. P. 385–391.

Hasebe M., Kofuji R., Ito M., et al. Phylogeny of gymnosperms inferred from *rbcL* gene sequences // Ibid. 1992в. Vol. 105. P. 673–679.

Hasebe M., Omori T. et al. RbcL gene sequences provide evidence for the evolutionary lineages of leptosporangiate ferns // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1992 c. Vol. 91. P. 5730–5734.

Hasebe M., Wolf P. G., Pryer K. M., et al. Fern phylogeny based on *rbcL* nucleotide sequences // Amer. Fern J. 1995. Vol. 85. P. 134–181.

Hasebe M, Banks J. A. Evolution of MADS gene family in plants. In "Evolution and diversification of land plants", Iwatsuki K. & Raven P.H., Eds. 1997. Tokyo: Springer-Verlag, P. 179–197.

Heckman D. S., Geiser D. M., Eidell B. R. et al. Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants // Science. 2001. Vol. 293. P. 1129 – 1133.

Hedderson T. A., Chapman R., Cox C. J. Bryophytes and the origins and diversification of land plants: new evidence from molecules. Bryology for the twenty-first century. Ed. J.W. Bates et al. L.: Brit. Biol. Soc. 1998. P. 65–77.

Hedderson T. A., Chapman R. L., Rootes W. L. Phylogenetic relationships of bryophytes inferred from nuclear-encoded rRNA gene sequences // Plant Syst.Evol. 1996. Vol. 200. P. 213–224.

Hedderson T. A., Cox C. J., Gibbings J. G. Phylogenetic relationships of the Wardiaceae (Musci) inferred from 18S rRNA and *rps4* gene sequences // Amer. J. Bot. 1997. Vol. 84, suppl.. P. 25.

Hedderson T. A., Cox C. J., Gibbings J. G. Phylogenetic relationships of the Wardiaceae (Musci): evidence from 18S rRNA and *rps4* gene sequences // The Bryologist. 1999. Vol. 102. P. 26–31.

Hedderson T. A., Murray D. J. Cox C. J., Nowell T. L. Phylogenetic relationships of haplolepideous mosses (Dicranidae) inferred from *rps4* gene sequences // Syst. Bot. 2004. Vol. 29, N 1. P. 29–41.

Hedren M., Chase M. W., Olmstead R. G. Relationships in the Acanthaceae and related families as suggested by cladistic analysis of *rbcL* nucleotide sequences // Plant Syst. Evol. 1995. Vol. 94. P. 93–109.

Hempel A. L., Reeves P. A., Olmstead R. G., Jansen R. K. Implications of the *rbcL* sequence data for higher order relationships of the Loasaceae and the anomalous aquatic plant *Hydrostachys* (Hydrostachyaceae) // Ibid. 1995. Vol. 194. P. 25–37.

Hennig W. 1948 (цит. по *Hennig. W.*, 1966).

Hennig W. Phylogenetic systematics. Urbana: Univ. of Illinois Press. 1966.

Herrman R.G. et al. Chloroplast DNA from three archegoniiates // Planta. 1980. Vol. 148. P. 319–322.

Hershkovitz M. A., Zimmer E. A. On the evolutionary origins of the cacti // Taxon. 1997. Vol. 46. P. 217–232.

Hibsch-Jetter C., Soltis D. E. Phylogentic analysis of "Saxifragales" baed on nrDNA sequence data (18S, *rbcL* and *matK*) // Amer. J. Bot. 1996. S. 83.

Hiesel R., Von Haeseler A., Brennicke A. Plant mitochondrial nucleic acid sequences as a tool for phylogenetic analysis // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1994. Vol. 91. P. 634–638.

Hill L. R. An index to deoxyribonucleic acid base composition of bacterial species // J. Gen. Microbiol. 1966. Vol. 44. P. 419–437.

Hillis D. M. Discriminating between phylogenetic signal and random noise in DNA sequences. Phylogentic analysis of DNA sequences. Ed. M.K.Miyamoto, J. Cracraft. N.Y.: Oxford Univ. Press. 1991. P. 278–294.

Hillis D. M. Inferring complex phylogenies // Nature. 1996. Vol. 383. P. 130–131.

Hillis D. M. Taxonomic sampling, phylogenetic accuracy, and investigator bias // Syst. Biol. 1998. Vol. 47. P. 3–8.

Hillis D. M., Bull J. J. An empirical test of bootstraping as a method of assessing confidence in phylogenetic analysis // Syst. Biology. 1993. Vol. 42. P. 182–192.

Hillis D. M., Huelsenbeck J. P. Signal, noise, and reliability in molecular phylogenetic analyses // J. Hered. 1992. Vol. 83. P. 189–195.

Hillis D. M., Huelsenbeck J. P., Cunningham C. W. Applications and accuracy of molecular phylogenies // Science. 1994a. Vol. 264. P. 671–77.

Hillis D. M., Moritz C., Mable B. K. Molecular systematics. 2nd ed. Sunderland (Mass.): Sinauer. 1996.

Hilu K. W., Liang H. The *matK* gene: sequence variation and application in plant systematics // Amer. J. Bot., 1997. Vol. 84, N 6. P 830–839.

Hilu K. W., Alice L. A., Liang H. Phylogeny of Poaceae inferred from *matK* sequences // Ann. Missouri Bot. Gard. 1999. Vol. 86. P. 835–851.

Hilu K. W., Borsch T., Muller K. et al. Angiosperm phylogeny based on *matK* sequence information // Amer. J. Bot. 2003. Vol. 90. P. 1758 – 1776.

Hoot S. B. Phylogeny of Ranunculaceae based on preliminary *atpB*, *rbcL*, and *18S* nuclear ribosomal DNA sequence data // Plant Syst. Evol. 1995. Vol. 9. P. 241–251.

Hoot S. B., Crane P. Inter-familial relationships in the Ranunculidae based on molecular systematics // Ibid. 1995 a. Vol. 9. P. 119–131.

Hoot S. B., Culham A., Crane P. R. The utility of *atpB* gene sequences in resolving phylogenetic relationships: comparison with *rbcL* and 18S ribosomal DNA sequences in Lardizabalaceae // Ann. Missouri Bot. Gard. 1995b . Vol. 82. P. 194–207.

Hoot S.B., Culham A., Crane P. Phylogenetic relationships of the Lardizabalaceae and Sargentodoxaceae: chloroplast and nuclear DNA sequence evidence // Plant Syst. Evol. 1995c. Vol. 9. P. 195–199.

Hoot S. B., Douglas A. W. Phylogeny of the Proteaceae based on *atpB* and *atpB-rbcL* intergenic spacer region sequences // Austral. Syst. Bot. 1998. Vol. 11. P. 301–320.

Hoot S. B., Taylor W. C. The utility of nuclear ITS, a leafy homolog intron, and chloroplast *atpB-rbcL* spacer region data in phylogenetic analysis and species determination in I*soetes* // Amer. Fern. J. 2001. Vol. 91. P. 166–177.

Hopper S. D., Fay M. F., Rosseto M., Chase M. W. A molecular phylogenetic analysis of the bloodroot and kangaroo paw family, Haemodoraceae: taxonomic, biogeographic and conservation implications // Amer. J. Bot. 1998. Vol. 85, N 6. P. 128.

Hori H., Lim B.-L., Osawa S. Evolution of green plants as deduced from 5S rRNA sequences // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. Vol. 82. P. 820–823.

Horres R., Zizka G., Hall G., Weissng K. Molecular phylogenetics of Bromeliaceae: evidence from *trnL*(UAA) intron sequences of the chloroplast genome // Plant Biol. 2000. Vol. 2. P. 306–315.

Hoss et al., 1994; цит. по Cooper, Poinar, 2001.

Hsiao C., Jacobs S. W. L., Chatterton N. J., Asay K. H. A molecular phylogeny of the grass family (Poaceae) based on the sequences on nuclear ribosomal DNA (ITS) // Aust. Syst. Bot. 1999. Vol. 11. P. 667–688.

Huang J., Price R. A. Estimation of the age of extant *Ephedra* using chloroplast *rbcL* sequence data // Mol. Biol. Evol. 2003. Vol. 20, N 3. P. 435–440.

Hufford L., McMahon M.., Sherwood A. M., Reeves G., Chase M. W. The major clades of Loasaceae: phylogenetic analysis using the plastid *matK* and *trnL-trnF* regions // Amer. J. Bot. 2003. Vol. 90. P. 1215–1228.

Huang Y.-l., Shi S.-H. Phylogenetics of Lythraceae sensu lato: A preliminary analysis based on chloroplast *rbcL* gene, *psaA-ycf3* spacer, and nuclear rDNA internal transcribed spacer (ITS) sequences // Intern. J. Plant Sci. 2002, Vol. 163, N 2. P. 215–225.

Huelsenbeck, J. P., Crandall K. A. Phylogeny estimation and hypothesis testing using maximum likelyhood // Annu. Rev. Ecol. Syst. 1997. Vol. 28. P. 437–466.

Huelsenbeck J. P., Ronquist F. R. MrBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees // Bioinformatics. 2001. Vol. 17. P. 754–755.

Huss V., Kranz H. D. Charophyte evolution and the origin of land plants / In "Origins of algae and their plastids", Bhattacharaya D., ed. Springer: Wien, N.Y. 1997 P. 103–114.

Ito M., Kawamoto A., Kita Y. et al. Phylogeny of Amaryllidacceae based on *matK* sequence data // Jap. J. Pant Res.. 1999. Vol. 112. P. 207 – 216.

Jager M., Hassanin A., Manuel M., et al. MADS-box genes in *Ginkgo biloba* and the evolution of the AGAMOUS family // Mol. Biol. Evol. 2003. Vol. 20, N 5. P. 842 – 854.

Jansen R. K., Palmer J. D. A chloroplast DNMA inversion marks an ancient evolutionary split in the sunflower family (Asteraceae) // Proc. Natl. Acad . Sci. USA. 1987. Vol. 84. P. 5818–5822.

Jansen R. K., Holsinger K. E., Michaels H. J., Palmer J. D. Phylogenetic implications of chloroplast DNA restriction site data at higher taxonomic levels: an example from the Asteraceae // Evolution. 1991. Vol. 16. P. 98–115.

Jansen R. K., Kaittanis C., Lee S.-B. et al. Phylogenetic analysis of *Vitis* (Victaceae) based on complete chloroplant genome: effects of taxon sampling and phylogenetic methods on resolving relationships among rosids. BMC Evol. Biol. 2006. Vol. 6, P. 1–40.

Jobson R. W., Playford J., Cameron K. M., Albert V. A. Molecular phylogenetics of Lentibulariaceae inferred from plastid *rps16* intron and *trnL-F* sequences: implications for character evolution and biogeography // Syst. Botany. 2003. Vol. 228, N 1. P. 157–171.

Jobst P., King K., Hemleben V. Molecular evolution of the internal transcribed spacers (ITS1 and 2) and phylogenetic relationships among species of the family Cucurbitaceae // Mol. Phylogenet. Evol. 1998. Vol. 9. P. 204–219.

Johanson J. T., Jansen R. K. Chloropast DNA variation and phylogeny of the Ranunculaceae // Plant Syst. Evol., 1993. Vol. 187. P. 29–49.

Johnson L. A., Soltis D. E. Phylogenetic inference in Saxifragaceaes.s. s. and *Gilia* (Polemoniaceae) using *matK* sequences // Annals Missouri Bot Gard. 1995. Vol. 82. P. 149–175.

Johnson L. A., Schultz J. L., Soltis D. E., Soltis P. S. Monophyly and generic relationships of Polemoniaceae based on *matK* sequences // Amer. J. Bot., 1996. Vol. 83. P. 1207–1224.

Johnson L. A., Soltis D. E. MatK DNA sequences and phylogenetic reconstruction in Saxifragaceae s.str // Syst. Bot. 1994, Vol. 19 P. 143–156.

Johnson L. A., Soltis D. E., Soltis P. S. Phylogenetic relationships of Polemoniaceae inferred from 18S ribosomal DNA sequences // Plant Syst. Evol. Vol. 1999. Vol. 214, N 1–4. P. 136–142.

Judd W. S., Campbell C. S., Kellog E. A., Stevens P. F. Plant systematics: a phylogenetic approach. Sunderland (Mass.): Sinauer, 1999. XVI. 464; второе издание в 2002 г.

Judd W. S., Olmstead R. G. A survey of tricolpate (eudicot) phylogenetic relationships // Amer. J. Bot. 2004. Vol. 91, N 10. P. 1627–1644.

Kajita T., Kamlya K., Nakamura K. et al. Molecular phylogeny of Dipetrocarpaceae in southeast Asia based on nucleotide sequences of *matK*, *trnL* intron, and *trnL-trnF* intergenic spacer region in chloroplast DNA // Mol. Phylogenet. Evol. 1998. Vol. 10, N 2. P. 178–190.

Kalendar R., Tanskanen J., Immonen S. et al. Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by *BARE-1* retrotransposone dynamics in response to sharp microclimatic divergence // Proc. Natl. Acad. Sci. 2002. www.pnas./cgi/doi/10.1073/pnas 110587/497.

Kallersjo M., Farris J. S., Chase M. W. et al. Simultaneous parsimony jacknife analysis of 2538 *rbcL* DNA sequences reveals support for major clades of green plants, land plants, seed plants and flowering plants // Plant Syst. Evol. 1998. Vol. 213, N 3–4. P. 259–287.

Kallersjo M., Bergquist G., Anderberg A. A. Generic realignment in primuloid families of the Ericales s.l.: a phyogenetic analysis based on DNA sequences from three chloroplast genes and morphology // Amer. J. Bot. 1999. Vol. 87. P. 1325–1341.

Karehed J. Multiple origin of the tropical forest tree family Icacinaceae // Amer. J. Bot. 2001. Vol. 88, N 12. P. 2259–2274.

Karehed J., Lundberg J., Bremer B., Bremer K. Evolution of the Australian families Alseuosmiaceae, Agrophyllaceae and Phellinaceae // Syst. Bot. 1999. Vol. 24, N 4. P. 660–682.

Karlin S., Burge C. Dinucleotide relative abundance extremes: a genomic signature // TIG. 1995. Vol. 11. P. 283 – 290.

Kass E., Wink M. Molecular phylogeny of the Papilionoideaea (family Leguminosae): *rbcL* gene sequences versus chemical taxonomy // Bot. Acta. 1995. Vol. 108. P. 63–168.

Kass E., Wink M. Phylogenetic relationships in the Papilionoideae (family Leguminosae) based on nucleotide sequences of cpDNA (*rbcL*) and ncDNA (ITS1 and 2) // Mol. Phylogenet. Evol. 1998. Vol. 8. P. 65–88.

Katz-Downie D. S., Valiejo-Roman K. M., Terentieva E. I. et al. Towards a molecular phylogeny of Apiaceae subfamily Apioideae: additional information from nuclear ribosomal DNA ITS sequences // Plant Syst. Evol. 1999. Vol. 216. P. 167–195.

Keegan L. M., Gallo A., O'Connell M. A. The many roles of an RNA editor // Nature Reviews (Genetics). 2001. Vol. 2. P. 869–878.

Kehoe D. M., Villand P., Somerville S. DNA microassays for studies of higher plants and other photosynthetic organisms // Trends Plant Sci. 1999. Vol. 4. P. 38–41.

Kelch D. G. Phylogeny of Podocarpaceae: comparison of evidence from morphology and 18S rDNA // Amer. J. Bot. 1998. Vol. 85. P. 986–996.

Kelchner S. A. The evolution of non-coding chloroplast DNA and its application in plant systematics // Ann. Missouri Bot. Gard. 2000. Vol. 87. P. 482–498.

Kellog E. A. Relatioships of cereal crops and other grasses // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998. Vol. 95. P. 2005–2010.

Kellog E. A. Evolutionary history of grasses // Plant Physiol. 2001. Vol. 125. P. 1198–1205.

Kellog E. A. What happens to genes in duplicated genomes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. Vol. 100. P. 4369–4371.

Kellog E. A., Appels R., Mason-Gamer R. J. When genes tell different stories: the diploid genera of Triticeae (Gramineae) // Syst. Bot. 1996. Vol. 21. P. 321–347.

Kellog E. A., Bennetzen J. L. The evolution of nuclear genome structure in seed plants // Amer. J. Bot. 2004. Vol. 91. P. 1709–1725.

Kellogg E. A., Juliano N. D. The structure and function of RuBisCo and their implications for systematic studies // Amer. J. Bot. 1997. Vol. 84, N 3. P. 413–428.

Kenrick P. The family tree flowers // Nature. 1999. Vol. 402. P. 358–359.

Kenrick P., Crane P. R. The origin and early evolution of plants on land // Nature. 1997. Vol. 389. P. 33–40.

Kenrick P., Friis E. M. Paleobotany of land plants // Prog. Bot. 1995. Vol. 56. P. 372–395.

Kim K.- J., Jansen R. K. NdhF sequence evolution and the major clades in the sunflower family // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1995. Vol. 92. P. 10379–10383.

Kim K- J., Jansen R. K., Wallace R. S. et al. Phylogenetic implications of *rbcL* sequence variation in the Asteraceae // Ann. Missouri Bot. Gard. 1992. Vol. 79. P. 428–445.

Kim S., Soltis D. E., Soltis P. S., et al. Phylogenetic relationships among early-diverging eudicots based on four genes: were the eudicots ancestrally woody ? // Mol. Phylogenet. Evol. 2004. Vol. 31, N 1. P. 16–30.

Kim Y-D., Jansen R.K. Characterization and phylogenetic distribution of a structural change in chloroplast DNAs of Berberidaceae // Plant Syst. Evol. 1994. Vol. 193. P. 107–114.

Kim Y-D., Jansen R. K. Phylogenetic implications of the chloroplast DNA variation from the Berberidaceae // Ibid. 1995. Vol. 9. P. 341–349.

Kim Y-D., Jansen R. K. Phylogenetic implications of *rbcL* and ITS sequence variation in the Berberidaceae // Syst. Botany. 1996. Vol. 21. P. 381–396.

Kim Y-D, Jansen R. K. Chloroplast DNA restriction site variation and phylogeny of the Berberidaceae // Amer. J. Bot. 1998. Vol. 85. P. 1766–1778.

Kimura M. The neutral theory of molecular evolution. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1983.

Kirschner J. et al. Principal features of the cpDNA evolution in *Taraxacum* (Asteraceae, Lactuceae): a conflict with taxonomy // Plant Syst. 2003. Vol. 239. P. 231–255.

Klak C., Khunou A., Reeves G., Hedderson T. A phylogenetic hypothesis for the Aizoaceae (Caryophyllales) based on four plastid DNA regions // Amer. J. Bot. 2003. Vol. 90. P. 1433–1445.

Knox E., Downie S. R., Palmer J. D. Chloroplast genome rearrangements and the evolution of giant lobelias from herbaceous ancestors // Mol. Biol. Evol. 1993. Vol. 10. P. 414–430.

Kolukisaoglu H. M., Marx M. S., Wiegmann C., et al. Divergence of the phytochrome gene family predates angiosperm evolution and suggests that *Selaginella* and *Equisetum* arose prior to *Psilotum* // J. Mol. Evol. 1995. Vol. 41. P. 329–337.

Koontz J. A., Soltis D. E. Molecular phylogenetics of Brexiaceae // Amer. J. Bot. 1996. S83. Abstract 479.

Korall P., Kenrick P., Therrien J. P. Phylogeny of Selaginellaceae: evaluation of generic/subgeneric relationships based on *rbcL* gene sequences // Intern. J. Plant Sci. 1999. Vol. 160, N 3. P. 585–594.

Korall P., Kenrick P. Phylogenetic relationships in Selaginellaceae based on *rbcL* sequences // Amer. J. Bot. 2002. Vol. 89. P. 506–517.

Kossel H., Edwards K., Fritzsche E. et al. Phylogenetic significance of nucleotide sequence analysis. In "Proteins and nucleic acids in plant systematics", U. Jensen & D.E. Fairbrothers, Eds. Springer. 1983. P. 36–57.

Kowalsky et al., 1994; цит. по Bancroft, 2001.

Kranz H. D., Huss V. A. R. Molecular evolution of pteridophytes and their relatiionship to seed plants: evidence from complete 18S rRNA gene sequences // Plant Syst. Evol. 1996. Vol. 202. P. 1–11.

Kranz H. D., Miks D., Siegler M.-L., et al. The origin of land plants: phylogenetic relationships among charophytes, bryophytes, and vascular plants inferred from complete small-subunit RNA gene sequences // J. Mol. Evol. 1995. Vol. 41. P. 74–84.

Kress W. J., Prince L. M., Williams K. J. The phylogeny and a new classification of the gingers (Zingiberaceae): evidence from molecular data // Amer. J. Bot. 2002. Vol. 89. P. 1682–1696. (see also Syst.Biol. 2001. Vol. 50, N 6. P. 926–944).

Kron K., Chase M. Systematics of the Ericaceae, Empetraceae, Epacridaceae and related taxa based upon *rbcL* sequennce data // Ann. Missouri Bot. Gard. 1993 . Vol. 80. P. 735–741.

Kron K. A., Judd W. S., Anderberg A. A., et al. Major clades of Ericaceae: molecular evidence // Amer. J. Bot. 1998. Vol. 85, N 6. P. 86.

Kugita M., Kaneko A., Yamamoto Y. et al. The complete nucleotide sequence of the hornwort (*Anthoceros formosae*) chloroplast genome: insights into the earliest land plants // Nucleic Acids Res. 2003. Vol. 31, N 2. P. 716–721.

Kullersjo et al. 2000; цит. по Anderberg et al., 2002.

Kumar A., Bennetsen J. L. Plant retrotransposons // Ann. Rev. Gener. 1999. Vol. 33. P. 479–532.

Kunst F., Ogasawara, N., Moszer, I. et al. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium, *Bacillus subtilis* // Nature. 1997. Vol. 390. P. 249–256.

Kurata N., Nagamura Y., Yamamoto K., et al. A 300 kilobase internal genetic map of rice including 883 expressed sequnces // Nature Genet., 1994. Vol. 8. P. 365–372.

Kusumi J., Tsumura Y., Yoshimara H., Tachida H. Phylogenetic relationships in Taxodiaceae and Cupressaceae sensu stricto based on *matK* gene, *chlL* gene, *trnL-trnF* IGS region, and *trnL* intron sequences // Amer. J. Bot. 2000. Vol. 87. P. 1480–1488.

Kuzoff R. K., Sweere J. A. et al. The phylogenetic potential of entire 26S rDNA sequences in plants // Mol. Biol. Evol. 1998. Vol. 15, N 3. P. 251–263.

LaDuke J. C., Doebley J. A chloroplast DNA based phylogeny of the Malvaceae // Syst. Bot. 1995. Vol. 20. P. 259–271.

LaDuke, J. C., Fryxell P., Alvillar J. J. Phylogenetic relationships in the Malvaceae: RFLP and morphological data // Amer. J. Bot. 1998. Vol. 85, N 6. P. 98.

LaFarge C., Shaw J., Vitt D. H. The circumscription of the Dicraniaceae (Bryopsida) based on chloroplast regions *trnL – trnF* and *rps4* // Syst. Botany. 2002. Vol. 27, N 3. P. 435– 452.

Langencrantz et al., 1996, 1998; цит. по Bancroft, 2001.

Lecointre G., Philippe H., VanLe H. L., Le Guyader H. Species sampling has a major impact on phylogenetic inference // Mol. Phylogenet. Evol. 1993. Vol. 2. P. 205–224.

Lee J., Manhart J. Spirogyra maxima cpDNA contains gene clusters and introns found in land plant chloroplast DNAs // Amer. J. Bot. 1997a. Vol. 84, N 6. P. 209.

Lee J., Manhart J. A comparison of the *psbB* gene cluster in Charophyceae and land plant chloropast DNAs // Ibid. 1997b. Vol. 84, N 6 .P. 209.

Lee J.-Y., Mummenhoff K., Bowman J. L. Allopolyploidization and evolution of species with reduced floral structures in *Lepidium* (Brassicaceae) // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. Vol. 99, N 26. P. 16835–16840.

Lemmon A. R., Millinkovitch M. C. The metapopulation genetic algorithm: an efficient solution for the problem of large phylogeny estimation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. Vol. 99, N 16, P. 10516–10521.

Les D.H., Crawford D.J., Landolt E., et al. Systematics of Lemnaceae revisited // Amer. J. Bot. 1997b. Vol. 84, N 6. P. 211.

Les D. H., Crawford D. K., Landoly E. et al., Phylogeny and systematics of Lemnaceae, the duckweed family // Syst. Botany. 2002. Vol. 27, N 2. P. 221–240.

Les D. H., Garvin D. K., Wimpee C. F. Molecular evolutionary history of ancient aquatic angiosperms // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1991. Vol. 88. P. 10119–10123.

Les D. H., Schneider E. L., Padgett D. J. Phylogeny of the Nymphaeales: on the verge of a synthesis // Amer. J. Bot. 1997a. Vol. 84, N 6. P. 210–211.

Les D. H., Schneider E. L., Pudgett D. J., et al. Phylogeny, classification, and floral evolution of water lilies (Nymphaeaceae, Nymphaeales): a synthesis of non-molecular, *rbcL*, *matK*, and 18S rDNA data // Syst. Botany. 1999. Vol. 24, N 1. P. 28–46.

Leskinen E., Als-Rappoport C. Molecular phylogeny of Salicaceae and closely related Flacourtaceae: evidence from 5.8S, ITS1 and ITS2 of the rDNA // Plant Syst. Evol. 1999. Vol. 215, N 1/4.

Levin R. A. Phylogenetic relationships within Nyctaginaceae tribe Nyctagineae: evidence from nuclear and chloroplast genomes // Syst. Botany. 2000. Vol. 25, N 4. P. 738 –750.

Levin R. A., Wagner W. L., Hoch P. C. et al. Family-level relationships of Onagraceae based on chloroplast *rbcL* and *ndhF* data // Amer. J. Bot. 2003. Vol. 90. P. 107–115.

Levin R. A., Wagner W. J., Hoch P. et al., Paraphyly in tribe Onagreae: insights into phylogenetic relationships of Onagraceae based on nuclear and chloroplast sequence data // Syst. Botany. 2004. Vol. 29, N 1. P. 147–164.

Lewis L. A., McCourt R. M. Green algae and the origin of land plants // Amer. J. Bot. 2004. Vol. 91. P. 1535–1556.

Lewis L. A., Mishler B. D., Vilgals R. Phylogenetic relationships of the liverworts (Hepatica), a basal embryophyte lineage, inferred from nucleotide sequence data on the chloroplast gene *rbcL* // Mol. Phylogenet. Evol. 1997. Vol. 7. P. 377–393.

Li J., Bogle A. L., Klein A. S. A phylogenetic analysis of the Hamamelidaceae using DNA sequences of nuclear ribosomal ITS and chloroplast gene *matK* // Amer. J. Bot. 1997. Vol. 84, N 6. P. 212.

Li J., Bogle A. L., Klein A. S. Phylogenetic relationships of the Hammamelidaceae inferred from the sequences of the internal transcrbed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA // Ibid. 1999. Vol. 86. P. 1027–1036.

Li W.H. Molecular evolution. Sunderland (Mass.): Sinauer. 1997. 487 p.

Liang H., Hilu K. W. Phylogenetic reconstruction of the grass family (Poaceae) using *matK* gene sequences // Amer. J. Bot. 1997. Vol. 84, N 6. P. 212.

Liden M., Fukuhara T., Rylender J., Oxelman B. Phylogeny and classification of Fumariaceae, with emphasis on *Dicentra* s.l. , based on plastid gene *rps16* intron // Pl. Syst. Evol. 1997. Vol. 206. P. 411–420.

Lin X., Kaul S., Rounsley S., et al. Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana* // Nature. 1999. Vol. 402. P. 761–768.

Lledo M.D., Crespo M.B., Cameron K.M. et al., Systematics of Plumbaginaceae based upon cladistic analysis of *rbcL* sequence data // Syst. Bot. 1998. Vol. 23. P. 21–29.

Lockhart R. J., Steel M. A., Hendy M. D., Penny D. Recovering evolutionary trees under a more realistic model of sequence evolution // Mol. Biol. Evol. 1994. Vol. 11. P. 605–612.

Maden A. R., Whittier D. P., Garbary D. J., Renzaglia K. D. Ultrastructure of the spermatozoid of *Lycopodiella lateralis* (Lycopodiaceae) // Can. J. Bot. 1997. Vol. 7. P. 1728 –1738.

Magallon S., Sanderson M. J. Relationships among seed plants inferred from highly conserved genes: sorting conflicting phylogenetic signals among ancient lineages // Amer. J. Bot. 2002. Vol.89. P. 1991–2006.

Magombo Z. L. K. The phylogeny of basal peristomate mosses: evidence from cpDNA and implications for peristome evolution // Syst. Botany. 2003. Vol. 28, N 1. P. 24–38.

Makalowski W. Genomic scrap yard: how genomes utilize all that junk // Gene. 2000. Vol. 259. P. 61–67.

Malek O., Lattig K., Hiesel R. et al. RNA editing in bryophytes and a molecular phylogeny of land plants // EMBO J. 1996. Vol. 15. P. 1403 – 1411.

Manchart J. R. et al. 1994. Цит. по Manchart et al., 1995

Manchart J. R. Chloroplast 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of fern allies and ferns // Amer. Fern J. 1995. Vol. 85. P. 182 – 192.

Manen J. F., Natali A., Erendorfer F. Phylogeny of Rubiaceae-Rubieae inferred from the sequence of a cpDNA intergene region // Plant Syst. Evol. 1992. Vol. 190. P. 195–211.

Manhart J. R. Phylogenetic analysis of green plant *rbcL* sequences // Molec. Phylogenet. Evol. 1994. Vol. 3. P. 114–127.

Manhart J. R. Chloroplast 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of fern allies and ferns // Amer. Fern J. 1995. Vol. 85. P. 182–192.

Manhart J. R., Palmer J. The gain of two chloroplast *trnA* introns marks the green algal ancestors of land plants // Nature. 1990. Vol. 345. P. 268–270.

Manos P. S., Nixon K. C., Doyle J. J. Cladistic analysis of restriction site variation within the chloroplast DNA inverted repeat region of selected Hamamelididae // Syst. Botany. 1993. Vol. 18. P. 551–562.

Manos P. S., Steele K. P. A phylogenetic analysis of "higher" Hamamelidae based on sequences from nuclear ribosomal RNA // Amer. J. Bot. 1996. S. 83.

Manos P. S., Steele K. P. Phylogenetic analysis of "higher" Hamamelididae based on plastid sequence data // Amer. J. Bot. 1997. Vol. 84, N10. P. 1407–1419.

Marienfeld J., Unseld M., Brennicke A. The mitochondrial genome of *Arabidopsis* is composed of both native and immigrant information // Trends Plant Sc. 1999. Vol. 4, N 12. P. 495–502.

Martin P. G., Dowd J. M. The study of plant phylogeny using amino acid seuquences of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. V. Magnoliaceae, Poligonaceae and the concept of primitiveness // Austr. J. Bot. 1984. Vol. 32. P. 301–309.

Martin P. G, Boulter D., Penny D. Angiosperm taxonomy studied using sequences of five macromolecules // Taxon. 1985. Vol. 34. P. 393–400.

Martin P. G., Dowd J. M. Studies of angiosperm phylogeny using protein sequences // Ann. Missouri Bot. Gard. 1991 a. Vol. 78. P. 296–337.

Martin P. G., Dowd J. M. A comparison of 18S ribosomal RNA and rubisco large subunit sequences for studying angiosperm phylogeny // J. Mol. Evol. 1991b. Vol. 33. P. 274–282.

Martin W., Deusch O., Stawski N. et al. Chloroplast genome phylogenetics: why we need independent approaches to plant molecular evolution // Trends in Plant Sc. 2005. Vol. 10 , N 5. P. 203–209.

Martin W., Gierl A., Saedler H. Molecular evidence for pre-Cretaceous angiosperm origins // Nature. 1989. Vol. 339. P. 46–48.

Martin W., Deusch O., Stawski N. et al. Chloroplast genome phylogenetics: why we need independent approaches to plant molecular evolution // Trends in Plant Sc. 2005. Vol. 10, N 5. P. 203–209.

Martin W., Herrman R.G. Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and why // Plant Physiol. 1998a. Vol. 118. P. 9–17.

Martin W., Lydiate D., Brinkman H. et al. Molecular phylogenies in angiosperm evolution // Mol. Biol. Evol. 1993. Vol. 10. P. 140–162

Martin W., Stoebe B., Goremykin V. et al. Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts // Nature. 1998b. Vol. 393. P. 162–165.

Martin W., Rujan T., Richly E., et al. Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002. Vol. 99. P. 12246 – 12251.

Martins L., Oberprieler C., Hellwig F. H. A phylogenetic analysis of Primulaceae s.l. based on internal transcribed spacer (ITS) DNA sequence data // Plant Syst. Evol. 2003. Vol. 237. P. 75–85.

Mason-Gamer R. J., Holsinger K. E., Jansen R. K. Chloroplast DNA haplotype variation within and among populations of *Coreopsis grandiflora (*Asteraceae) // Mol. Biol. Evol. 1995. Vol. 12. P. 371–381.

Mason-Gamer R. J., Kellog E. A. Testing for phylogenetic conflict among molecular data sets in the tribe Triticeae (Gramineae) // Syst. Biol. 1996. Vol. 45. P. 522–543.

Mason-Gamer R. J., Weil G. F., Kellog E. Granule-bound starch synthase: structure, frunction, and phylogenetic utility // Mol. Biol. Evol. 1998. Vol. 15. P. 1658–1673.

Mathews et al., 1995, 1997. Цит. по Mathews, Donoghue, 1999.

Mathews S., Donoghue M. The root of angiosperm phylogeny inferred from duplicate phytochrome genes // Science. 1999. Vol. 286. P. 947–950.

Mathews S., Sharbock R. A. The phytochrome gene family in grasses (Poaceae): a phylogeny and evidence that grasses have a subset of loci found in dicot angiosperms // Ibid. 1996. Vol. 13. P. 1141–1150.

Mathews S., Donoghue M. J. The root of angiosperm phylogeny inferred from duplcate phytochrome genes // Science. 1999. Vol. 286. P. 947–950.

Mathews S., Tsai R. C., Kellog E. Phylogenetic structure in the grass family (Poaceae): evidence from the nuclear gene phytochrome B // Am. J. Bot., 2000. Vol. 87. P. 96–107.

Mayer K., Schuller G., Wambutt R. et al. Sequence and analysis of chromosome 4 of the plant *Arabidopsis thaliana* // Nature. 1999. Vol. 402. P. 769–777.

McDade L. A., Moody M. L. Phylogenetic relationships among Acanthaceae: evidence from nuclear and chloroplast genomes // Amer. J. Bot. 1997. Vol. 84, N 6. P. 214.

Mathews S., Donoghue M. The root of angiosperm phylogeny inferred from duplicate phytochrome genes // Science. 1999. Vol. 286. P. 947–950.

McDade L. A., Moody M. L. Phylogenetic relationships among Acanthaceae: evidence from nuclear and chloroplast genomes // Amer. J. Bot. 1997. Vol. 84, N 6. P. 214.

McDade L.A., Moody M.L. Phylogenetic relationships among Acanthaceae: evidence from noncoding *trnL-trnF* chloroplast DNA sequences // Ibid. 1999. Vol. 86. P. 70–80 (цит.по McDade et al., 2000).

McDade L. A., Masta S. E., Moody M. L, Waters E. Phylogenetic relationships among Acanthaceae: evidence from two genomes // Syst. Botany. 2000. Vol. 25, N 1. P. 106–121.

McFadden G. I. Chloroplast origin and integration // Plant Physiol. 2001. Vol. 125. P. 550–552.

Meerow A.W., Fay M.F., Guy C.L., et al. Systematics of Amaryllidaceae based on cladistic analysis of plastid *rbcL* and *trnL-F* sequence data. // Amer. J. Bot. 1999. Vol. 86, N 9. P. 1325–1345.

Meerow A. W., Guy C. L., Li Q. B. Phylogeny on neotropical Amaryllidaceae based on nrDNA ITS sequences // Ibid. 1998. Vol. 85. P. 144.

Meisser W., Stewart C.-B. Episodic adaptive evolution of primate lysozymes.// Nature. 1998. Vol. 385. P. 151–154.

Melkonian B. D., Marin B., Surek B. Phylogeny and evolution of the algae // Biodiversity and Evolution, Arai R. et al., Eds. Tokyo: Natl. Sc. Museum Foundation, 1995, P. 158–176.

Meng S..-W., Chen Z.-D., Li D.-Z., Liang H.-X. Phylogeny of Saururaceae based on mitochondrial *matR* gene sequence data // J. Plant Res. 2002. Vol. 115. P. 71–76.

Meyerowitz E. T. Today we have naming of parts // Nature. 1999. Vol. 402. P. 731–732.

Meyer T. E., Cusanovich M. A., Kamen M. D. Evidence against use of bacterial amino acid sequence data for construction of all-inclusive phylogenetic trees // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. Vol. 83. P. 217–220.

Michaels H. J., Scott K. M., Olmstead R. G., et al. Interfamilial relationships of the Asteraceae: insights from *rbcL* sequence variation // Ann. Missouri Bot. Gard. 1993. Vol. 80. P. 742–751.

Michelangeli F. A., Davis J. I., Stevenson D. W. Phylogenetic relationships among Poaceae and related families as inferred from morphology, inversions in the plastid genome, and sequence data from mitochondrial and plastid genomes // Amer. J. Bot. 2003. Vol. 90. P. 93–106.

Mischler B. D., Churchill S. P. A cladistic approach to the phylogeny of "bryophytes" // Brittonia. 1984. Vol. 36. P. 406–424.

Mischler B. D., Churchill S. P. Transition to land flora: phylogenetic relationshipsof the green algae and bryophytes // Cladistics. 1985. Vol. 1. P. 305 – 328.

Mischler B. D., Gonzalez D., Arrington J. M. et al. An overview of the phylogeny of mosses inferred from the cladistic analysis of morphology and the *rbcL* gene // Amer. J. Bot. 1997. Vol. 84, N 6. P. 5.

Mischler B. D., Lewis L. A., Delwiche C. F. et al. Phylogenetic relationships of the "green algae" and "bryophytes" // Ann. Missouri Bot. Gard. 1994. V. 81. P. 451–483.

Mishler B. D., Thrall P. H., Hopple J. S. et al. A molecular approach to the phylogeny of bryophytes: cladistic analysis of chloropast-encoded 16S and 23S ribosomal RNA genes // Bryologist. 1992. Vol. 95. P. 172–180.

Mitchel A. D., Heenan P. B. Systematic relationships of New Zealand endemic Brassicaceae inferred from nrDNA ITS sequence data // Syst. Botany. 2000. Vol. 25, N 1.P. 98–105.

Mitton J.B. Molecular approaches to population biology // Annu. Rev. Ecol. Syst. 1994. Vol. 25. P. 45–69.

Miya M., Nishida M. Use of mitogenomic information in teleostean molecular phylogenetics: a tree-based exploration under the maximum-parsimony optimality criterion // Mol. Phylogenet. Evol. 2000. Vol. 17, N 3. P. 26–38.

Miya M., Kawaguchi A., Nishida M. Mitogenomic extrapolation of higher teleostean phylogenies: a case study for moderate-scale evolutionary genomics with 38 newly determined complete mitochondrial DNA sequences // Mol. Biol. Evol. 2001. Vol. 18. P. 1993–2009.

Molecular systemaics and evolution: theory and practice // Eds. DeSalleR., Giribet G., Wheeler W. Boston, Berlin, Basel: Birkhauser Verlag. 2001.

Moniz de Sa M., Drouin G. Phylogeny and substitution rates of angiosperm actin genes // Mol. Biol. Evol. 1996. Vol. 13. P. 1198–1212.

Montieri S., Gaudio L., Aceto S. Isolation of the *LFY/FLO* homologue in *Orchis italica* and evolutionary analysis in some European orchids // Gene. 2004. Vol. 333. P. 101–109.

Moon E., Kao T.Y., Wu R // Mol. Gen. Genet. 1988. Vol. 213. P. 247–253. цит. по Shimada, Sugiura, 1989.

Morgan D. R. nrDNA external transcribed spacer (ETS) sequence data, reticulate evolution, and systematics of *Machaeranthera* (Asteraceae) // Syst. Botany. 2003. Vol. 28, N 1. P. 179–190.

Morgan D. R., Soltis D., et al. Phylogenetic relationships among members of Saxifragaceae *sensu lato* based on *rbcL* sequence data // Ann. Missouri Bot. Gard. 1993. Vol. 80. P. 631–660.

Morgan D. R., Soltis D. E., Robertson K. R. Systematic and evolutionary implications of *rbcL* sequence variations in Rosaceae // Amer. J. Bot. 1994. Vol. 81. P. 890–903.

Morley R. J., Dick C. W. Missing fossils, molecular clocks, and the origin of the Melastomataceae // Amer. J. Bot. 2003. Vol. 90. P. 1638–1644.

Mort M. E., Soltis D. E., Soltis P. S. Molecular systematics of Crassulaceae based on *matK* sequence data // Ibid. 1998. Vol. 85, N 6. P. 68.

Mort M. E., Soltis P. S., Soltis D. E., Mabry D. L. Comparison of three methods of estimating internal support on ohylogenetic trees // Syst. Biology. 2000. Vol. 49. P. 160 – 171.

Morton B. R., Gaut B. S., Clegg M. T. Evolution of alcochol dehydrigenase genes in the palm and grass families // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. Vol. 93. P. 17335–17339.

Morton C. M., Chase M. W., Kron K. A. A molecular evaluation of the monophyly of the order Ebenales // Amer. J. Bot. 1995 Vol. 82. P. 151.

Morton C. M., Chase M. W., Kron K. A., Swensen S. M. A molecular evaluation of the monophyly of the order Ebenales based upon *rbcL* sequence data // Syst. Bot. 1997b. Vol. 21. P. 567–586.

Morton C. M., Mori S. A., Prance G. T. et al. Phylogenetic relationships of Lecythidaceae: a cladistic analysis of *rbcL* sequence and morphological data // Amer. J. Bot. 1997a. Vol. 84, N 4. P. 530–540.

Morton C. M., Prance G. T., Mori S. A., Thorburn L. G. Recircumotion of the Lecythidaceae // Taxon. 1998. Vol. 47. P. 817–827.

Muasya A. M., Simpson D. A., Chase M. W., Culham A. An assesment of supragenеric phylogeny of Cuperaceae using *rbcL* DNA sequences // Plant Syst. Evol. 1998. Vol. 211, N 3–4. P 23–28.

Muellner A. N., Samuel R., Johnson S. A. et al. Molecular phylogenetics of Meliaceae (Sapindales) based on nuclear and plastid DNA sequences // Amer. J. Bot. 2003. Vol. 90. P. 471–480.

Munster T, Pahnke J., Di Rosa A. et al., Floral homeotic genes were recruited from homologous MADS-box genes preexisting in the common ancestor of ferns and seed plants // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. Vol. 94. P. 2415–2420.

Murray B. G. Nuclear DNA amounts in gymnosperms // Annals Bot. 1998. Vol. 82. P. 3–15.

Nadot S., Bajon R., Lejeune B. The chloroplast gene *rps4* as a tool for the study of Poaceae phylogeny // Plant. Syst. Evol. 1994. Vol. 191. P. 27–38.

Nadot S., Bittar G., Carter L., Lacroix R., Lejeune B. A phylogenetic analysis of monocotyledons based on the chloroplast gene *rps4*, using parsimony and new numerical phenetic methods // Mol. Phylogenet. Evol. 1995. Vol. 4. P. 257–282.

Nagaraju J., Kathirvel M., Subbaiah E. V. et al. FISSR-PCR: a simple and sensitive assay for high throughout genotyping and genetic mapping // Molec. Cell. Probes. 2002. Vol. 16. P. 67–72.

Nagley P., Devenish R. J. Leading organellar proteins along new pathways: the relocation of mitochondrial and chloroplast genes to the nucleus // TIBS. 1989. Vol. 14. P. 31–35.

Nam J., dePamphilis C. W., Ma H., Nei M. Antiquity and evolution of the MADS-box gene family controlling flower development in plants // Mol. Biol. Evol. 2003. Vol. 20, N 9. P. 1435–1447.

Nam J., Kim J., Lee S., et al. Type I MADS-box genes have experienced faster birth-and-death evolution than type II MADS-box genes in angiosperms // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. Vol. 101. P. 1910–1915.

Nandi O. I., Chase M. W., Endress P. K. A combined cladistic analysis of angiosperms using *rbcL* and non-molecular data sets // Ann. Missouri Bot. Gard. 1998. Vol. 85, N 1. P. 139–177.

Natali A., Manen J., Ehrendorfer F. Phylogeny of the Rubiaceae-Rubioideae, in particular the tribe Rubieae: evidence from the non-coding chloroplast DNA sequence // Ibid. 1995. Vol. 82. P. 428–439.

Newton A. C., Allnutt T. R., Gillies A. C. M., et al. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species // Trends Ecol. Evol. 1999. Vol. 14, N 4. P. 140–145.

Neyland R. A phylogeny inferred from large-subunit (26S) ribosomal DNA sequences suggests that Burmanniales are monophyletic // Australian Syst. Botany. 2002. Vol. 15. P. 19–28.

Newton A. E., Cox C., Duckett J. G. et al. Evolution of the major moss lineages: phylogenetic analyses based on multiple gene sequences and morphology // Bryilogist. 2000. Vol. 103. P. 187 – 211.

Ngernprasirtsiri J., Kobayashi H., Akasawa T. // Proc. Nat. Acad. Sci. US 1988. Vol. 85. P. 4750–4754. Цит. по Nickrent et al., 2000.

Nickrent D. L., Parkinson C. L., Palmer J. D. et al. Multigene phylogeny of land plants with special reference to bryophytes and the earliest land plants // Mol. Biol. Evol. 2000. Vol. 17. P. 1885 – 1895.

Nickrent D.L., Blarer A., Qiu Y.-L. et al. Molecular data place Hydnoraceae with Aristolochiaceae // Amer. J. Bot. 2002. Vol. 89. P. 1809–1817.

Nickrent D. L., Colwell A. Elevated nucleotide substitution rates in nuclear 18S rDNA from heterotrophic angiosperms // Ibid. 1994. Vol. 81. P. 176.

Nickrent D. L., Duff R. J. Unusual plastid-encoded 16S rRNAs in "nonasterid" holoparasitic angiosperms // Ibid. 1997. Vol. 84, N 6. P. 219

Nickrent D.L., Franchina C.R. Phylogenetic relationships of the Santanales and relatives // J. Mol. Evol. 1990. Vol.31. P. 294–301.

Nickrent D. L., Parkinson C. L., Palmer J. D., Duff R. J. Multigene phylogeny of land plants with special reference to bryophytes and the earliest land plants // Mol. Biol. Evol. 2000. Vol. 17, N 12. P. 1885–1895.

Nickrent D. L., Parkinson C. L., Palmer J. D., Duff R. J. Multigene phylogeny of land plants: hornworts are basal and mosses are sister to liverworts // Mol. Biol. Evol. 2001. Vol. 17 , N 12. P. 1885–1895.

Nickerent D. L., Soltis D. E. A comparison of angiosperm phylogenies from nuclear 18S rDNA and *rbcL* sequences // Ann. Missouri Bot. Gard. 1995. Vol. 82. P. 208–234.

Nielsen R. The molecular clock is gone but not forgotten // TIG. 1999. Vol.15. P. 442–443.

Niesbach-Klosgen U., Barsen E. et al. Chalcone synthase genes in plants: A tool to study evolutionary relationships // J. Mol. Evol. 1987. Vol. 26. P. 213–225.

Niklas W., Kenrick P. Phylogeny of Lycopodiaceae (Lycopsida) and the relationship of *Phylloglossum drummondii* Kunze based on *rbcL* sequences // Amer. J. Bot. 1997. Vol. 84 N 6. P. 169.

Nishimura D. DNA analysis:New kid on the block // Science. 1999. Vol. 285. P. 355–356.

Nishiyama T., Kato M. Molecular phylogenetic analysis among bryophytes and tracheophytes based on combined data of plastid coded genes and the 18S rRNA gene // Mol. Biol. Evol. 1999. Vol. 16, N 8. P. 1027–1036.

Nishiyama T., Wolf P. G., Kugita M. et al. Chloroplast phylogeny indicates that bryophytes are monophyletic // Mol. Biol. Evol. 2004. Vol. 21, N 10. P. 1813–1819.

Nkongolo K. K.., Deverno L., Michael P. Genetic variation and characterization of RAPD markers differentiating black and red spruces: molecular certification of spruce trees and hybrids // Plant Syst. Evol. 2003. Vol. 236, N 3–4. P. 151–163.

Noh E. W., Lee J. S., Choi Y. I. et al. Complete nucleotide sequence of *Pinus koraiensis* // http//www.ncbi.nlm.nih.gov. 2003.

Nybom H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants // Molec. Evol. 2004. Vol. 13. P. 1143–1155.

Nyffeler R. Phylogenetic relationships in the cactus family (Cactaceae) based on evidence from *trnK/matK* and *trnL-trnF* sequences. // Amer. J. Bot. 2002. Vol. 89. P. 312–326.

O'Brien S. J., Wienberg J., Lyons L. A. Comparative genomics: lessons from cats // TIG. 1997. Vol. 13. P. 393–399.

O'Brien S.J., Eizirik E., Murphy W. J. On choosing mammalian genomes for sequencing // Science. 2001. Vol. 292. P. 2264–2266.

Oda K., Yamato K., Ohta E., et al. Gene organization deduced from the complete

sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* mitochondrial DNA: a primiitive form of plant mitochondrial genome // J. Mol. Biol. 1992. Vol. 223. P. 1–7.

Ohno S. Evolution by gene duplication. Springer Verlag: Berlon-Heidelberg-New York. 1970.

Olby R. The path to the double helix. Seattle: Univ. Washington Press, 1974.

Ollgaard B. A revised classifiaction of of the Lycopodiaceae s. lat // Opera Botanica. 1987. Vol. 92. P. 153 – 178.

Olmstead R. G., Bremer B. A. et al. A parsimony analysis of the Asteridae sensu lato based on *rbcL* sequences // Ann. Missouri Bot. Garden. 1993. Vol. 80. P. 700–722.

Olmstead R. G., Michaelis H. J., Scott K.M., Palmer J. D. Monophyly of the Asteridae and identification of the major lineages inferred from DNA sequences of *rbcL* // Ibid. 1992b. Vol. 79. P. 249–265.

Olmstead R. G., Palmer J. D. A chloroplast DNA phylogeny of the Solanaceae: subfamilial relationships and character evolution // Ibid. 1992a. Vol. 79. P. 346–360.

Olmstead R. G., Palmer J. D. Chloroplast DNA systematics: a review of methods and data analysis // Amer. J. Bot. 1994a. Vol. 81. P. 1205–1224.

Olmstead R. G., Reeves P. A. Evidence for the polyphyly of the Scrophulariaceae based on chloroplast *rbcL* and *ndhF* sequences // Ann. Missouri Bot. Garden. 1995. Vol. 82. P. 176–193.

Olmstead R. G., dePamphilis, C. W., Wolfe A. D., et al.. Disintegration of Scrophulariaceae // Amer. J. Bot. 2001. Vol. 88. P. 348–361.

Olmstead R., Sweere J. A. Combining data in phylogenetic systematics: An empirical approach using three molecular data sets in the Solanaceae // Syst. Biol. 1994b. Vol. 43. P. 467–481.

Olson M. E. Combining data from DNA sequences and morphology for a phylogeny of Moringaceae (Brassicales) // Syst. Bot. 2002. Vol. 27, N 1. P. 55–73.

Ovchinnikov I.V., Gotherstrom A., Romanova G.P. et al. Molecular analysis of neanderthal DNA from the Northern Caucasus // Nature. 2000. Vol. 404. P. 490–493.

Oxelman B., Backlund M., Bremer B. Relationships of the Buddlejaceae s. l. investigated using parsimony jacknife and branch support analysis of chloroplast *ndhF* and and *rbcL* sequence data // Syst. Botany. 1999. Vol. 24. P. 164 – 182.

Paabo S. Of bears, conservation genetics, and the value of time travel // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 2000. Vol. 97. P. 1320–1321.

Paegel B. M., Emrich C. A., Wedemayer G. J. et al. High throughout DNA sequencing with a microfabricated 96-lane capillary array electrophoresis bioprocessor // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. Vol. 99. P. 574–579.

Page R., Holmes E. Molecular evolution: A phylogenetic approach // Oxford: Blackwell Science Ltd. , 1998.

Pagel M. Inferring the historical patterns of biological evolution // Nature. 1999. Vol. 401. P. 877–884.

Pahnke J., Goremykin V., Bobrova V.T. et al. Utility of rDNA internal transcribed spacer sequences from the inverted repeat of chloroplast DNA in pteridophyte molecular phylogenetics. In: Pteridology in perspective, J.M. Camus et al., Ed. Kew: Royal Bot. Gardens. 1996. P. 217–230.

Palmer J. D. Comparative organization of chloropast genomes // Annu. Rev. Genet. 1985. Vol. 19. P. 325–354.

Palmer J. D. Chloroplast DNA and phylogenetic relationships. In: DNA systematics. Plants. S.K. Dutta, Ed. Vol. 2. Boca Raton: CRC Press. 1986. P. 63–80.

Palmer J. D. Chloroplast DNA evolution and biosystematics uses of chloroplast DNA variation // Amer. Natur. 1987. Vol. 130. P. S6–S29.

Palmer J. D. Contrasting modes and tempos of genome evolution in land plant organelles // TIG. 1990. Vol. 6. P. 115–120.

Palmer J. D. Plastid chromosomes: Structure and evolution. In: Cell culture and somatic cell genetics of plants. San Diego: Acad. Press. 1991. Vol. 7a. P. 5–43.

Palmer J. D. Comparison of chloroplast and mitochondrial genome evolution in plants. Cell organelles. Ed. R.G. Herrman. Wien: Springer. 1992. P. 99–136.

Palmer J. D., Nugent J. M., Herbon L. A. Unusual structure of geranium chloroplast DNA: a triple-sized inverted repeat, extensive gene duplications, multiple inversions, and two repeat familiies // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1987. Vol. 84. P. 769–773.

Palmer J., Osorio B., Aldrich J., Thompson W. F. Chloroplast DNA evolution among legumes: loss of a large inverted repeat occurred prior to other sequence rearrangements // Curr. Genet. 1987. Vol. 11. P. 275–286.

Palmer J. D., Soltis D. E., Chase M. W. The plant tree of life: an overview and some points of view // Amer. J. Bot. 2004. Vol. 91. P. 1437–1445.

Palmer J D., Thompson W. F. Chloroplast DNA inversions are more frequent when a large inverted repeat is lost // Cell. 1982. Vol. 29. P. 537–550.

PalmerJ. D., Stein P., 1982 ; цит. по Palmer, 1991.

Palmer J. D., Zamir D. Chloroplast DNA evolution and phylogenetic relationships in *Lycopersicon* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1982. Vol.79. P. 5006–5010.

Pandey A. Genome sequencing in a day // Trends in Genet. 2001. Vol. 17. P. 627.

Parenti L. R. A phylogenetic analysis of the land plants // Biol. J. Linn. Soc. 1980. Vol. 13. P. 225 – 242.

Parkinson C. L., Adams K. L., Palmer J. D. Multigene analyses identify the three earliest lineages of extant flowering plants // Curr. Biol. 1999. Vol.9, N 24. P. 1485–1488.

Patterson C., Williams D.M., Humphries C. J. Congruence between molecular and mophological phylogenies // Annu. Rev. Ecol. Syst. 1993. Vol. 24. P. 53–188.

Patterson T. B., Givnish T .J. Phylogeny and evolutionary trends in Liliaceae s.s., Calochortaceae, and Uvulariiaceae: insights from *ndhF* sequence data // Amer. J. Bot. 1998. Vol. 85, N 6. P. 106.

Patterson T. B., Givnish T. J. Phylogeny, concerted convergence, and phylogenetic niche conservatism in the core Liliales: Insights from *rbcL* and *ndhF* sequence data. // Evolution. 2002. Vol. 56, N 2. P. 233–252.

Penissi E. 100 frogs A-leaping for biodiversity // Science. 2002. Vol. 298. P. 339–340.

Perasso R., Baroin A., Qu L. H., Bachelerie J. P., Adoutte A. Origin of the algae // Nature. 1989. Vol. 339. P. 142–144.

Pesole G., Ceci L. R., Gissi C., et al. Evolution of the *nad3-rps12* gene cluster in angiosperm mitochondria: comparison of edited and unedited sequences // J. Mol. Evol. 1996. Vol. 42. P. 447–452.

Peteren N., Cox C., Hedenas L. Phylogeny of the moss family Bryaceae inferred from chloroplast DNA sequences and morphology // Syst. Botany. 2003. Vol. 28, N 3. P. 471–482.

Petersen G., Seberg O. Phylogenetic analysis of the Triticeae (Poaceae) based on *rpoA* sequence data // Mol. Phylogenet. Evol. 1997. Vol. 7. P. 217–230.

Plotkin M. S., Sanderson M. J. Molecular phylogenetic analysis and biogeography of Limnanthaceae // Amer. J. Bot. 1997. Vol. 84, N 6. P. 222–223.

Plunkett G. M., Downie S. R. Major lineages within Apiaceae subfamily Apioideae: A comparison of chloroplast restriction site and DNA sequence data // Ibid. 1999. Vol. 86. P. 1014–1032.

Plunkett G. M., Soltis D. E., Soltis P. S. Higher level of relationship of Apiales (Apiaceae and Araliaceae) based on phylognetic analysis of *rbcL* sequences // Ibid. 1996. Vol. 83. P. 499–515.

Porter J. M. Phylogeny of Polemoniaceae based on nuclear ribosomal internal transcribed spacer DNA sequences // Aliso. 1997. Vol. 15. P. 57–77.

Porter J. M., Johnson L. A. Phylogenetic relationshi[s of Polemoniaceae: Inferences from mitochondrial *nad1B* intron sequences // Aliso. 1998. Vol. 17, N 2. P. 157–188.

Potgieter K., Albert V. A. Phylogenetic relationships within Apocynaceae s.l. based on *trnL* intron and *trnL-F* spacer sequences and propagule characters // Annals Missouri Bot. Gard. 2001. Vol. 88, N 4. P. 523–549.

Potter D. Variation and phylogenetic relationships of nucleotide sequences for putative genes encoding polygalacturonase inhibitor proteins (PRIPs) among taxa of Rosaceae // Amer. J. Bot. 1997. Vol. 84, N 6. P. 224.

Potter D., Gao F., Esteban B. P. et al. Phylogenetic relationships in Rosaceae inferred from chloroplast *matK* and *trnL-trnF* nucleotide sequence data // Plant Syst. Evol. 2002. Vol. 231, N 1–4. P. 77–89.

Prather L. A., Ferguson C. J., Jansen R. K. Polemoniaceae phylogeny and classification: implications of sequence data from the chloroplast gene *ndhF* // Amer. J. Bot. 2000. Vol. 87. P. 1300–1308.

Price R.A. Systematics of the Gnetales: A review of morphological and molecular evidence // Intern. J. Plant. Sci. 1996. Vol. 157, N 5. P. S40–S49.

Price R., Palmer J. Phylogenetic relationships of the Geraniaceae and Geraniales from *rbcL* sequence comparisons // Ann. Missouri Bot. Garden. 1993. Vol. 80. P. 661–671.

Prince L. M., Parks C. R. Phylogenetic relationships of Theaceae inferred from chloroplast DNA sequence data // Am. J. Bot. 2001. Vol. 88, N 12. P. 2309–2320.

Pryer K.M., Smith A.R., Skog J.E. Phylogenetic relationships of extant ferns based on the evidence from morphology and *rbcL* sequences // Amer. Fern J. 1995. Vol. 85. P. 205–282.

Pryer K. M., Schneider H., Smith A. R., et al. Horsetails and ferns are a monophyletic group and the closest relatives to seed plants // Nature. 2001. Vol. 409. P. 618–622.

Pryer K. M, Schuettpelz E., Wolf P. G. et al. Phylogeny and evolution of ferns (monilophytes) with a focus on the early leptosporangiate divergences // Amer. J. Bot. 2004. Vol. 91, N 10. P. 1582–1598.

Purugganan M. D., Suddith J. I., 1998. Цит. по Montieri et al., 2004.

Pyck N., Van Lysebetten A., Stessens J., Smets E. The phylogeny of Patrinieae sensu Graebner (Valerrianaceae) revisited: additional evidence from *ndhF* sequence data // Plant Syst. Evol.. 2002. Vol. 233, N 1–2. P. 29–46.

Qiu Y.-L., Cho Y. et al. The gain of three mitochondrial introns identifies liverworts as the earliest land plants // Nature. 1998a. Vol. 394. P. 671–674.

Qiu Y.-L., Lee J., Bernasconi-Quadroni F. et al. The earliest angiosperms: evidence from mitochondral, plastid and nuclear genomes // Ibid. 1999. Vol. 402. P. 404–407.

Qiu Y.-L., Lee J. Transition to a land flora: A molecular phylogenetic perspective // J. Phycol. 2000. Vol. 36. P. 799–802.

Qiu Y-L., Palmer J. D. Phylogeny of early land plants: insights from genes and genomes // Trends Plant Sci. 1999. Vol. 4, N 1. P. 26–30.

Qiu Y. L., Lee J., Bernasconi-Quadroni F. et al. Phylogeny of basal angiosperms: analyses of five genes from three genomes // Intern. J. Plant Sc. 2000. Vol. 161, N 6. S. 3–27.

Qiu Y. -L., Lee J., Whitlock B. A. et al. Was the ANITA rooting of the angiosperm phylogeny affected by long-branch attraction ? // Mol. Biol. Evol. 2001. Vol. 18, N 9. P. 1445–1453.

Qiu Y.-L., Soltis D. et al. Phylogenetic relationships of *Cornus L.* sensu lato and putative relatives inferred from *rbcL* sequence data // Ann. Missouri Bot. Gard. 1993a. Vol. 80. P. 723–734.

Quigley F., Weil J. H. Organization and sequence of five *trnA* genes and of unidentified reading frame in the wheat chloroplast genome: Evidence for gene rearrangements during evolution of chloroplast genomes // Curr. Genet. 1985. Vol. 9. P. 495–503.

Race H. L., Herrman R. G., Martin W. Why have organelles retained genomes? // TIG. 1999. Vol. 19, N 9. P. 364–370.

Rambaut A. Sequence alignment program (Se – Al) v1.d1. Dept. of Zoology. Univ. Oxford. England.

Randall T., Smith J. A. C., Crayn D., Winter K. Reassesment of subfamily relationships in Bromeliaceae using noncoding sequences of the chloroplast genome // Amer. J. Bot. 1998. Vol. 85, N 6. P. 182.

Ranker T. A., Haufler C. H., Smith A. R., Li J. Merging morphology and molecules to modify models of paraphyly and polyphyly in the "Polygrammaceae" // Ibid. 1997. Vol. 84, N 6. P. 165–166.

Ranker T. A., Soltis D. E., Soltis P. S., Gilmartin A. J. Subfamilial phylogenetic relationships of the Bromeliaceae: Evidence from chloroplast DNA restriction site variation // Syst. Bot. 1990. Vol. 15. P. 425–434.

Ratner V.A., Zharkikh A. A. et al. Molecular evolution // Biomathematics. eidelberg: Springer, 1996. Vol. 24. P. 241–270.

Raubesson L. A. Chloroplast DNA structural similarities shared by conifers and Gnetales: Coincidence or common ancestry? // Amer. J. Bot. 1998. Vol. 85, N 6. P. 88.

Raubesson L. A., Jansen R. K. Chloroplast DNA evidence on the ancient evolutionary split in vascular land plants. // Science. 1992a. Vol. 255. P. 1697–1699.

Raubesson L. A., Jansen R. K. A rare chloroplast DNA structural mutation is shared by all conifers // Biochem. Syst. Ecol. 1992 b. Vol. 20. P. 17–24.

Raubesson L. A., Jansen R. K. Phylogenetically informative chloroplast DNA rearrangements in the Podocarpaceae // Amer. J. Botany. 1993. Vol. 80. P. 173.

Ravin A.W. Experimental approach to the study of bacterial phylogeny // Amer. Natur. 1963a. Vol. 97. P. 307–318.

Ravin A.W. Discussion // In: "Systematic Biology", Natl. Acad. Sci. USA, Washington DC, publ. N 1692. 1963b. P. 275–278.

Rawwitch A. B. Evolutionary upgrade // Science. 1999. Vol. 285. P. 357.

Reeves G., Chase M. W., DeChies T. et al. Molecular systematics of Iridaceae: a combined analysis of three plastid DNA sequence matrices // Amer. J. Bot. 1997. Vol. 84, N 6. P. 225.

Renner S. S. A molecular phylogeny of Laurales based on *rbcL, trnL-trnF,* and *rpl16* plastid DNA sequences // Ibid. 1998a. Vol. 85, N 6. P. 143.

Renner S. S. Phylogenetic affinities of Monimiaceae based on cpDNA gene and spacer seuqences // Perspect. Plant Ecol., Evol. Syst // 1998c. Vol. 1. P. 61–77.

Renner S. S. Circumscription and phylogeny of the Laurales: Evidence from molecular and morphological data // Amer. J. Bot. 1999. Vol. 86, N 9. P. 1301–1315.

Renner S. S., Foreman D. B. Molecular phylogenetics and biogeography of Atherospermataceae-two Chile-Australiia/New Zealand disjunctions // Amer. J. Bot. 1998b. Vol. 85, N 6. P. 174.

Rice K. A., Donoghue M. J., Olmstead, R. G. Analysing large data sets: *rbcL* 500 revisited. // Syst. Biol. 1998. Vol. 46. P. 554–563.

Richardson J. E., Fay M. F., Cronk Q. C. B. et al. A molecular analysis of Rhamnaceae using *rbcL* and *trnL-F* plastid DNA sequences // Amer. J. Bot. 1997. Vol. 84, N 6. P. 226.

Richardson J. E., Fay M. F., Cronk Q. C. B., et al. A phylogentic analysis of Rhamnaceae using *rbcL* and *trnL*-F plastid sequences // Amer. J. Bot. 2000. Vol. 87. P. 1309–1324.

Riesberg L. H. Homology among RAPD fragments in interspecific comparisons // Molec. Evol. 1996. Vol. 5. P. 99–105.

Rivadavia F., Kondo K., Kato M., Hasebe M. Phylogeny of sundews, *Drosera* Droseriaceae) based on chlorolast *rbcL* and nuclear 18S ribosomal DNA sequences // Amer. J. Bot. 2003. Vol. 90. P. 123 – 130.

Ro K.-E., Keener C., McPheron B. Molecular phylogenetic study of the Ranunculaceae: Utility of the nuclear 26S ribosomal DNA in inferring intrafamilial relationships // Mol. Phylogenet. Evol. 1997. Vol. 8. P. 117–127.

Rodman J., Karol K., Price R., Savolainen V. Salvadoraceae are Capparalean, all but one of the mustard oil taxa from a monphyletic clade and Dahlgren was right // Amer. J. Bot. 1995. S. 82.

Rodman J., Soltis P., Soltis D. et al. Plastid *rbcL* shouts and nuclear 18S-ribosomal DNA whispers, but the message is the same: Dahlgren cuts the mustard // Amer. J. Bot. 1997. Vol. 84, N 6. P. 226.

Rodman J., Sytsma K. Molecules, morphology, and Dahlgren's expanded order Capparales // Syst. Bot. 1996. Vol. 21. P. 289–307.

Rogstad S. H., Patton J. C., Schaal B. M13 repeat probe detects DNA minisatellite-like sequences in gymnosperms and angiosperms //Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1988. Vol. 85. P. 9176–9178.

Rohwer J. G. Toward a phylogenetic classification of the Lauraceae: evudence from *matK* sequences // Syst. Botany. 2000. Vol. 25, N 1. P. 60–71.

Rokas A., Holland P. W. H. Rare genomic changes as a tool for phylogenetics // Trends Ecol. Evol. 2000. Vol. 15, N 11. P. 454 – 459.

Rokas A., Williams B. L., King N., Carroll S. B. Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies // Nature. 2003. Vol. 425. P. 798 – 804.

Ronblom K., Anderberg A. A. Phylogeny of Dispensiaceae based on molecular data and morphology // Syst. Botany. 2002. Vol. 27, N 2. P. 383–395.

Rossetto M., McNally J., Henry R.J. Evaluating the potential of SSR flanking regions for examining taxonomic relationships in the Vitaceae // Theor. Appl. Genetics. 2002. Vol.. 104, N 1. P. 61–66.

Rova J.H.E., Andersson L., Delprete P., Albert V.A. Macrophylogeny of the Rubiaceae from *trnL*-F sequence data // Amer. J. Bot. 1997. Vol. 84, N 6. P. 227.

Rounsley S., Lin X., Ketchum K. A. Large-scale sequencing of plant genomes // Curr. Opin. Plant Biol., 1997. Vol. 1. P. 136–141.

Rudall P. J., Chase M. W., Cutler D. F. et al. Anatomical and molecular systematics of Asteliaceae and Hypoxidaceae // Bot. J. Linn. Soc. 1998. Vol. 127. P. 1–42.

Ryder O. A., McLaren A., Brenner S., et al. DNA banks for endangered animal species // Science. 2000. Vol. 288. P. 275–277.

Rydin C., Kallersjo M. Taxon sampling and seed plant phylogeny // Cladistics. 2002. Vol. 18. P. 485–513.

Rydin C., Kallersjo M., Friis E. M. Seed plant relationships and the systematic position of Gnetales based on nuclear and chloroplast DNA: conflicting data, rooting problems, and the monophyly of conifers // Int. J. Plant Sci. 2002. Vol. 163, N 2. P. 197–214.

Rujan T., Martin W. How many genes in *Arabidopsis* come from cyanobacteria ? An estimate from 386 protein phylogenies // Trends in Genetics. 2001. Vol. 17, N 3. P. 113–120.

Saito N., Nei M. The neighbour-joining method: A new method for the recostruction of phylogenetic trees // Molec. Biol. Evol. 1987. Vol. 4. P. 406–425.

Salamin N., Hodkinson T. R., Savolainen V. Building supertrees: an empirical assessment using the grass family, Poaceae // Syst. Biology. 2002. Vol. 51. P. 136–150.

Salatino A., Salatino M.-L. F., De Mello-Silva R. et al. Phylogenetic inference in Velloziaceae using chloroplast *trnL-F* sequences // Syst. Botany. 2001. Vol. 26, N 1. P. 92–102.

Samigullin T. H., Martin W., Troitsky A. V., Antonov A. S. Molecular data from the chloroplast *rpoC1* gene suggest a deep and distinct dichotomy of contemporary spematophytes into two monophyla: Gymnosperms (including Gnetales) and Angiosperms // J. Mol. Evol. 1999. Vol. 49. P. 310–315.

Samigullin T., Valiejo-Roman K., Troitsky A. et al. Sequences of rDNA internal transcribed spacers from the chloroplast DNA of 26 bryophytes: Properties and phylogenetic utility // FEBS Lett. 1998. Vol. 422. P. 47–51.

Samigullin T. Kh., Yacentyuk S. P., Degtyaryeva G. V. et al. Paraphyly of bryophytes and close relationship of hornworts and vascular plants inferred from analysis of chloroplast rRNA ITS (cpITS) sequences // Arctoa, 2002. Vol. 11. P. 31–43.

Sanders C. A., YajkoD. M., Hyun W. et al. Determination of guanine-plus-cytosine content of bacterial DNA by dual-laser flow cytometry // J. Gen. Microbiol. 1990. Vol. 136. P. 359–365.

Sanders E. R., Karol K. G., McCourt R. M. Occurence of *matK* in a *trn* phylogeny of Characeae // Amer. J. Bot. 2003. Vol. 90. P. 628–633.

Sanderson M. J. Estimating absolute rates of molecular evolution and divergence times: a penalized likelihood approach // Mol. Biol. Evol. 2002. Vol. 19, N 1. P. 101 – 109.

Sanderson M. J. Molecular data from 27 proteins do not support a Precambrian origin of land plants // Amer. J. Bot. 2003. Vol. 90. P. 954–956.

Sanderson M. J., Doyle J. A. Sources of error and confidence intervals in estimating the age of angiosperms from *rbcL* and 18S rDNA data // Amer. J. Bot. 2001. Vol. 88, N 8. P. 1499–1516.

Sanderson M. J., Purvis A., Henze C. Phylogenetic supertrees: assembling the trees of life // Trends Ecol. Evol. 1998. Vol. 13. P. 105–109.

Sanderson M. J., Thorne J. L.., Wikstrom N., Bremer K. Molecular evidence on plant divergence times // Amer. J. Bot. 2004. Vol. 91. P. 1656–1665.

Sang T., Crawford D.J., Stuessy T. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae) // Amer. J. Bot. 1997. Vol. 84, N 8. P. 1120–1136.

Sanger F., Coulson A. R. A rapid method for determining sequencesin DNA by primer synthesis with DNA polymerase // J. Mol. Biol. 1975. Vol. 94. P. 441–448.

Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. Vol. 74. P. 5463–5467.

Savard L., Li P., Strauss S. H., Chase M. W. et al. Chloroplast and nuclear gene sequences indicate Pennsylvanian time for the last common ancestor of extant seed plants // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1994. Vol. 91. P. 5163–5167.

Saunders G. W., Kranz G. T. A molecular perspective on red algae evolution: focus on Florideophycidae. In " Origins of algae and their plastids", Bharracharaya D., Ed. Springer: Wien : N.Y., 1995a. P. 115–138.

Savolainen V., Chase M. W. A decade of progress in plant molecular phylogenetics // Trends Genet. 2003. Vol. 19. P. 717 – 724.

Savolainen V., Cuenoud P., Spichiger R. et al. The use of herbarium specimens in DNA phylogenetics: evaluation and improvement // Plant Syst. Evol. 1995. Vol. 197. P. 87–98.

Savolainen V., Manen J. F., Douzery E, Spichiger R. Molecular phylogeny of families related to Celastrales based on *rbcL* 5′-flanking sequences // Mol. Phylogenet. Evol. 1994. Vol. 3. P. 27–37.

Schaal B. A., Learn G. H. Ribosomal DNA variation within and among plant populations // Annals Missouri Bot. Garden. 1988. Vol. 75. P. 1207–1216.

Schilling G. Evolutionary and systematic biologists converge // Science. 1996. Vol. 273. P. 181–182.

Schmidt M., Schneider-Poetsch C. The evolution of gymnosperms redrawn by phytochrome genes: the Gnetatae appear at the base of the gymnosperms // J. Mol. Evol. 2002. Vol. 54. P. 715–724.

Schmidt T. LINEs, SINEs, and repetitive DNA: non-LTR retrotransposones in plant genomes // Plant Mollec. Biol. 1999. Vol. 40. P. 903–910.

Schneider H., Russel S. J., Cox C. J. et al. Chloroplasst phylogeny of asplenoid ferns based on *rbcL* and *trn* L-F spacer sequences (Polypodiidae, Aspleniaceae) and its implications for biogeography // Syst. Bot. 2004. Vol. 29, N 2. P. 260–274.

Schonenberg J., Conti E. Molecular phylogeny anf floral evolution of Penaeaceae, Oliniaceae, Rhynchocalycaceae, and Alzateaceae (Myrtales) // Amer. J. Bot. 2003. Vol. 90. P. 293–309.

Schulman A. H., Gupta P. K. Varshney R. K. Organization of retrotransposons and microsatellites in cereal genomes // http://www.rbgkew.org.uk/cvalues. .

Schultheis L. M., Baldwin B. G. Molecular phylogenies of Fouquieriaceae: evidence from nuclear rDNA ITS studies // Amer. J. Bot. 1999. Vol. 86, N 4. P. 578–587.

Schuster R. M. Morphology, phylogeny and classification of the Anthocerotae // New manual of bryology. Schuster R. M., Miazaki—Ken, Eds. Japan: Hattori Botanical Lab. 1984a. P. 456–479.

Schuster W., Brennicke A. The plant mitochondrial genome: Physical structure, information content, RNA editing, and gene migration to the nucleus // Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol. 1994. Vol. 45. P. 61–78.

Schutze P., Freitag H., Weising K. An integrated molecular and morphological study of the subfamily Suaedoideae Ulbr. (Chenopodiaceae) // Plant Syst. Evol. 2003. Vol. 239. P. 257–286.

Schwartzbach A. E., Ricklefs R. E. Systematic affinities of Rhizophoraceae and Anisophyllaceae and intergeneric relationships within Rhizophoraceae // Amer. J. Botany. 2000. Vol. 87. P. 547–564.

Schwartzbach A. E., McDade L. A. Phylogenetic relationships of the mangrove family Avicenniaceae based on chloroplast and nuclear ribosomal DNA sequences // Syst. Botany. 2002. Vol. 27, N 1. P. 84–98.

Scotland R. W., Sweere J. A., Reeves P. A., Olmstead R. G. Higher-level systematics of Acanthaceae determined by chloroplast DNA sequences // Amer. J. Bot. 1995. Vol. 82. P. 266–275.

Scotland R.W. Are angiosperms firmly rooted ? // Taxon. 2000. Vol. 49. P. 529–531.

Seloguchi H., Osawa T. A., Pintaud J.-C. et al. Phylogenetic relationships within Araucariaceae based on *rbcL* gene sequences // Amer. J. Bot. 1998. Vol. 85. P. 1507–1518.

Shaw A. J. Phylogeny of Sphagnopsida based on chloroplast and nuclear DNA sequences // Bryologist. 2000. Vol. 103. P. 277 – 306.

Shaw A. J. Scizymenium shevokii (Bryaceae), a new species of moss from California, based on morphological and molecular evidence // Syst. Botany. 2000a. Vol. 25, N 2. P. 188–196.

Shaw A. J , Goffinet B. Molecular evidence of reticulate evolution in the peatmosses (*Sphagnum*) , including *S. ehyalinum* sp. nov // Bryologist., 2000b. Vol. 103. P. 357–374.

Shaw A . J., Cox C . J., Boles S. B. Polarity of peatmoss (*Sphagnum*) evolution: who says bryophytes have no roots ? // Amer. J. Bot. 2003. Vol. 90. P. 1777–1787.

Shaw J., Renzaglia K. Phylogeny and diversification of bryophytes // Amer. J. Bot. 2004. Vol. 91, N 10. P. 11557–1581.

Sheahan M. C., Chase M. W. A phylogenetic analysis of Zygophyllaceae R. Br. based on morphological, anatomical and *rbcL* sequence data // Bot. J. Linn. Soc. 1996. Vol. 122. P. 279–300.

Sheahan M. C., Chase M. W. Phylogenetic relationships within Zygophyllaceae based on DNA sequences of three plastid regions, with special emphasis on Zygophylloideae // Syst. Botany. 2000. Vol. 25, N 2. P. 371–384.

Shi S. H., Qu L.H. et al. Sequencing and comparative analysis of the large subunit ribosomal RNA 5'-terminal region for four species of gymnosperms and their phylogenetic significance // Cathaya. 1994. Vol. 6. P. 35–42.

Shi S., Zhong Y., Huang Y. et al. Phylogenetic relationships of the Rhizophoraceae in China based on sequences of the chloroplast gene *matK* and the internak transcribed spacer regions of nuclear ribosomal DNA and combined data set.// Bioch. Syst. Ecol. 2002. Vol. 30, N 4. P. 309–319.

Shih A., Li W.-H. GS-aligner: a novel tool for aligning genimic sequences using bit-level operations // Mol. Biol. Evol. 2003. Vol. 20, N 8. P. 1299–1309.

Shi S.H., Chag H.T. et al. Phylogeny of Hamamelidaceae based on the ITS sequences of nuclear ribosomal DNA // Biochem. Syst. Ecol. 1998. Vol. 26. P. 55–69.

Shimada H., Sugiura M. Pseudogenes and short repeated sequences in the rice chloroplast genome // Curr. Genet. 1989. Vol. 16. P. 293–301.

Shirasu K., Schulman A. H., Lahaye T., Sculze-Lefert P. A contiguous 66-kb barley DNA sequence provides evidence for reversible genpome expansion // Genome Res. 2000. Vol. 10. P. 908–915.

Shutov A. D., Braun H., Chesnokov Yu. V. et al. Sequence peculiarity of Gnetalean legumin-like seed storage proteins // J. Mol. Evol. 1998. Vol. 47. P. 486–492.

Simmons S. L., Panero J. L., Chase M. W. Molecular systematics of Staphyleaceae: A re-evaluation of its composition, ordinal placement, intra- and infrageneric relationships as inferred from *rbcL* and ITS sequence data // Amer. J. Bot. 1998. Vol. 85, N 6. P. 147.

Simmons M. P., Clevinger C. C., Savolainen V. et al. Phylogeny of Celastraceae inferred from phytochrome B gene sequence and morphology // Ibid. 2001. Vol. 88. P. 313–325.

Skotnicki M. L., Ninham A. L., and Selkirk P. M. Genetic diversity and dispersal of the moss *Sarconeurum glaciale* on Ross Island, Antarctica // Mol. Ecol. 1999. Vol. 8, N 50. P. 753–762.

Skotnicky M. L., Ninham A. L., Selkirk P. M. Genetic dispersal, mutagenesis and dispersal of Antarctic mosses – a review of progress with molecular studies // Antarctic Science. 2000. Vol. 12, N 3. P. 363–373.

Small R. L., Cronn R. C., Wendel J. L. Use of nuclear genes for phylogeny reconstruction in plants // Austral. Syst. Botany. 2004. Vol. 17. P. 145–170.

Smissen R. D., Clement J. C., Garnock-Jones P. J, Chambers G. K. Subfamilial relationships within Caryophyllaceae as inferred from 5' *ndhF* sequences // Amer. J. Bot. 2002. Vol. 89. P. 1336–1341.

Smith J. F., Doyle J. J. A cladistic analysis of chloroplast DNA restriction site variation and morphology for the genera of the Juglandaceae // Amer. J. Bot.. 1995. Vol. 82. P. 1163–1172.

Smith J.F., Wolfram J.C., Brown K.D. et al. Tribal relationships in the Gesneriaceae: evidence from DNA sequences of the chloroplast gene *ndhF* // Ann. Missouri Bot. Gard. 1997. Vol. 84. P. 50–66.

Smith J., Kress W., Zimmer E. Phylogenetic analysis of the Zingiberales based on *rbcL* sequences // Ann. Missouri Bot. Garden. 1993. Vol. 80. P. 620–630.

Smith R. A., Depamphilis C. W. Phylogenetiic placement of the holoparasitic family Lennoaceae: preliminary molecular evidence // Amer. J. Bot. 1998. V. 85, N 6. P. 82.

Sogo A., Setoguchi H.,; Noguchi J. et al. Molecular phylogeny of Casuarinaceae based on *rbcL* and *matK* gene sequences // J. Plant Res. 2001. Vol. 114 N 1116. P. 459–464.

Soltis D. E., Kuzoff R. K., Mort M. E., et al. Elucidating deep-level phylogenetic relationships in Saxifragaceae using sequences for six chloroplastic and nuclear DNA regions // Ann. Missouri Bot. Gard. 2001. Vol. 88 , N 4. P. 669–693.

Soltis D. E., Mort M. E., Soltis P. S., et al. Phylogenetic relationships of the enigmatic angiosperm family Podostemaceae inferred from 18S rDNA and *rbcL* sequence data // Mol. Phylogenet. Evol. 1999a. Vol. 11, N 2. P. 261–272.

Soltis D. E., Senters A. E., Zanis M. J. et al. Gunnerales are sister to other core eudicots: implications for the evolution of pentametry // Amer. J. Bot., 2003. Vol. 90. P. 461–470.

Soltis D. E., Soltis P. S. Phylogenetic relationships in Saxifragaceae sensu lato: a comparison of topologies based on 18S rDNA and *rbcL* sequences // Amer. J. Bot. 1997. Vol. 84. P. 504–522.

Soltis D. E, Soltis P. S. Polyploidy: Recurrent formation and genome evolution // Trends Ecol. Evol. 1999c. Vol. 14, N 9. P. 348–352.

Soltis D. E., Soltis P. S. Contribution of plant molecular systematics to studies of molecular evolution // Plant Molec. Biol. 2000. Vol. 42, N 1. P. 45–75.

Soltis D. E., Soltis P. S. et al. *RbcL* sequence divergence and phylogenetic relationship in Saxifragaceae s.l // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1990. Vol. 87. P. 4640–4644.

Soltis, D. E., Soltis, P. S. et al., Angiosperm phylogeny inferred from 18S ribosomal DNA sequences. // Ann. Missouri Bot. Garden. 1997a. Vol. 84. P. 1–49.

Soltis D. E., Soltis P. S., Chase M. W. et al. Inferring complex phylogenies: An empirical approach using three large DNA data sets for angiosperms // Amer. J. Bot. 1997b. Vol. 84, N 6. P. 232.

Soltis D.E., Soltis P.S., Chase M.W. et al. Molecular phylogenetics of angiosperms: congruent patterns inferred from three genes. Prt 1,2 // Amer. J. Bot. 1998a. Vol. 85, N 6. P. 165–166.

Soltis D. E., Soltis P. S., Bennet M. D., Leitch I .J. Evolution of genome size in the angiosperms // Am. J. Bot. 2003. Vol. 90. P 1596 – 1603.

Soltis D. E., Soltis P.S., Chase M. W. et al // Bot. J. Linn. Soc. 1998b. Vol. 133. P. 381–461. Цит. по *Davies* et al., 2004.

Soltis D. E., Soltis P. S. Amborella not a "basal angiosperm"? Not so fast // Amer. J. Bot. 2004. Vol. 91. P. 997–1001.

Soltis D. E., Xiang Q-Y., Hufford L. Relationships and evolution of Hydrageaceae based on *rbcL* sequences // Amer. J. Botany. 1995. Vol. 82. P. 504–514.

Soltis P S., Soltis D. S. The origin and diversifcation of angiosperms // Amer. J. Bot. 2004. Vol. 91, N 10. P. 1614–1626.

Soltis P. S., Soltis D. E., Smiley C. J. An *rbcL* sequence from a Miocene *Taxodium* (bald cypress) // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. Vol. 89, N 1. P. 449–451.

Soltis P. S., Soltis D. E., Chase M. W. Angiosperm phylogeny inferred from multiple genes as a tool for comparative biology // Nature. 1999a. Vol. 402. P. 402–404.

Soltis P. S., Soltis D. S., Savolainen V., et al. Rate heterogeneity among lineages of tracheophytes: integration of molecular and fossil data and evidence for molecular living fossils // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002. Vol. 99. N 7. P. 4430–4435.

Soltis P. S., Soltis D. E., Wolf P. G. et al. The phylogeny of land plants inferred from 18S rDNA sequences: pushing the limits of rDNA signal ? // Mol. Biol. Evol. 1999b Vol. 16, N 12. P. 1774–1784.

Sone T., Fujisawa M., Takenaka M. et al. Bryophyte 5S rRNA was inserted into 45S rDNA repeat units after the divergence from higher land plants // Plant Mol. Biol. 1999. Vol. 41. P. 679–685.

Song B.-H., Wang X.-Q., Li E.-Z., Hong D.-Y. Further evidence for paraphyly of the Celtidaceae from the chloroplast gene *matK* // Plant Syst. Evol. 2001. Vol. 228, N 1–2. P. 107–115.

Soranzo N., Goldstein D. B. Following the dogma: molecular evoltionists move from genes to messages and proteins // Trends Genet. 2002. Vol. 18, N 10. P. 497–499.

Soreng R. J. Chloroplast-DNA phylogenetics and biogeography in a reticulating group: Study in *Poa* (Poaceae) // Amer. J. Bot. 1990. Vol. 77. P. 1383–1400.

Soreng R. J., Davis J. I. Phylogenetics and character evolution in the grass family (Poaceae): Simultaneous analysis of morphological and chloroplast DNA restriction site data sets // Bot. Rev. 1998. Vol. 64. P. 1–85.

Soreng R. J., Davis J. I., Doyle J. J. A phylogenetic analysis of chloroplast DNA restriction site variation in Poaceae subfam. Pooideae // Plant Syst. Evol. 1990. Vol. 172. P. 83–97.

Sosa V., Chase M. W. Phylogenetics of Crossosomataceae based on *rbcL* sequence data // Syst. Botany. 2003. Vol. 28, N 1. P. 960–105.

Souza-Chies T.T., Bittar G., Nadot S., et al. Phylogenetic analysis of Iridaceae with parsimony and distance methods using the plastid gene *rps4* // Plant Syst. Evol. 1997. Vol. 204. P. 109–123.

Spangler R. E., Olmstead R. G. Phylogenetic relationships of the Bignoniaceae based on cpDNA gene sequences of *rbcL* and *ndhF* // Amer. J. Bot. 1997. V. 84, N 6. P. 234.

Specht C. D., Kress W. J., Stevenson D. W., DeSalle R. A molecular phylogeny of Costaceae (Zingiberales) // Molec. Phylogenet. Evol. 2001. Vol. 21, N 3. P. 333–345.

Spichiger R., Savolainen V., Manen J. F. Systematic affinities of Aquifoliaceae and Icacinaceae from molecular data analysis // Candonella. 1993. Vol. 48. P. 459–464.

Stech M. A reclassification of the Dicranaceae (Bryopsida) based on non-coding cpDNA sequence data // J. Hattori Bot. Lab. 1999. Vol. 86. P. 137 – 159.

Stech M., Frahm J. P., Hilger H. H., Frey W. Molecular relationship of *Treubia goebel* (Treubiaceae, Treubiopsida) and high taxonomic level classification of the Hepaticophytina – Studies in austral temperature rain forest bryophytes // Nova Hedwigia. 2000. Vol. 72, N 1–2. P. 195–208.

Stech M., Frey W. CpDNA-relationship and classification of the liverworts (Hepaticophytina, Bryophyta) // Nova Hedwigia. 2001. Vol. 72, N 1–2. P. 45–58.

Steele K.P., Vilgalys R. Phylogenetic analyses of Polemoniaceae using nucleotide sequences of the plastid gene *matK* // Syst. Bot. 1994. Vol. 19. P. 126–142.

Stefanovich S., Jager M., Deutsch J. et al. Phylogenetic relationships of conifers inferred from partial 28S rRNA gene sequences // Amer. J. Bot. 1998. Vol. 85, N 5. P. 688–697.

Stefanovich S., Krueger L, Olmstead R. G. Monophyly of the Convolvulaceae and circumscription of their major lineages based on DNA sequences of multiple chloroplast loci // Amer. J. Bot. 2002. Vol. 89. P. 1510–1522.

Stefanovich S., Austin D., Olmstead R. Classification of Convolvulaceae: a phylogenetic approach. / // Syst. Botany. 2003. Vol. 28, N 4. P. 791 – 806.

Stein D. B., Connant D. S. et al. Structural rearragements of the chloroplast genome provide an important phylogenetic link in ferns // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1992. Vol. 89. P. 1856–1860.

Steinhauser S., Beckert S., Capesius I., Malek O. et al. Plant mitochondrial RNA editing - extreme in hornworts and dividing the liverworts // J. Mol. Evol. 1999. Vol. 48. P. 48–56.

Stevens, F. C. et al. 1967. Цит. по: Takhtajan, 1973.

Stewart W. N., Rothwell G. W. Paleobotany and the evolution of plants. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1993.

Stocklein L., Ludwig W., Schleifer K. H., Stackebrandt E. Proteins and nucleic acids in plant systematics. Ed. U. Jensen, D.E. Fairbrothers. B., Heidelberg: Springer. 1983. P. 58–62.

Stoebe B., Kowallik K. V. Gene-cluster analysis in chloroplast genomics // TIG. 1999. Vol. 15, N 9. P. 344–347.

Strauss et al., 1988; цит. по Palmer, 1991.

Struwe L., White P., Pepper A. Albert V. A. Relationships and basal groupings within Gentianaceae from morphological and *trnL* nucleotide sequence data // Amer. J. Bot. 1997. Vol. 84, N 6. P. 236.

Stuart-Rogers C., Flavell A.J. The evolution of Ty1-copia group retrotransposons in gymnosperms // Mol. Biol. Evol. 2001. Vol. 18, N 2. P. 155–163.

Suh Y. L., Thien B., Reeve H. E., Zimmer E. A. Molecular evolution and phylogenetic implications of internal transcribed spacer sequences of ribosomal RNA in Winteraceae // Amer. J. Bot. 1993. Vol. 80. P. 1042–1055.

Suhua S., Yu Q. L., Hongda X. Z. Molecular evidence for the relationship among *gnetum*, gymnosperm and fngiosperm // Acta Sci. Natur. Univ. Sunyatsen. 1993. Vol. 32. P. 55–59.

Swensen S. M., Mullin B. C., Chase M. W. Phylogenetic affinities of Datiscaceae based on analysis of nucleotide sequences from the plastid *rbcL* gene // Syst. Bot. 1994. Vol. 19. P. 157–168.

Swensen S. M., Walsh C. M. A molecular phylogeny of Cucurbitaceae // Amer. J. Bot. 1997. Vol. 84, N 6. P. 236.

Swofford D.L. PAUP: phylogenetic analysis using parsimony version 3.1. Computer program distributed by Illinois Natural History Survey. Champaign, Illinois.

Sykes B. Lights turning red on amber // Nature. 1997. Vol. 386. P. 764–765.

Sytsma K. J., Baum D. A., Rodrigues A. et al. An ITS phylogeny for Onagraceae: Congruence with three molecular data sets // Amer. J. Bot. 1998b, Vol. 85, N 6. P. 178.

Sytsma K. J., Conti E., Nepokroeff M., et al. Urticales: *rbcL* sequences clarify placement in Rosidae, composition, and familial relationships // Amer. J. Bot. 1996. Vol. 83. P. 197.

Sytsma K. J., Gottlieb L. D. Chloroplast DNA evolution and phylogenetic relationships in *Clarkia* sect. Peripetamsa (Onagraceae) // Evolution. 1986. Vol. 40. P. 1248–1261.

Sytsma K. J., Morawetzz J., Pires J. C. et al. Urticalean rosids: circumscription, rosid ancestry, and phylogenetics based on *rbcL, trnL-F*, and *ndhF* sequences // Amer. J. Bot. 2002. Vol. 89. P. 1531–1546.

Sytsma K. J., Zjhra M. L., Nepokroeff M. et al. Phylogenetic relationships, morphological evolution, and biogeography in Myrtaceae based on *ndhF* sequence analysis // Amer. J. Bot. 1998a. Vol. 85, N 6. P. 177.

Takhtajan A. L., The chemical approach to plant classification with special reference to the higher taxa of Magnoliophyta. Chemistry in Botanical Classification. Ed. G. Bend , J. Santesson. Stockholm: Nobel Foundation; L.; N.Y.: Acad. press, 1973. P. 17–28.

Takhtajan A. L. Diversity and classification.of flowering plants. N.Y.: Columbia Univ. Press, 1997.

Tan I. H., Blomster J., Hansen G., et al. Molecular phylogenetic evidence for a reversible morphogenetic switch controlling the gross morphology of two common genera of green seaweeds, *Ulva* and *Enteromorpha* // Mol. Biol. Evol. 1999. Vol. 16, N 8.P. 1011–1018.

Tanksley et al., 1992. Цит. по Bancroft, 2001.

Taylor W. C., Lekschas A. R., Wang Q. F., et al. Phylogenetic relationships of *Isoetes* (Isoetaceae) in ChinaE// Amer. Fern J. 2004. Vol. 94. P. 196–205.

Terry R., Smith J. A. C., Crayn D., Winter K. Reassesment of subfamiily relationships in Bromeliaceae using noncoding sequences of chloroplast genome // Amer. J. Bot. 1998. Vol. 85, N 6. P. 182.

Theissen G, Saedler H. MADS-box genes in plant ontogeny and phylogeny: Haeckel's "biogenetic law" revisited // Curr. Opin. Genet. 1995. Vol. 5. P. 628–639.

Theissen G., Saedler H. Molecular architects of plant body plans // Prog. Bot. 1998. Vol. 59. P. 227–256.

Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. CRUSTAL.W: improving the sensitivity of progressing multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // Nucleic Acids Res., 1994. Vol. 22. P. 4673 –4680.

Thorne R. F. Classificatiion and geography of the flowering plants // Bot. Rev. 1992. Vol. 58. P. 225–348.

Thorne R.F. The classification and geography of the flowering plants: dicotyledons of the class angiospermae // Bot. Review. 2000. Vol. 66, N 4. P. i –ii.

Thorne R. F. The classification and geography of the monocotyledon subclasses Alismatidae, Liliidae, and Commelinidae of the class Angiospemae [Electromic resource. Mode of access: http://www.monocots3.org/classif.pdf].

Thorness P. E., Weber E. R. Escape and migration of nucleic acids between chloroplast, mitochondria and nucleus // Intern. Rev. Cytol. 1996. Vol. 165. P. 207–231.

Tompa M. Identifying functional elements by comparative DNA sequence analysis // Genome Res. 2001. Vol. 11. P. 1143–1144.

Troitsky A. V., Bobrova V. K. 23S rDNA-derived small ribosomal RNAs: their structure and evolution with reference to plant phylogeny. In: DNA systematics, Vol. 2: Plants. S. K. Dutta, Ed.., CRC Press, Boka Raton, 1986. P. 137 – 170.

Troitsky A. V., Melekhovets Yu. F., Bobrova V. K. et al. Angiosperm origin and early stages of seed plant evolution deduced from rRNA sequence comparisons // J. Molek. Evol. 1991. Vol. 32. P. 253–261.

Turner B. L. Plant systematics: beginnings and endings // Aliso. 1998. Vol. 17, N 2. P. 189–200.

Ueda K., Nakano A., Rodriguez R. et al. Molecular phylogeny of the Gomortegaceae, a Chilean endemic, monotypic and endangered family // Notic. Biol. 1998. Vol. 5. P. 24.

Unseld M., Marienfeld J. R., Brand P. Brennecke A. The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 3669244 nucleotides // Nat. Genet., 1997. Vol. 15. P. 57–61.

Valiejo-Roman K. M., Pimenov M. G., Terentieva E. I. et al. Molecular systematics of the Umbelliferae: debatable problems of taxonomy and phylogeny being checked by sequence studies of nuclear rDNA internal transcribed spacers .// Ботан. журнал. 1998. Т. 83. С. 1–22.

Valiejo-Roman K.M., Terentieva E. I., Samigullin T. H., Pimenov M. G. Relationships among genera in Saniculoideae and selected Apioideae (Umbelliferae) inferred from nrITS sequences // Taxon. 2002a. Vol. 51. P. 91–103.

Valiejo-Roman K. M., Terentieva E. I., Samigullin T. H. , Pimenov M. G. nrDNA ITS sequences and affinities of Sino-Himalayan Apioideae (Umbelliferae) // Taxon. 2002b. Vol. 51. P. 685–701.

Van de Peer Y., De Wachter R. Evolutionary relationships among the eukaryotic crown taxa taking into account site-to-site variation in 18S rRNA // J. Mol. Evol. 1997. Vol. 45. P. 619–630.

Van Hamm R., Hart C. et al. Molecular evolution of non-coding regions of the chloroplast genome in the Crassulaceae and related species // Curr. Genet. 1994. Vol. 25. P. 558–566.

Van Valen, L. 1974 (цит. по: Martin W. Gierl A., Saedler H. Martin, Gierl, and Saedler: Reply // Nature. 1989. Vol. 342. P. 132.

Vanderporten A., Goffinet B., Hedenas L. et al. A taxonomic reassesment of the Vittiaceae (Hyphnales, Bryopside): evidence from phylogenetic analysis of combined chloroplast and nuclear sequence data // Plant Syst. Evol. 2003. Vol. 241. P. 1–2.

Vedel F.,Quetier F., Bayen V. Specific cleavage of chloroplast DNA from higher plants by *Eco*R1 restriction nuclease // Nature. 1976. Vol. 263. P. 440–442.

Vicient C. M., Jaaskelainen M. J., Kalendar R., Schulman A. H. Active retrotransposons are a common feature of grass genomes // Plant Physiol. 2001. Vol. 125. P. 1283–1292.

Vinnerstern A., Reeves G. Phylogenetic relationships within Colchicaceae // Amer. J. Bot. 2003. Vol. 90. P. 1455–462.

Vitt D. H., Goffinet B., Hedderson T. The original classification of the mosses: questions and answers for the 1990s. //Bryology of the twenty-first century J. W. Bates et al., Eds. British Bryol. Soc. 1998. P. 113–123.

Vining T. F., Gernandt D. S., Liston A., Campbell C. S. Nuclear ribosomal DNA (nrDNA) internal transcribed spacer 1 (ITS1) subrepeats and phylogeny of Pinaceae // Amer. J. Bot. 1998. Vol. 85, N 6. P. 184.

Vitt D.H. New mannual of bryology. Jp.: Hattory Bot. Lab. Nichiman. 1984. Vol. 2. P. 697–759.

Vitt D. H., Goffinet B., Hedderson T. The original classification of the mosses: questions and answers for the 1990. Bryology of the twenty-first century, J. W. Bates et al. Eds. British Bryol. Soc. 1998. P. 113–123.

Vogl C., Badger J ., Kearney P. et al. Probabilistic analysis indicates discordant gene trees in chloroplast evolution // J.Mol. Evol.. 2003. Vol. 56. P. 330–340.

Wagner A. Birth and death of duplicated genes in completely sequenced eucaryotes // Trends in Genet. 2001. Vol. 17. N 5. P. 237–239.

Wagner W. H., Beitel M. J., Generic classification of modern North American Lycopodiaceae // Ann. Missouri Bot. Gard. 1992. Vol. 79. P. 676–686.

Wagstaff S. J., Hickerson L., Spangler R. et al. Phylogeny of Labiatae s.l., inferred from cpDNA sequences // Plant Syst. Evol. 1998. Vol. 209, N 3/4.

Wagstaff S. J., Olmstead R. G. Phylogeny of Labiatae and Verbenaceae inferred from *rbcL* sequences // Syst. Bot. 1997. Vol. 22. P. 165–177.

Wallace R .S. Molecular evidence for the elucidation of subfamilial relationships within the Aizoaceae s.l // Amer. J. Bot. 1998. Vol. 85, N 6. P. 19.

Wallander E., Albert V. Phylogeny of Oleaceae based on the *trnL-F* and *rps16* intron of the plastid genome // Ibid. 1998. Vol. 85, N 6. P. 39.

Wallandr E., Albert V. A. Phylogeny and classification of Oleaceae based on *rps16* and *trnL*-F sequence data // Ibid. 2000. Vol. 87. P. 1827–1841.

Ward N. M, Price R. A. Phylogenetic relationships of Marcgraviaceae: insights from three chloroplast genes. // Syst. Botany. 2002, Vol. 27, N 1, P. 149–160.

Waters D. A., Buchheim M. A., Dewey R. A., Chapman R. C. Preliminary inferences of the phylogeny of bryophytes from nuclear-encoded ribosomal RNA sequences // Amer. J. Bot. 1992. Vol. 79. P. 459–466.

Waters E. R., Vierling E. The diversification of plant cytosolic small heat shock proteins preceded the divergence of mosses // Mol. Biol. Evol. 1999. Vol. 16. P. 127–139.

Weigel D., Alvarez J., Smyth D. R. et al. LEAFY controls floral meristem identity in *Arabidopsis* // Cell. 1992. Vol. 69. P. 843–859.

Weissler S. R. Plants transposable elements. A hard act to follow, // Plant Physiol. 2001. Vol. 125. P. 149–151.

Welsh J., McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers // Nucl Acids. Res. 1990. Vol. 18, N 22. P. 7213–7218.

Wen J., Vanek-Krebitz M. et al. The potential of *betv1* homologues, a nuclear multigene family, as phylogenetic markers in flowering plants // Mol. Phylogenet. Evol. 1997. Vol. 8. P. 317–333.

Wen J., Plunkett G. M., Mitchell A. D. The evolution of Araliaceae: a phylogenetic analysis based on ITS sequences of nuclear ribosomal RNA // Syst. Botany. 2001. Vol. 26, N 1. P. 144 – 167.

Wendel J. F., Doyle J. J. Phylogenetic incongruence: Window into genome history and molecular evolution. In: Molecular systematics of plants, Boston: Kluwer, 1998. Vol. 2. DNA sequencing. P. 265–296.

Wheeler J. A. Toward an understanding of the deep "marchantioid" radiation // Amer. J. Bot. 1997. Vol. 84, N 6. P. 24.

Wiegrefe S.J., Sytsma K.J., Guries R.P. The Ulmaceae, one family or two ? Evidence from chloroplast DNA restriction site mapping // Plant Syst. Evol. 1998. Vol. 210, N 3–4. P. 111–128.

Wiens J., Servedio M. Species delimination in systematics: Inferring diagnostic differences between species // Proc. R. Soc. London. B. Biol. Sci. 2000. Vol. 267. P. 631–636.

Wikstrom N., Kenrick P. Phylogeny of Lycopodiaceae (Lycopsida) and the relationship of *Phylloglossum drummondii* Kunze based on *rbcL* sequences // Intern. J. Plant Sci. 1997. Vol. 158, N 6. P. 862–871.

Wikstrom N., Kenrick P., Chase M. Epiphytism and terrestrialization in tropical *Huperzia* (Lycopodiaceae) // Plant Syst. Evol. 1999. Vol. 218. P. 221–243.

Wikstrom N., Kenrick P. Phylogeny of epiphytic *Huperzia* (Lycopodiaceae): paleotropical and neotropical clades corroborated by *rbcL* sequences // Nord. J. Bot. 2000a. Vol. 20. P. 165–171.

Wikstrom T,, Kenrick P. Relationships of *Lycopodium* and *Lycopodiella* based on combined plastid *rbcL* gene and *trnL* intron sequence data // Syst. Bot. 2000b. Vol. 25. P. 495 – 510.

Wikstrom N., Kenrick P. Evolution of Lycopodiaceae (Lycopsida) : estimating divergence times from *rbcL* gene sequences by the non-parametric rate smoothing // Mol. Phylogenet. Evol. 2001. Vol. 19. P. 177–186.

Willliams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J. et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers // Nucl. Acids Res. 1990. Vol. 18, N 22. P. 6531–6535.

Williams S. E., Albert V. A., Chase M. W. Relationships of Droseriaceae: a cladistic analysis of *rbcL* sequence and morphological data // Amer. J. Bot. 1994. Vol. 81. P. 1027–1037.

Wilson E. O. On the future of conservation biology // Conservation Biol. 2000. Vol. 14, N 1. P. 1–3.

Wilson P. G., O'Brien M., Gadek P. A., Quinn C. J. Myratceae revisited: a reassessment of infrafamilial groups // Am. J. Bot. 2001. Vol. 88, N 11. P. 2013–2025.

Winter K. U., Becker A., Munster T. et al. MADS-box genes reveal that gnetophytes are more closely related to conifers than to flowering plants // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1999. Vol. 96, N 13. P. 7342–7347.

Witte C. P., Le Q. H., Bureau T., Kumar A. Terminal-repeat retrotransposons in miniature (TRIM) are involved in restructuring plant genomes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. Vol. 98, N 24. P. 13778–13783.

Woese C. R. Bacterial evolution // Microbiol. Rev. 1987. Vol. 51. P. 221–271.

Wolf P. G. Phylogenetic analysis of *rbcL* and nuclear ribosomal RNA gene sequences in Dennstaedtiaceae // Amer. Fern J. 1995. Vol. 85. P. 306–327.

Wolf P. G. Evaluation of *atpB* nucleotide sequences for phylogenetic studies of ferns and other pteridophytes // Amer. J. Bot. 1997. Vol. 84, N 10. P. 1429–1440.

Wolf P. G., Karol K. G., Mandoli D. F., et al. The first complete chloroplast genome sequence of a lycophyte, *Huperzia lucidula* (Lycopodiaceae) // Gene, 2005 (in press).

Wolf P. G., Pryer K. M., Smith A. R., Hasebe M. Phylogenetic studies of extant pteridophytes // In: Molecular Systematics of Plants. Boston: Kluwer, 1998. Vol. 2. P. 541–556.

Wolf P. G., Soltis P. S., Soltis D. E. Phylogenetic relationships of Dennstaedtioid ferns: evidence from *rbcL* sequences //Mol. Phylogenet Evol. 1994. Vol. 3. P. 383–392.

Wolfe A. D., DePamphilis C. W. The effect of relaxed functional constraints on the photosynthetic gene rbcL in photosynthetic and nonphotosynthetic plants // Mol. Biol. Evol. 1998. Vol. 15, N 10. P. 1243–1258.

Wolfe K. H., Gouy M., Yang Y. W., Sharp P., Li W.-H. Date of monocot-dicot divergence estimated from chloroplast DNA sequence data // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1989. Vol. 84. P. 9054–9058.

Wolfe K. H., Li W.-H., Sharp P. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1987. Vol. 84. P. 9054–9058.

Won H., Renner S. S. Horizontal gene transfer from flowering plants to *Genetum* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. Vol. 100. P. 10824–10829.

Woodward S. R., Weyland N. J., Bunell M. Science, 1994. Vol. 266. P. 1229. Цит. по Cooper, Poinar, 2000.

Wurdack K. J., Chase M. W. Molecular systematics of Euphorbiaceae *sensu lato* using *rbcL* sequence data // Amer. J. Bot. 1996. Vol. 83. P. 203.

Xiang Q-Y., Soltis D. RbcL sequence divergence and phylogenetic relationships of Cornaceae *sensu lato*. In: Sino-Japanese flora – its characteristics and diversification. Ed. D.E. Boufford, H. Ohta. Tokyo: Univ. Press, 1998a.

Xiang Q-Y., Soltis D. E., Soltis P. S. The Eastern Asian and Eastern and Western American floristic disjunction: congruent phylogenetic patterns in seven diverse genera // Mol. Phylogent. Evol. 1998b. Vol. 10. P. 1065–1073.

Yang F. S., Wang X. Q, Hong D. Y. Unexpected high divergence in nrDNA ITS and extensive parallelism in foral morpology of *Pedicularis* (Orobanchaceae) // Plant Syst. Evol. 2003. Vol. 240. P. 91–105.

Yu J., Hu S., Wang J. et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa L.* ssp. Indica) // Science. 2002. Vol. 296. P. 79–91.

Zanis M., Soltis D. E., Soltis P. S., et al. The root of angiosperms revisited // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. Vol. 99. P. 6848–6853.

Zhang W. The phylogeny of the grass family (Poaceae) from *rpl6* intron sequence data // Amer. J. Bot. 1997. Vol. 84, N 6. P. 247.

Zhang X., Mcellin S. M. The reconstruction and comparison of phylogenetic trees of the order Nymphaeales based on morphological and molecular data // Amer. J. Bot. 1998. Vol. 85, N 6. P. 7.

Zimmer E. A., Hamby R. K., Arnold D. A. et al. Ribosomal RNA phylogenies and flowering plant evolution // In: The hierarcy of life. Ed. B. Fernholm et al. Amsterdam: North-Holland, 1989. P. 205–226.

Zuckerkandl E., Pauling L. Evolutionary divergence and convergence in proteins // In: Evolving genes and proteins. Ed. V. Bryson, H.J. Vogel.N.Y.: Acad. Press, 1965.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таксон	Объект и метод изучения	Литература
Acanthaceae	хпДНК	Scotland et al., 1995
–"–	интрон trnL-trnF, яд. ITS 1,2	McDade, Moody, 1997, 1999
Aizoacae	интрон rp/16	Wallace, 1998
–"–	четыре фрагмента хпДНК	Klak et al., 2003
Akaniaceae	rbcL, 18S rDNA	Rodman et al., 1997
Alliaceae	rbcL, trnL-F	Fay et al., 1997b
–"–	–"–	Meerow et al., 1999
Alseuossmiacceae	rbcL, ndhF+морфология	Karehed et al., 1999
Alstroemeriacae	rbcL, rps16 + морфология	Aagesen, Sanso, 2003
Alzateaceae	6 хп генов	Schonenberger, Conti, 2003
Amaryllidaceae	–"–	Meerow et al., 1998, 1999
–"–	matK	Ito et al., 1999
Anemarrheniaceae	rbcL	Conran et al., 1997
Anisophyllaceae	гены хпДНК. яд рРНК, морфол.	Schwartzbach, Riklets, 2000
Anthericaceae	–"–	Chase et al., 1996
Atherospermataceae	rbcL, спейсер trnL-F, интрон rp/16	Renner, Foreman, 1998
Apiales (Apiaceae + Araliaceae)	bcL	Plunkett et al., 1996
Apiaceae	ядерные ITS	Valiejo-Roman et al., 1998
–"–	nITS + rpoC1 intron	Downie et al.,.1998
–"–		Plunkett, Downie, 1999
cp rpl16, rpoC		Downie et al., 2000a,b
Apocynaceae	rbcL, matK	Endress et al., 1996
(and related taxa)	обзор	Endress et al., 2001
–"–	trnL-интрон, trnL-F спейсер	Potgieter, Albert, 2001
Aquifoliaceae	rbcL	Spicheger et al., 1993
Araliaceae	nuc. rRNA-ITS	Wen et al., 2001
Araucariacae	rbcL	Seloguchi et al., 1998
Arecaceae	хпДНК, trnL-trnF	Baker et al., 1997
Argophyllaceae	bcL, ndhF+ морфология	Karehed et al, 1999
Aristolochiales	rbcL, atpB, 18S rRNA gene	D. Soltis et al., 2000
Asphodeliaceae	trnL-F, rbcL	Brunn et al., 1999
–"–	–"–	Chase et al.,2000 a.
Aspleniaceae	rbcL, trn L-F	Schneider et al., 2004
Asteliaceae	rbcL	Rudall et al., 1998
Asteraceae	рестр. анализ хпДНК	Jansen, Palmer., 1988
–"–	rbcL, ndhF	Kim et al., 1992, 1995
–"–	rbcL	Michaels et al., 1993.
–"–	некод. посл. хпДНК	Bayer, Starr, 1998
Asteridae	rbcL	Olmstead et al., 1992b; 1993
–"–	рестр. анализ хпДНК	Downie, Palmer, 1992a
–"–	, s.l. 8S rDNA, rbcL, ndhF, atpB	Albach et al., 1998
Asteridae s.str.	–"–	Backlund, Bremer, 1997
–"–	, s. lato rbcL	Olmstead et al., 1993
Avicenniacae	яд и хп рДНК	Schwarzbach, McDade, 2002

Таксон	Объект и метод изучения	Литература
Бриофиты (таксон в целом)	8 ядерных, хп и мт-генов	Cox et al., 2004
–"– (мхи)	rps4	Goffinet et al., 2001
–"–	rbcL, rps4, интрон trnL	(UAA) Magombo, 2003
Balsaminaceae	18S rDNA, rbcL, ndhF, atpB	Albach et al., 1998
Bataceae	rbcL, 18S rDNA	Rodman et al., 1997
Behniaaceae	rbcL	Conran et al., 1997
Berberidaceae	gapA	Adachi et al., 1995
–"–	рестр. анализ хпДНК	Kim, Jansen, 1994-1998
Betulaceae	rbcL	Bousquet et al., 1992.
–"–	посл. ДНК, морфол., палеобот.	Chen et al., 1999
Bignoniaceae	rbcL, ndhF	Spangler, Olmstead, 1997
Boraginaceae	8S rDNA, rbcL, ndhF, atpB	Albach et al., 1998
Brassicaceae	rbcL, 18S rDNA	Rodman et al., 1997
–"–	trnL-F, ndhF	Hall et al., 2002
Bretschneideraceae	rbcL, 18S rDNA	Rodman et al.,1997
Brexiaceae	rbcL	Kootnz, Soltis, 1996.
Bromeliaceae	rbcL	Clark et al., 1990, 1993
–"–	рестр. анализ хпДНК	Givnish et al., 1990
–"–	–"–	Ranker et al., 1990
–"–	trnL-trnF спейсер, интрон trnL	Randall et al., 1998
–"–	некод. послед. хп ДНК	Terry, Saedler, 1995
–"–	интрон интрон trnL(UAA)	Horres et al., 2000
Bromeliiflorae-Commeliniflorae-Zingiberiflorae complex	rbcL	Clark et al., 1993
Bryaceae	последовательности хпДНК, + морфология	Petersen N. et al., 2003
Buddlejaceae	ndhF, rbcL	Oxelman et al., 1999
Burmanniales	6S rRNA genes	Neyland, 2002
Buxbaumiaceae	rbcL, rps4, интрон trnL(UAA)	Magombo, 2003
Cactaceae	rbcL, интрон trnL	Areces-Mallea et al., 1997 Hershkovitz, Zimmer, 1997
–"–	trnT-trnL	Applequist, Wallace, 2002
–"–	trnK/matK, trnL-trnF	Nyffeler, 2002
Calochortaceae	dhF	Patterson, Givnish, 1998
Campanulales	8S rDNA, rbcL, ndhF, atpB	Albach et al., 1998
Cannabaceae	rbcL, trn-F, ndh-F	Sytsma et al, 2002
Capparales, Capparaceae	rbcL, 18S rDNA	Rodman et al., 1996, 1997.
–"–	trnL-F, ndhF	Hall et al., 2002
Caricaceae	–"–	Rodman et al., 1997
Caryophyllidae	rbc L	Gianassi et al., 1992
Caryophyllales	хпДНК ORF	Downie et al., 1997
Caryophyllaceae	ndhF	Smissen et al., 2002
Cassuarinaceae	rbcL, matK	Sogo et al., 2001
Cecropiaceae	rbcL, trn L-F, ndhF	Sytsma et al., 2002
Celastrales	5'-фланк. посл. rbcL	Savolainen et al., 1994
Celastraceae	ndhF	Clevinger, Panero, 1998
–"–	PhytB, морфология	Simmons et al., 2001
Celtidaceae	rbcL, trn L-F, ndhF	Sytsma et al., 2002
–"–	mat K	Song et al.,
Characeae	matK, trnK	Sanders E. et al., 2003
Chenopodiaceae	atp—rbcL, psbB-psbH	Schutze et al., 2003
Colchicaceae	интр.rps16, atpB-rbcL, trnL-F	Vinnersten, Reeves, 2003
Commelinales,	rbcL	Givnish et al., 1999
Commelinaceae	rbcL	Evans et al., 2003
Compositae	nuc ITS	Balddwin, 1992, 1994

Таксон	Объект и метод изучения	Литература
Coniferales	гены хлоропластов	Tsumura et al., 1995
—"—	28S rDNA	Stefanovich et al., 1998
Convallariaceae	rbcL, trnL-F	Meerow et al., 1999
Convolvulaceae	rbcL, atpB, psb E-J-operon, rnL-trnF интрон-спейсер	Stefanivich et al., 2002, 2003
Cornaceae	rbcL	Qiu et al., 1993 a a
—"—	—"—	Xiang et al., 1998a
—"—	8S rDNA, rbcL, ndhF, atpB	Albach et al., 1998
Costaceae	разные гены	Specht et al., 2001, 2004
Crassulaceae	некод. участки хпДНК	vanHam et al., 1994
—"—	nucITS	Goncharova, Goncharov, 2004
—"—	matK	Mort et al., 1998
Crossosomataceae	rbcL	Sosa, Chase, 2003
Cucurbitaceae	rbcL	Swensen, Walsh, 1997
—"—	nITS 1,2	Jobst et al., 1998
Cunoniaceae	посл. хпДНК, морфлогия	Bradford, Barnes, 2001
Cupressaceae	rbcL	Gadek, Quinn, 1993
—"—	matK	Gadek et al., 1997
то же	matK, rbcL, морфология	Gadek et al., 2000
—"—	matK, chlL, trnL-trnF IGS, trnL intron	Kusumi et al., 2000
Cyperaceae	rbcL	Muasya et al., 1998
Datiscaceae	rbcL	Swenson et al., 1994
Dennstaedtiaceae	n. rDNA, rbcL	Wolf, 1995
Dicranaceae	некод. посл. хпДНК	Stech, 1999;
—"—	trnL – F, rps4	LaFarge et al., 2002
Dicranidae	rps4	Heddersen et al., 2004
Didiereaceae	rpl 16	Wendy et al., 1997
—"—	rbcL	Applequist, Wallace, 2000
Dioscoreale	морфология + молекулы	Gaddick et al., 2002
Dipetrocarpaceae	matK, интрон trnL, trnL-trnF межгенный спейсер	Kajita et al., 1998
Dipsacales	rbcL	Donoghue et al., 1992.
—"—	18S rDNA, rbcL, ndhF, atpB	Albach et al., 1998
—"—	разные гены	Donoghue et al., 2001
—"—	посл. хп ДНК	Bell et al., 2001
Dispensiaceae	nucITS, rbcL, ndhF, matR	Ronblom, Anderberg, 2002
Droseriaceae	rbcL	Williams et al., 1994
Dryopteridaceae	rbcL	Gastony et al., 1997
Dyphisciaceae	rbcL, rps4, интрон trnL(UAA)	Magombo, 2003
Ebenales	—"—	Morton et al., 1995, 1997b
Empetraceae	rbcL	Kron, Chase, 1993
Epacridaceae	rbcL	Kron, Chase, 1993
Equisetaceae	rps4	Guillon, 2004
Ericaceae	rbcL	Kron, Chase, 1993; Kron et al., 1998
Ericales	8S rDNA, rbcL, ndhF, atpB	Albach et al., 1998
—"—	tpB, ndhF, rbcL + морфология	Kullersjo et al., 2000
—"—	rbcL, ndhF, atpB, atp1, matR	Anderberg et al., 2002
Euphorbiacea	rbcL	Wurdack, Chase, 1996.
Fagaceae	rbcL	Frascaria et al., 1993
Flacourtiaceae	5.8S, ITS 1,2 (яд.)	Chase et al., 1996 aa; Leskinen et al., 1999
Fouquieriaceae	nrDNA ITS	Schultheis, Baldwin, 1999
Funariaceae	18S rDNA	Cox et al., 1997
—"—	rps16 intron	Liden et al., 1997
Gentianales	rbcL	Bremer et al., 1994
—"—	18S rDNA, rbcL, ndhF, atpB	Albach et al., 1998

Таксон	Объект и метод изучения	Литература
то же	ndhF, rbcL	Backlund et al., 2000
Gentianaceae	trnL	Struwe et al., 1997
Geraniaceae	rbcL	Price, Palmer, 1993
Gesneriaceae	ndhF	Smith et al., 1997
Gnetales	морф. и молек. данные	Price, 1996
GnetophytarbcL		Hasebe et al., 1992a
Gomortegaceae	молек. данные	Ueda et al., 1997
Grubbiaceae	26S rDNA, matK-rbcL	Fan, Xiang, 2003
Gunnerales,	26S rDNA	Soltis D. et al., 2003
Gunneraceae		
Gyrostemonaceae	rbcL, 18S rDNA	Rodman et al., 1997
Haemodoraceae	trnF	Hopper et al., 1998
Hamamelididae	анализ хп ДНК	Manos et al., 1993
Hamamelidae	ядерн. рРНК	Manos, Steele, 1996
–"–	matK	Manos, Steele, 1997.
Hamamelidaceae	ITS, matK	Li et al., 1997
–"–	ITS рРНК (ядерн.)	Shi et al., 1998
		Li J.et al., 1999
Hyacinthaceae	rbcL, trnL-F	Meerow et al., 1999
Hylocomiaceae	2 спейсера яд. рДНК	Chiang, Schaal, 2000
Hydnoraceae	nuc SSU+LSU, atp1, matR	Nickrent et al., 2002
Hydrangeaceae	rbcL	Soltis D. et al., 1995.
–"–	8S rDNA, rbcL, ndhF, atpB	Albach et al., 1998
–"–	26S rDNA, matK-rbcL	Fan, Xiang, 2003
Hydrostachiaceae	–"–	–"–
Hypoxiidaceae	rbcL	Rudall et al., 1998
Icacianaceae	–"–	Spichiger et al., 1993
–"–	ndhF, rbcL, atpB, 18S rDNA	Karehed, 2001
Iridaceae	rps4	Souza-Chies et al., 1997
–"–	rps4, rbcL,trnL	Reeves et al. 1997
Juglandacae	rbcL	Gunter et al., 1994
–"–	рестр. анализ хпДНК	Smith, Doyle, 1995
Juncaceae	bcL	Drabkova et al., 2003
Koeberliniaceae	rbcL, 18S rDNA	Rodman et al., 1997
Labiatae s.l.	rbcL, ndhF	Wagstaff et al., 1997, 1998
Lamiales	18S rDNA, rbcL, ndhF, atpB	Albach et al., 1998
Lardizabalaceae	atpB (rbcL, 18S)	Hoot et al., 1995 a,b
Laurales	bcL	Ablett et al., 1997
–"–	rbcL, trnL-F, rpl16	Renner, 1998aaa; 1999
Lauraceae	matK	Rolwer, 2000
Lecythidaceae	rbcL, trnL	Morton et al., 1997a, 1998
Leguminosae	bcL, ITS 1,2	Kass et al., 1998
–"–	rbcL	Doyle J. J., 1994;
–"–	–"–	Doyle J. J.et al., 1997
Lemnaceae	rbcL	Les et al., 1997b
–"–	rbcL, matK, интроны trnK, rpl16	Les et al., 2002
Lentibulariaceae	интрон rps16, trnL-F	Jobson et al., 2003.
Liliales	rbcL, ndhF	Patterson, Givnish, 2002
Liliaceae	ndhF	Patterson, Givnish, 1998
Limnanthaceae	ITS 1,2, интроны trnL	Plotkin, Sanderson, 1997
–"–	rbcL, 18S rDNA	Rodman et al., 1997
Lennoaceae	rps2	Smith, Depamphilis, 1998
Loasaceae	matK, trnL-trnF	Hufford et al., 2003
–"–	26S rDNA, matK-rbcL	Fan, Xiang, 2003
Lycopodiaceae	rbcL	Niklas, Kenrick, 1997
Lythraceae	rbcL, яд рДНК, спейсеры psaA	Huang et al., 2002
Loasaceae	bcL	Hempel et al., 1995
Loganiaceae	rbcL	Bremer, Struwe, 1992

Таксон	Объект и метод изучения	Литература
–"–	rbcL, ndhF	Backlund et al., 2000
Lycopodiaceae	rbcL	Wikstrom, Kenrick, 1997; 2001
–"–	cpITS	Яцентюк с соавт. 2001 б
Magnoliidae	rbcL	Qiu et al., 1993 бб
Magnoliaceae	matK, trnK интрон, psbA-trnH и др.	Azuma et al., 2001
Malesherbiaceae	nuc rDNA-ITS	Gengler et al., 1997
–"–	–"–	Gengler-Nowak, 2003
Malpigiaceae	несклько генов	Davis et al., 2002
Malvaceae	хпДНК	LaDuke, Doebley, 1995
–"–	хпRFLP	LaDuke et al., 1998
Malvales	rbcL, atpB	Bayer et al., 1998, 1999
–"–	rbcL, ndhF	Alverson et al., 1998, 1999
Marcgraviaceae	хп гены	Ward, Price, 2002
Meliaceae	rbcL, matK, 26S rDNA	Muellner et al., 2003
Melanthiaceae	matK	Fuse, Tamura, 2000
Monimiaceae	гены и спейсеры хпДНК	Renner, 1998c
Moraceae	rbcL, trn L-F, ndhF	Sytsma et al., 2002
Moringaceae	rbcL, 18S rDNA	Rodman et al., 1997
–"–	многие гены	Olson, 2002
Myrothamnaceae	26S rDNA	D. Soltis et al., 2003
Myrsinaceae	atpB, nhdF, rbcL + морфололгия	Kallersjo et al., 1999
Myrtales	rbcL	Conti et al., 1996, 1997
Myrtaceae	matK, ndhF	Gadek et al., 1996,1998;
–"–		Sytsma et al., 1998a;
–"–	matK	Wilson et al., 2001.
Nyctaginaceae	nucITS, rbcL-accD spacer	Levin, 2000
Nymphaeales	rbcL, matK, интроны	Les et al., 1997a
–"–	rbcL	Zhang, Mcellin, 1998
Nyssaceae	18S rDNA, rbcL, ndhF, atpB	Albach et al., 1998
Одноодольные	atpA	J. Davis et al., 1998
–"–	rbcL, atpA	J. Davis et al., 2004; Chase, 2004
Oleaceae	trnL-F, интрон rps16	Wallander, Albert, 1998, 2000
Oliniaceae	6 хп генов	Schonenberger, Conti, 2003
Onagraceae	rbcL	Conti et al., 1993
–"–	ITS	Sytsma et al., 1998b
–"–	ITS, rps16,rbcL, ndhF, trn L-F	Levin et al., 2003, 2004
Orchidaceae	nad1 b-c мит. интрон	Feudenstein et al., 1998
–"–	rbcL, matK	Feudenstein et al., 2004
–"–	rbcL	Chase et al., 1994; Cameron et al., 1999
Orthotrichales	rbcL	Goffinet et al., 1998
Papilionoideae	rbcL, nuc ITS	Kass, Wink, 1995, 1998
Penaeaceae	6 хп генов	Shonenberger, Conti, 2003
Pentadiplandraceae	rbcL, 18S rDNA	Rodman et al., 1997
Pertrosaviaceae	rbcL, atpB	Cameron et al., 1998
Phellinaceae	rbcL, ndhF + морфология	Karehed et al., 1999
Phrymaceae	tmL/F, nuc. ITS+ETS	Beardsley, Olmstead, 2002
Rhynchocalycaceae	6 хп генов	Schonenberger, Conti, 2003
Restionaceae	комплекс генов	–"–
Pinaceae	ITS1 (яд.)	Vining et al., 1998
–"–	интроны, многие гены	Gugerli et al., 2001
Plumbaginaceae	bcL	Lledo et al., 1998
Poaceae	rRNA	Hamby, Ziimmer, 1988
–"–	ITS rDNA	Hsiao et al., 1999
–"–	рестр. анализ cpDNA	Soreng et al., 1990; 1998

Таксон	Объект и метод изучения	Литература
–"–	rps4	Nadot et al., 1994
–"–	rbcL	Barker et al., 1995 а,бб
–"–	ndhF	Clark et al., 1995
–"–	rbcL, ndhF	Gaut et al., 1997 Catalan et al., 1997
–"–	rpoA	Petersen, Seberg, 1997
–"–	rpl16	Zhang, 1997
–"–	matK	Liang, Hilu, 1997 Hilu et al., 1999
–"–	Phyt B	Mathews et al., 2000
–"–	GBSSI	Mason-Cramer et al., 1996, 1998
–"–	atpA, rbcL и инверсии и близкие семйства и хп ДНК	Michelangeli et al., 2003
(Gramineae)	rbcL	Doebley et al., 1990
Podocarpaceae	cpDNA	Raubessson,Jansen, 1993
–"–	18S rDNA	Kelch, 1998
Polemoniaceae	matK	Steele, Vilgalys, 1994
	nuc. ITS	Porter, 1997
–"–	matK	Johnson et al., 1996
–"–	–"–	Grant, 1998
–"–	18S pPHK	Johnson et al., 1999
–"–	18S rDNA, rbcL, ndhF, atpB	Albach et al., 1998
–"–	интрон гена nad1B	Porter, Johnson, 1998
–"–	ndhF	Prather et al., 2000
	rpoC2	Barker et al., 1999
Polygonaceae	rbcL. rye,	Kron, 2003.
E. Polygrammaceae	rbcL, trnF, ITS	Ranker et al., 1997.
Polytrichaceae	rbcL, rps4, интрон trnL (UAA)	Magombo, 2003
Podostemaceae	18S rDNA, rbcL	Soltis D et al., 1999
Pontederiaceae	rbcL, ndhF	Graham et al., 1997, 1998
Primulales	rbcL	Andenberg et al., 1998
–"–	18S rDNA, rbcL, ndhF, atpB	Albach et al., 1998
Prmulaceae	atpB, ndhF, rbcL + морфология	Kallersjo et al., 1999
zд ITS		Martins et al., 2003
Proteaceae	atpB, atpB-rbcL spacer	Hoot, Douglas, 1998
Ranunculidae	комплекс генов	Hoot, Crane, 1995 a
Ranunculaceae	26S рДНК	Ro et al., 1997
–"–	atpB, rbcL, 18S rDNA	Hoot, 1995
–"–	cpDNA	Johansson, Jansen, 1993
Rapateaceae	ndhF + морфолония	Givnish et al., 2000
Resedaceae	rbcL, 18S rDNA	Rodman et al., 1997
Restionaceae	trn L-F	Eldenas, Linder, 2000
Rhamnaceae	rbcL, trnL-F	Richardson et al., 1997; 2000
Rhizophoraceaemat	ITS	Schwartzbach, Riclets, 2000; Shi et al., 2002
Rosaceae	rbcL	Morgan et al., 1994
–"–	PGIPs	Potter, 1997, 2002
–"–	cp matK, trnL-trnF	–"–
Rubiaceae-Rubieae-фрагмент хпДНК		Manen et al., 1994
Rubiaceae	рестр. анализ хпДНК	Bremer, Jansen, 1991
–"–	rbcL	Bremer et al., 1995
–"–	некод. посл. хпДНК	Natali et al., 1995
Rubiaceae	trnL-F	Rova et al., 1997
–"–	другие гены	Bremer et al., 1999
Rubiaceae-Ixoroideae	rbc L	Andreasen, Bremer, 2000
–"–	ITS, rbc L	Andreason, Bremer, 2000

Таксон	Объект и метод изучения	Литература
Salicaceae	5.8S, ITS 1,2	Leskinen et al., 1999
Salvadoraceae	rbcL, 18S rDNA	Rodman et al., 1995, 1997
Saururaceae	matK	Meng et al., 2002
Santanales	rbcL	Nickrent, Franchina, 1990
Sapindales	rbcL	Gadek et al., 1996.
Sargentodoxaceae	гены яд. и хп. ДНК	Hoot et al., 1995 b
Sarraceniaceae	rbcL, nITS	Bayer et al., 1996
Saxifragales	18S, rbcL, matK	Hibsch-Jetter, Soltis, 1996
Saxifragalescp	atpB, matK, rbcL, 18S & 26S nrDNA	Fishbein et al., 2001
Saxifragaceae	s.str matK	Johnson, Soltis, 1994,, 1995
–"–	s.l. rbcL	Soltis D. et al., 1990, 1997
–"–	–"–	Morgan, Soltis, 1993
–"–	шесть яд. и хп. послед.	Soltis et al., 2001
Scrophulariaceae	rbcL, ndhF	Olmstead, Reeves, 1995
Scytopetalaceae	rbcL, trnL	Morton, 1998
Selaginellaceae	rbcL	Koral et al., 1999, 2002
Solanaceae	рестр. анализ хпДНКО	Imstead, Palmer, 1992
–"–	rbcL	Olmstead, Sweere, 1994
Solanales	18S rDNA, rbcL, ndhF, atpB	Albach et al., 1998
Sphagnopsida	яд. и хп. посл. ДНК	Shaw, 2000
Staphyleaceae	rbcL, ITS	Simmons et al., 1998
Surianaceae		Fernando et al., 1993
Taxaceae	8S rDNA	Chaw et al., 1993
Taxodiaceae	rbcL	Brunsfeld et al., 1994;
–"–	matK, chlL, trnL-trnF IGS, trnL intron	Kusumi et al., 2000
Tetraphidaceae	rbcL, rps4, интрон trnL(UAA)	Magombo, 2003
Theales	18S rDNA, rbcL, ndhF, atpB	Albach et al., 1998
Theacae	rbcL, matK, cpITS	Prince,Parks, 2001
Theophrastaceae	atpB, ndhF, rbcL + морфология	Kallersjo et al., 1999
Themidaceae	rbcL, trnL-F	Meerow et al., 1999
Tovariaceae	rbcL, 18S rDNA	Rodman et al., 1997
Tropaeolaceae	–"–	–"–
Ulmaceae	рестр. анализ хпДНК Wiegrefe et al., 1998	
–"–	rbcL, trn L-F, ndhF	Sytsma et al., 2002
Umbelliferae	ITS 1 и 2 ядерн. рДНК	Valiejo-Roman et al., 1998 (см. также Apiales)
Urticales	rbcL	Sytsma et al., 1996
Urticaceae	rbcL, trn L-F, ndhF	Sytsma et al., 2002
Uvulariaceae	ndhF	Patterson, Givnish, 1998
Velloziaceae	trnL-F	Salatino et al., 2001
Vitaceae	фланк. участки SSR	Rossetto et al., 2002
Wardiaceae	18S rDNA, rps4	Hedderson et al., 1997, 1999
Winteraceae	ITS rDNA	Suh et al., 1993
Zingiberales	rbcL	Smith et al., 1993
Zingiberacae	яд ITS, matK	Kress et al., 2002
Zygophyllaceae	rbcL	Sheahan, Chase, 1996
–"–	rbcL, trn L-F	–"– 2000
–"–	trnL, морморфология	Beier et al., 2003

Учебное пособие

Антонов А.С.

ГЕНОСИСТЕМАТИКА РАСТЕНИЙ

Редактор *Н.М. Александрова*
Художник *И.А. Слюсарев*
Дизайнер *Н.М. Апрелова*
Компьютерный дизайн и верстка *С.Н. Лаврентьева*

ИД № 4284 от 15.03.2001

Подписано в печать 11.07.2006. Формат $70\times100^{1}/_{16}$. Гарнитура NewtonC.
Печать офсетная. Печ. л. 18.5 . Тираж 400 экз. Тип. зак. 3083.

Международная академическая
издательская компания «Наука/Интерпериодика»

Издательско-книготорговый центр «Академкнига»

117997, Москва, Профсоюзная ул., 90

По вопросам поставок обращаться в отдел реализации ИКЦ «Академкнига»
Тел./факс: (495) 334-73-18
e-mail: bookreal@maik.ru, web-site: http: // www.akademkniga.com

Отпечатано с готовых диапозитивов в
ОАО «Ивановская областная типография»
153008, г. Иваново, ул. Типографская, 6
E-mail: 091-018@adminet.ivanovo.ru