

УДК 575.17:582.52

К.С. Добрякова

K.S. Dobryakova

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ITS1-ГЕН 5.8S РРНК-ITS2 И TRNL-TRNF ВИДОВ РОДА *ELYMUS* L. СЕКЦИИ *TURCZANINOVIA* (NEVSKI) TZVEL.

THE ITS 1-GENE 5.8S RRNA- ITS2 AND TRNL-TRNF SEQUENCES VARIABILITY OF *ELYMUS* L. SPECIES OF THE SECTION *TURCZANINOVIA* (NEVSKI) TZVEL.

Секвенирование и сравнительный анализ последовательностей ITS1-ген 5.8S рРНК-ITS2 ядерного генома видов рода *Elymus* выявил близкое родство между последовательностями ITS таксонов *E. dahuricus*, *E. dahuricus* var. *cylindricus* и *E. dahuricus* var. *tangutorum*, а также было выявлено близкое родство между последовательностями trnL-trnF видов *E. dahuricus*, *E. franchetii* (*E. dahuricus* var. *cylindricus*), *E. excelsus* и *E. dahuricus* var. *tangutorum*.

Род *Elymus* является крупным родом трибы *Triticeae* семейства Злаки (Poaceae). Он включает в себя около 150 видов. Пырейники произрастают в основном в умеренной, а так же в арктической и субтропической климатических зонах. Они занимают различные экологические ниши, встречаются среди кустарников, в лесах, на склонах гор, в полупустынях и долинах (Цвелев, 1976, 2008). Все известные на территории России виды рода *Elymus*, согласно современной классификации Н.Н. Цвелева (2008), можно разделить на четыре секции: sect. 1. *Turczaninovia* (Nevski) Tzvel., sect. 2. *Goulardia* (Husn.) Tzvel., sect. 3. *Clinelymopsis* (Nevski) Tzvel. и sect. 4. *Elymus*. Секция *Turczaninovia* включает следующие виды: *E. dahuricus* Turcz. ex Griseb., *E. franchetii* Kitag. (синоним *E. dahuricus* var. *cylindricus*), *E. woroschilowii* Probat. (синоним *E. dahuricus* subsp. *pacificus* Probat.), *E. excelsus* Turcz. ex Griseb. (*E. dahuricus* subsp. *excelsus* (Turcz. ex Griseb.) Tzvel.). Вопрос о границах между видами, близкими к *E. dahuricus* остается дискуссионным. ITS последовательности ядерного генома и trnL-trnF последовательности генома хлоропластов являются популярными маркерами при молекулярно-филогенетических исследованиях растений. (обзоры: Alverez, Wendel, 2003; Матвеева и др., 2011). В работу были включены последовательности ITS двух видов *E. dahuricus* и видов *Elytrigia geniculata* и *Agropyron cristatum*, полученные нами, а также 10 последовательностей локуса ITS1-5.8S рДНК-ITS2, которые были депонированы из базы данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites>). Мы секвенировали две trnL-trnF последовательности *E. excelsus*, а также trnL-trnF последовательности видов *E. dahuricus*, *E. franchetii* и *Agropyron cristatum*, 7 последовательностей trnL-trnF также были взяты из международной базы данных GenBank. Образцы растений были собраны в Алтайском крае в республике Алтай, Хакасии, на данный момент они хранятся в гербарии лаборатории Биосистематики и цитологии БИН РАН. Растительный материал для исследования был также взят из гербарных коллекций БИН РАН (LE). ДНК из листового материала была выделена с помощью СТАВ-метода (Doyle J.J., Doyle J.L., 1987). ПЦР была проведена на амплификаторе «Techne TC412» (BarloworldScientific, Великобритания). Амплификация района ITS была проведена с использованием праймеров ITS 1P (Ridgway et al., 2003) и ITS 4 (White et al., 1990). Параметры циклов амплификации следующие: 1 цикл: 5 мин 95 °С; 30 циклов: 1 мин 94 °С; 1 мин 52 °С; 1 мин. 72 °С; 1 цикл: 10 мин 72 °С и цикл: 3 мин 94 °С; 34 цикла: 30 сек 94 °С; 30 сек 54 °С; 50 сек 72 °С. Для амплификации последовательности trnL-trnF использовали праймеры с, d, e, f (Taberlet et al., 1991). Параметры амплификации: цикл: 3 мин. 94 °С; 30 циклов: 30 сек. 94 °С; 40 сек. 55 °С; 1 мин. 72 °С; цикл: 10 мин. 72 °С. Полученные в ходе амплификации фрагменты выделяли из 1 % агарозного геля с помощью набора QiaGen Extraction Kit (Qiagen, Inc., Германия). Для установления 5'-3' последовательности нуклеотидов молекулы ДНК интересующих участков применяли технику секвенирования с использованием флуоресцентно меченных терминирующих реакцию аналогов нуклеотидов согласно методу Сэнгера с соавторами на базе ЦКП БИН РАН. Последовательности были выравнены с помощью программы ClustalW входящих в пакет программ MEGA 6 с последующей визуальной проверкой. С помощью программы MEGA 6 были так же рассчитаны р-расстояния между последовательностями ITS1 – гена 5.8S рРНК – ITS2, а также между последовательностями trnL-trnF видов *Elymus*. Длина последовательностей ITS1-5.8S рРНК-ITS2 видов *Elymus* составила от 599 до 602 позиций, из них вариабельных позиций – 46. Длина ITS1 от мотива TCGT до TTAATC у изученных нами видов *Elymus* L. варьировала от 219 пар нуклеотидов до 221 пар нуклеотидов (в связи с наличием в

нуклеотидных последовательностях делеций). Длина ITS2 от мотива СААААСА до мотива ТТСГАСС варьировала от 216 до 217 п. н. Длина 5,8 S рДНК от мотива САСАСГАС до мотива СГТСАСГС у изученных нами видов *Elymus* L. составляла в среднем 164 п. н. (табл. 2). Длина проанализированных последовательностей *trnL-trnF* включает 1091 выровненную позицию, переменных – 79 (табл. 3). С помощью стандартной компьютерной программы Mega 6 были рассчитаны р-расстояния для всех исследованных последовательностей ITS1 – 5.8S рДНК – ITS2 и *trnL-trnF* видов *Elymus*. Р-расстояние – величина, отражающая процент нуклеотидов, по которым различаются последовательности при их попарном сравнении. При сравнении 12 ITS-последовательностей вида рода *Elymus* эта величина изменялась в пределах от 0 до 3 %. Р-расстояния между 10 последовательностями *trnL-trnF* видов рода *Elymus* изменялись от 0 до 1 %. Согласно полученным данным можно сделать о близком родстве последовательностей ITS видов *E. dahuricus*, *E. dahuricus* var. *cylindricus* и *E. dahuricus* var. *tangutorum*, а также последовательностей *trnL-trnF* видов *E. dahuricus*, *E. franchetii* (*E. dahuricus* var. *cylindricus*), *E. excelsus* и *E. dahuricus* var. *tangutorum*.

Таблица 1

Секвенированные и проанализированные последовательности ITS1-ген 5.8S рДНК-ITS2 и *trnL-trnF*

Номер в GenBank	Вид, номер ваучера в коллекции гербарных образцов лаборатории биосистематики и цитологии БИН РАН и отдела гербария БИН РАН (LE)	Информация о месте и дате сбора и определении образца
<i>trnL-trnF</i>	ITS1-5.8S рДНК-ITS2	
KJ744040	KJ540222 <i>E. dahuricus</i> Turcz. ex Griseb. Ха 09-157	Респ. Хакасия, Орджоникидзевский р-н, между с. Кобяково и с. Июс. Луг, долина реки Белый Июс. 54°46.6' с.ш., 89°45.2' в.д. 400 м над ур. м. 22.08.09. А.В. Родионов, Н.Н. Носов. Опр.: К.С. Добрякова, Н.Н. Цвелев.
	KJ540223 <i>E. dahuricus</i> Turcz. ex Griseb. Alt 11-39	Респ. Алтай, Онгудайский р-н. Луговина около р. Черной. Опушка леса. 50°58'7" с.ш., 88°43'6" в.д. 1425 м над ур. м., 13.08.2011. А.В. Родионов, Е.О. Пунина, Н.Н. Носов, А.А. Гнутиков. Опр.: К.С. Добрякова, Н.Н. Цвелев.
KP325398	<i>E. excelsus</i> Griseb.	ЛЕ. Читинская область. Кыринский район. Заказник «Горная степь». 19 км к Ю от п. Кыра. Днище пади. Разнотравно (<i>Lathyrus</i> , <i>Sanguisorba officinalis</i>) -осоково-пижмолистнопопынное сообщество. 49°23.8' с.ш., 111°58.8' в.д. № 265. Собр., опр.: Е.О. Головина.
KP325395	<i>E. excelsus</i> Griseb.	ЛЕ. Зап. Саяны. Устье р. Ус. 20.08.1932. Г.А. Балабаева. Опр.: Н.Н. Цвелев.
KP325396	<i>E. franchetii</i> Kitag.	ЛЕ. Окр. г. Никольск. 8.08.1931. И.К. Шишкин. Опр.: Н.Н. Цвелев.
KJ744042	KJ561241 <i>Agropyron cristatum</i> (L.) Beauv. Alt 11-377	Респ. Алтай. Кош-Агачский р-н. Прав. б. р. Юстыг. 2230 м над ур. м. 49°48.1' с.ш., 89°21.7' в.д. 20.08.2011. А.В. Родионов, Е.О. Пунина, Н.Н. Носов, А.А. Гнутиков. Опр.: К.С. Добрякова, Н.Н. Цвелев.
	KJ561242 <i>Elytrigia geniculata</i> (Trin.) Nevski Ха 09-180 (<i>Agropyron geniculatum</i>)	Респ. Хакасия, Орджоникидзевский р-н. У г. Первый Сундук, дол. р. Белый Июс, каменистый склон. 410 м над ур. м. 54°40.6' с.ш., 89°42.4' в.д. 23.08.09. А.В. Родионов, Н.Н. Носов. Опр.: К.С. Добрякова, Н.Н. Цвелев.

Таблица 5

P-расстояния (в %) между исследованными последовательностями trnL-trnF видов *Elymus*

	[1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11]
[1] <i>Agropyron cristatum</i> KJ744042	-												
[2] <i>E. dahuricus</i> KJ744040	1												
[3] <i>E. dahuricus</i> KF905194	1	0											
[4] <i>E. excelsus</i> KP325395	1	0	0										
[5] <i>E. excelsus</i> KP32539	1	1	1	0									
[6] <i>E. franchetii</i> KP325396	1	1	1	0	0								
[7] <i>E. dahuricus</i> var. <i>cylindricus</i> KF905222	1	0	0	0	0	0							
[8] <i>E. dahuricus</i> var. <i>cylindricus</i> KF905188	1	0	0	0	0	0	0						
[9] <i>E. dahuricus</i> var. <i>cylindricus</i> KF905208	1	1	0	0	1	1	0	0					
[10] <i>E. dahuricus</i> var. <i>tangutorum</i> KF905219	1	1	0	0	1	1	0	0	1				
[11] <i>E. dahuricus</i> var. <i>tangutorum</i> KF905212	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0			

Благодарности

Автор выражает глубокую признательность чл.-корр. РАН, д. б. н., проф. Н.Н. Цвелёву, за неоценимые консультации и помощь в определении образцов, коллективу Лаборатории Биосистематики и цитологии: д. б. н. Родионову А.В., д. б. н. В.С. Чупову, д. б. н. В.С. Шнеер, к. б. н. Э.М. Мачсу, к. б. н. Н.Н. Носову, инж. Е.Е. Крапивской, а также К.Г. Петровой за помощь в работе. Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 15-04-06438_мол_а, 14-04-01416 и программы «Динамика генофондов».

ЛИТЕРАТУРА

- Матвеева Т.В., Павлова О.А., Богомаз Д.И. Демкович А. Е., Лутова Л.А.* Молекулярные маркеры для видоидентификации и филогенетики растений // Экологическая генетика, 2011. – Т. 9(1). – С. 32–43.
- Цвелев Н.Н.* Злаки СССР. – Л., 1976. –788 с.
- Цвелев Н.Н.* О роде *Elymus* L. (Poaceae) в России // Бот. журн., 2008. – Т. 93, № 10. – С. 1587–1596.
- Alvarez E., Wendel J.F.* Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference // Molecular Phylogenetics and Evolution, 2003. – Vol. 29. – P. 417–434.
- Doyle J.J., Doyle J.L.* A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochem. Bull., 1987. – Vol. 19. – P. 11.

SUMMARY

Sequencing and comparative analysis of the ITS1-5.8S rRNA gene-ITS2 fragments of the nuclear genome revealed the close relationship between the ITS sequences of the taxa *Elymus dahuricus*, *E. dahuricus* var. *cylindricus* and *E. dahuricus* var. *tangutorum*, and we also identified a close relationship between the trnL-trnF sequences of the species *E. dahuricus*, *E. franchetii* (*E. dahuricus* var. *cylindricus*), *E. excelsus* and *E. dahuricus* var. *tangutorum*.