

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ В ИССЛЕДОВАНИИ РАСТЕНИЙ И ХЕМОСИСТЕМАТИКА ОТДЕЛЬНЫХ ТАКСОНОВ

УДК 582.594:575.113.2

Генетический полиморфизм *Cypripedium calceolus*, *C. macranthon*, *C. shanxiense*, *C. × ventricosum* (Orchidaceae) по данным пиросеквенирования

Genetic polymorphism of *Cypripedium calceolus*, *C. macranthon*, *C. shanxiense*, *C. × ventricosum* (Orchidaceae) inferred from pyrosequencing data

Е. В. Андропова¹, Э. М. Мачс¹, Е. Г. Филиппов²

E. V. Andronova, E. M. Machs, E. G. Filippov

¹Ботанический сад Уральского отделения РАН, Екатеринбург, Россия, e-mail: filorch@mail.ru

²Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: elena.andronova@mail.ru

Реферат. Ранее были высказаны предположения, что особи *C. × ventricosum* представляют собой гибриды первого поколения между *C. calceolus* и *C. macranthon*, а в местах произрастания *C. shanxiense* и *C. calceolus* последний таксон замещен гибридами *C. calceolus × C. shanxiense*. Для проверки гипотез были исследованы участки *ITS1* гена 5,8S рибосомальной ДНК и *trnL-F* хлоропластной ДНК с использованием методики пиросеквенирования. У некоторых образцов *C. calceolus* был выявлен внутригеномный полиморфизм *ITS1* участка по замене С на Т в позиции 320 (в соответствии с аналогичными позициями у референса из Генбанка). Полиморфные образцы *C. calceolus* были собраны в разных частях ареала, какой-либо географической приуроченности не установлено. У *C. shanxiense* в *ITS1* участке в позициях 268 и 276 имелись замены Г на Т, которые являлись специфичными только для данного таксона (из числа изученных), а в позиции 320 имела замена С на Т (в 100 % прочтений). Позиции 268 и 276 оказались полиморфными: замены обнаружены в 50 % прочтений у образцов из Забайкалья, в 85–87 % – из Приморья, 70–73 % – с Сахалина. Все *C. shanxiense* имели 13–50 % последовательностей идентичных *C. calceolus*, тогда как у *C. calceolus* из мест совместного произрастания двух таксонов замены Г на Т встречались в единичных (не более 1,5 %) прочтениях. *ITS1* участки у *C. macranthon* и референса отличались по замене С на Т в позициях 269, 320 и 352 (практически 100 % прочтений). Анализ *ITS1* участка *C. × ventricosum* выявил полиморфизм в позициях 269 и 352 и подтвердил, что это гибриды первого поколения между *C. calceolus* и *C. macranthon*. Участок хлоропластной ДНК оказался идентичным у всех изученных образцов *C. shanxiense* и у *C. calceolus* из Забайкальского края и из Приморья. Он имел существенные различия при сравнении с образцами *C. calceolus*, собранными в Сибири, Урале, Европейской части России и запада Забайкалья (Бурятия). У двух из 11 изученных образцов *C. × ventricosum* изученный участок хлоропластной ДНК имел сходство с *C. calceolus* из Забайкальского края и из Приморья, у всех других он был идентичен таковому *C. macranthon*. Исследования с применением 454 метода секвенирования не подтвердили предположение о том, что в Забайкалье и Приморье *C. calceolus* замещен гибридом *C. calceolus × C. shanxiense*. Однако было показано, что *C. calceolus* на территории России представлен двумя разными группами (а возможно и таксонами) на основании различий участка хлоропластной ДНК и данных аллозимного анализа.

Summary. It was assumed early that the individuals of *C. × ventricosum* were the hybrids of the first generation between *C. calceolus* and *C. macranthon*, and in the locations of sympatric populations of *C. shanxiense* and *C. calceolus* the last one was substituted by hybrids (*C. calceolus × C. shanxiense*). For checking the hypotheses the 5,8S of ribosomal (*ITS1*) DNA and chloroplast DNA (*trnL-F*) were investigated with the using of a pyrosequencing. In some samples of *C. calceolus* the intragenomic polymorphism in *ITS1* by the replacement of C by T in the position 320 (here and throughout designated in according with the analogous positions in reference from GenBank) was revealed. Polymorphous samples of *C. calceolus* were collected in the different parts of the area, any geographical confinement was not established. In *C. shanxiense* in the positions 268 and 276 of *ITS1* replacements of G by T occurred, which were specific only for this taxon (from the number of studied), while in the position 320 there was a replacement of C by T (in 100 % reads). Positions 268 and 276 proved to be polymorphous: replacements were discovered in 50 % reads in the samples from Transbaikalia, in 85–87 % – from the Primorye, in 70–73 % – from Sakhalin. All samples of *C. shanxiense* had 13–50 % of the sequences identical to *C. calceolus*, whereas in *C. calceolus* from the places of the joint vegetation of both taxa, replacement of G by T occurred in the single (not more 1.5 %) reads. *ITS1*

in *C. macranthon* and in reference were differed in the replacement of C by T in the positions 269, 320 and 352 (practically 100 % reads). Analysis of *ITS1* in *C. × ventricosum* revealed polymorphism in the positions 269 and 352, and confirmed that these were the hybrids of the first generation between *C. calceolus* and *C. macranthon*. Chloroplast DNA was proved to be identical in all studied samples of *C. shanxiense* and of *C. calceolus* from the Transbaikalia and from the Primorye. It is demonstrated essential differences comparing with the samples of *C. calceolus*, collected in Siberia, Urals, European part of Russia and West of Transbaikalia (Buryatia). In two of 11 samples *C. × ventricosum* studied chloroplast DNA resembled *C. calceolus* from the Transbaikalia and from the Primorye, in all others it was identical to the same in *C. macranthon*. Studies with the using of 454 method did not confirm the assumption about the fact that in Transbaikalia and Primorye *C. calceolus* was substituted by the hybrids (*C. calceolus* × *C. shanxiense*). However, it was shown that *C. calceolus* in the territory of Russia was represented by two different groups (but possibly also by taxa) on the basis of differences of chloroplast DNA and of allozyme analysis data.

На основании морфологического исследования и анализа генетической структуры популяций с использованием аллозимного анализа 10 генных локусов (*PGI*, *6PGD*, *NADHD*, *SKDH*, *GDH*, *PGM*, *DIA*, *ADH*, *GOT-1*, *GOT-2*) было сделано заключение, что в зоне перекрытия ареалов *Cypripedium calceolus* и *C. shanxiense* в Забайкальском, Хабаровском и Приморском краях, образовался межвидовой интрогрессивно гибридный комплекс. В его состав входят в основном гибриды (*C. calceolus* × *C. shanxiense*), а доля особей родительских видов в нем невелика. Один из родительских видов – *C. shanxiense* относится к наиболее редким представителям рода. Особи *C. shanxiense* характеризуются облигатной автогамией. Эта особенность обеспечивает биологическую изоляцию таксона от близкого к нему *C. calceolus*. Второй из родительских видов – *C. calceolus* в норме относится к перекрестно опыляемым растениям и является облигатным энтомофилом. Однако на юге Приморского края большое число особей имеют нетипичные для *C. calceolus* признаки цветка (губа коричневого цвета) и особенности репродуктивной биологии (факультативное самоопыление). У некоторых из них была выявлена генетическая нестабильность при формировании пыльцы и семян (высокая доля аномалий в строении пыльцевых зерен, сниженная семенная продуктивность). Это давало возможность предположить, что представители *C. calceolus* на большей территории Дальнего Востока и Забайкальского края отсутствуют, а растения, морфологически похожие на них, являются гибридами *C. calceolus* × *C. shanxiense* (Андропова и др., 2007, 2009; Филиппов, Андропова, 2011).

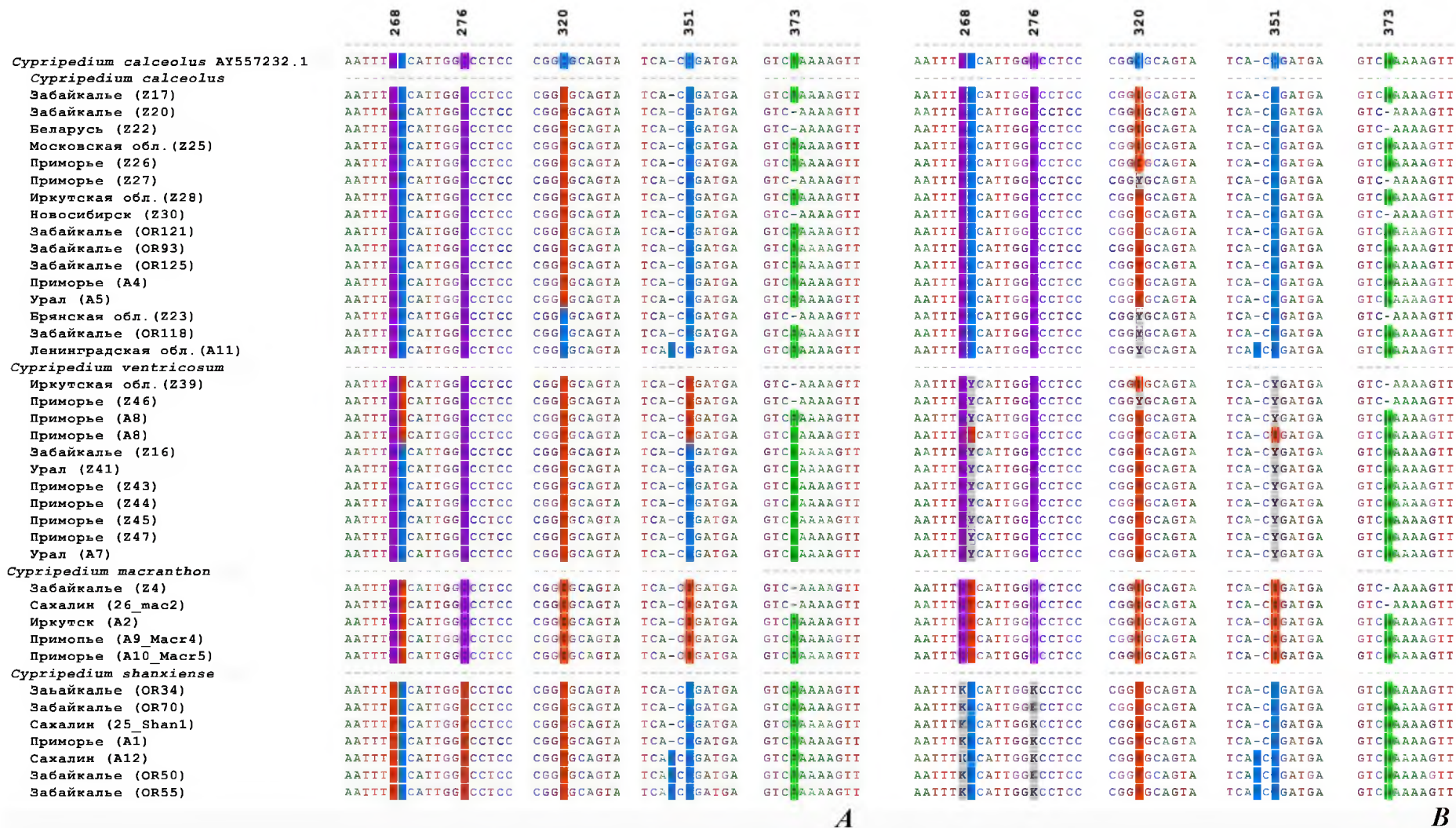
Для подтверждения высказанной гипотезы было проведено исследование внутригеномного полиморфизма с использованием методики 454 участков *ITS1* гена 5,8S рибосомальной ДНК и *trnL-F* хлоропластной ДНК у *C. calceolus*, *C. macranthon*, *C. shanxiense* и *C. × ventricosum*. Секвенирование проводили на приборе GS Junior System (Roche Diagnostics Corporation) с использованием фьюжин-праймеров. Все полученные прочтения сравнивали с последовательностью из генбанка. В качестве референса для *ITS1* участка был использован образец *C. calceolus* из Европы, для *trnL-F* – *C. macranthon* из генбанка (рис. 1, 2).

Сравнительный анализ *ITS1* участка у 16 образцов *C. calceolus* показал, что у 4 из них имеется внутригеномный полиморфизм в позиции 320 (позиция здесь и далее обозначены в соответствии с аналогичными позициями у референса (табл., рис. 1). У трех образцов преобладали последовательности аналогичные

Таблица

Наличие замен в локусе *ITS1* и их доля в общем числе прочтений (в %) у некоторых изученных образцов по сравнению с референсом из генбанка (образец *C. calceolus* из Швейцарии, см. рисунок 1) по данным пиросеквенирования (454 метод)

Вариант замены, позиция	<i>C. macranthon</i>				<i>C. ventricosum</i>		<i>C. calceolus</i>			<i>C. shanxiense</i>			
	Иркутск. обл	Урал	Приморье (розовый)	Приморье (белый)	Урал	Приморье	Приморье	Урал	Ленинградская обл	Сахалин	Забайкалье 1	Забайкалье 2	Приморье
269: C/T	100.00	99.72	98.81	99.32	46.7	45.55	0.39	1.43	1.53	2.81	3.97	3.94	0.60
320: C/T	98.89	99.74	99.83	99.88	98.58	99.45	100.0	99.61	51.02	99.46	99.05	99.39	99.40
352: C/T	97.05	97.26	96.25	97.67	45.01	45.34	0.00	0.6	1.17	2	0.73	0.85	0.00
276: G/T	0.00	0.03	0.07	0.04	0.36	0.00	0.00	0.07	0.11	69.82	49.85	46.04	85.12
268: G/T	0.00	0.15	0.17	0.14	1.3	0.25	0.58	1.89	0.77	73.08	54.48	51.92	81.97



A

B

Рис. 1. Полиморфизм ITS 1 участка ДНК у 4 таксонов рода *Surippedium* на межвидовом (А) и внутривидовом (В) уровнях по результатам 454 метода пиросеквенирования (обозначения замен К=G/T, Y=C/T).

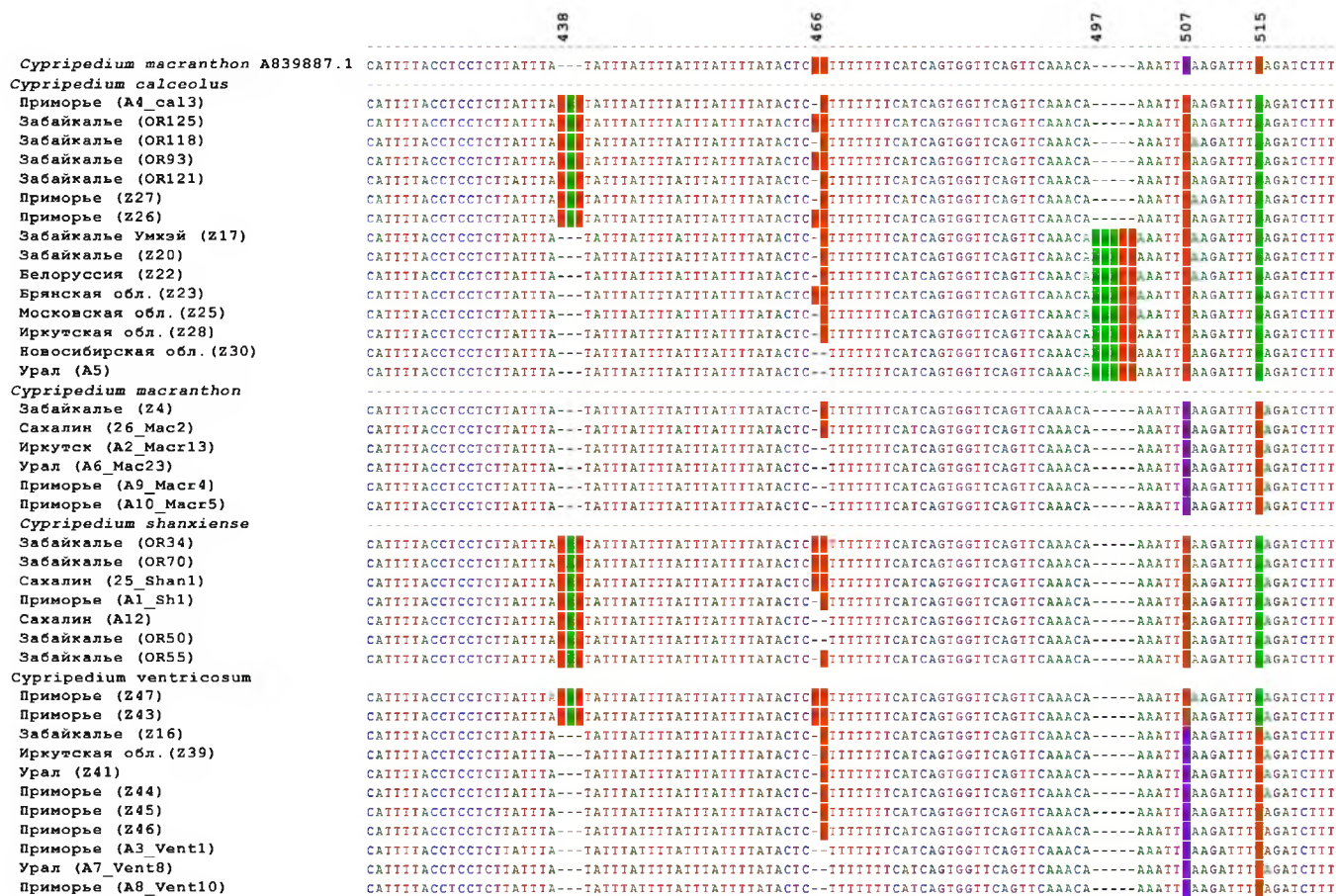


Рис. 2. Полиморфизм участка *Cyp2* (Fay et al., 2009) межгенного спейсера хлоропластной ДНК (*trnL-trnF*) у 4 таксонов рода *Cypridium*.

референсу, у одного образца преобладали последовательности с заменой С на Т. У большинства изученных образцов замена в 320 позиции была практически во всех рядах. Полиморфные образцы *C. calceolus* были собраны в разных частях ареала в Ленинградской обл., Брянской обл., в Забайкалье и в Приморье; географической дифференциации между локальными популяциями по данному признаку не выявлено.

Сравнительный анализ *ITS1* участка у 7 образцов *C. shanxiense* (4 образца из Забайкалья, 2 – с Сахалина, 1 – из Приморья) показал, что в позициях 268 и 276 имеются замены G на T, а в позиции 320 – С на Т. Замена в позиции 320 была практически в 100 % прочтений. Как оказалось, по позициям 268 и 276 особи *C. shanxiense* отличаются и от референса, и от всех других изученных таксонов. Это специфичные для данного таксона замены.

Следует отметить, что по позициям 268 и 276 у образцов *C. shanxiense* имелся внутригеномный полиморфизм. Так, образцы из Забайкалья отличались от референса по позициям 268 и 276 в 50 % прочтений, из Приморья – в 85–87 %, а с Сахалина 70–73 % (табл.). Это указывает на различие ядерной ДНК у *C. shanxiense* из различных местонахождений. При этом в образцах *C. shanxiense* из Забайкалья последовательности идентичные *C. calceolus* присутствовали в большом числе (табл.). По данным аллозимного анализа, все изученные особи были полностью мономорфными по всем 10 изученным генным локусам.

В образцах *C. calceolus* замены G на T в позициях 268 и 276 были обнаружены только в единичных рядах. Из этого следует, что изученные образцы *C. calceolus* нельзя отнести к гибридам. Полученные результаты с использованием метода 454 отличаются от данных аллозимного анализа. Тем самым, вопрос об интрогрессивной гибридизации между *C. calceolus* и *C. shanxiense* в реальном времени остается нерешенным.

Сравнительный анализ *ITS1* участка у 5 образцов *C. macranthron* показал, что они отличаются от референса по позициям 269, 320 и 352, где есть замены С на Т. По позициям 269 и 352 они отличаются также от *C. calceolus* и *C. shanxiense*.

Сравнительный анализ *ITS1* участка у 11 образцов *C. x ventricosum* показал, что имеется полиморфизм в позициях 269 и 352, по которым различаются родительские виды *C. calceolus* и *C. macranthron*. Число

прочтений с заменами в позиции 269 и 352 было примерно 50 % (табл.). В позиции 320 замена была практически в 100 % прочтений. Согласно результатам исследования, практически все образцы *C. x ventricosum* являются гибридами первого поколения между *C. calceolus* и *C. macranthon*. Эти данные полностью согласуются с результатами аллозимного анализа. Ни одного гибрида между *C. macranthon* и *C. shanxiense* не обнаружено.

У двух из 11 изученных образцов *C. x ventricosum* изученный участок хлоропластной ДНК имел сходство с *C. calceolus* из Забайкальского края и из Приморья, у всех других он был идентичен таковому *C. macranthon*. Тем самым, особи этого гибридного таксона могут образовываться с участием как *C. macranthon*, так и *C. calceolus* в качестве женских растений.

Если изученные образцы *C. calceolus* не различались по *ITS1* участку, то по хлоропластной ДНК они разделились на 2 группы. Нуклеотидная последовательность участка хлоропластной ДНК оказалась идентичной у всех изученных образцов *C. shanxiense* и у *C. calceolus* из Забайкальского края и из Приморья. Однако при сравнении с образцами *C. calceolus*, собранными в забайкальской части Бурятии и западнее (Сибирь, Урал и Европейская часть России), были выявлены существенные различия по наличию вставок/делений в позиции 438 и 497 (рис. 2). Вероятная граница между группами *C. calceolus* проходит в Забайкальском крае. Эти данные хорошо согласуются с результатами аллозимного анализа.

Из полученных результатов следует, что на территории России имеются две разные линии *C. calceolus*, которые различаются по хлоропластной ДНК. Она, как известно, наследуется по материнской линии, и полученные данные с использованием 454 метода подтверждают это, т. к. полиморфизм по изученному участку хлоропластной ДНК выявлен не был.

Участки хлоропластной ДНК у одной из линий *C. calceolus* и *C. shanxiense* оказались идентичными, тогда как *ITS1* участок ДНК у данных представителей имел существенные различия. Интересно отметить, что особи *C. calceolus* с таким гаплотипом произрастали только в пределах ареала *C. shanxiense*. Поскольку хлоропластная ДНК наследуется по материнской линии, то можно предположить, что имеется ограничение расстояния, на которое происходит рассеивание семян после диссеминации. Полученные данные по анализу хлоропластной ДНК не подтверждают, но и не опровергают возможное гибридогенное происхождение линии *C. calceolus* с гаплотипом, идентичным *C. shanxiense*. Очевидно, что эти два таксона имеют общее происхождение по материнской линии.

Зона гибридизации между *C. calceolus* и *C. shanxiense*, определенная на основании аллельного состава локусов *PGI* и *SKDH* (по дифференцирующим *C. shanxiense* аллелям у *C. calceolus*) представляется более широкой, т. к. она распространяется не только на территорию совместного произрастания двух таксонов, но и на прилегающие к ней районы. Это может быть связано с тем, что имеет место поток генов, который осуществляется посредством переноса пыльцы на большие расстояния, по сравнению с дисперсией семян. Однако статистическая обработка данных аллозимного анализа показала, что популяции *C. calceolus* находятся в равновесном (Харди-Вайнберга) состоянии по локусам, в которых были выявлены дифференцирующие *C. shanxiense* аллели. Следовательно, обмен генетическим материалом между гибридами или таксонами происходит очень редко.

Как оказалось, не все гипотезы, высказанные на основании данных аллозимного анализа, нашли подтверждение после проведения исследования внутригеномного полиморфизма двух участков ДНК. Так, например, была уверенность, что аллельный состав двух локусов *PGI* и *SKDH* у *C. calceolus* из Приморья указывает на интрогрессивную гибридизацию со стороны *C. shanxiense*, которая осуществляется в реальном времени. Однако в исследовании внутригеномного полиморфизма *ITS1* участка ДНК у *C. calceolus* последовательности идентичные *C. shanxiense* встречались очень редко (не более 1,5 % от числа всех прочтений). Тогда как в генотипе *C. shanxiense*, который по данным аллозимного анализа является мономорфным по всем 10 генным локусам, *ITS1* участок ДНК имел сходство на 13–50 % с *C. calceolus*. По этим данным, наоборот, именно *C. shanxiense* является гибридным, и имеет место интрогрессия со стороны *C. calceolus* (табл.).

Благодарности. Работа выполнена по государственным заданиям № 01201255606 и № 012001459509 при финансовой поддержке гранта РФФИ (проект № 14-04-92004 ННС_а) и Программы фундаментальных исследований Президиума РАН: «Живая природа: современное состояние и проблемы развития». Прочтение последовательностей ДНК с использованием метода 454 (пиросеквенирование) проводилось в отделение Геномных технологий Центра коллективного пользования научных оборудованием отделением земле-

делия Российской академии сельскохозяйственных наук «Геномные технологии и клеточная биология» ГНУ ВНИИСХМ Россельхозакадемии. Авторы благодарят сотрудников лаборатории и лично заведующего лабораторией Андропова Евгения Евгеньевича за выполнение высокотехнологичного молекулярно-генетического исследования.

ЛИТЕРАТУРА

Андропова Е. В., Филиппов Е. Г., Мельникова А. Б., Аверьянов Л. В. Морфологический анализ и соотношение типичных и уклоняющихся форм в популяциях *Cypripedium calceolus* на юге Хабаровского и Приморского краев // Вестник ТвГУ. Серия Биология и Экология, 2007. – № 7(35). – С. 17–19.

Андропова Е. В., Филиппов Е. Г., Мельникова А. Б. Об особой генетической структуре популяций *Cypripedium calceolus* L. в Хабаровском и Приморском краях // Амур заповедный: сб. тр. II регион. науч.-практ. конф. (Комсомольск-на-Амуре, 7–9 октября 2008) / под ред. Г. П. Телицина. – Хабаровск, 2009. – С. 122–127.

Филиппов Е. Г., Андропова Е. В. Генетическая дифференциация представителей рода *Cypripedium* России по данным аллозимного анализа // Генетика, 2011. – Т. 47, № 5. – С. 615–623.

Fay M. F., Bone R., Cook P., et al. Genetic diversity in *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae) with a focus on north-western Europe, as revealed by plastid DNA length polymorphisms // Ann. Bot., 2009. – Vol. 104. – P. 517–525.