

УДК 575.17:582.52

Изменчивость последовательностей ITS1-5.8S-ITS2 видов *Elymus*, связанная с гибридизацией и рекомбинацией: филогенетическая сеть NeighbourNet

The ITS 1-5.8S-ITS2 sequences variability of *Elymus* L. species associated with hybridization and recombination: phylogenetic network NeighbourNet

К. С. Добрякова

K. S. Dobryakova

Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, г. Санкт-Петербург, e-mail: kdobryakova@mail.ru

Реферат. Картина распределения ITS последовательностей видов *Elymus* в сети NeighbourNet зависит от географии видов. Сравнительный анализ последовательностей ITS1-5.8S-ITS2 выявил две группы родства видов *Elymus*.

Summary. Distribution of the *Elymus* ITS sequences in NeighbourNet network depends on geographic location of species. Comparative analysis of the sequences ITS1-5.8S-ITS2 showed that the species of *Elymus* had two kinship groups.

Процессы видообразования в пределах аллополиплоидного рода *Elymus* могут быть успешно описаны с помощью алгоритмов, учитывающих возможность сетчатой микроэволюции, например, программы SplitsTree4, сеть NeighbourNet. Также для выявления молекулярно-филогенетических связей традиционно используют алгоритмы, продуктом которых являются молекулярно-филогенетические деревья.

Образцы растений были собраны в Алтайском крае, в Республиках Алтай, Хакасия, на данный момент они хранятся в гербарии лаборатории Биосистематики и цитологии БИН РАН. Растительный материал для исследования были также взят из гербарных коллекций БИН РАН (LE). ДНК из листового материала была выделена с помощью СТАВ-метода (Doyle, Doyle, 1987). ПЦР была проведена на амплификаторе «Technе 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 на базе ЦКП БИН РАН. Последовательности были выравнены с помощью программы ClustalW, входящей в пакет программ MEGA 6, с последующей визуальной проверкой (Добрякова, Носов, 2015). Была построена филогенетическая сеть NeighbourNet с помощью программы SplitsTree4 (Huson, Bryant, 2006). Для анализа межвидовой изменчивости видов *Elymus* и других видов трибы *Triticeae* было проанализировано 43 уникальных ITS последовательности (каждая ITS-последовательность отличалась от другой не менее чем одним нуклеотидом) (табл. 1).

Общая длина выровненных последовательностей видов *Elymus*, всего 37 видов с учетом инсерций/делеций, составила 603 п. н., из них 510 консервативных сайтов, 58 переменных, из которых парсимоничных – 18. (Парсимоничные сайты – это переменные сайты, в которых как минимум два нуклеотида встречаются не менее двух раз).

В ITS1 насчитывалось 8 парсимоничных сайтов, в гене 5,8 S – 0, в ITS2 – 10. Отметим, что в некоторых положениях выравнивания, где были обнаружены парсимоничные сайты, также были детектированы полиморфные сайты (PS). Так в 158 положении ITS1 у разных образцов: А, Т или W; в 588 положении А, G или R. На рисунке изображена филогенетическая сеть NeighbourNet 37 последовательностей ITS видов *Elymus*, 1 последовательности *Elytrigia geniculata*, 1 последовательности *×Elyhordeum schmidii*, 2х после-

Таблица 1

Секвенированные и проанализированные последовательности ITS1-5.8S-ITS2

Номер в GenBank	Вид	Местонахождение ваучера, место и дата сбора и информация об определении образца
KM871828	<i>E. amurensis</i> (Drob.) Czer.	ЛЕ. Ворошиловский р-н, 18.07.1952. Собр.: С. К. Черепанов. Опр.: Н. Н. Цвелев.
KJ561233	<i>E. caninus</i> (L.) L.	РА. Чарышский р-н., 51°12' с.ш., 83°51' в.д., 25.08.2007. Собр.: А. В. Родионов (АР), Е. О. Пунина (ЕП), Н. Н. Носов (НН). Опр.: Н. Н. Носов (НН), Н. Н. Цвелев (НЦ). Alt 1031.
KJ561234	<i>E. caninus</i> (L.) L.	Сев. Кавказ, сев. склон г. Оштен. Собр.: АР, ЕП. Опр.: Н Н, Н Ц К 26.
KJ540222	<i>E. dahuricus</i> Turcz. ex Griseb.	Респ. Хакасия, Орджоникидзевский р-н, 54°47' с.ш., 89°45' в.д. 22.08.2009. Собр.: АР, НН. Опр.: К. С. Добрякова (КД), НЦ. Ха 09–157.
KJ540223	<i>E. dahuricus</i> Turcz. ex Griseb.	Респ. Алтай (РА), Онгудайский р-н. 50°59' с.ш., 88°44' в.д. 13.08.2011. Собр.: АР, ЕП, НН. Опр.: КД, НЦ. Alt 11–39.
KM363383	<i>E. fibrosus</i> (Schrenk) Tzvel.	РА. Кош-Агачский р-н, 07.09.2008. Собр.: АР, ЕП, НН. Опр.: Н Н, Н Ц Alt 1491.
KM871830	<i>E. fibrosus</i> (Schrenk) Tzvel.	ЛЕ. Ex herbario universitatis ouluensis. Finland. 29.07.1978. Leg.: T. Ulvinen, A. Ylimartimo & Co.
KJ540225	<i>E. gmelinii</i> (Ledeb.) Tzvel.	Алтайский край, на границе Змеиногорского и Курьинского р-нов, 51°10' с.ш., 82°49' в.д., 22.08.2007. Собр.: АР, ЕП, НН. Опр.: Н Н, Н Ц Alt 971.
KM363382	<i>E. gmelinii</i> (Ledeb.) Tzvel.	РА, Улаганский р-н, 50°35' с.ш., 88°02' в.д., 23.08.2012. Собр.: АР, ЕП, НН. Опр.: КД. Alt 12–193.
KM363384	<i>E. gmelinii</i> (Ledeb.) Tzvel.	Кемеровская обл., Тисульский р-н, 55°46' с.ш., 88°22' в.д., 24.08.2009. Собр.: АР. Опр.: КД, НЦ. Ке 09–15.
KM871831	<i>E. hyperarcticus</i> (Polun.) Tzvel.	ЛЕ. Западная Чукотка, 07.08.1976. Собр., опр.: В. В. Петровский, Т. М. Королева.
KM363381	<i>E. jacutensis</i> (Drob.) Tzvel.	Якутия, Булунский р-н. 24.07.2007. Собр., опр.: Е. Г. Николин. JaK 5.
KM575844	<i>E. jacutensis</i> (Drob.) Tzvel.	РА, Шебалинский р-н, 51°07' с.ш., 85°36' в.д., 11.08.2006. Собр.: АР, ЕП. Опр.: НН. Alt 239.
KM871826	<i>E. karakabanicus</i> Kotuch.	РА. Улаганский р-н. 21.08.2012. Собр.: АР, ЕП, НН. Опр.: КД. Alt 12–137.
KJ561237	<i>E. kronokensis</i> (Kom.) Tzvel.	РА. Онгудайский р-н, 50°39' с.ш., 86°19' 31.08.2006. Собр.: АР, ЕП, НН. Опр.: Н Н, Н Ц Alt 660.
KM502299	<i>E. macrourus</i> (Turcz.) Tzvel.	Якутия, Кобяйский р-н., 10.07.1986. Собр.: Е. Г. Николин. Опр.: Г. А. Пешкова. JaK38.
KM871827	<i>E. mutabilis</i> (Drob.) Tzvel.	РА, Усть-Коксинский р-н, 50°17' с.ш., 85°22' в.д., 26.07.13. Собр.: АР, ЕП, НН. Опр.: ЕП, КД.
KM871824	<i>E. peschkovae</i> Tzvel.	ЛЕ. Якутия, Сусуманский р-н, около пос. Тангора, 03.07.1957. Собр.: П. П. Реутт. Опр.: НЦ.
KM502300	<i>E. sajanensis</i> (Nevski) Tzvel.	РА. Кош-Агачский р-н, 50°04' с.ш., 87°46' в.д., 20.08.2010. Собр.: АР, ЕП, НН. Опр.: ЕП. Alt 10–131.
KM871825	<i>E. sajanensis</i> (Nevski) Tzvel.	Респ. Тыва, берег р. Моген-Бурен, 50°10' с.ш., 89°45' в.д., 2200 м над ур. м. Собр.: АР. Опр.: НН, НЦ. Tuva 49.
KM502297	<i>E. schrenkianus</i> (Fisch. et C. A. Mey.) Tzvel.	РА. Кош-Агачский р-н, 49°18' с.ш., 87°45' в.д., 22.08.2006. Собр.: АР, ЕП.
KM502301	<i>E. schrenkianus</i> (Fisch. et C. A. Mey.) Tzvel.	РА. Кош-Агачский р-н, 49°84' с.ш., 89°21' в.д., 20.08.2010. Собр.: АР, ЕП, НН. Опр.: КД. Alt 11–653.
KJ540220	<i>E. sibiricus</i> L.	РА. Кош-Агачский р-н, 50°02' с.ш., 88°16' в.д., 25.08.2010. Собр.: АР, ЕП, НН. Опр.: КД, НЦ. Alt 10–409
KM975705	<i>E. subfibrosus</i> (Tzvel.) Tzvel.	ЛЕ. Якутия, 200 км южнее от г. Якутска, 03.07.1969. Собр.: Т. Г. Леонова. Опр.: Т. Г. Леонова, НЦ.

Окончание таблицы 1

Номер в GenBank	Вид	Местонахождение ваучера, место и дата сбора и информация об определении образца
KM575845	<i>E. transbaicalensis</i> (Nevski) Tzvel.	РА, Кош-Агачский р-н, 50°09' с.ш., 88°18' в.д., 29.08.2006. Собр.: АР, ЕП, НН. Опр.: НН, НЦ. Alt 544.
KM363385	<i>E. transbaicalensis</i> (Nevski) Tzvel.	РА, Улаганский р-н, 50°19' с.ш., 87°43' в.д. 30.08.2010. Собр.: АР, ЕП, НН. Опр.: КД, НЦ. Alt 10–545.
KM379150	<i>E. turuchanensis</i> (Reverd.) Czer.	РА, Усть-Коксинский р-н, пер. Ажу. 27.08.2012. Собр.: АР, ЕП. Опр.: КД. Alt 12–374.
KJ540221	<i>E. vernicosus</i> (Nevski ex Grub.) Tzvel	РА, Улаганский р-н. Собр.: АР, ЕП, НН. Опр.: КД, НЦ. Alt 12–142.
KJ561239	<i>Elymus</i> sp. ×	РА, Чемальский р-н. 51°38' с.ш., 85°46' в.д., 386 м над ур. м. Собр.: АР, ЕП, НН. Опр.: КД, НЦ. Alt 11–60.
KJ561241	<i>Agropyron cristatum</i> (L.) Beauv.	РА, Кош-Агачский р-н, 49°48' с.ш., 89°22' в.д., 20.08.2011. Собр.: АР, ЕП, НН. Опр.: КД, НЦ. Alt 11–377.
KJ561240	<i>A. krylovianum</i> Schischk.	РА, Улаганский р-н. 50°54' с.ш., 88°12' в.д., 23.08.2012. Собр.: АР, ЕП, НН. Опр.: КД, НЦ. Alt 12–264.
KJ755830	× <i>Elyhordeum schmidii</i> (Melderis) Melderis	РА, Шебалинский р-н. Чуйский тракт, окр. пос. Черга, берег р. Сема. 51°35' с.ш., 85°35' в.д., 450 м над ур. м. 28.08.2004. Собр.: АР, ЕП, С. А. Дьяченко. Опр.: НЦ. Alt 053
KJ561242	<i>Elytrigia geniculata</i> (Trin.) Nevski	Респ. Хакасия, Орджоникидзеvский р-н, 54°41' с.ш., 89°42' в.д., 23.08.2009. Собр.: АР, НН. Опр.: КД, НЦ. Ха 09–180.
KJ561243	<i>Psathyrostachys desertorum</i> (Fisch.) Nevski (<i>P. juncea</i>)	РА, Кош-Агачский р-н, 50°09' с.ш., 88°18' в.д., 21.08.2010. Собр.: АР, ЕП, НН. Опр.: ЕП, НЦ. Alt 10–261.

Таблица 2

Последовательности ITS1-5.8-ITS2 международной базы данных GenBank

Номер в GenBank	Вид	Происхождение образца	Авторы
GQ373284	<i>E. caninus</i> (L.) L.		Dizkirici et al., 2010
AY740808	<i>E. caucasicus</i> (K. Koch) Tzvelev	Armenia: Dilidjan	Liu et al., 2006
FJ040160	<i>E. confusus</i> (Roshev.) Tzvelev	China?	Wang X., Zhou Y.
KF905146	<i>E. dahuricus</i> var. <i>cylindricus</i> Franch.	China: Yongdeng, Gansu	Song et al., 2015
AY740883	<i>E. himalayanus</i> (Nevski) Tzvelev	Pakistan: Astor valley, Gilgit	Liu et al., 2006
KF713228	<i>E. repens</i> (L.) Gould	South Korea	Lee J., Kim C.-S., Lee I. Y.
GQ373268	<i>E. repens</i> (L.) Gould	Turkey	Dizkirici et al., 2010
GQ373309	<i>Agropyron cristatum</i> (L.) Beauv.	Turkey	Dizkirici et al., 2010

довательностей *Agropyron cristatum*, последовательности *A. krylovianum*, а также ITS-последовательности *Psathyrostachys desertorum*. Виды близких родов к роду *Elymus* трибы *Triticeae* были взяты в качестве внешней группы; нас также интересовало положение видов разных родов на филогенетической сети в связи с возможными процессами межродовой гибридизации.

На рисунке сети NeighbourNet представлены три группы родства видов *Elymus*. Первую группу родства образуют следующие виды (образцы № 1–30): *E. confusus*, *E. dahuricus* var. *cylindricus* (Китай); *E. hyperarcticus* (Западная Чукотка); *E. gmelinii* (Кем. обл.); Республика Алтай: *E. caninus*, *E. fibrosus*, *E. gmelinii*, *E. jacutensis*, *E. kronokensis*, *E. mutabilis*, *E. sajanensis*, *E. schrenkianus*, *E. pendulinus*, *E. sibiricus*, *E. transba-*

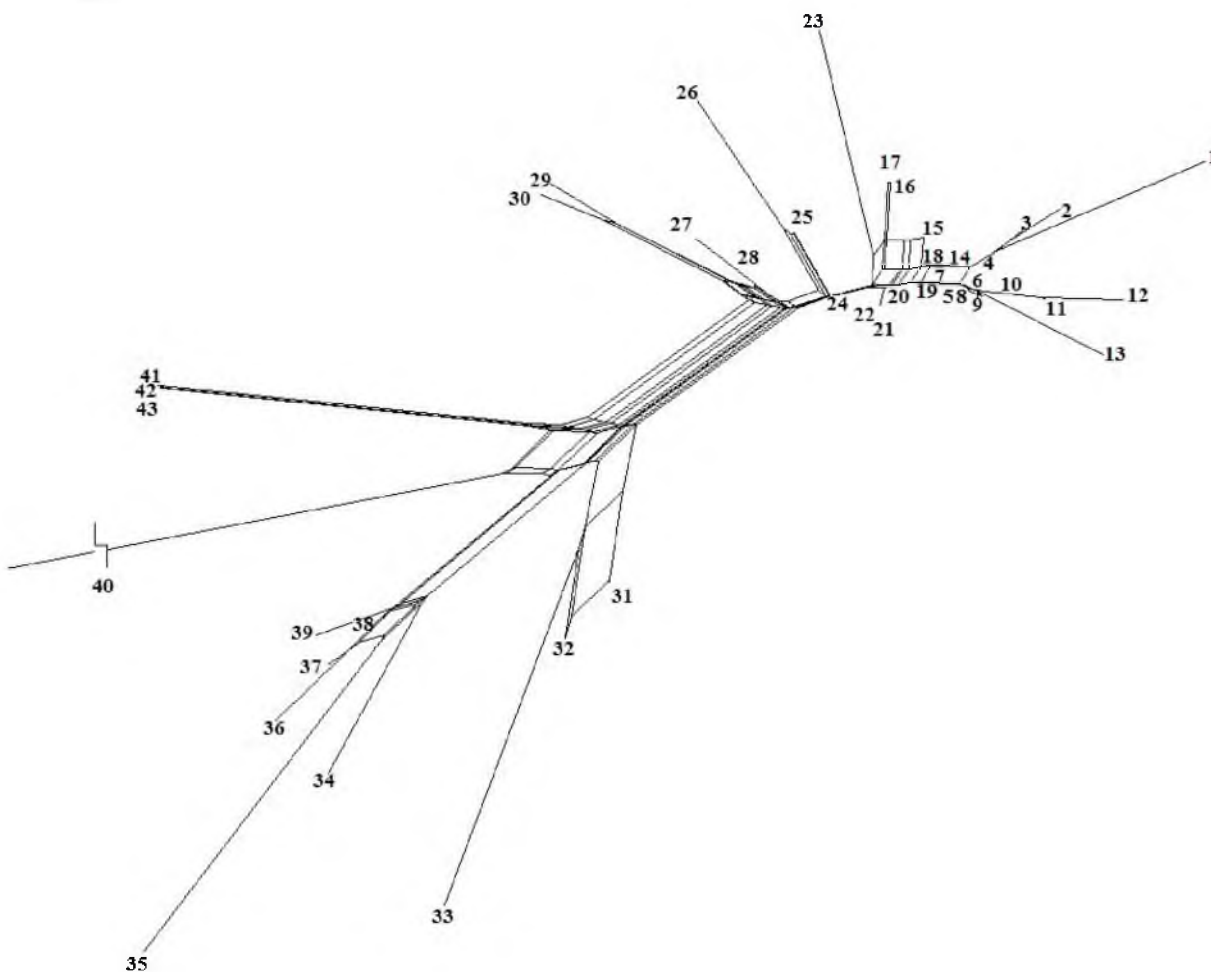


Рис. 1. Сеть NeighbourNet (SplitsTree4) последовательностей ITS видов *Elymus* и других видов трибы *Triticeae*. 1. *E. confusus* FJ040160, 2. *E. hyperarcticus* KM871831, 3. *E. sajanensis* KM871825, 4. *E. gmelinii* KM363384, 5. *E. caninus* KJ561233, 6. *E. sibiricus* KJ540220, 7. *E. macrourus* KM502299, 8. *E. sajanensis* KM502300, 9. *E. transbaicalensis* KM575845, 10. *E. mutabilis* KM871827, 11. *E. fibrosus* KM363383, 12. *E. fibrosus* KM871830, 13. *E. peschkovae* KM871824, 14. *E. gmelinii* KJ540225, 15. *E. caninus*, 16. *E. caninus*, 17. *E. subfibrosus* KM975705, 18. *E. turuchanensis* KM379150, 19. *E. sp.*× KJ561239, 20. *E. vernicosus* KJ540221, 21. *E. transbaicalensis* KM363385, 22. *E. jacutensis* KM363381, 23. *E. gmelinii* KM363382, 24. *E. jacutensis* KM575844, 25. *Elytrigia geniculata* KJ561242, 26. *E. kronokensis* KJ561237, 27. *E. schrenkianus* KM502297, 28. *E. schrenkianus* KM502301, 29. *E. dahuricus* var. *cylindricus* KF905146, 30. *E. pendulinus* KM871821, 31. *E. repens* KF713228, 32. *E. repens* GQ373268, 33. *E. caucasicus* AY740808, 34. *E. amurensis* KM871828, 35. ×*Elyhordeum schmidii* KJ755830, 36. *E. dahuricus* KJ540223, 37. *E. dahuricus* KJ540222, 38. *E. karakabinicus* KM871826, 39. *E. himalayanus* AY740883, 40. *Psathyrostachys desertorum* KJ561243, 41. *Agropyron cristatum* GQ373309, 42. *A. krylovianum* KJ561240, 43. *A. cristatum* KJ561241.

icalensis, *E. turuchanensis*, *E. sp.*×, *E. vernicosus*; *E. sajanensis* (Республика Тыва); *E. caninus* (Северный Кавказ); Якутия: *E. macrourus*, *E. peschkovae*, *E. subfibrosus*, *E. jacutensis*; *E. fibrosus* (Финляндия), а также *Elytrigia geniculata* (Республика Хакасия). Все представленные виды являются европейскими или азиатскими.

Особенно близкое родство продемонстрировали ITS-последовательности видов первой группы родства: *E. caninus*, *E. confusus*, *E. fibrosus*, *E. gmelinii*, *E. hyperarcticus*, *E. macrourus*, *E. mutabilis*, *E. peschkovae*, *E. sajanensis*, *E. sibiricus*, *E. transbaicalensis* (образцы № 1–13), а также ITS-последовательности (образцы № 24–30) следующих видов: *E. dahuricus* var. *cylindricus*, *E. jacutensis*, *E. kronokensis*, *E. pendulinus*, *E. schrenkianus*.

Ниже приведены последовательности видов *Elymus*, которые на рисунке 19 расположены между данными двумя группами (образцы № 14–23): *E. caninus*, *E. gmelinii*, *E. subfibrosus*, *E. transbaicalensis*, *E. turuchanensis*, *E. sp.*×, *E. vernicosus*, *E. jacutensis*. ITS-последовательности видов *E. subfibrosus*, *E. turuchanensis*, *E. sp.*×, *E. vernicosus* могут являть индикаторами событий гибридизации между некоторыми видами из групп: образцы № 1–13 и № 24–30. Различия в положении ITS-последовательностей видов *E. caninus*,

E. gmelinii, *E. transbaicalensis* и *E. jacutensis* на данной схеме (рис. 1) могут быть объяснены географической изоляцией популяций данных видов, приводящей к накоплению мутаций. Во второй группе родства находятся ITS-последовательности видов: *E. repens* (Северная Корея, Турция) и *E. caucasicus* (Армения), данная группа состоит из азиатских видов. В состав третьей группы входят ITS-последовательности *E. amurensis* (РФ), РА: *E. dahuricus*, *E. karakabinicus*, ×*Elyhordeum schmidii*, *E. dahuricus* (Республика Хакасия) и *E. himalayanus* (Пакистан). На филогенетической сети NeighbourNet мы можем наблюдать две группы родства ITS последовательностей видов *Elymus*. Картина распределения последовательностей образцов в сети NeighbourNet зависит от географии объектов.

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 12-04-31524 мол_а, 14-04-01416, 15-04-06438, на базе ЦКП ОБН БИН РАН.

ЛИТЕРАТУРА

- Добрякова К. С., Носов Н. Н.* Изменчивость последовательностей ITS1-генов 5.8S рРНК – ITS2 и *trnL-trnF* в ходе дивергенции видов рода *Elymus* L. флоры Сибири и Дальнего Востока // Вестник СПбГУ, 2015. – Сер. 3, вып. 4. – С. 4–17.
- Dizkirci A., Kaya Z., Cabi E., Dogan M.* Phylogenetic relationships of *Elymus* L. and related genera (Poaceae: Triticeae Dumort.) based on the nuclear ribosomal internal transcribed spacer sequences // Turkish Journal of Botany, 2010. – Vol. 3, No. 6. – P. 467–478.
- Doyle J. J., Doyle J. L.* A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochemical Bulletin, 1987. – Vol. 19. – P. 11–15.
- Huson D. H., Bryant D.* Application of phylogenetic networks in evolutionary studies // Mol. Biol. Evol., 2006. – Vol. 23. – P. 254–267.
- Liu Q., Ge S., Tang H., Zhang X., Zhu G., Lu B. R.* Phylogenetic relationships in *Elymus* (Poaceae: Triticeae) based on the nuclear ribosomal internal transcribed spacer and chloroplast *trnL-F* sequences // New Phytol., 2006. – Vol. 170. – P. 411–420.
- Ridgway K. P., Duck J. M., Young J. P. W.* Identification of roots from grass swards using PCR-RFLP and FFLP of the plastid *trnL* (UAA) intron // BMC Ecology, 2003. – Vol. 3(8e).
- Song H., Nan Z. B., Tian P.* Phylogenetic analysis of *Elymus* (Poaceae) in western China // Genet. Mol. Res., 2015. – Vol. 14, No. 4. – P. 12228–12239.
- Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J.* Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA // Plant Molecular Biology. – 1991. – Vol. 17. – P. 1105–1109.
- White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. W.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // PCR protocols: a guide to methods and application / Eds Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J. – New York, Academic Press, Inc., 1990. – P. 315–322.