

УДК 575.222.73:582.734.3

С.В. Асбаганов, Е.В. Кобозева, А.В. Агафонов

S.V. Asbaganov, E.V. Kobozeva, A.V. Agafonov

**АНАЛИЗ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ITS1-5.8S-ITS2 RDNA  
*SORBOCOTONEASTER POZDNJAKOVII* POJARK. В СРАВНЕНИИ С ВИДАМИ ИЗ РОДОВ  
*COTONEASTER* MEDIK. И *SORBUS* L.**

**THE ANALYSIS OF ITS1-5.8S-ITS2 RDNA NUCLEOTIDE SEQUENCES OF  
*SORBOCOTONEASTER POZDNJAKOVII* POJARK. IN COMPARISON WITH SPECIES  
FROM THE GENERA *COTONEASTER* MEDIK. AND *SORBUS* L.**

Анализ последовательностей ITS1-5.8S-ITS2 rDNA подтвердил близкое родство *Sorbocotoneaster pozdnjakovii* с видами рода *Sorbus* из Азиатской части России. В геноме искусственных гибридов  $F_1$  *Sorbus sibirica* × *Sorbocotoneaster pozdnjakovii* обнаружен рекомбинантный фрагмент последовательности между современными видами *Sorbus* и *Cotoneaster*. Полученные данные подтверждают происхождение × *Sorbocotoneaster* путем гибридизации между представителями этих родов.

Значительное число современных видов рябины (*Sorbus* L.) образовалось в результате отдаленной гибридизации, часто сопровождающейся полиплоидией. Благодаря апомиктическому размножению, распространенному в этом роде, гибридные и полиплоидные растения, сохраняя свой новый морфологический тип, занимают обширные территории. Некоторые из них формируют фертильную пыльцу и при возвратных скрещиваниях с исходными или родственными видами создают огромное разнообразие морфологических и генетических форм. По этой причине род *Sorbus* в таксономическом отношении является одним из самых запутанных и сложных в подсемействе Maloideae C.Weber.

На территории России обнаружен только один естественный межродовой гибрид с участием *Sorbus* – *Sorbocotoneaster pozdnjakovii* Pojark. (Рябинокизильник Позднякова) – единственный представитель монотипного рода *Sorbocotoneaster* Pojark., предположительно возникшего в результате спонтанной гибридизации между видами *Sorbus* L. и *Cotoneaster* Medik. (Пояркова, 1953). Рябинокизильник является узколокальным эндемиком Южной Якутии и находится под угрозой исчезновения (Коропачинский, Встовская, 2012).

По нашим данным (Асбаганов и др., 2014), рябинокизильник проявляет высокую семенную и пыльцевую фертильность. При его гибридизации с рябиной сибирской (*S. sibirica*) наблюдается рекомбинация молекулярно-генетических (ISSR, запасные белки семядолей) и морфологических признаков, что свидетельствует о близком родстве их геномов. Однако полученных данных не достаточно для доказательства гибридогенной природы этого вида.

В настоящем исследовании проведен сравнительный анализ нуклеотидной последовательности региона ITS1-5.8S-ITS2 rDNA у представителей родов *Sorbocotoneaster*, *Cotoneaster* и *Sorbus* с целью уточнения их филогенетических связей.

**Материалы и методы**

В работу были отобраны 11 образцов видов и межвидовых гибридов родов ×*Sorbocotoneaster*, *Cotoneaster* и *Sorbus* из коллекции ЦСБС СО РАН. Дополнительно использовали последовательности из базы NCBI. Для выделения ДНК использовали стандартный набор NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel, Germany). Для амплификации ITS1-5.8S-ITS2 rDNA региона *Sorbus* использовали универсальные праймеры ITS4 – (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') и ITS5 – (5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3') (White et. al., 1990, Dłużewska et al., 2013). Предварительную оценку эффективности ПЦР проводили на амплификаторе C-1000 (Bio-Rad, USA) в объеме 25 µl. Для повышения выхода продукта подобрали условия при помощи градиентной ПЦР на амплификаторе Verity (Applied Biosystems, USA). В итоге, стандартная реакция содержала однократный «HF» буфер, смесь по 0.2 mM каждого dNTP, 4 mM свободного Mg<sup>2+</sup> в виде раствора MgCl<sub>2</sub>, по 0.6 µM ITS5\_F и ITS4\_R праймеров, 0.2-0.5 ng/µl геномной ДНК, 10 % глицерин и 10 u/ml Phusion Hot Start II ДНК полимеразы (ThermoScientific Bio. Lithuania). Использовали следующий оптимизированный температурный профиль: первичная денатурация при 98 °C – 1 мин.; 38 циклов: денатурация 98 °C – 15 сек., отжиг праймеров 59 °C – 15 сек., элонгация при 72 °C – 30 сек.; финальная элонгация – 5 мин. при 72 °C и

хранение при 4°C до дальнейшего использования. Аликвоту ПЦР, содержащую исследуемый фрагмент, анализировали электрофорезом в 1.5 % агарозном геле при напряжении 10-14 V/cm.

1 µl полученного амплификата использовали для клонирования в состав вектора pJET (ThermoScientific Bio, Lithuania). Полученные на карбенициллин-содержащем LB агаре колонии *E.coli* штамма Mach-1 (Invitrogen, Sweden) использовали для выращивания 4 ml ночной культуры в жидкой питательной среде LB в течение 16 часов при 37°C и 220 об./мин.

Для каждого образца отобрали 5-20 клонов. Плазмидную ДНК выделяли при помощи набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit (ThermoScientific Bio, Lithuania). ДНК части клонов нарабатывали изотермальной амплификацией при помощи набора TempliPhi (GE Healthcare, Sweden). Клоны, содержащие вставку в составе pJET вектора, секвенировали по Сэнгеру.

Статистическая обработка выполнена с помощью программ UGENE и TREECON. Выравнивание последовательностей выполнено методом T-Coffee. Для расчета генетических дистанций использовали модель Кимуры (Kimura, 1980).

### Результаты

В ходе работы были секвенированы и проанализированы последовательности транскрибируемых спейсеров ITS1, ITS2 и гена 5.8S рРНК у 11 образцов видов и межвидовых гибридов родов *Sorbus*, *Sorbocotoneaster*, *Cotoneaster*. Последовательности ITS1 изученных видов, начинаются с мотива «TCGAACCT», 5.8S начинаются последовательностью «CGGCAACG» и заканчивается «GTTGCCCC», ITS2 заканчивается мотивом «AACGCGAC». Характеристики длины, GC-состава, числа консервативных и переменных сайтов представлены в таблице 1. Как и ожидалось, нуклеотидная последовательность 5.8S оказалась консервативной. Длина этого гена у всех проанализированных клонов составила 165 пн, на всем протяжении было выявлено 14 переменных сайтов, только 4 из них были парсимониичны. ITS1 и ITS2 характеризуются схожей длиной и схожими GC составом, числом переменных и парсимони-информативных сайтов.

Длина ITS1 последовательностей за счет вариаций в позиции 74 составила 223-224 пн. В позиции 74 обнаружена вставка специфичная для рябин Азиатской России (*S. sibirica* Hedl., *S. kamtchatcensis* Kom., *Sorbus amurensis* Koehne, *Sorbocotoneaster pozdnjakovii*). Наиболее информативные вариации последовательности ITS1 представлены в таблице 2. В целом, последовательности ITS1 и ITS2 проявляют высокую родоспецифичность в отношении *Cotoneaster* и *Sorbus* (транзиции в позициях 11, 33, 120, 132, 191, 206, 474, 527, 542 и трансверсии – 103, 132, 156, 446). При этом, включенные в анализ образцы цельнолистных рябин из подрода *Hahnia* Medik. (*S. torminalis* AF186533, *S. aria* FJ810045) занимают промежуточное положение между видами *Cotoneaster* и видами *Sorbus* из подрода *Eu-Sorbus* Kom. Рябины Азиатской России отличаются от европейских и восточноазиатских по частоте встречаемости отдельных мутаций, а также уникальными заменами в позициях 471 и 588, что отражает их географическую отдаленность, и может служить обоснованием таксономической дифференциации комплекса *S. aucuparia* s.l. на виды *S. aucuparia* s. str. и *S. sibirica*.

Для *Sorbocotoneaster pozdnjakovii* были секвенированы 20 различных копий ITS1-5.8S-ITS2 rDNA, которые все оказались идентичны последовательностям *S. sibirica*. На основании этих данных можно предположить, что *Sorbocotoneaster* может иметь не гибридное происхождение, а является видом близкородственным рябине сибирской, который сохранился на территории незатронутой в ледниковый период. Это также подтверждается приуроченностью *Sorbocotoneaster pozdnjakovii* к растительной формации, характерной для

Таблица 1

Характеристики ITS1-5.8S-ITS2 rDNA представителей родов *Sorbocotoneaster* Pojark., *Sorbus* L. и *Cotoneaster* Medik.

	ITS1	5.8S	ITS2	Общая
Выровненная длина пн.	224	165	215	604
Длина без пробелов пн.	223-224	165	204-213	592-602
GC состав, %	62-68	59	66-72	63-69
Число константных сайтов	160	151	148	459
Число переменных сайтов	64	14	67	145
Число парсимони-информативных сайтов	29 (12,9%)	4 (2,4%)	29 (13,5%)	62 (10,3%)



Таблица 2

Вариабельные последовательности внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS1) видов родов *Sorbocotoneaster* Pojark., *Sorbus* L. и *Cotoneaster* Medik.

	11	33	44	50	53	62	67	68	74	75	85	103	115	120	124	126	127	132	153	156	170	172	176	185	187	191	206
.	A	A	C	T	G	C	T	C	A	C	C	C	A	A	G	G	C	T	G	A	C	G	C	C	C	T	A
<i>C. mongolicus</i> JQ392402	.	G	.	C	.	.	.	.	–	.	.	.	C	G	.	.	T	C	C	C	.	.	.	.	.	C	G
<i>C. integerrimus</i> JQ392408	.	G	.	.	A	T	.	.	–	.	.	.	C	G	.	.	T	C	T	C	T	A	T	T	.	C	T
<i>C. niger</i> JQ392407	.	G	.	C	A	.	C	.	–	.	.	.	C	G	.	.	.	C	C	C	.	.	.	T	.	C	G
<i>C. armenus</i> JQ392406	.	G	.	C	A	.	C	.	–	.	T	.	C	G	.	.	.	C	C	C	.	A	.	T	.	C	T
<i>C. horizontalis</i> JQ392393	G	G	.	.	.	.	.	.	–	.	.	.	C	G	.	.	T	C	C	C	.	.	.	T	.	C	G
<i>C. microphyllus</i> JQ392380	G	G	.	.	.	.	.	.	–	.	.	.	C	G	.	.	T	C	C	C	.	.	.	T	.	C	G
<i>C. multiflorus</i> JQ392399	.	G	.	.	.	.	.	.	–	.	.	.	C	G	.	.	T	C	C	C	.	.	.	T	.	C	G
<i>C. nitidus</i> JQ392395	G	G	T	.	.	.	.	.	–	.	.	.	C	G	.	.	T	C	C	C	.	.	.	T	.	C	G
<i>C. atropurpureus</i> JQ392384	G	G	.	.	.	.	.	.	–	.	.	.	C	G	.	.	.	C	C	C	.	.	.	T	.	C	G
<i>C. melanocarpus</i> 2*	.	G	.	C	A	.	C	.	–	.	T	.	C	G	.	.	.	C	C	C	.	A	.	T	.	C	G
<i>C. melanocarpus</i> 3*	.	G	.	.	.	.	.	.	–	.	.	.	C	G	.	.	.	C	C	C	.	A	.	T	.	C	G
<i>C. melanocarpus</i> 4*	.	G	.	.	.	T	.	.	–	.	.	.	C	G	.	.	T	C	T	C	.	A	.	T	.	C	G
<i>C. melanocarpus</i> 5*	G	G	.	.	.	.	.	.	–	.	.	.	C	G	.	.	T	C	C	C	.	.	.	T	.	C	G
<i>C. melanocarpus</i> 6*	G	G	.	.	.	.	.	.	–	.	.	.	C	G	.	.	.	C	C	C	.	.	.	T	.	C	G
<i>C. melanocarpus</i> 7*	.	G	.	C	A	.	C	T	–	.	.	.	C	G	.	.	.	C	C	C	.	.	.	T	.	C	G
<i>Sorbocotoneaster pozdnjakovii</i> 3*	.	.	.	.	.	.	T	.	–	.	T	.	.	T	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>Sorbocotoneaster pozdnjakovii</i> 4*	.	.	.	.	.	.	T	.	–	.	T	.	.	T	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.
<b><i>S. sibirica</i> × <i>Sorbocotoneaster</i> 1*</b>	.	.	C	A	.	C	.	–	.	.	.	C	G	.	T	C	C	C	T	A	T	T	.	C	T	.	
<i>S. sibirica</i> × <i>Sorbocotoneaster</i> 2*	.	.	.	.	.	.	C	.	–	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>S. sibirica</i> × <i>Sorbocotoneaster</i> 5*	.	.	.	.	.	.	T	.	–	T	.	.	T	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.
<i>S. sibirica</i> × <i>Sorbocotoneaster</i> 6*	.	.	.	.	.	.	T	.	–	T	T	.	.	T	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.
<i>S. sibirica</i> × <i>Sorbocotoneaster</i> 7*	.	.	.	.	.	.	T	.	–	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>S. aucuparia</i> × <i>Sorbocotoneaster</i> 5*	.	.	.	.	.	.	.	–	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>S. aucuparia</i> × <i>Sorbocotoneaster</i> 6*	.	.	.	.	.	.	T	.	–	T	.	.	T	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.
<i>S. torminalis</i> AF186533	G	G	G	.	.	.	.	–	.	.	.	C	G	.	T	C	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>S. aria</i> FJ810045	.	G	.	.	.	.	.	–	.	.	.	C	G	.	.	.	C	T	C	.	.	.	.	.	.	.	G
<i>S. caucasigena</i> 5*	.	.	.	.	.	.	.	–	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>S. caucasigena</i> 6*	.	.	T	.	.	.	.	–	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>S. tianschanica</i> FJ810043	.	.	.	.	.	.	.	–	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>S. vilmorinii</i> FJ810040	.	.	.	.	.	.	.	–	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>S. scopulina</i> FJ810039	.	.	.	.	.	.	.	–	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>S. commixta</i> FJ810038	.	.	.	.	.	.	.	–	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>S. americana</i> FJ810037	.	.	.	.	.	.	.	–	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>S. intermedia</i> FJ810036	.	.	.	.	.	.	.	–	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>S. discolor</i> FJ810026	.	.	.	.	.	.	.	–	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G
<i>S. aucuparia</i> FJ796913	.	.	.	.	.	.	.	–	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>S. americana</i> 1*	.	.	.	.	.	.	.	–	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>S. americana</i> 4*	.	.	.	.	.	.	.	–	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>S. americana</i> 6*	.	.	T	.	.	.	.	–	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>S. kamtschatiensis</i> 4*	.	.	.	.	.	.	T	.	–	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>S. kamtschatiensis</i> 5*	.	.	.	.	.	.	T	.	–	T	.	.	T	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.
<i>S. amurensis</i> 1*	.	.	.	.	.	.	T	.	–	T	.	.	T	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.
<i>S. amurensis</i> 6*	.	.	.	.	.	.	T	.	–	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>S. sibirica</i> 4*	.	.	.	.	.	.	T	.	–	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>S. sibirica</i> 6*	.	.	.	.	.	.	T	–	.	T	.	.	T	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.
<i>S. aucuparia</i> × <i>S. aucuparia</i> 4*	.	.	T	.	.	.	.	–	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>S. aucuparia</i> × <i>S. aucuparia</i> 5*	.	.	.	.	.	.	.	–	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>S. sibirica</i> × <i>S. aucuparia</i> 2*	.	.	.	.	.	.	.	–	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Окончание таблицы 2

	11	33	44	50	53	62	67	68	74	75	85	103	115	120	124	126	127	132	153	156	170	172	176	185	187	191	206
.	A	A	C	T	G	C	T	C	A	C	C	C	A	A	G	G	C	T	G	A	C	G	C	C	C	T	A
<i>S. sibirica</i> × <i>S. aucuparia</i> 3*	.	.	.	.	.	.	.	.	–	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
<i>S. sibirica</i> × <i>S. aucuparia</i> 4*	.	.	.	.	.	.	.	T	.	–	.	T	.	.	T	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.
<i>S. sibirica</i> × <i>S. aucuparia</i> 5*	.	.	T	.	.	.	.	.	–	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

\*-звездочкой помечены секвенированные последовательности. Для последовательностей из генбанка указаны номера базы данных NCBI.

ризующей комплексом реликтовых видов плейстоценового возраста (Полякова, 1953). Однако, в данный анализ кроме видовых образцов были включены искусственные гибриды *F<sub>1</sub> Sorbus sibirica* × *Sorbocotoneaster pozdnjakovii* и *F<sub>1</sub> Sorbus aucuparia* × *Sorbocotoneaster pozdnjakovii*. Оказалось, что одна из секвенированных копий (*S. sibirica* × *Sorbocotoneaster* 1\* - в таблице 2 и на дендрограмме) ITS1-5.8S-ITS2 rDNA гибрида *F<sub>1</sub> Sorbus sibirica* × *Sorbocotoneaster pozdnjakovii* имела уникальную нуклеотидную последовательность, являющуюся рекомбинантной между *Cotoneaster* и *Sorbus*. По данным В.Н. Гладковой (1967) хромосомный набор *Sorbocotoneaster pozdnjakovii* может быть  $2n = 68, 85$ , что, в случае гибридогенной природы рябино-кизильника, характеризует его как аллополиплоид, высокую изогенность rDNA которого можно объяснить избирательной элиминацией копий rDNA одного из родительских видов. Генная конверсия rDNA у полиплоидов и гибридов была показано на капусте (Song et al. 1995), хлопке (Hanson et al. 1998), табаке (Lim et al., 2000), но причины и механизмы этого явления пока не известны.

Таким образом, анализ первичной структуры ITS1-5.8S-ITS2 rDNA явным образом свидетельствует о близком родстве *Sorbocotoneaster pozdnjakovii* с видами рода *Sorbus* и косвенно – с *Cotoneaster*.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Асбаганов С.В., Кобозева Е.В., Агафонов А.В.** Применение электрофореза запасных белков семян и ISSR-маркеров для идентификации гибридов между *Sorbus sibirica* Hedl. и *Sorbocotoneaster pozdnjakovii* Pojark. // Вавилов. журн. генет. и селекции, 2014. – Т. 18, № 3. – С. 486–496.
- Гладкова В.Н.** Цитологическое изучение спонтанного гибридогенного рода *Sorbocotoneaster* Pojark. // Бот. журн., 1967. – Т. 52, № 3. – С. 981–983.
- Коропачинский И.Ю., Встовская Т.Н.** Древесные растения Азиатской России. – Новосибирск: Гео, 2012. – С. 376–377.
- Полякова А.И.** ×*Sorbocotoneaster* Pojark. – новый естественный межродовой гибрид // Ботанические материалы гербария Бот. института АН СССР, 1953. – Т.15. – С. 92–108.
- Dłużewska J., Ślesak I., Kruk J.** Molecular analysis of *Sorbus* sp. from the pienny mts. and its relation to other *Sorbus* species // Acta Biologica Cracoviensia s. Botanica, 2013. – Vol. 55. – P. 86–92.
- Hanson R.E., Zhao X-P., Nurul I-F., Paterson A.H., Zwick M.S., Crane C.F., McKnight T.D., Stelly D.M., Price H.J.** Evolution of interspersed repetitive elements in *Gossypium* (Malvaceae) // Am J Bot., 1998. – Vol. 85(10). – P. 1364–1368.
- Kimura M.** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitution through comparative studies of nucleotides sequences // Journal of Molecular Evolution, 1980. – Vol.16. – P. 111–120.
- Lim K.Y., Kovarik A., Matýásek R., Bezděk M., Lichtenstein C.P., Leitch A.R.** Gene conversion of ribosomal DNA in *Nicotiana tabacum* is associated with undermethylated, decondensed and probably active gene units // Chromosoma, 2000. – Vol. 109(3). – P.161–172.
- Song K., Lu P.L., Tang K., Osbourn T.C.** Rapid genome change in synthetic polyploids of *Brassica* and its implications for polyploid evolution // Proc Natl Acad Sci USA, 1995. – Vol. 92. – P. 7719–7723.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // PCR Protocols: a guide to methods and applications / Eds M.A. Innis, Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. – New York: Academic Press, 1990. – P. 315–322.

#### SUMMARY

The analysis of ITS1-5.8S-ITS2 rDNA sequences confirmed close relationships of *Sorbocotoneaster pozdnjakovii* with species of the genus *Sorbus* from Asian part of Russia. In the genome of an artificial hybrids *F<sub>1</sub> Sorbus sibirica* × *Sorbocotoneaster pozdnjakovii* the recombinant fragment between modern species *Sorbus* and *Cotoneaster* was found. The obtained data confirm an origin of *Sorbocotoneaster* by hybridization between taxa of these genera.