

УДК 58.088:582.675.1

Изучение полиморфизма ампликонов ITS1 и ITS2 ядерной рибосомальной ДНК с помощью высокопроизводительного параллельного секвенирования и прямого секвенирования по Сэнгеру у *Paeonia lactiflora* (Paeoniaceae)

Sequence variation in nuclear ribosomal internal transcribed spacer (nrDNA ITS1, ITS2) regions revealed by Sanger and next generation sequencing in *Paeonia lactiflora* (Paeoniaceae)

Ефимов С. В.¹, Дегтярева Г. В.¹, Терентьева Е. И.¹, Самигуллин Т. Х.²,
Логачева М. Д.², Касьянов А. С.³, Вальехо-Роман К. М.²

Efimov S. V.¹, Degtjareva G. V.¹, Terentjeva E. I.¹, Samigullin T. H.²,
Logacheva M. D.², Kasianov A. S.³, Valiejo-Roman C. M.²

¹ Ботанический сад биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12,
E-mail: efimov-msu@yandex.ru, degavi@mail.ru, el.terentjeva@mail.ru

¹ Botanical Garden, Biological Faculty, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Leninskie Gory, 1/12

² НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского, МГУ им. М. В. Ломоносова, г. Москва, Ленинские горы, д. 1,
стр. 40, samigul@belozersky.msu.ru, maria.log@gmail.com, vallejo@genebee.msu.su

² A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Leninskie Gory, 1/40

³ Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, г. Москва, ул. Губкина, д. 3, artem.kasianov@gmail.com

³ Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Gubkina str. 3

Реферат. Ядерные гены рибосомальной РНК (рДНК) представлены тандемно расположенными и многократно повторенными копиями, подвергающимися периодической гомогенизации. Неоднородность кластера рДНК часто считается свидетельством недавних событий гибридизации. В работе изучен внутригеномный полиморфизм внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS1 и ITS2) рДНК у вида *Paeonia lactiflora*. С помощью метода высокопроизводительного секвенирования подтверждено существование полиморфных позиций, обнаруживаемых при прямом секвенировании по Сэнгеру, а также выявлено несколько дополнительных. В целом показано наличие 27 (9 в ITS1 и 18 в ITS2) полиморфных позиций, представляющих собой как однонуклеотидные замены, так и индели. В большинстве случаев полиморфизм обусловлен появлением нуклеотидов, не отмеченных у других видов, и не вызван гибридным происхождением. По-видимому, несмотря на то, что вид *Paeonia lactiflora* морфологически хорошо обособлен, на уровне нуклеотидных последовательностей границы вида находятся на стадии оформления. В роде *Paeonia* полиморфизм ITS может быть следствием не только гибридизации, но и генетической дифференциации.

Summary. Nuclear ribosomal DNA (nrDNA) is present ed in multiple copies, which become homogenized due to concerted evolution. Heterogeneity of rDNA copies is often arisen from hybridization events. Here, we investigate the *Paeonia lactiflora* for intragenomic variation of the internal transcribed spacer (ITS) region of nrDNA. Based on next generation sequencing approach, 27 polymorphic sites (9 in ITS1 and 18 in ITS2) were found. There are single nucleotide polymorphisms as well as indels. It supports the existence of polymorphic sites revealed by Sanger sequencing and reveals several additional sites. A lot of additive nucleotides are not found in other species, which could be considered as parent forms. It is possible to assume, that ITS polymorphism in the genus *Paeonia* is connected not only with hybrid origin of species, but also with recent divergence of the group.

Введение

Внутренние транскрибируемые спейсеры (ITS) ядерных генов рибосомной РНК (рДНК) – одни из самых широко используемых молекулярных маркеров при изучении взаимоотношений на уровне видов и родов. Рибосомальная ДНК присутствует в геноме в виде тандемно расположенных и многократно повторенных копий, подвергающихся периодической гомогенизации, известной как согласованная эволюция (Álvarez, Wendel, 2003), т. е. вновь возникшие мутации либо быстро удаляются, либо

распространяются по всем копиям при помощи механизма неравного кроссинговера. Неоднородность рДНК считается характерной, главным образом, для недавних гибридов, однако накапливается всё больше данных, показывающих, что внутривидовой полиморфизм не всегда связан с гибридизацией (Simon et al., 2012). Развитие методов высокопроизводительного секвенирования помогает подойти к изучению полиморфизма ITS на новом уровне, поскольку дает возможность получения информации о разнообразии гаплотипов на большой выборке.

Род *Paeonía* L. (Paeoniaceae) служит удобным объектом для изучения полиморфизма ITS, поскольку в истории рода имели и имеют место гибридизационные процессы, подтвержденные также молекулярными данными. Выводы о гибридной природе видов были сделаны главным образом на основании изучения последовательностей ITS рДНК при обнаружении полиморфных позиций, совмещающих два нуклеотида, по которым различаются «родительские» геномы (Sang et al., 1995, 1997; Punina et al., 2012).

Вид *Paeonía lactiflora* Pall. интересен тем, что морфологически хорошо обособлен, благодаря таким признакам, как форма листа, многоцветковое соцветие и зазубренный край листа, содержит диплоидный набор хромосом ($2n = 10$) и для него не показана гибридная природа. Помимо этого, вид имеет ключевое значение для селекции, поскольку с его участием создано большое число межвидовых и межсекционных гибридов. *P. lactiflora* произрастает на территории Китая, Монголии и сопредельных районов России, пересекаясь на юге с *P. veitchii* Lynch (провинции Шаньси, Ганьсу, Сычуань), а на востоке – с видами комплекса *P. obovata* Maxim. Интересно отметить, что в естественных условиях на стыке ареалов с другими видами гибридные формы не встречены. Однако в настоящее время получены данные, доказывающие гибридную природу *P. anomala* L., возникшего от скрещивания *P. veitchii* и *P. lactiflora* (Pan et al., 2007). С видами комплекса *P. obovata* гибриды в природе не отмечены, в то время как в культуре получен единственный культивар 'Fan Tan' (предположительно *P. lactiflora* × *P. obovata*, по: Smirnow, 1975).

Представленные в международной базе GenBank нуклеотидные последовательности ITS, принадлежащие *P. lactiflora*, содержат до 17 полиморфных позиций, обусловленных появлением дополнительных нуклеотидов. При этом большая часть таких позиций оказывается видоспецифичной и у других видов не обнаружена (Пунина и др., 2017). Целью нашего исследования было изучить полиморфизм ITS рДНК у *P. lactiflora* с использованием метода высокопроизводительного секвенирования и сопоставить полученные результаты с данными, получаемыми при секвенировании по Сэнгеру.

Материалы и методы

Для выделения ДНК были использованы образцы *P. lactiflora* из коллекции гербария MW, а также собранные в ходе экспедиционных поездок по Приморскому краю. Использовано 5 образцов из разных точек ареала (Амурская область, Монголия, Приморский край, Читинская область) для изучения внутривидовой изменчивости. Препараты ДНК получали с помощью набора для экстракции растительной ДНК NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel, Düren, Germany).

ПЦР-продукты у 5 образцов *P. lactiflora* для прямого секвенирования по Сэнгеру получали, используя пару праймеров L и 4 (White et al., 1990). Определение нуклеотидных последовательностей ДНК проводили с использованием набора реагентов ABI Prism BigDye Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI Prism 3100-Avant.

Целевые продукты у одного образца *P. lactiflora* для высокопроизводительного параллельного секвенирования получали с помощью двух последовательных ПЦР. Участки ITS1 и ITS2 амплифицировали и секвенировали отдельно, так как длина чтения ограничена 250 нуклеотидами с каждого конца фрагмента. Секвенирование ампликонов проводили на платформе MiSeq (Illumina, США). Полноразмерные фрагменты получали из прямого и обратного чтений и после этого профильтровывали для удаления дубликатов. Оставшиеся последовательности были объединены по сходству в кластеры. Чтобы отсеять случайные ошибки полимеразы, для анализа полиморфизма были отобраны кластеры, содержащие не менее 5 % от общего числа чтений.

Все полученные последовательности ITS1 и ITS2 были выровнены, отредактированы и сопоставлены с последовательностями других видов рода *Paeonía* с помощью программы BioEdit (Hall, 1999).

Результаты и обсуждение

С помощью прямого секвенирования по Сэнгеру получены последовательности для 5 образцов *P. lactiflora* из разных точек ареала. Длина ITS1 составила 269 п.н., ITS2 – 223–224 п.н. Для *P. lacti-*

flora характерно несколько полиморфных позиций в последовательностях ITS, 6 позиций обнаружено в ITS1 и также 6 – в ITS2. Сравнение последовательностей ITS у образцов из разных частей ареала не выявило различий по полиморфным позициям. Данные о полиморфных позициях приведены в таблице.

Таблица

Варьирующие позиции нуклеотидных последовательностей ITS1 и ITS2 яд-рДНК *Paeonia lactiflora*

№ кластера	Число последовательностей в кластере	Позиция выравнивания ITS1								
		46	55	69	93	125	160	199	212	217
1	2816	G	G	T	G	T	T	C	G	C
2	1765	G	G	T	G	C	C	A	A	T
3	1607	A	G	C	A	C	T	A	G	C
4	350	G	A	T	G	C	T	A	G	C
<i>Paeonia</i> spp.		G	G	C	G	C C/T ¹	T	A	G G/T ²	C C/T ³
Тип мутации		Ти	Ти	Ти	Ти	Ти	Ти	Тв	Ти	Ти
№ кластера	Число последовательностей в кластере	Позиция выравнивания ITS2								
		12	27	37	67	76	85	91	93	133
1	1907	C	A	A	C	T	G	–	T	–
2	1532	–	C	T	C	T	G	G	C	G
3	1442	C	A	A	C	T	G	–	T	–
4	394	–	A	A	A	A	T	–	T	–
<i>Paeonia</i> spp.		– C ⁴ –/C ⁵	C	A	C	T	G	–	C	–
Тип мутации		Инд	Тв	Тв	Тв	Тв	Тв	Инд	Ти	Инд
№ кластера	Число последовательностей в кластере	Позиция выравнивания ITS2								
		139	150	166	172	187	193	201	211	215
1	1907	T	G	G	G	C	G	C	T	G
2	1532	G	T	G	T	A	G	A	C	T
3	1442	T	T	G	T	C	T	A	C	G
4	394	T	T	A	T	C	G	A	C	G
<i>Paeonia</i> spp.		T	T	G G/A ⁶	T	C C/T	G	A	C T ⁷	G
Тип мутации		Тв	Тв	Ти	Тв	Тв	Тв	Тв	Ти	Тв

Примеч.: Полу жирным шрифтом отмечены позиции, выявляемые также с помощью прямого секвенирования по Сэнгеру. Условные обозначения: Инд – индель, Тв – трансверсия, Ти – транзиция. Надстрочные цифры: 1 – *P. caucasica*; 2 – *P. anomala*; 3 – некоторые образцы *P. obovata*; 4 – *P. coriacea*; 5 – *P. veitchii*; 6 – *P. peregrina*; 7 – *P. californica*.

С помощью высокопроизводительного параллельного секвенирования проанализированы последовательности ITS1 и ITS2 у одного образца *P. lactiflora*. Получено 10 021 полноразмерных последовательностей ITS1, которые распределились в 1567 кластеров, из которых достоверных только 4, и 8320 последовательностей ITS2, которые распределились в 1144 кластера, из которых достоверных также только 4. Длина ITS1 составила 269 п.н., ITS2 – 223–225 п.н. В ампликонах ITS1 и ITS2 выявлено значительное количество однонуклеотидных полиморфизмов (9 позиций в ITS1 и 15 – в ITS2), а также однонуклеотидных инделей (3 позиции в ITS2). Данные о полиморфных позициях приведены в таблице.

Таким образом, с помощью метода высокопроизводительного секвенирования подтверждено существование полиморфных позиций, обнаруживаемых в ходе прямого секвенирования по Сэнгеру, а также выявлено несколько дополнительных. Полиморфные позиции распределены более или менее равномерно по всей длине фрагментов. Большая часть полиморфных позиций в ITS1 представлена транзициями, в то время как в ITS2 – трансверсиями. Если сравнить полученные последовательности ITS *P. lactiflora* с другими видами рода *Paeonia*, можно видеть, что выявляемый полиморфизм об-

условлен появлением дополнительных нуклеотидов, не отмеченных у других видов и не возникших вследствие гибридизации. Также можно видеть (рис.), что большая часть дополнительных нуклеотидов не доминирует над основными и представлена в относительно небольшом числе копий.

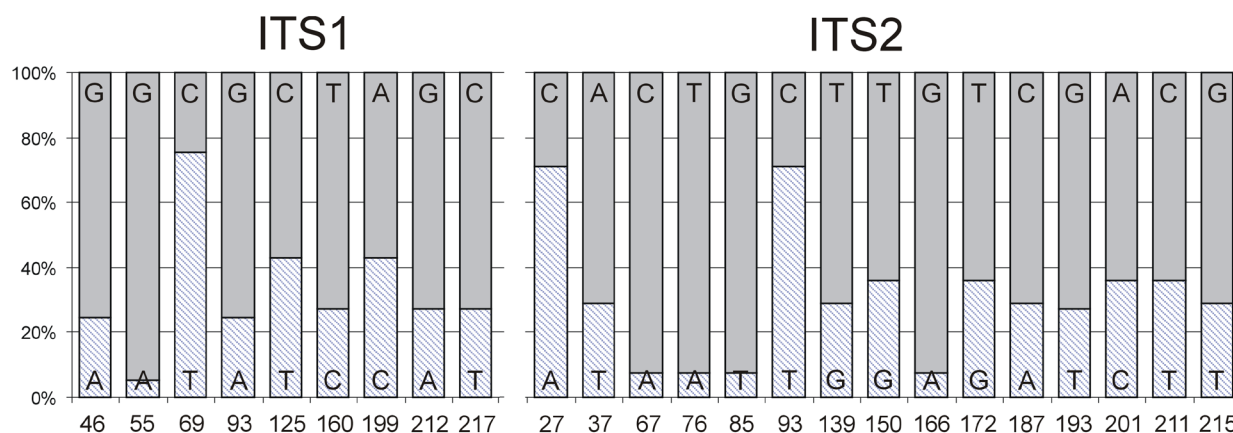


Рис. Соотношение дополнительных и основных нуклеотидов в полиморфных позициях ITS1 и ITS2 у *Paeonia lactiflora*. Дополнительные нуклеотиды отмечены штриховкой, основные нуклеотиды – серым цветом.

Морфологически вид *Paeonia lactiflora* достаточно хорошо обособлен от других видов рода, в то время как по нуклеотидным последовательностям ITS вид характеризуется наличием большого числа полиморфных позиций и не имеет однозначных апоморфных замен. Можно сделать вывод, что генетическая дифференциация вида не соответствует морфологической. Возможно, границы вида на уровне нуклеотидных последовательностей находятся на стадии оформления. Таким образом, в роде *Paeonia* полиморфизм ITS может быть следствием не только гибридизации, но и генетической дифференциации.

Благодарности. Выражаем благодарность сотрудникам Лазовского государственного заповедника имени Л. Г. Капланова за помощь в организации полевых исследований. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 14-50-00029 «Научные основы создания национального банка-депозитария живых систем» (сбор материала в природе, получение нуклеотидных последовательностей), а также в рамках госзадания МГУ им. М. В. Ломоносова (темы № АААА-А16-116021660099-5 и 01201353074) (анализ нуклеотидных последовательностей).

ЛИТЕРАТУРА

- Пунина Е. О., Мачс Э. М., Крапивская Е. Е., Родионов А. В. Полиморфные сайты в транскрибируемых спейсерах генов 35S рРНК пионов как индикатор происхождения сортов // Генетика, 2017. – Т. 53, № 2. – С. 181–191.
- Álvarez I., Wendel J. F. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference // Mol. Phylogenet. Evol., 2003. – Vol. 29. – P. 417–434.
- Hall T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // Nucl. Acids Symp., 1999. – Vol. 41. – P. 95–98.
- Pan J., Zhang D., Sang T. Molecular phylogenetic evidence for the origin of a diploid hybrid of *Paeonia* (Paeoniaceae) // Am. J. Bot., 2007. – Vol. 94. – P. 400–408.
- Punina E. O., Machs E. M., Krapivskaya E. E., Kim E. S., Mordak E. V., Myakoshina Yu. A., Rodionov A. V. Interspecific hybridization in the genus *Paeonia* (Paeoniaceae): polymorphic sites in transcribed spacers of the 45S rRNA genes as indicator of natural and artificial peony hybrids // Russ. J. Genet., 2012. – Vol. 48. – P. 684–697.
- Sang T., Crawford D. J., Stuessy T. F. Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: implications for biogeography and concerted evolution // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995. – Vol. 92. – P. 6813–6817.
- Sang T., Crawford D. J., Stuessy T. F. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae) // Am. J. Bot., 1997. – Vol. 89. – P. 1120–1136.
- Simon U. K., Trajanoski S., Kroneis T., Sedlmayr P., Guelly C., Guttenger H. Accession-specific haplotypes of the internal transcribed spacer region in *Arabidopsis thaliana* – a means for barcoding populations // Mol. Biol. Evol., 2012. – Vol. 29. – P. 2231–2239.
- 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, D. H. Geifand, J. J. Snisky, T. J. White. – New York: Academic Press, 1990. – P. 315–322.