

Молекулярно-филогенетическое исследование редких сорно-полевых видов рода *Avena* L.

Molecular phylogenetic study of rare weed-field species of the genus *Avena* L.

Гнутиков А. А.¹, Носов Н. Н.², Лоскутов И. Г.¹, Блинова Е. В.¹, Родионов А. В.²

Gnutikov A. A.¹, Nosov N. N.², Loskutov I. G.¹, Blinova E. V.¹, Rodionov A. V.²

¹Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова, г. Санкт-Петербург, Россия.

E-mail: alexandr2911@yandex.ru

¹N. I. Vavilov Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St-Petersburg, Russia

²Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН, г. Санкт-Петербург, Россия,

E-mails: nmosov2004@mail.ru, i.loskutov@vir.nw.ru, e-blinova.blinova2017@yandex.ru, avrodionov@mail.ru

²Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences (BIN RAS), St-Petersburg, Russia

Реферат. Проведено молекулярно-филогенетическое исследование сорно-полевых видов рода *Avena* L. с использованием маркерных последовательностей ITS1–гена 5.8S рРНК–ITS2. Кроме того, было проведено секвенирование нового поколения (NGS) на платформе Illumina последовательности ITS1 и начала гена 5.8S рРНК. Результаты секвенирования по Сэнгеру выявили отдельную кладу видов с хорошим уровнем поддержки и малым уровнем различия между собой. По данным NGS-секвенирования, были выявлены два наиболее массовых по количеству последовательностей риботипа. Среди общих последовательностей гексаплоидов не обнаружены относящиеся к С-геному. Для *A. persica* и *A. georgica* показано наличие уникальных риботипов.

Ключевые слова. Овес, филогения, ITS, NGS, Poaceae.

Summary. A molecular phylogenetic study of weed-field species of the genus *Avena* L. using marker sequences ITS1–5.8S rRNA gene–ITS2 was undertaken. In addition, next-generation sequencing (NGS) was performed on the Illumina platform for the ITS1 sequence and the beginning of the gene 5.8S rRNA. Sanger sequencing results revealed the separate clade of microspecies with a good level of support and small level of difference between themselves. According to NGS sequencing data, the two most abundant subgenomes in terms of the number of sequences were identified. Among the common sequences of hexaploids, those associated with the C-genome were not found. The presence of unique ribotypes was shown for *A. persica* and *A. georgica*.

Key words. ITS, NGS, oats, phylogeny, Poaceae.

Ареал сорно-полевых видов овса когда-то охватывал весь зерновой пояс, занимая пространства от южных до полярных районов земледелия. Такая обширная география способствовала формированию широкого внутривидового разнообразия. Сорно-полевые виды рода *Avena* L. – это специализированные сорняки полбы, овса и ячменя, распространяются они с зерном культурных растений, засоряя посевы. Сегодня, в условиях интенсивного земледелия, эти виды встречаются очень редко, а некоторые, возможно, уже исчезли из природы. Между тем широкий диапазон адаптации сорно-полевых видов к неблагоприятным факторам внешней среды, их приспособленность к разнообразным почвенно-климатическим условиям, устойчивость к патогенным организмам представляют уникальный источник исходного материала для селекции (Лоскутов, 2007). Изучение внутривидового разнообразия – сборов, сохранившихся в коллекции генетических ресурсов овса (ВИР), показало, что сорно-полевые виды имеют четкую географическую приуроченность и локализуются, в основном, на территории Ирана, Грузии и России (республики Башкортостан, Дагестан, Татарстан и Чувашия).

Для прояснения таксономического статуса редких сорных видов представляет большой интерес исследование группы родства *A. sativa* (*A. aggr. sativa*) и *A. fatua* (*A. aggr. fatua*). В *A. aggr. sativa* включают, в частности, такие виды и разновидности, как эндемик Поволжья *A. volgensis* (Vavilov) Nevski (= *A. sativa* var. *volgensis* Vavilov), *A. sativa* var. *kasanensis* Vavilov, *A. sativa* var. *segetalis* Vavilov, европейско-среднеазиатский *A. macrantha* (Hack.) Nevski (= *A. sativa* var. *asiatica* Vavilov), европейско-кавказско-сибирский *A. georgica* Zuccagni (= *A. sativa* var. *praeagravis* Krause), евросибирско-дальневосточный *A. orientalis* Schreb., преимущественно южноевропейско-среднеазиатский *A. persica* Steud. (= *A. sativa* var. *persica* Vavilov). К *A. aggr. fatua* относят, например, европейско-кавказскосибирский *A. intermedia* T. Lestib., преимущественно европейско-североамериканский *A. cultiformis* (Malzew) Malzew, европейский *A. aemulans* Nevski и южноевропейско-среднеазиатский *A. occidentalis* Durieu (= *A. fatua* subsp. *meridionalis* Malzew).

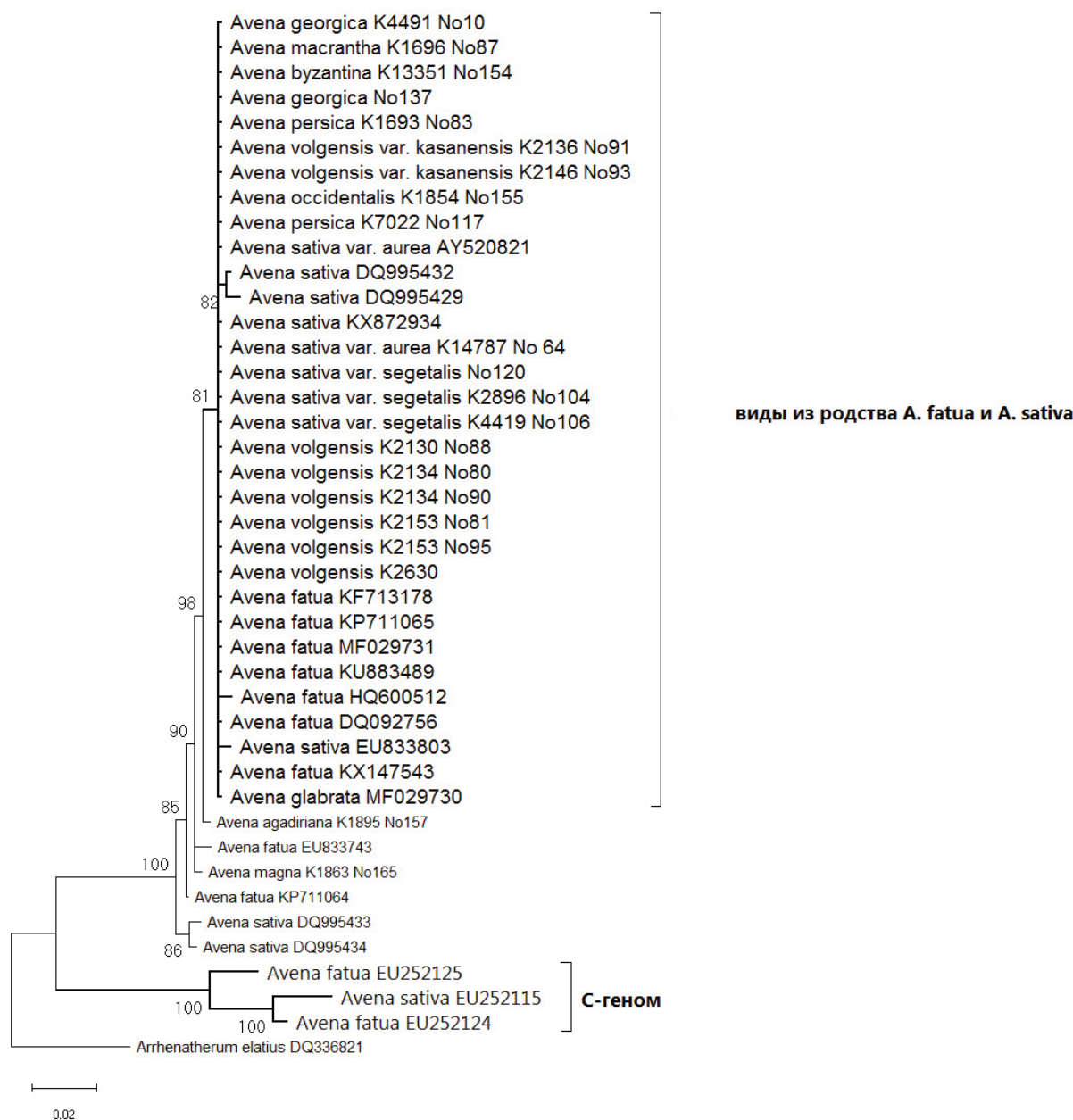


Рис. 1. Филогенетическое древо, построенное по результатам анализа последовательностей ITS1–гена 5.8 рРНК–ITS2 методом Байеса, и отражающее родство видов из групп *Avena sativa* и *A. fatua*.

Нами впервые были секвенированы маркерные последовательности ITS1–гена 5.8S рРНК–ITS2 у разновидностей *A. sativa* и *A. fatua* (рис. 1). Геномную ДНК выделяли из семян СТАВ методом (Doyle, Doyle, 1987) с модификациями, а также используя Qiagen DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA). Для амплификации района ITS1–5.8S рДНК–ITS2 ядерного генома в ходе полимеразной цепной реакции использовались праймеры: Its-1P (Ridgway et al., 2003) и Its-4 (White et al., 1990).

Все виды и разновидности сформировали отдельную кладу с хорошим уровнем поддержки, при этом их различия между собой невелики (p-distance от 0.003 до 0.02). Все они гексаплоиды с геномом ACD (Loskutov, Rines, 2011), при этом следует помнить, что секвенирование по Сэнгеру выявляет лишь наиболее массовый вариант субгенома в полиплоидном геномном наборе. Эта клада соответствует А-геному гексаплоидных овсов, в нее также входит ряд образцов *A. sativa* (из Южной Кореи и из Греции) и *A. fatua* (из Южной Кореи и Китая).

Характерная особенность ITS-последовательностей видов – внутригеномный полиморфизм в позициях 46 и 101 (ITS1), 226 (5.8S рДНК), 301, 308, 543 (ITS2). Так, у *A. georgica*, *A. occidentalis*, образца *A. persica* из Дагестана, *A. sativa* var. *segetalis* в позиции 46 стоит А и G (у *A. volgensis*, *A. volgensis* var. *kasanensis*, образца *A. persica* из Ирана в позиции 46 находится А, у некоторых образцов *A. sativa* из Греции – G, у *A. intermedia* из Китая (провинция Сычуань) – G, и у некоторых образцов *A. sativa* из Греции – А. Такой же полиморфизм у вышеназванных образцов наблюдается и в позиции 101, там С и Т у *A. volgensis*, *A. macrantha*, *A. volgensis* var. *kasanensis*, *A. persica* в этом положении стоит С, у *A. intermedia* из Сычуаня Т, греческие образцы *A. sativa* – либо С, либо Т. Не все образцы *A. sativa* попадают в кладу с видами: например, некоторые образцы из Греции имеют в позиции 143 (5.8S рДНК) аутапоморфную делецию трех нуклеотидов.

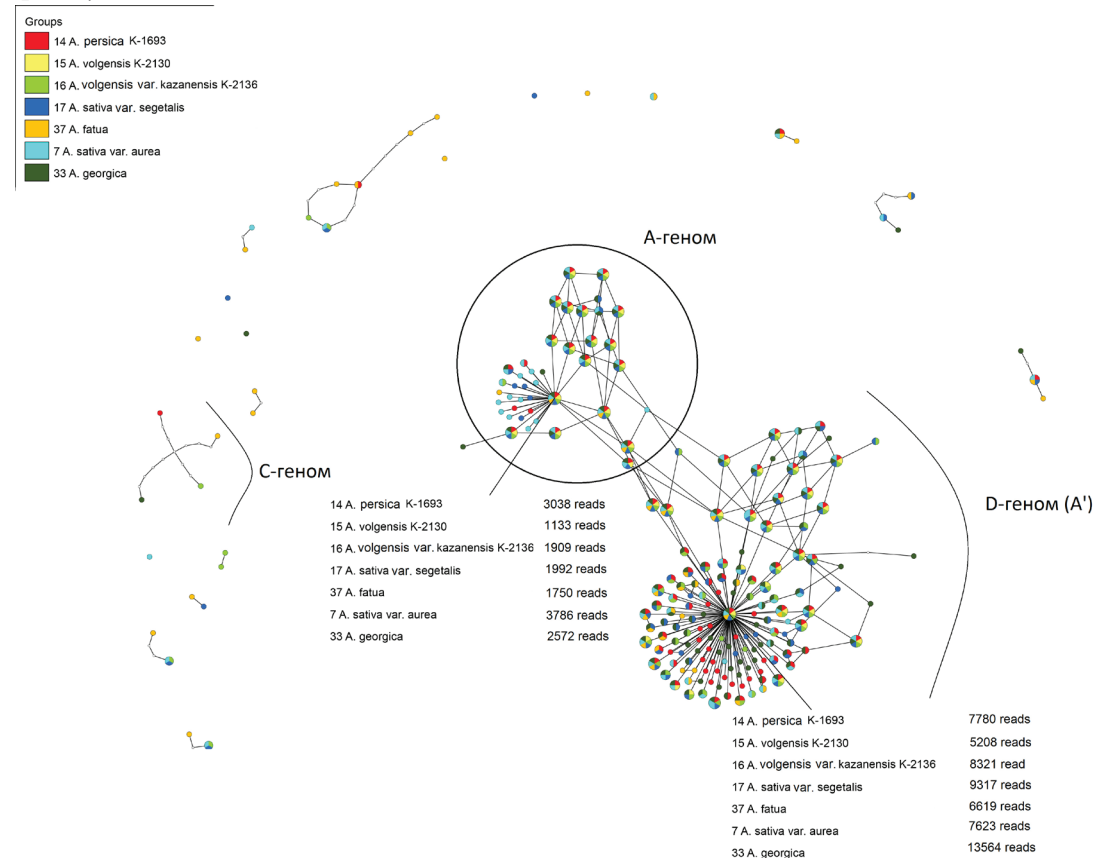


Рис. 2. Схема, отражающая родство риботипов видов и разновидностей из агрегатов *A. sativa* и *A. fatua*, построенная с помощью программы TCS 1.2 и визуализированная в программе TCS BU.

Кроме того, для прояснения филогенетического положения видов из агрегатов *A. sativa* и *A. fatua* нами было проведено локус-специфичное секвенирование нового поколения (NGS) маркерных

последовательностей ITS1–гена 5.8S рРНК на платформе Illumina. NGS-секвенирование проводили в ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии (ВНИИСХМ).

Мы обработали результаты NGS-секвенирования «популяции» ITS-последовательностей полиплоидных геномов *Avena* с помощью программы TCS (Clement et al., 2000). Алгоритм TCS основан на вероятностном методе статистической парсимонии и позволяет определять вероятность связи между всеми гаплотипами с индикацией числа мутаций, по которым различаются исследуемые гаплотипы. Результаты TCS-расчетов были обработаны в программе TCS BU (Múrias dos Santos et al., 2016).

Результаты NGS выявили два наиболее представленных по количеству последовательностей семейства риботипов в полиплоидном геномном наборе, общих почти для всех исследованных видов и разновидностей из родства *A. fatua* и *A. sativa* (рис. 2). Эти два семейства риботипов соответствуют последовательностям А-генома и D (A')-генома, который, как предполагалось ранее, является вариантом генома А (Лоскутов, 2007). При этом большинство риботипов в этих субгеномах оказались общими для всех исследованных образцов. Для *A. persica* и *A. georgica* показано и наличие уникальных видоспецифичных риботипов, содержащих последовательности исключительно этих видов, числом чуть более двухсот ридов для каждого.

Полученные данные позволяют предположить, что мы имеем дело с начальными процессами видообразования в этой очень близкородственной группе гексаплоидных овсов. Именно поэтому по результатам молекулярно-филогенетических исследований достаточно сложно разделить эту группу на отдельные виды. Тем не менее, мы видим вероятное начало обособления двух видов: *A. persica* и *A. georgica*. Так же вызывает большой интерес то, что последовательности С-генома в общем пуле последовательностей гексаплоидов не обнаружены, они располагаются отдельно, образуя очень небольшую фракцию (всего 44 рида), вероятно сильно измененную процессами постгибридизационной трансформации. Наши данные подтверждаются цитогенетическими исследованиями. Метод FISH показал, что С-субгеномы полиплоидных видов овса потеряли большую часть рДНК, и на них удается выявить только очень слабые 35S рДНК-позитивные сигналы (Badaeva et al., 2010).

Выявляя филогенетические связи редких сорно-полевых видов и разновидностей овса, а также устанавливая их фактический геномный состав, мы способствуем прояснению сложной картины эволюции в роде *Avena*.

Благодарности. Работа выполнена на оборудовании ЦКП «Клеточные и молекулярные технологии изучения растений и грибов» в рамках гос. задания по проекту № 0662-2019-0006 и при поддержке гранта РФФИ № 20-516-10002 КО_а.

ЛИТЕРАТУРА

Лоскутов И. Г. Овес (*Avena* L.). Распространение, систематика, эволюция и селекционная ценность. – СПб.: ГНЦ РФ ВИР, 2007. – 336 с.

Badaeva E. D., Shelukhina O. Yu., Goryunova S. V., Loskutov I. G., Pukhalsky V. A. Phylogenetic Relationships of Tetraploid AB-Genome *Avena* Species Evaluated by Means of Cytogenetic (C-Banding and FISH) and RAPD Analyses // Journal of Botany, 2010. – Vol. 2010. – Article ID 742307. – 13 pp. DOI:10.1155/2010/742307

Baum B. R. Oats: wild and cultivated. A monograph of the genus *Avena* L. (Poaceae). – Canada, 1977. – 463 pp.

Clement M., Posada D., Crandall K. A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies // Molecular Ecology, 2000. – Vol. 9, № 10. – P. 1657–1660. DOI:10.1046/j.1365-294x.2000.01020.x

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.

Ladizinsky G. Studies in Oats Evolution. – Heidelberg e.a.: Springer, 2012. – 87 pp.

Loskutov I. G., Rines H. W. *Avena* L. In: Kole C. (ed) Wild crop relatives: genomic and breeding resources. – Heidelberg: Springer, 2011. – P. 109–184.

Múrias dos Santos A., Cabezas M. P., Tavares A. I., Xavier R., Branco M. TCS BU: A tool to extend TCS network layout and visualization // Bioinformatics, 2016. – Vol. 32, № 4. – P. 627–628. DOI:10.1093/bioinformatics/btv636

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).

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. / Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J. (Eds) – New York: Academic Press, Inc., 1990. – P. 315–322.