

Происхождение *Alopecurus × brachystylus* Peterm. по данным секвенирования нового поколения (NGS)

The origin of *Alopecurus × brachystylus* Peterm. according to the results of next-generation sequencing (NGS)

Гнутиков А. А.^{1,2}, Носов Н. Н.², Пунина Е. О.², Родионов А. В.^{2,3}

Gnutikov A. A.^{1,2}, Nosov N. N.², Punina E. O.², Rodionov A. V.^{2,3}

¹ *Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова, г. Санкт-Петербург, Россия.
E-mail: alexandr2911@yandex.ru*

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

² *Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН, г. Санкт-Петербург, Россия.
E-mail: nnosov2004@mail.ru, elizaveta_punina@mail.ru, avrodionov@mail.ru*

² *V. L. Komarov Botanical Institute (BIN RAS), St-Petersburg, Russia*

³ *Санкт-Петербургский госуниверситет (СПбГУ), г. Санкт-Петербург, Россия*

³ *Saint-Petersburg State University (SPbSU), St.-Petersburg, Russia*

Реферат. Проведено молекулярно-филогенетическое исследование гибридного вида *Alopecurus × brachystylus* Peterm. и некоторых предполагаемых предковых таксонов. Было использовано секвенирование нового поколения (NGS) на платформе Illumina последовательности ITS1 и начала гена 5.8S рРНК. По данным NGS-секвенирования геном *A. × brachystylus* образует общие субгеномы с представителями секции *Alopecurium*: *A. geniculatus* и *A. aequalis*, а также с представителями типовой секции: *A. pratensis*, *A. arundinaceus* и высокогорным *A. vlassowii*. Кроме того, обнаружено, что *A. vlassowii* (секция *Alopecurus*) несет в своем составе последовательности, идентичные видам другой секции, *Alopecurium*.

Ключевые слова. Гибриды, ITS, NGS, филогения *Alopecurus × brachystylus*, Poaceae.

Summary. A molecular phylogenetic study of the hybrid species *Alopecurus × brachystylus* Peterm. and some supposed ancestral taxa was carried out. Next-generation sequencing (NGS) of the ITS1 sequence and the start of the 5.8S rRNA gene was used on the Illumina platform. According to NGS sequencing, genome of the *A. × brachystylus* forms common subgenomes with representatives of the section *Alopecurium*: *A. geniculatus* and *A. aequalis*, as well as representatives of the type section: *A. pratensis*, *A. arundinaceus*, and alpine *A. vlassowii*. In addition, it was found that *A. vlassowii* (section *Alopecurus*) contains sequences identical to the species of another section, *Alopecurium*.

Key words. *Alopecurus × brachystylus*, hybrids, ITS, NGS, phylogeny, Poaceae

Alopecurus × brachystylus Peterm. – лисохвост короткостолбиковый – по представлениям систематиков (Цвелев, 1976; Stace et al., 2015), является межсекционным гибридом. Один из предполагаемых родительских видов, европейско-средиземноморско-южноазиатский *A. geniculatus* L., относится к секции *Alopecurium* Dumort., представители которой отличаются характерными узкоцилиндрическими метелками. Второй родительский таксон, евросибирско-центральноазиатский *A. pratensis* L., принадлежит к типовой секции, куда относят виды с преимущественно широкими цилиндрическими или эллипсоидальными метелками. Родительские виды, произрастая в одних экотопах, могут гибридизировать, формируя обычно стерильное потомство (Sieber, Murray 1979, 1980).

Молекулярно-филогенетических исследований *A. × brachystylus* ранее не проводили. Между тем соответствие морфологических признаков молекулярно-генетическим данным для ботаников всегда представляет несомненный интерес.

Многие аллополиплоидные виды, особенно у злаков, происходят от множественной интрогрессивной гибридизации нескольких видов разных секций, причем в результате интрогрессии сохраняются лишь признаки одного из родителей, практически не выявляемые по морфологии (Kovarik et al., 2005). Однако традиционно для молекулярно-филогенетических исследований выбирают 1–3 маркерные последовательности генов ядерного и хлоропластного геномов, при этом не учитывается весь геномный пул последовательностей аллополиплоида. Поэтому для наиболее точной картины происхождения таксона необходимо получение всего пула маркерных последовательностей в геноме. Новейшие методы секвенирования (Illumina) позволяют решить эту проблему: получить сиквенсы маркерных последовательностей («ДНК-штрих-кодов») от всех вариантов предковых таксонов в геноме аллополиплоида, включая даже такие минорные компоненты, которые не выявляются или трудно выявляются путем клонирования. С его помощью можно получить весь набор маркерных последовательностей (как правило, это последовательности ITS1 или ITS2 ядерного генома), соответствующий всем предполагаемым предковым таксонам. В качестве ДНК-штрих-кодов ядерных геномов аллополиплоидов чаще используют внутренние транскрибируемые спейсеры генов 45S рРНК последовательности – наиболее эффективный «штрих-код» ядерного генома (Hollingsworth et al., 2011; Wang et al., 2016).

Материалом для исследования послужили гербарные образцы, взятые в гербарии LE, а также собранные во время экспедиции по Горному Алтаю в 2014–15 гг. Секвенирование внутреннего спейсера – ITS1–ген 5.8S рРНК методом NGS было выполнено на платформе Illumina в Центре коллективного пользования «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии (ВНИИСХМ).

Геном каждого из исследованных видов содержал от 1–23 тыс. ридов. Для анализа гаплотипов был взят порог по 12 ридам для каждого, при этом в некоторых случаях были взяты сиквенсы с меньшим числом ридов, поскольку это отражало уникальный минорный компонент.

NGS секвенирование показало, что наиболее массовые последовательности генома (5828 ридов) *A. × brachystylus* образуют общий субгеном с представителями секции *Alopecurium*: *A. geniculatus* ($2n = 28$) и *A. aequalis* Sobol. ($2n = 14$), а также с еще одним представителем типовой секции, сибирско-центральноазиатским высокогорным *A. vlassowii* Trin. Вторая по численности последовательностей часть генома *A. × brachystylus* (3182 рида) образует общий субгеном с тетраплоидными *A. pratensis* и *A. arundinaceus* Poir. *A. arundinaceus* – евросибирско-центральноазиатский слабо галофильный вид из родства *A. aggr. pratensis*. Отметим, что число хромосом *A. × brachystylus* до сих пор неизвестно. *A. vlassowii* – высокий полиплоид с $2n$ более 120 (Gnutikov et al., 2017, 2018). Наиболее представленные последовательности *A. vlassowii* (свыше 5 тыс. ридов) образуют самостоятельный субгеном, больше всего близкий к последовательностям высокополиплоидного ($2n = 80–126$) тундрового скально-осыпного *A. borealis* Trin., а вторая часть последовательностей генома лисохвоста Власова, как было сказано, образуют общий субгеном с видами секции *Alopecurium*. Таким образом, несмотря на огромное число хромосом, *A. vlassowii* по результатам NGS образует всего два субгенома. Геном *A. pratensis* ($2n = 28$) образован тремя субгеномами (примерно одинаково представленными по количеству ридов: 5, 3, 2 тыс.), один из которых – общий с *A. arundinaceus* ($2n = 28$).

Наши данные отчасти подтверждают прежние представления классической систематики о природе *A. × brachystylus*, но также показывают нам такой интересный феномен, как интрогрессия, не выявляемая по морфологическим признакам: *A. vlassowii* (секция *Alopecurus*) несет в своем составе последовательности, идентичные представителям другой секции, *Alopecurium*.

Работа выполнена на оборудовании ЦКП «Клеточные и молекулярные технологии изучения растений и грибов» при поддержке грантов РФФИ № 18-04-01040 и КОМФИ 17-00-00337, 17-00-00338, 17-00-00340.

ЛИТЕРАТУРА

- Цвелёв Н. Н. Злаки СССР. – Л.: Наука, 1976. – 788 с.
Gnutikov A. A., Punina E. O., Nosov N. N., Rodionov A. V. In: IAPT/IOPB chromosome data 26 (K. Marhold & J. Kučera, eds.) // Taxon, 2017. – Vol. 66, No 6. – P. 1489. E10–E11. DOI: 10.12705/666.30

Gnutikov A. A., Punina E. O., Nosov N. N., Rodionov A. V. In: IAPT/IOPB chromosome data 27 (K. Marhold & J. Kučera, eds.) // *Taxon*, 2018. – Vol. 67, No 5. – P. 1043. E8–E9. DOI: 10.12705/675.24

Hollingsworth P. M., Graham S. W., Little, D. P. Choosing and using a plant DNA barcode // *PLoS One*, 2011. – Vol. 6, Iss. 5. e19254. DOI: 10.1371/journal.pone.0019254

Kovarik A., Pires J. C., Leitch A. R., Lim K. Y., Sherwood A. M., Matyasek R., Rocca J., Soltis D. E., Soltis P. S. Rapid Concerted Evolution of Nuclear Ribosomal DNA in Two *Tragopogon* Allopolyploids of Recent and Recurrent Origin // *Genetics*, 2005. – Vol. 169, № 2. – P. 931–944. DOI: 10.1534/genetics.104.032839

Sieber V. K., Murray B. G. The cytology of the genus *Alopecurus* (Gramineae) // *Botanical Journal of the Linnean Society*, 1979. – Vol. 79. – P. 343–355. DOI: 10.1111/j.1095-8339.1979.tb01822.x

Sieber V. K., Murray B. G. Spontaneous polyploids in marginal populations of *Alopecurus bulbosus* Gouan (Poaceae) // *Botanical Journal of the Linnean Society*, 1980. – Vol. 81. – P. 293–300. DOI: 10.1111/j.1095-8339.1980.tb01680.x

Stace C. A., Preston C. D., Pearman, D. A. Hybrid flora of the British Isles. – Durham: BSBI Publications, 2015. – 501 p.

Wang W., Ma L., Becher H., Garcia S., Kovarikova A., Leitch I. J., Leitch A. R., Kovarik A. Astonishing 35S rDNA diversity in the gymnosperm species *Cycas revoluta* Thunb. // *Chromosoma*, 2016. – Vol. 125. – P. 683–699. DOI: 10.1007/s00412-015-0556-3