

NGS-секвенирование (Illumina) как инструмент для определения геномного состава и таксономической принадлежности видов и межвидовых гибридов на примере злаков трибы Ячmeneвых (*Hordeae*)

NGS-sequencing (Illumina) as a tool for determining the genomic composition and taxonomic affiliation of species and interspecific hybrids on the example of *Hordeae* grasses

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

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

¹ Ботанический институт им. В. Л. Комарова Российской академии наук, г. Санкт-Петербург, Россия
E-mails: elizaveta_punina@mail.ru; edw.machs@gmail.com; nnosov2004@mail.ru

¹ Komarov Botanical Institute, St. Petersburg, Russia

² Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова, г. Санкт-Петербург, Россия
E-mail: alexandr2911@yandex.ru

² Federal Research Center N. I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia

³ Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург, Россия. E-mail: avrodionov@mail.ru
³ St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

Реферат. Обсуждаются результаты исследования внутригеномного полиморфизма многокопийных ядерных ITS1-последовательностей ДНК у разных представителей родов злаков трибы *Hordeae* (*Agropyron*, *Hordeum*, *Elytrigia*, *Elymus*, *Psathyrostachys*, *Leymus*) и межродового гибрида × *Leymotrigia* методом NGS-секвенирования (Illumina). Показано, что этот метод может быть хорошим инструментом для определения геномной композиции и происхождения полиплоидных видов и отдаленных гибридов, а также решения таксономических вопросов о родовой принадлежности и видовом статусе объектов.

Ключевые слова. Аллополиплоиды, видообразование, гены 35S рРНК, межвидовая гибридизация, молекулярная филогения, полиплоидия, ITS1.

Summary. The results of the study of intragenomic polymorphism of multicopy nuclear ITS1 DNA sequences in different representatives of the cereal genera of the tribe *Hordeae* (*Agropyron*, *Hordeum*, *Elytrigia*, *Elymus*, *Psathyrostachys*, *Leymus*) and intergeneric hybrid × *Leymotrigia* by NGS (Illumina) are discussed. It is shown that this method can be a good tool for determining the genomic composition and origin of polyploid species and distant hybrids, as well as solving taxonomic questions about the genus and species status of objects.

Key words. Allopolyploidy, interspecific hybridization, ITS1, molecular phylogeny, speciation, 35S rRNA genes.

Таксономия и родственные связи злаков трибы Ячmeneвых (*Hordeae* Martinov) до сих пор являются предметом дискуссий. Большинство представителей этой группы – полиплоиды со сложным геномным составом. Создание достоверной картины родового и видового состава и родственных связей Ячmeneвых затруднено часто регистрируемыми случаями межвидовой и межродовой гибридизации. Одним из способов выяснить происхождение культиваров и видов гибридного происхождения может быть исследование внутривидового полиморфизма генов 35S рРНК (Punina et al., 2012, 2017). Особенно эффективно это удастся сделать, исследуя внутригеномный полиморфизм 35S рДНК методами NGS-секвенирования (Rodionov et al., 2020a, b; Belyakov et al., 2022; Gnutikov et al., 2022a, b). В гаплоидном геноме цветковых растений от 200 до 22 000 генов 35S рРНК. При этом цистроны 35S рДНК расположены в виде длинных tandemных повторов на одной или нескольких хромосомах генома (Rodionov et al., 2017). Межвидовые гибриды первого поколения всегда имеют рДНК обоих родителей в геноме. В следующих поколениях некоторые виды гибридного происхождения длительное время сохраняют рДНК предковых видов (Punina et al., 2012, 2017; Rodionov et al., 2017 и др.), в то время как комплекс

генов рРНК других изменяется – гены одного из родителей быстро накапливают SNPs и делеции, частично или полностью теряются (Rodionov et al., 2017; 2020a).

В генах 35S рРНК есть эволюционно консервативные и быстро эволюционирующие участки (Rodionov et al., 2017). Для целей настоящей работы – определения геномного состава и происхождения видов и межвидовых гибридов из трибы Ячmeneвых (*Hordeae*) семейства Poaceae – мы изучили внутривидовой полиморфизм участка ITS1. Мы выбрали фрагмент ITS1 35S рДНК в качестве маркера, поскольку было показано, что процессы гомогенизации в ITS1 видов гибридного происхождения идут медленнее, чем в ITS2 (Osuna-Mascaro et al., 2022).

Мы исследовали методом локус-специфичного NGS-секвенирования на платформе Illumina внутривидовой полиморфизм района ITS1 у 50 диплоидных и полиплоидных образцов злаков трибы Ячmeneвых (табл. 1). Большинство этих образцов (44) были собраны нами в природе, а 6 – взяты из гербария LE. Видовая принадлежность образцов определена нами по монографии «Злаки России» (Цвелев, Пробатова, 2019); там же взяты сведения об их хромосомных числах, за исключением межродового гибрида × *Leymotrigia bergrothii* (H. Lindb.) Tzvelev, где число $2n = 49$ впервые было определено нами. Предварительно для большинства образцов последовательности ITS1-5.8S рРНК-ITS2 были секвенированы по Сэнгеру.

Таблица 1

Видовая принадлежность, хромосомные числа и происхождение исследованных образцов Ячmeneвых

| Вид/синоним | Образцы | 2n | Происхождение образца |
|---|-------------------------------------|-------|---|
| <i>Elymus komarovii</i> (Nevski) Tzvelev | Alt16-305 | 28 | Алтай |
| <i>Elymus hyperarcticus</i> (Polunin) Tzvelev (= <i>Roegneria villosa</i> subsp. <i>caerulea</i> Jurtzev) | б/н | 28 | о-в Врангеля, LE holotypus |
| <i>Elymus vassiljevii</i> Czerep. (= <i>Roegneria villosa</i> ssp. <i>lake-pilosa</i> Jurtzev = <i>Roegneria villosa</i> V. N. Vassil.) | б/н | 28 | Чукотка, LE isotypus Таймыр LE |
| <i>Elymus scandicus</i> (Nevski) A.P. Khohr. (= <i>Roegneria borealis</i> (Turtz.) Nevski) | б/н | 28 | Таймыр LE |
| <i>Elytrigia villosa</i> (Drobov) Tzvelev | б/н | 28 | Якутия LE |
| <i>Elytrigia gmelinii</i> (Trin.) Nevski | Alt14-710 Alt1180 Alt11-90 | 14 | Алтайский край Алтай Алтай |
| <i>Elytrigia geniculata</i> (Trin.) Nevski | Тy09-136 Alt14-496 | 28 | Тыва Алтайский край |
| <i>Elytrigia lolioides</i> (Kar. et Kir.) Nevski | Alt334 | 28 | Алтай |
| <i>Elytrigia pseudocaesia</i> (Pacz.) Prokudin | Alt1468 | 42 | Алтай |
| <i>Elytrigia repens</i> var. <i>glauca</i> (Döll) Tzvelev | Alt14-354 Alt14-69 | 42 | Алтайский край Алтайский край |
| <i>Elytrigia repens</i> var. <i>aristata</i> (Döll) Prokudin | Alt14-645 Alt18 Alt16-368 | 42 | Алтайский край Алтай Алтай |
| <i>Elytrigia repens</i> (L.) Nevski | Alt09-03 Alt673 Alt16-261 | 42 | Алтай Алтай Алтай |
| <i>Hordeum brevisubulatum</i> (Trin.) Link | Alt14-185 Alt14-294 Alt11-679 | 28 | Алтайский край Алтайский край Алтай |
| <i>Hordeum nevskianum</i> Bowden | Alt14-41 Alt14-571 | 14 | Алтайский край Алтайский край |
| <i>Hordeum roshevitzii</i> Bowden | Alt301 Alt296 | 14 | Алтай Алтай |
| <i>Hordeum turkestanicum</i> Nevski | Alt11-614 Alt10-594 | 28/42 | Алтай Алтай |

Продолжение табл. 1

| Вид/синоним | Образцы | 2n | Происхождение образца |
|--|--|-------|--|
| <i>Hordeum macilentum</i> Steud | Alt16-439 Alt15-276 | 28 | Алтай Алтай |
| <i>Hordeum</i> sp. | Alt19-160 Alt10-254 | ? | Алтай Алтай |
| <i>Psathyrostachys juncea</i> (Fisch.) Nevski | б/н Alt14-05 | 14 | Алтайский край, LE Алтайский край |
| <i>Leymus ramosus</i> (K. Richt.) Tzvelev | Alt14-218 | 28 | Алтайский край |
| <i>Leymus arenarius</i> (L.) Hochst. | б/н Pur19-21 | 56 | Ленинградская обл. Архангельская обл. |
| × <i>Leymotrigia bergrothii</i> (H. Lindb.) Tzvelev | б/н Pur19-24 Pur19-27 | 49 | Архангельская обл. Архангельская обл. Архангельская обл. |
| <i>Agropyron desertorum</i> (Fisch. ex Link) Schult. | Alt13-246 | 14/28 | Алтай |
| <i>Agropyron krylovianum</i> Schischk. | Alt18-289 Alt10-445 Alt13-30 Alt15-82 Alt1212 Alt15-144 | ? | Алтай Алтай Алтай Алтай Алтай Алтай |
| <i>Agropyron</i> sp. | Alt14-150 | ? | Алтайский край |

При построении филогенетического дерева секвенированных по Сэнгеру последовательностей ITS1-5.8S рРНК-ITS2 мы включили в него также ряд последовательностей, взятых из GenBank, в том числе и секвенированные ранее в нашей лаборатории (рис. 1). На представленном древе видно, что хорошо поддерживаемые клады образуют роды *Agropyron*, *Leymus*, *Psathyrostachys*, *Hordeum*, но виды в пределах этих клад неразделимы. Необычно, что в кладе *Agropyron* попали два представителя *Elytrigia*: *E. lolioides* и *E. villosa* из Якутии. Прочие же представители *Elytrigia* либо занимают базальное положение, либо образуют общую неразрешимую кладу с видами рода *Elymus*.

Далее мы исследовали методом локус-специфичного NGS-секвенирования на платформе Illumina внутригеномный полиморфизм района ITS1. Подготовка библиотеки и секвенирование Illumina MiSeq были выполнены в Центре коллективного пользования ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии. Маркерные последовательности (3'-часть гена 28S рРНК, полные последовательности ITS1 и 5'-часть гена 5.8S рРНК) амплифицировали с использованием праймеров ITS-1P (Ridgway et al., 2003) и ITS-2 (White et al., 1990). Риботипы растений были отсортированы по частоте и отфильтрованы от грибов и бактерий с помощью BLAST, для каждого образца было получено не менее 20 тысяч прочтений (ридов). В анализ включали риды, встречающиеся у образца не менее 10 раз. Отобранные риботипы выравнивали с помощью алгоритма MUSCLE в MEGA 11. Данные обрабатывались с помощью пакета USEARCH 11.0 (Edgar, 2010). Выявлено 56 вариантов ITS1 (риботипов, ZOTU) в исследованных образцах. Они представлены в таблице, где указаны только SNPs, помеченные соответствующими цветами (рис. 2). В качестве референс-последовательности нами была принята последовательность ITS1 *Agropyron cristatum* Alt 11-377 KJ561241. Такая таблица позволяет визуализировать группы сходных риботипов в виде «штрих-кода» и установить соответствие этих групп отдельным субгеномам Ячменевых. Так, нами было выявлено 6 вариантов Р-риботипов (*Agropyron*), 6 вариантов St-риботипов (*Pseudoroegneria*), 21 вариант H(I)-риботипов (*Hordeum*), которые можно разнести по 5 группам, 7 вариантов риботипов *Psathyrostachys*, которые мы временно обозначили как Ps, и 16 вариантов *Leymus*-риботипов (L), которые можно разнести по 4 группам. Иных вариантов риботипов мы не обнаружили. Далее мы вычислили процентное соотношение этих риботипов среди всех полученных ридов для каждого образца и визуализировали результаты в виде диаграмм.

Род *Hordeum*. Исследованные нами образцы рода *Hordeum* в обработке Н. Н. Цвелева и Н. С. Пробатовой (2019) относятся к одной секции *Stenostachys* Nevskii и двум группам родства: *H. aggr.*

brevisubulatum (*Hordeum brevisubulatum*, *H. nevskianum*, *H. macilentum* и *H. turkestanicum*) и *H. aggr. brachyantherum* (*H. roshevitzii*). По цитогенетическим данным у них один тип генома и субгеномы H, в настоящее время обозначаемые как I-тип (Brassac, Blattner, 2015). На филогенетическом древе, построенном на основании сравнения последовательностей района ITS1-5.8S рДНК-ITS2, секвенированных по Сэнгеру, виды с высоким бутстрэп-индексом различаются, хотя образцы *H. roshevitzii* попадают в две разные клады (рис. 1).

Таксономический статус видов *H. aggr. brevisubulatum* – предмет дискуссий. Незначительные морфологические различия между видами дают основания считать их лишь циторасами (Landstrom et al., 1984) или подвидами вида *H. brevisubulatum* (Гудкова и др., 2022). Изучение внутригеномного полиморфизма рДНК диплоидного вида *H. nevskianum* соответствует ожиданиям – 99,7 % копий его ITS1 последовательности можно отнести к одному семейству риботипов (8 вариантов, отличающиеся друг от друга 1–2 нуклеотидными заменами). Этот вариант рДНК мы обозначили как *nevskianum*-тип. В минорном количестве (0,3 %) у одного образца присутствовали копии *H. jubatum*-типа, а у другого – *H. roshevitzii*-типа.

У трех образцов тетраплоидного *H. brevisubulatum nevskianum*-риботипы также заметно преобладали, но при этом в геноме присутствовали от 8 до 26 % риботипов *jubatum*-типа, что говорит об аллополиплоидном, а не автополиплоидном происхождении этого вида.

У двух образцов *H. turkestanicum* композиция риботипов в геноме незначительно, но определенным образом отличалась от характерной для *H. brevisubulatum*: здесь также преобладали *nevskianum*-риботипы и присутствовало заметное количество *jubatum*-риботипов (8 и 14 %), но, кроме того, в геноме обоих образцов этого вида были обнаружены риботипы, характерные для североамериканского ячменя *H. brachyantherum*, их было 2 и 10 %.

Два образца, собранные нами на Алтае, мы определили как *H. macilentum*, хотя этот восточно-сибирский вид для Алтая ранее не указывался. Мажорные компоненты комплекса рДНК в геноме этого вида соответствовали тому, что мы видели у диплоида *H. nevskianum*. У одного из этих образцов были обнаружены последовательности только *nevskianum*-типа, а у другого присутствовали также последовательности *jubatum*-типа (2,98 %) и, в минорном количестве, (0,32 %) обнаружилось последовательности *Leymus*-типа. Различия между *H. nevskianum* и алтайскими *H. macilentum*-подобными образцами, возможно, являются лишь отражением закона гомологичных рядов наследственной изменчивости Н. И. Вавилова (Вавилов, 1935). Окончательный вывод можно будет сделать после того, как будет исследован внутригеномный полиморфизм рДНК *H. macilentum* из *locus classicus*.

Два образца из группы родства *H. aggr. brevisubulatum* нам не удалось определить до вида, хотя они походили на не совсем типичные экземпляры *H. brevisubulatum*. У одного из них, помимо риботипов *nevskianum* (87,36 %) и *jubatum* (12,32 %), были обнаружены минорные *brachyantherum*-копии (0,32 %), что может свидетельствовать о гибридном происхождении этого образца от *H. brevisubulatum* и *H. turkestanicum*. У другого же образца (Alt10-254) состав риботипов определялся как *nevskianum* (91,03 %) + *jubatum* (8,26 %) + *Leymus* (0,72 %) + *tetraploidum* (0,72 %). Последний риботип, наиболее сходный с имеющейся в базе GenBank ITS1-последовательностью аргентинского вида *H. tetraploidum*, кроме данного образца, был выявлен также у трех образцов *Elytrigia*. Возможно, что этот образец также несет следы предшествующих отдаленных гибридизаций.

Среди генов 35S рРНК двух исследованных нами образцов диплоидного *H. roshevitzii* преобладали риботипы *roshevitzii*-типа, но в заметных количествах (3 и 5 %) присутствовали также и последовательности *nevskianum*-типа.

Выявленный нами внутригеномный полиморфизм у исследованных видов агрегата *H. brevisubulatum* дает основания признать *Hordeum nevskianum*, *H. brevisubulatum* и *H. turkestanicum* самостоятельными видами, а видовой статус алтайских образцов *H. macilentum* требует дополнительного исследования. Диаграммы, иллюстрирующие композиции риботипов у исследованных образцов ячменей, представлены на рис. 3.

Роды *Psathyrostachys* и *Leymus*. Считается, что диплоидные виды рода *Psathyrostachys*, в частности *P. juncea*, являлись донорами одного из субгеномов (Ns) гибридогенного рода *Leymus*, где все виды – как минимум, тетраплоиды, и встречаются виды с более высокой ploидностью ($2n = 56, 84$) (Fan et al., 2009). Донор же второго субгенома (Xm) у *Leymus* пока неизвестен. Наши данные показы-

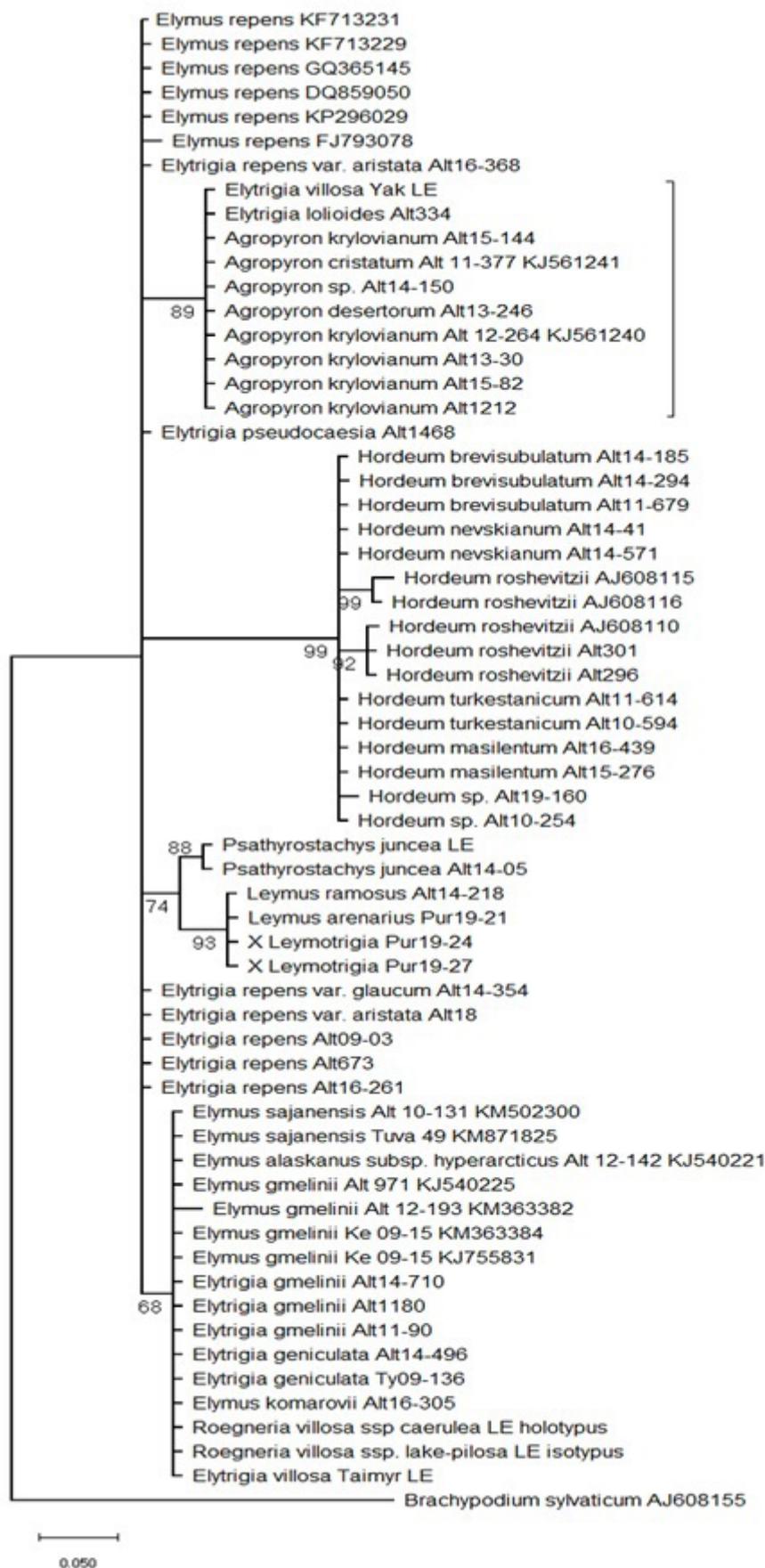


Рис. 1. Филогенетическое дерево секвенированных по Сэнгеру последовательностей ITS1-5.8S рНК-ITS2 у представителей трибы *Hordeae*.

вают, что, несмотря на определенное сходство риботипов, встречающихся у *Psathyrostachys* и *Leymus*, это все же разные группы риботипов (рис. 2). При этом 7 вариантов *Psathyrostachys*-риботипа, отличающихся друг от друга одной нуклеотидной заменой, мы обнаружили только у двух образцов *P. juncea* (наше обозначение – Ps), причем никаких других риботипов у этих образцов не выявлено (рис. 4).

У двух образцов октоплоидного *Leymus arenarius* из разных географических точек было выявлено 16 вариантов (4 группы) собственных *Leymus*-риботипов, которые мы обозначили как L, но не риботипы Ps. У тетраплоидного *L. ramosus* было выявлено лишь 3 сходных варианта одной группы риботипов L (рис. 4). Иных риботипов у этих трех образцов *Leymus* не выявлено. Можно ли считать риботипы L производными от Ps, или же это и есть риботипы неизвестного донора Xm, пока неизвестно. Очевидно, что требуются более подробные исследования видов этой группы. Примечательно, что в минорных количествах L- и Ps-риботипы изредка присутствуют и у других представителей Ячменевых, что может свидетельствовать о еще более широком вовлечении злаков этой трибы в гибридизационные процессы.

Круг родства вида *Elytrigia repens*. Считается, что субгеномная композиция широко распространенного и очень полиморфного гексаплоидного вида *Elytrigia repens* может быть обозначена как StStH, где субгеномы St получены от *Pseudoroegneria*, а H (вероятно, правильнее этот субгеном правильнее называть I – см. выше) – от *Hordeum*, на основании чего этот вид в настоящее время многими авторами рассматривается как *Elymus repens* (Assadi, Runemark, 1995 и др.). Мы исследовали 8 образцов *E. repens*,

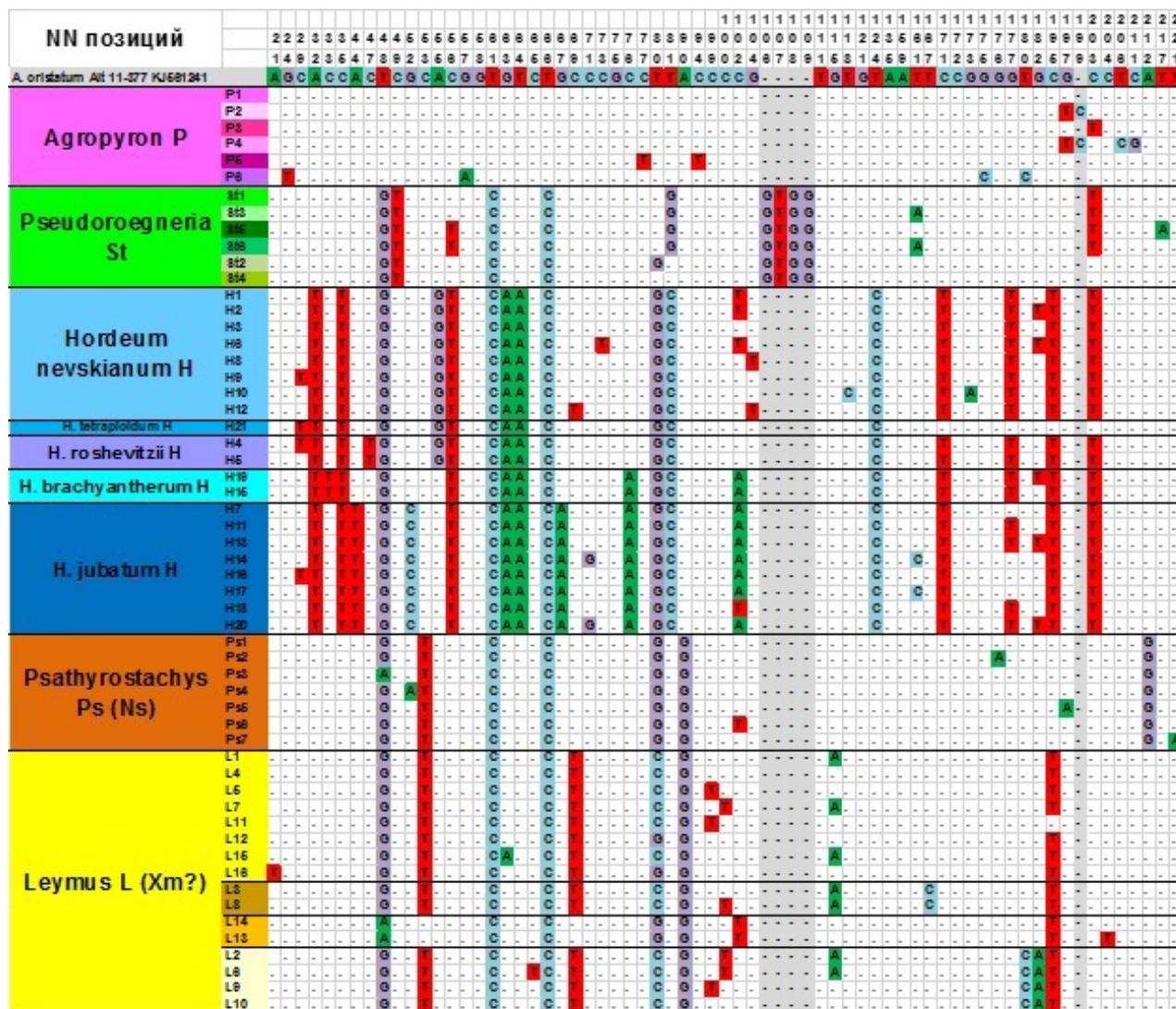


Рис. 2. Варианты риботипов, полученных при NGS-секвенировании района ITS1, и их соответствие общепринятой классификации субгеномов Ячменевых.

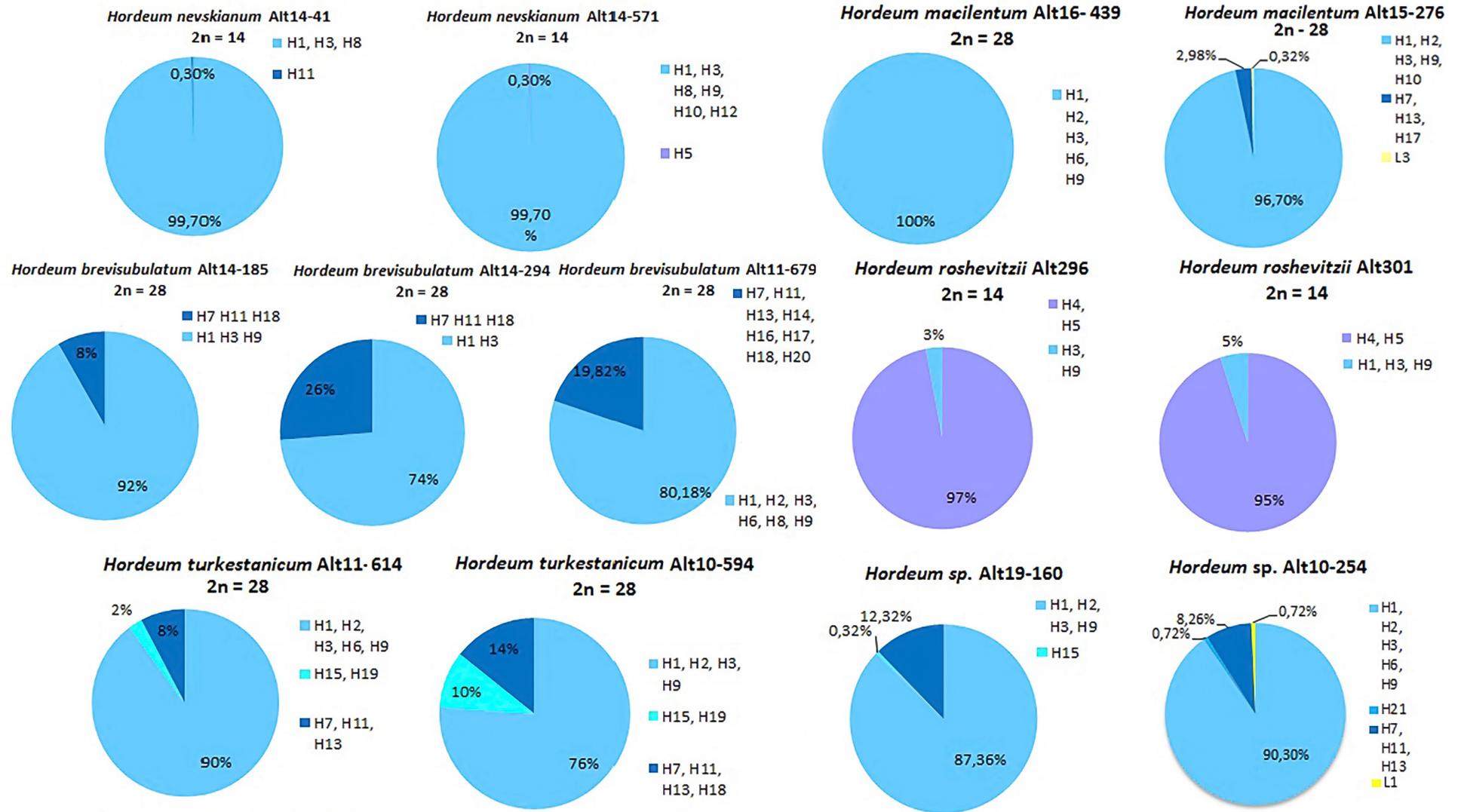


Рис. 3. Внутригеномный полиморфизм ITS1-последовательностей у исследованных видов рода *Hordeum*.

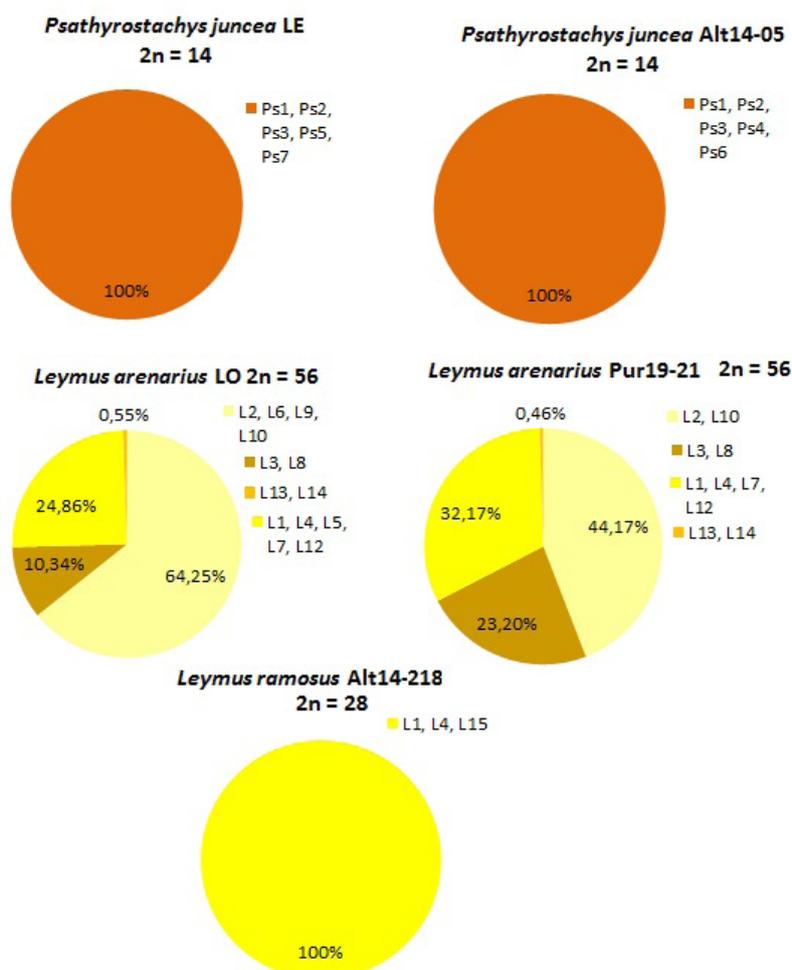


Рис. 4. Внутригеномный полиморфизм ITS1-последовательностей у исследованных видов родов *Psathyrostachys* и *Leymus*.

морфологически разных разновидностей (*E. repens* var. *repens*, *E. repens* var. *aristata* и *E. repens* var. *glauca*) и один образец из ближайшего круга родства этого вида, определенный нами как *E. pseudocaesia*. У всех этих образцов были выявлены, в первую очередь, два варианта St-риботипов (St2 и St4), отличающиеся между собой одной трансверсией G/T. У пяти образцов *E. repens* эти два варианта риботипов составляли каждый приблизительно по половине всех полученных ридов, а у трех, кроме St2 и St4, присутствовал также в заметном количестве риботип St5 (рис. 5). У *E. pseudocaesia* риботип St5 составил половину полученных ридов. Риботипы H-типа в заметном количестве были выявлены только у *E. pseudocaesia* и 2-х образцов *E. repens*, еще у одного образца *E. repens* H-риботипы отмечены как минорные (0,26 %). Примечательно, что эти H-риботипы относятся к *nevskianum*-типу и *tetraploidum*-типу. Мы не выявили каких-либо закономерностей, позволяющих охарактеризовать те или иные разновидности *E. repens*, и, следовательно, не видим причин для пересмотра таксономического статуса этих разновидностей. Наши данные подтверждают сложившееся мнение о субгеномной композиции этого вида (Yang et al., 2017). Однако следует отметить, что, вероятно, H-риботипы у этого аллогексаплоида находятся в состоянии постепенной элиминации. Кроме того, найденные в минорных количествах у многих образцов риботипы St1, характерные для диплоидных (= *Pseudoroegneria*) и тетраплоидных *Elytrigia* и *Elymus* могут быть «следами» когда-то случавшихся гибридизационных процессов.

Межродовой гибрид × *Leymotrigia bergrothii*. Гибрид *Elytrigia repens* и *Leymus arenarius* был впервые описан Х. Линдбергом (Lindberg, 1906) как *Tritordeum bergrothii* Lindb. по сборам с Белого моря И. О. Бергрота 1896 г. на острове Русский Кузов и по образцу, собранному А. К. Каяндером в 1899 г. на песчаном берегу моря у Покровского (Онежский берег). Позднее Н. Н. Цвелев отнес эти растения к роду × *Leymotrigia* Tzvelev как вид × *L. bergrothii* (Н. Lindb.) Tzvelev, 1964, в Аркт. фл. СССР, 2: 250. На

Онежском берегу Белого моря этот гибрид встречается часто и образует обширные клоны. По-видимому, он полностью стерилен, так как не образует семян, и лишь изредка, в отдельных цветках на отдельных колосьях формируются недоразвитые пыльники с немногочисленными абортными пыльцевыми зёрнами. Мы определили хромосомное число у этого гибрида, и, как и ожидалось, он оказался гептаплоидом с $2n = 49$. Очевидно, что это гибрид первого поколения, и его исследование представляло интерес, поскольку можно было предположить сохранность всех риботипов субгеномов, его формирующих, не элиминирующих в ряду поколений, как это может происходить у фертильных аллополиплоидов. В результате у всех трех исследованных образцов были отмечены примерно в равных долях (от 15 до 25 %) пять вариантов риботипов: St2 и St4 риботипы, самые массовые у *Elytrigia repens*, и 3 группы L-риботипов, самые массовые у *Leymus arenarius* (рис. 6). Никаких иных минорных вариантов риботипов у этих гибридов мы не обнаружили.

При исследовании прочих образцов Ячменевых нам удалось показать, что у диплоидного вида *Elytrigia gmelinii* и тетраплоидного *E. geniculata* выявляются иные, чем у *E. repens* St-риботипы, которые можно отнести к группе Northern St-риботипов, широко распространенных у разных видов *Elymus* Сибири и Дальнего Востока, включая Якутию и Чукотку (Rodionov et al., 2019), в то время как преоб-

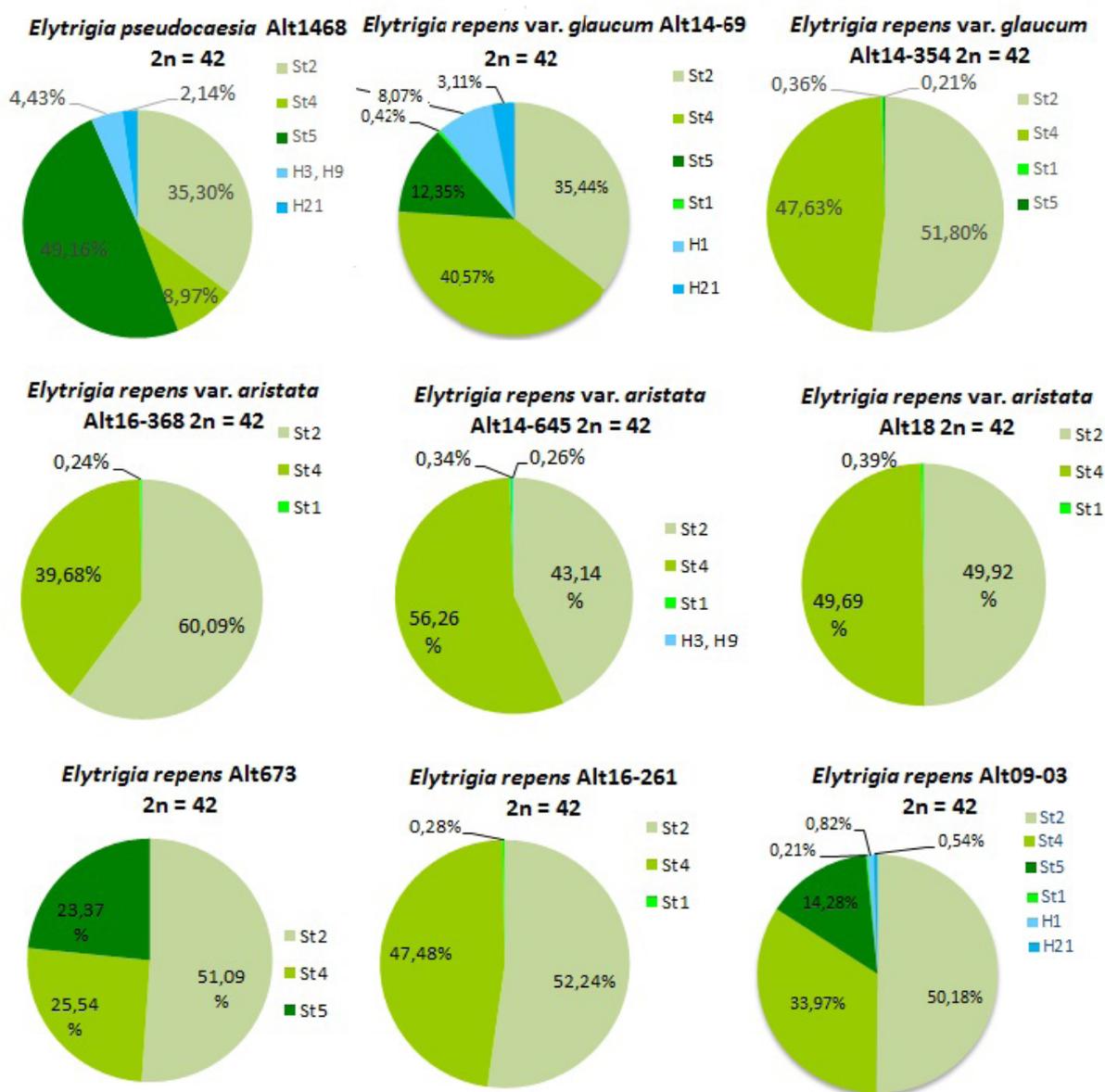


Рис. 5. Внутригеномный полиморфизм ITS1-последовательностей у исследованных видов круга родства *Elytrigia repens*.

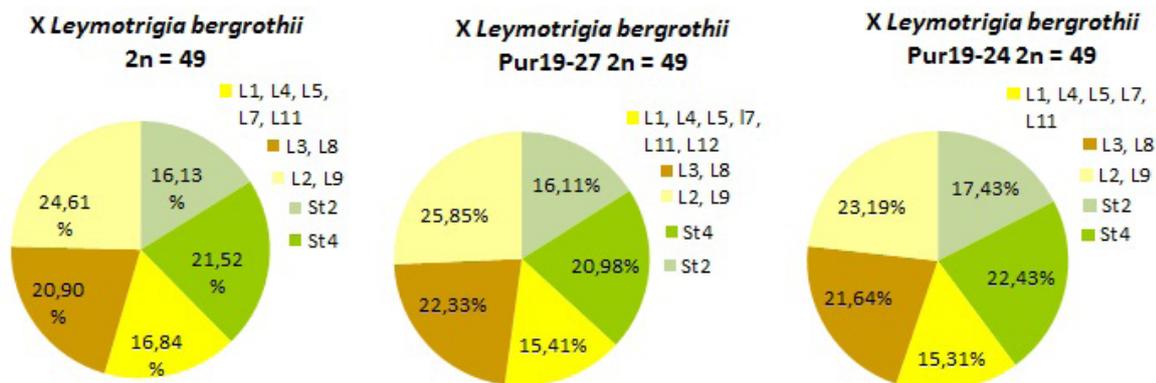


Рис. 6. Внутригеномный полиморфизм ITS1-последовательностей у \times *Leymotrigia bergrothii*.

ладающие у гексаплоидного *E. repens* (см. выше) риботипы St2 и St4 относятся к двум другим группам, Southern St и Southern dahuricus St соответственно. Риботип Northern dahuricus St во всей исследованной подборке образцов не был обнаружен. Наше исследование объясняет феномен, выявленный нами ранее (Rodionov et al., 2019), когда разные образцы одного и того же вида из группы родства *Elymus* / *Pseudoroegneria* при секвенировании по Сэнгеру демонстрировали то «северные», то «южные» St-риботипы. Ранее мы предположили, что это объясняется существованием криптических видов, но сейчас более правдоподобным представляется то, что у подобных образцов имеется два или более St-риботипа, и, в зависимости от того, какой из них количественно преобладает, тот и будет определен при секвенировании по Сэнгеру.

При проверке гипотезы о гибридогенном происхождении *Agropyron krylovianum* с участием *Elytrigia repens* мы показали, что никакие риботипы St или H (I) не идентифицируются у *A. krylovianum* и других изученных житняков, но гибридогенные процессы могли происходить внутри рода *Agropyron*. При этом риботипы *Agropyron*-типа (P) преобладали у якутского вида *Elytrigia villosa*, что дает основания пересмотреть его родовую принадлежность и вернуться к предложенному когда-то названию *Agropyron karawaewii* P. F. Smirn. Также мы обнаружили, что у тетраплоидного *Elytrigia loliooides*, субгеномная формула которого недавно была принята как StH (Yang et al., 2017), половина риботипов относятся к St, из которых основной – St2, а около половины – это P-риботипы, и субгеномная формула этого вида – StP.

Таким образом, мы показали, что исследование внутригеномного полиморфизма 35S рДНК-последовательностей методами NGS-секвенирования – продуктивный подход, позволяющий устанавливать субгеномный состав и происхождение полиплоидов и отдаленных гибридов.

Благодарности. Работа выполнена на средства Госзадания-122011800672-6 с использованием ресурсов ЦКП БИН РАН и ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии.

ЛИТЕРАТУРА

- Вавилов Н. И.** Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости. – М.; Л.: ОГИЗ-Сельхозгиз, 1935. – 56 с.
- Гудкова П. Д., Золотов Д. В., Крючкова Е. А., Рыжакова Д. Д.** Ревизия рода *Hordeum* (Poaceae) Алтайского края // *Turczaninowia*, 2022. – Т. 25, № 1. – С. 16–23. DOI: 10.14258/turczaninowia.25.1.2
- Цвелев Н. Н., Пробатова Н. С.** Злаки России. – М.: Тов-во науч. изд. КМК, 2019. – 646 с.
- Assadi M., Runemark H.** Hybridization, genomic constitution, and generic delimitation in *Elymus* s. l. (Poaceae: Triticeae) // *Plant Syst. Evol.*, 1995. – Vol. 194(3–4). – P. 189–205.
- Belyakov E. A., Mikhaylova Y. V., Machs E. M., Zhurbenko P. M., Rodionov A. V.** Hybridization and diversity of aquatic macrophyte *Sparganium* L. (Typhaceae) as revealed by high-throughput nrDNA sequencing // *Scientific Reports*, 2022. – Vol. 12(1). – P. 21610. DOI: 10.1038/s41598-022-25954-0
- Brassac J., Blattner F. R.** Species-Level Phylogeny and Polyploid Relationships in *Hordeum* (Poaceae) Inferred by Next-Generation Sequencing and In Silico Cloning of Multiple Nuclear Loci // *Systematic Biology*, 2015. – Vol. 64. – P. 792–808. DOI: 10.1093/sysbio/syv035

- Edgar R. C.** Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // *Bioinformatics*, 2010. – Vol. 26. – P. 2460–2461. DOI: 10.1093/bioinformatics/btq461
- Fan X., Sha L. N., Yang R. W., Zhang H. Q., Kang H. Y., Ding C. B., Zhang L., Zheng Y. L., Zhou Y. H.** Phylogeny and evolutionary history of *Leymus* (*Triticeae*; Poaceae) based on a single-copy nuclear gene encoding plastid acetyl-CoA carboxylase // *BMC Evol Biol.*, 2009. – Vol. 9 (1). – P. 247.
- Gnutikov A. A., Nosov N. N., Koroleva T. M., Punina E. O., Probatova N. S., Shneyer V. S. and Rodionov A. V.** Origin of the Rare Hybrid Genus *Trisetokoeleria* Tzvelev (Poaceae) According to Molecular Phylogenetic Data // *Plants*, 2022a. – Vol. 11(24). P. 3533. DOI: 10.3390/plants11243533
- Gnutikov A. A., Nosov N. N., Loskutov I. G., Machs E. M., Blinova E. V., Probatova N. S., Rodionov A. V.** New insights into the genomic structure of the oats (*Avena* L., Poaceae): Intragenomic polymorphism of ITS1 sequences of rare endemic species *Avena bruhsiana* Gruner and its relationship to other species with C-genomes // *Euphytica*, 2022b. – Vol. 218(1). – P. 3. DOI: 10.1007/s10681-021-02956-z
- Landstrom T., Bothmer R., Dewey D. R.** Genomic relationships in the *Hordeum brevisubulatum* complex // *Can. J. Genet. Cytol.*, 1984. – Vol. 26. – P. 569–577.
- Lindberg H.** *Triticum repens* L. × *Hordeum arenarium* (L.) Aschers. (*Tritordeum Bergrothii* Lindb. fil. n. hybr.) // *Meddelanden af Societatis pro Fauna et Flora Fennica*, 1905–1906. – H. 32. – S. 21.
- Osuna-Mascaro C., de Casas R. R., Berbel M., Gomez J. M., Perfectti F.** Lack of ITS sequence homogenization in congeneric plant species with different ploidy levels // *bioRxiv*, 2022. – DOI: 10.1101/2022.05.29.493735
- Punina E. O., Machs E. M., Krapivskaya E. E., Kim E. S., Mordak E. V., Myakoshina Y. A., Rodionov A. V.** Interspecific hybridization in the genus *Paeonia* (Paeoniaceae): polymorphic sites in transcribed spacers of the 45S rRNA genes as indicators of natural and artificial peony hybrids // *Russian Journal of Genetics*, 2012. – Vol. 48(7). – P. 684–697. DOI: 10.1134/S1022795412070113
- Punina E. O., Machs E. M., Krapivskaya E. E., Rodionov A. V.** Polymorphic sites in transcribed spacers of 35S rRNA genes as an indicator of origin of the *Paeonia* cultivars // *Russian Journal of Genetics*, 2017. – Vol. 53(2). – P. 202–212. DOI: 10.1134/S1022795417010112
- 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 Ecol.*, 2003. Vol. 3. – P. 8.
- Rodionov A. V., Amosova A. V., Krainova L. M., Machs E. M., Mikhailova Y. V., Gnutikov, A. A., Muravenko O. V., Loskutov I. G.** Phenomenon of Multiple Mutations in the 35S rRNA Genes of the C Subgenome of Polyploid *Avena* L. // *Russian Journal of Genetics*, 2020a. – Vol. 56. – P. 674–683.
- Rodionov A. V., Dobryakova K. S., Nosov N. N., Gnutikov A. A., Punina E. O., Kriukov A. A., Shneyer V. S.** Polymorphism of ITS sequences in 35S rRNA genes in *Elymus dahuricus* aggregate species: two cryptic species? // *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* [Vavilov Journal of Genetics and Breeding], 2019. – Vol. 23(2). P. 287–295.
- Rodionov A. V., Gnutikov A. A., Kotsinyan A. R., Kotseruba V. V., Nosov N. N., Punina E. O., Rayko M. P., Tyupa N. B., Kim E. S.** ITS1-5.8S rDNA-ITS2 sequence in 35S rRNA genes as a marker for reconstruction of phylogeny of grasses (Poaceae Family) // *Biology Bulletin Reviews*, 2017. – Vol. 7, № 2. – P. 85–102.
- Rodionov A. V., Gnutikov A. A., Nosov N. N., Machs E. M., Mikhaylova Y. V., Shneyer V. S., Punina E. O.** Intragenomic polymorphism of the ITS 1 region of 35S rRNA gene in the group of grasses with two-chromosome species: Different genome composition in closely related *Zingieria* species // *Plants*, 2020b. – Vol. 9(12). – P. 1647.
- 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* / M. A. Innis, Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J. (eds.). – New York, NY: Academic Press, 1990. – P. 315–322.
- Yang Y., Fan X., Wang L., Zhang H. Q., Sha L. N., Wang Y., Kang H. Y., Zeng J., Yu X. F., Zhou Y. H.** Phylogeny and maternal donors of *Elytrigia* Desv. sensu lato (*Triticeae*; Poaceae) inferred from nuclear internal-transcribed spacer and trnL-F sequences // *BMC Plant Biol.*, 2017. – Vol. 17(1). – P. 207.