

Межсекционная гибридизация в роде *Koeleria* Pers. (Poaceae)**Intersectional hybridization in the genus *Koeleria* Pers. (Poaceae)**Гнутиков А. А.^{1,2}, Носов Н. Н.², Родионов А. В.²Gnutikov A. A.^{1,2}, Nosov N. N.², Rodionov A. V.²¹ФИЦ Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова, г. Санкт-Петербург, Россия
E-mail: alexandr2911@yandex.ru¹Federal Research Center N. I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia²ФГБУН Ботанический институт им. В. Л. Комарова Российской академии наук, г. Санкт-Петербург, Россия
E-mails: nnosov2004@mail.ru, avrodionov@mail.ru²Komarov Botanical Institute, St. Petersburg, Russia

Реферат. Впервые проведено локус-специфичное секвенирование следующего поколения (NGS) на платформе Illumina последовательностей внутреннего транскрибируемого спейсера ITS1 и начала гена 5.8S рРНК образцов видов из таксономически сложных родов *Koeleria* и *Trisetum*. Для 13 образцов видов из рода *Koeleria* и двух образцов *Trisetum spicatum* из разных географических регионов России было получено свыше 10000 прочтений маркерных последовательностей на пул рДНК. Был изучен внутригеномный полиморфизм полученных последовательностей. По данным NGS рДНК образцов *Koeleria* формирует риботипы, куда входят последовательности видов из разных секций. Выявлена обширная межсекционная гибридизация между видами *Koeleria*. Показано, что один из риботипов *K. polonica* идентичен минорным риботипам *K. glauca*, *K. brevis* и одному образцу *Trisetum spicatum*. Выявлено, что главный риботип видов *K. theodoriana*, *K. spryginii*, *K. luerssenii* идентичен главному риботипу *K. glauca*, а главный риботип *K. cristata* идентичен главным риботипам *K. altaica* и *K. asiatica*. Обнаружено, что главный риботип *K. delavignei* идентичен главному риботипу *K. brevis* и одному из риботипов *K. glauca*.

Ключевые слова. Гибридизация, ITS, *Koeleriinae*, NGS, Poaceae, *Trisetum spicatum*.

Summary. For the first time, locus-specific next-generation sequencing (NGS) of the internal transcribed spacer (ITS1) and the 5.8S rRNA gene start sequences was performed on the Illumina platform for specimens of species from the taxonomically complex genera *Koeleria* and *Trisetum*. Over 10,000 marker sequence reads per rDNA pool were obtained for 13 *Koeleria* and two *Trisetum spicatum* samples from different geographic regions of Russia. Intragenomic polymorphism of the obtained sequences was studied. According to NGS data, the rDNA of *Koeleria* samples forms ribotypes, which include sequences from species from different sections. Extensive intersectional hybridization was revealed between *Koeleria* species. One ribotype of *K. polonica* was shown to be identical to minor ribotypes of *K. glauca*, *K. brevis*, and one *Trisetum spicatum* sample. The major ribotype of *K. theodoriana*, *K. spryginii*, and *K. luerssenii* was identical to that of *K. glauca*, while the major ribotype of *K. cristata* was identical to those of *K. altaica* and *K. asiatica*. The major ribotype of *K. delavignei* was found to be identical to that of *K. brevis* and one of the ribotypes of *K. glauca*.

Key words. Hybridization, ITS, *Koeleriinae*, NGS, Poaceae, *Trisetum spicatum*.

В роде тонконог (*Koeleria* Pers.) насчитывают около 200 видов, обитающих почти во всех вне-тропических странах обоих полушарий, а также в горных районах некоторых тропиков. Это один из самых крупных родов злаков в России, к нему относят до 56 видов, почти половина из которых (26) – эндемики (Цвелев, Пробатова, 2019). Многие авторы подчеркивали таксономическую сложность рода *Koeleria*, считая виды рода трудными для определения (Watson, Dallwitz, 1992; Quintanar et al., 2010). Высокая морфологическая изменчивость представителей рода *Koeleria* способствует тому, что границы между видами, даже видами разных подродов, часто оказываются неясными, размытыми. Одной из причин этого считают сетчатую эволюцию, характерную для трибы Мятликовых (*Poeae* R. Br.), куда входят виды рода *Koeleria*. Триба *Poeae* по частоте выявленных случаев межвидовой и межродовой гибридизации занимает лидирующее положение в семействе Poaceae. Здесь часто обнаруживают несоответствия между филогенетическими конструкциями, построенными на основе ядерной и хлоро-

пластной ДНК (Soreng, Davis, 2000; Soreng et al., 2007; Quintanar et al., 2007). В частности, представители подтрибы *Koeleriinae* Asch. et Graebn., наряду со всеми родами, так называемых, овсовых злаков (*Aveneae* chloroplast group) в трибе *Poeae* (Soreng et al., 2015; Saarela et al., 2017) склонны к множественным гибридизациям. Вероятно, процессы гибридизации и интрогрессии способствуют возникновению новых комбинаций субгеномов в полиплоидных геномах, что в свою очередь объясняет сложности в систематике по морфологическим признакам (Saarela et al., 2010, 2017).

Секвенирование по методу Сэнгера, успешно помогает выявлять аллополидные виды, но определить происхождение родительских субгеномов аллополиплоидов этим методом обычно не удастся. Поэтому мы изучили виды рода при помощи секвенирования следующего поколения (NGS) с целью описать внутригеномное разнообразие их рДНК и определить происхождение их субгеномов.

Образцы видов *Koeleria* и два образца рода *Trisetum* Pers. были получены из гербарных коллекций LE, а также собраны в ходе летних экспедиций сотрудников лаборатории Биосистематики и цитологии БИН РАН в Республику Алтай и Алтайский край. Был исследован внутригеномный полиморфизм внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1 локусов 35S рРНК с помощью локус-специфичного секвенирования этого района на платформе Illumina. Секвенирование следующего поколения (NGS) на платформе Illumina проводили в Центре коллективного пользования «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» Всероссийского исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии.

Полученный пул необработанных последовательностей был обрезан с помощью Trimmomatic (Bolger et al., 2014), входящего в состав Unipro Ugene (Okonechnikov et al., 2012). Затем парные последовательности были объединены, дереплицированы и отсортированы с помощью vsearch 2.7.1 (Rognes et al., 2016). Полученные последовательности рассматривались как риботипы. Чтобы ограничить вклад ошибок амплификации и секвенирования, в анализ брали только прочитанные не менее чем 10 раз. Последовательности выровнены с помощью MEGA v. 11.0.13 (Tamura et al., 2021). Сеть риботипов построена в программе TCS 1.2.1 (Clement et al., 2000) методом статистической парсимонии и визуализирована в TCS BU (Múrias dos Santos et al., 2016).

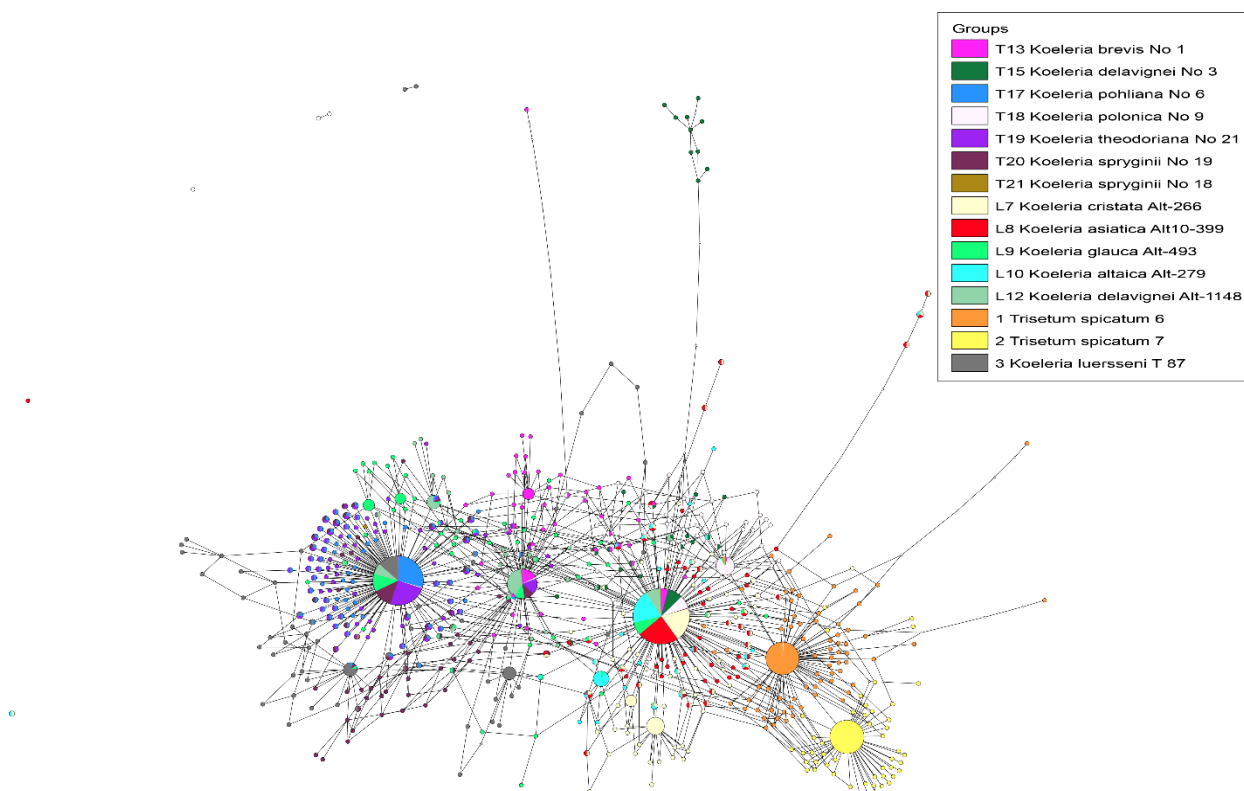


Рис. 1. Сеть риботипов, отражающая взаимоотношения видов родов *Koeleria* и *Trisetum*, построенная на основе сравнения ITS1-риботипов. Диаметр кругов и размер секторов пропорционален проценту основных риботипов от общего числа прочтений в геноме образца.

В результате исследования выявлена масштабная гибридизация между видами всех секций рода *Koeleria*. Риботипы видов из типовой секции (*K. aggr. splendens* C. Presl., *K. aggr. delavignei* Czern. ex Domin, *K. aggr. cristata* (L.) Pers. и др.) разделяются на группы (рис. 1). Среди мажорных риботипов (больше 1000 прочтений на пул рДНК) есть видоспецифичные и такие, которые встречаются у нескольких видов, даже видов разных секций. Например, главный риботип (самый представленный по количеству прочтений) видов из типовой секции, тяготеющих к меловым обнажениям: европейско-центральноазиатского *K. theodoriana* (Klokov ex Tzvelev) Tzvelev (sect. *Koeleria*, aggr. *sclerophylla* P. A. Smirn.), восточноевропейского *K. sprygini* Tzvelev (sect. *Koeleria*, aggr. *splendens*), кавказского *K. luerssenii* (Domin) Domin (sect. *Koeleria*, aggr. *luerssenii* (Domin) Domin) идентичен главному риботипу полиморфного евросибирского псаммофита *K. glauca* (Spreng.) DC. (sect. *Bulbosae* Domin). Кроме того, мы видим, что главный риботип *K. delavignei* Czern. ex Domin (sect. *Koeleria*, aggr. *delavignei*) идентичен главному риботипу *K. brevis* Steven (sect. *Imbricatae* (Domin) Tzvelev) и четвертому по представленности риботипу *K. glauca*. Главный по представленности риботип *K. polonica* Domin идентичен с минорными фракциями риботипов *K. glauca* и *K. brevis*. Этот же риботип в минорных количествах найден у одного из двух исследованных образцов *Trisetum spicatum* (L.) K. Richt. Главный риботип *K. cristata* (L.) Pers. (sect. *Koeleria*, aggr. *cristata*) идентичен главным риботипам *K. altaica* (Domin) Krylov и *K. asiatica* Domin (sect. *Koeleria*, aggr. *asiatica* Domin). Это подтверждает гипотезу Н. Н. Цвелева о родстве *Koeleria cristata* s. l. и горных азиатских видов, таких как *K. altaica* (Цвелев, 2005). Можно предположить, что секции и агрегаты видов (Цвелев, Пробатова, 2019) в роде *Koeleria* более близкородственны друг другу, чем в других родах трибы. Возможно, все виды этих агрегатов могут быть межвидовыми/секционными гибридами, а морфологические признаки, используемые для разграничения видовых границ, зависят от того, какая доля родительских геномов в них присутствует.

Благодарности. Работа выполнена на оборудовании ЦКП «Клеточные и молекулярные технологии изучения растений и грибов» Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН и ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» Всероссийского исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии, при поддержке гранта РФФИ № 25-24-00349 (<https://rscf.ru/project/25-24-00349/>).

ЛИТЕРАТУРА

- Цвелев Н. Н. Проблемы теоретической морфологии и эволюции высших растений: Сборник избранных трудов / Под ред. Д. В. Гельтмана. – М.: СПб.: Тов-во науч. изд. КМК, 2005. – 407 с.
- Цвелев Н. Н., Пробатова Н. С. Злаки России. – М.: Тов-во науч. изд. КМК, 2019. – 646 с.
- Bolger A. M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for illumina sequence data // *Bioinformatics*, 2014. – Vol. 30. – P. 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Clement M., Posada D., Crandall K. A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies // *Molecular Ecology*, 2000. – Vol. 9, № 10. – P. 1657–1660. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.01020.x>
- Múrias dos Santos A., Cabezas M. P., Tavares A. I., Xavier R., Branco M. tcsBU: A tool to extend TCS network layout and visualization // *Bioinformatics*, 2016. – Vol. 32, № 4. – P. 627–628. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv636>
- Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit // *Bioinformatics*, 2012. – Vol. 28, № 3. – P. 1166–1167. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
- Quintanar A., Castroviejo S., Catalán P. Phylogeny of the tribe *Aveneae* (Pooideae, Poaceae) inferred from plastid *trnT*-F and nuclear ITS sequences // *American Journal of Botany*, 2007. – Vol. 94, № 9. – P. 1554–1569. URL: https://www.researchgate.net/publication/51186972_Phylogeny_of_the_tribe_Aveneae_Pooideae_Poaceae_inferred_from_plastid_trnT-F_and_nuclear_ITS_sequences (Accessed 15 February 2026).
- Quintanar A., Catalan P., Castroviejo S. A review of the systematics and phylogenetics of the *Koeleriinae* (Poaceae: Poae) // *Diversity, Phylogenetics, and Evolution in the Monocotyl: Proceedings the fifth international symposium on grass systematics and evolution* (Copenhagen, 11–15 August 2008). – Aarhus University Press, 2010. – P. 539–556. URL: <https://www.researchgate.net/publication/336686569> (Accessed 15 February 2026).
- Rognes T., Flouri T., Nichols B., Quince C., Mahe F. VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics // *PeerJ*, 2016. – № 4. – P. e2584. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>
- Saarela J. M., Bull R. D., Paradis M. J., Ebata S. N., Peterson P. M., Soreng R. J., Paszko B. Molecular phylogenetics of cool-season grasses in the subtribes *Agrostidinae*, *Anthoxanthinae*, *Aveninae*, *Brizinae*, *Calothecinae*, *Koeleriinae* and *Phalaridinae* (Poaceae, Pooideae, Poae, Poae chloroplast group 1) // *PhytoKeys*, 2017. – Iss. 87. – P. 1–139. <https://doi.org/10.3897/phytokeys.87.12774>

Saarela J. M., Liu Q., Peterson P. M., Soreng R. J., Paszko B. Phylogenetics of the grass 'Aveneae-type plastid DNA clade' (Poaceae: *Pooideae*, *Poeae*) based on plastid and nuclear ribosomal DNA sequence data // Diversity, Phylogenetics, and Evolution in the Monocotyl: Proceedings the fifth international symposium on grass systematics and evolution (Copenhagen, 11–15 August 2008). – Aarhus University Press, 2010. – P. 557–587. URL: <https://www.researchgate.net/publication/336686569> (Accessed 15 February 2026).

Soreng R. J., Davis J. I. Phylogenetic structure in Poaceae subfamily *Pooideae* as inferred from molecular and morphological characters: misclassification versus reticulation // Grasses: systematics and evolution: Proceedings of the third international symposium on systematics and evolution of cereals (Sydney, 28 September 1998). – CSIRO, Melbourne, 2000. – P. 61–74.

Soreng R. J., Davis J. I., Monica A., Voionmaa M. A. A phylogenetic analysis of Poaceae tribe *Poeae* sensu lato based on morphological characters and sequence data from three plastid-encoded genes: evidence for reticulation, and a new classification for the tribe // Kew Bulletin, 2007. – Vol. 62, № 3. – P. 425–454. URL: <https://www.jstor.org/stable/20443368> (Accessed 15 February 2026).

Soreng R. J., Peterson P. M., Romaschenko K., Davidse G., Judziewicz E. J., Zuloaga F. O., Filgueiras T. S., Morrone O. A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae) // J. Syst. Evol., 2015. – Vol. 53, Iss. 2. – P. 117–137. <https://doi.org/10.1111/jse.12150>

Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11// Mol. Biol. Evol., 2021. – № 38. – P. 3022–3027. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>

Watson L., Dallwitz M. J. The grass genera of the world. – Wallingford: CAB International, 1992. – 1038 p.