

Н. Б. Тюпа,
Е. С. Ким,
И. Г. Лоскутов,
А. В. Родионов

К ПРОИСХОЖДЕНИЮ ПОЛИПЛОИДОВ В РОДЕ *AVENA* L.: МОЛЕКУЛЯРНО-ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Чтобы выяснить какой из диплоидных видов мог стать потенциальным донором Генома С у полиплоидных видов рода *Avena* L. (овёс), мы секвенировали последовательности ITS1 и ITS2 ядерных генов 45S рРНК тетраплоидных, *A. magna* (syn. *A. maroccana*) (ААСС или ССDD), *A. murphyi* (ААСС или ССDD), *A. insularis* (ААСС или ССDD), *A. vaviloviana* (ААВВ), *A. barbata* (ААВВ), *A. agadiriana* (ААВВ), гексаплоидных, *A. fatua* (ААССDD), *A. sativa* (ААССDD), *A. occidentalis* (ААССDD), а также ITS диплоидных видов овса *A. strigosa* (AsAs), *A. prostrata* (ApAp). Методом SCAR-анализа с использованием оригинальных, разработанных нами праймеров, специфичных для ITS С-геномов, показано, что наиболее вероятным предком, передавшим тетраплоидам *A. magna*, и *A. murphyi* и гексаплоидам *A. sativa* и *A. occidentalis* субгеном С был вид *A. ventricosa*.

Ключевые слова: *Poaceae*, *Aveneae*, кариотип, геном, эволюция хромосом, внутренние транскрибируемые спейсеры, nrRNA

ВВЕДЕНИЕ

Детальный сравнительный анализ кариотипов различных представителей рода *Avena*, показал, что у диплоидных и полиплоидных видов хромосомные наборы полиморфны. У диплоидов встречаются несколько вариантов генома А и два типа генома С (*A. ventricosa* и *A. bruhsiana* имеют кариотип С_v, *A. pilosa* и *A. clauda* – С_p [4, 27, 29, 33]. Варианты геномов А (табл. 1.) различаются по числу акроцентрических хромосом. Геномы С_p и С_v имеют различное количество спутничных хромосом: в геномах С_p – две пары спутничных хромосом, в С_v – одна. Для С-геномов диплоидов характерны ярко выраженная асимметричность хромосом, особый «диффузный тип» С-окрашивания, придающий хромосомам С-генома более темную, в сравнении с хромосомами А-геномов окраску, преимущественно интерстициальное положение С-блоков, особое положение генов 45S и 5S рРНК [8, 16, 33], специфичные, характерные только для С-геномов повторяющиеся последовательности ДНК [14, 16, 27], со специфичными паттернами AFLP и RAPD- маркеров [2, 13, 17] и спектром запасных белков-авенинов [8]. Диплоиды с С-геномами и А-геномами различаются по набору мутаций в ITS и ETS [3, 31, 32].

Тетраплоиды *A. barbata*, *A. vaviloviana* и *A. abyssinica* имеют кариотип АВ. К этой группе видов относится и *A. agadiriana*, однако кариотип этого вида своеобразен, вид, по-видимому, имеет особое происхождение [4, 8, 27]. Есть все основания считать, что геном В является модификацией генома А [27, 29], поэтому он иногда обозначается как А'. Геномы А и В могут быть разделены по особым геномспецифичным повторам [21, 23]. Обычно считают, что *A. magna* и *A. murphyi* несут геномы А и С [1, 9], а тетраплоид *A. insularis*, возможно, имеет особую геномную конституцию – CD [1, 25, 29]. Геном D является видоизменённым геномом А, и его иногда обозначают А" [28, 29]. Недавно Шелухина и соавт. (2007, 2008) убедительно показали, что геномы *A. insularis*, *A. magna* и *A. murphyi* не различаются ни по особенностям дифференциального окрашивания, ни по локализации генов рРНК и предложили считать эти виды тетраплоидами с геномами типа CD. Еще один тетраплоид *A. macrostachya* является автотетраплоидом с геномом Сm [3, 26, 31].

Кариотипы гексаплоидных видов *A. fatua*, *A. sterilis*, *A. ludoviciana*, *A. sativa*, *A. byzantina* и *A. occidentalis* состоят из трех типов геномов – их конституция AACCCDD [1, 9, 29]. При проведении геномной *in situ* гибридизации (GISH) геномы А и D гексаплоидов не различаются, в то время как геном С определенно иного происхождения [11, 27].

Таким образом, геном В представлен только на тетраплоидном уровне, геном D – на гексаплоидном и на тетраплоидном уровнях, а геномы А и С представлены на всех уровнях плоидности.

Отличия кариотипов на гексаплоидном уровне мало по сравнению с разнообразием кариотипов на диплоидном и тетраплоидном уровнях, все гексаплоиды, по-видимому, возникли в результате межвидовой гибридизации между видами с геномом CD из круга родства *A. insularis*, *A. magna* и *A. murphyi* и неизвестным видом с геномом типа А [8]. Геномное секвенирование ITS последовательностей диплоидных и полиплоидных видов *Avena* показывает, что по ITS геномы А, В и D не отличимы друг от друга, но определенно отличаются от геномов типа С. При этом у полиплоидов обнаруживались только ITS геномы типа А(В, D) [3, 32], что согласуется с результатами цитогенетических исследований – FISH показывает, что С-субгеномы полиплоидов потеряли большую часть рДНК, на них удастся выявить только слабые 45S рДНК-позитивные сигналы [7, 8, 11, 18, 22]. Для того, чтобы секвенировать последовательности ITS С-субгеномов полиплоидов, и тем самым определить от какого из диплоидных видов с геномами типа С произошли полиплоидные виды рода *Avena* мы, отталкиваясь от результатов нашего предыдущего исследования (Родионов и др., 2005), сконструировали праймеры, специфичные для геномов типа С, амплифицировали и секвенировали последовательности ITS1 и ITS2 ядерных генов 45S рДНК С-субгеномов тетраплоидных видов *A. magna*, *A. murphyi*, *A. insularis* и гексаплоидных видов *A. fatua*, *A. sativa*, *A. occidentalis*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Список исследованных видов представлен в табл. 1.

Выделение геномной ДНК производилось по методу [12] с модификациями [3]. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с использованием праймеров ITS1F cttggctatttagaggaagtaa [19] и ITS4 tcctccgcttattgatatgc [36]. Протокол реакции амплификации: 10' 97°C; 35 циклов: 1' 94; 1' 48; 1' 72; 10' 72°C. На основе результатов нашего предыдущего исследования [3] мы сконструировали праймеры M13R-cAvenaITS1F и M13R-cAvenaITS2R, комплементарные участкам ITS1 и ITS2, по которым С-геномы отличались от А-геномов. Эти олигонуклеотиды были соединены с универсальными праймерами вектора M13 [30]: M13R-cAvenaITS1F (gtaaaacgacggccagt (M13F)-cgcacgcgttatctatccg) и M13R-cAvenaITS2R (aggaaacagctatgaccat (M13R)-caccgttcaagggtctacg). Протокол реакции амплификации: 10' 94°C; 30 циклов: 30" 94°C; 30" 62°C; 30" 72°C; 10' 72°C. Секвенирование по Сэнжеру и соавт. (1977) производилось на базе фирмы ООО «Омникс» (Санкт-Петербург). Последовательности депонированы в ГенБанк (www.ncbi.nlm.nih.gov) (табл. 1). Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием пакета программ MEGA v. 4 [35]. В анализ были также включены полученные нами ранее последовательности: *A. clauda*–AY522432, *A. macrostachya*–AY522433, *A. pilosa*–AY530162, *A. sativa*–AY520821, *A. sterilis*–DQ364236, *A. ventricosa*–AY522437 [3] и *A. abyssinica*–DQ092754, *A. byzantina*–DQ092755, *A. damascena*–AY881171, *A. fatua*–DQ092756 и *A. ludoviciana*–DQ406585 [5], *Arrhenatherum elatius*–AEL96883 [20].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Секвенированные последовательности включали ~18S рДНК– ITS1–5.8S рДНК– ITS2– 26S рДНК~ (с праймеров ITS1F и ITS4), ~ITS1–5.8S рДНК–ITS2~ (с праймеров

M13F-сAvenaITS1F и M13R-сAvenaITS2R). Последовательность 5.8S рДНК во всех случаях имела длину 164 п.н. Длина ITS1 составила 219–220 п.н., ITS2 – 213–215 п.н. При сравнении последовательностей ITS1 с 60 н. по 219 н. было выявлено 23 значимых позиций (табл. 2). Независимо от пloidности все 5 исследованных видов, содержащих в кариотипе геном С, показали сходную картину нуклеотидных замен, характерную для диплоидных видов с геномом С (далее «виды с геномом С») и тетраплоида *A. macrostachya*. В положениях 64, 68, 73, 79, 105, 114, 133, 138, 167, 170, 173, 174, 177, 195 и 199 нуклеотиды были гомологичные нуклеотидам, характерным для видов с геномом С. В положениях 101 и 204 выявлены специфические для С генома трансверсии (С?А и G?Т), а в 188 положении – транзигия (G?А) у *A. fatua* или наличие двойных пиков R=G/А и К=G/Т, за исключением *A. murphyi*. В позициях 112 и 187 на хроматограммах обнаружен внутригеномный полиморфизм, характерный для *A. sativa*, *A. murphyi* и *A. occidentalis*. В положении 116 у *A. murphyi* и в положении 188 у *A. fatua* имеются видоспецифические замены. 187 и 190 позиции сближают С-геном полиплоидов с *A. ventricosa*. Позиции 104 и 190 у исследованных полиплоидов несут замены, характерные для геномов А. В позиции 105 однозначного разделения между геномами не наблюдается.

Т а б л и ц а 1. Список секвенированных последовательностей ITS1–5.8S–ITS2 *Avena*, депонированных в базе данных NCBI

Table 1. List of the sequenced *Avena* ITS1–5.8S–ITS2 sequences deposited in the NCBI database

Вид	Геномный состав, число хромосом	Номер образца по каталогу ВИР, страна происхождения	Индекс в базе GeneBank
<i>A. strigosa</i> Schreb.	A _s A _s 2n=2x=14	к-9888 (Великобритания)	DQ435067
<i>A. prostrata</i> Ladiz.	A _p A _p 2n=2x=14	к-2055 (Испания)	AY881173
<i>A. agadiriana</i> Baum et Fedak	AABB? 2n=4x=28	к-2074 (Марокко)	DQ341306
<i>A. vaviloviana</i> (Malz.) Mordv.	AABB 2n=4x=28	к-12 (Эфиопия)	AY881170
<i>A. barbata</i> Pott	AABB 2n=4x=28	к-237 (Азербайджан)	AY881169
<i>A. magna</i> Murphy et Ter.	AACC 2n=4x=28	к-144 (Марокко)	AY881168
		к-1786 Марокко	*FJ794721
<i>A. murphyi</i> Ladiz.	AACC 2n=4x=28	к-1897 Марокко	DQ364235
		к-1986 Испания	*FJ794722
<i>A. insularis</i> Ladiz.	CCDD? 2n=4x=28	к-2067 Италия	FJ794723
<i>A. occidentalis</i> Dur.	AACCCDD 2n=6x=42	к-1785 Канарские о-ва (Испания)	AY881167
			*FJ794720
<i>A. sativa</i> L.	AACCCDD 2n=6x=42	к-11480 Болгария	*FJ794718
<i>A. fatua</i> L.	AACCCDD 2n=6x=42	к-30 Россия	*FJ794719

В последовательности ITS2 (участок 1-158) были выявлены изменения в 21 позиции, в 15 из которых нуклеотиды С-генома полиплоидов совпадают с нуклеотидами, характерными для геномов диплоидных видов с геномом С (табл. 2). Позиции 20, 71, 102 и

125 сближают С-геном полиплоидов с видами *A. ventricosa* и *A. macrostachya*. 18-я позиция имеет видоспецифическую замену, характерную только для *A. ventricosa* и С-генома полиплоидов, за исключением *A. murphyi*. Интересна позиция 158: нуклеотид в этом положении в последовательностях ITS, амплифицированных с помощью С-геном-специфичных праймеров был таким же, как в ITS диплоидов с С-геномом, а в последовательностях ITS полиплоидных видов, амплифицированных методом геномного секвенирования с универсальных праймеров ITS1F и ITS4, этот сайт был полиморфным – в этом случае выявлялись варианты замен, характерные как для А-, так и для С-геномов. Недавно открытые виды *A. insularis* и *A. agadiriana* имеют в своем кариотипе геномы А-типа.

Результаты прямого секвенирования ITS-последовательностей диплоидных видов рода *Avena* с А-геномами и с С-геномами показали, что эти геномы различаются по многим позициям. Можно было бы ожидать, что у полиплоидных видов с кариотипами AC и ACD на хроматограммах будут наблюдаться полиморфные сайты, отражающие одновременное присутствие в этой позиции 2-х разных нуклеотидов в позициях, по которым геномы А и С различаются. Однако в большинстве случаев на хроматограммах обнаруживаются только нуклеотиды, характерные для геномов А-типа.

Это говорит о присутствии в полиплоидных геномах *Avena* преимущественно генов 45S рРНК геномов типа А. Гены 45S рРНК типа С у полиплоидов представлена лишь в минорных количествах, что хорошо совпадает с результатами экспериментов, где авторы картируя, гены 45S рРНК в кариотипах полиплоидов методом FISH, показали, что у полиплоидов с кариотипами AACС и AACСDD наиболее сильные сигналы гибридизации обнаружены на хромосомах А и D-субгеномов, а на хромосомах С-субгеномов сигналы не обнаруживаются, в то время, как хромосомы С-субгеномов утратили все или почти все гены 45S рРНК – на них располагаются только минорные сайты гибридизации или гибридизационных сигналов нет [7, 8, 16, 22]. Такого рода явления характерны для генов рРНК полиплоидов [10, 24].

На основании рассчитанных р-расстояний между видами по результатам секвенирования последовательностей ITS1 и ITS2, с использованием методов ближайшего соседа, метода максимальной парсимонии и метода UPMGA, были построены филогенетические деревья, отражающие наиболее вероятные топологии филогенетического древа всех исследованных нами видов рода *Avena*. Все они имели одинаковую топологию. Одно из них представлено на рисунке.

Как показано нами и другими исследователями ранее, виды с геномами А (включая полиплоиды, вне зависимости от наличия других геномов) и диплоидные виды с геномами С формируют отдельные клады в пределах рода *Avena* (bootstrap = 100), т.е. диплоидные виды с геномами С составляют сестринскую группу *Avena* с геномами А, АВ, АС, АСD [3, 32]. Эти данные хорошо совпадают с результатами сравнительного анализа RAPD и AFLP – паттернов диплоидных видов овсов с геномами А и С, где они также формируют две отдельные клады [2, 13]. Нам и, независимо, N. Nikolaudakis и A. Katsiotis [31], используя два разных набора праймеров, специфичных для ITS С-геномов, удалось выявить в составе геномов полиплоидов наряду с ITS-последовательностями А-типа минорные и неидентифицируемые обычным способом ITS-последовательности С-типа. На основании наших данных и данных греческой группы исследователей [31] можно заключить, что донором С-субгенома тетраплоидов и гексаплоидов являлся диплоидный вид *A. ventricosa*.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 09-04-01469-а и Программы «Динамика генофондов».

ЛИТЕРАТУРА

1. Лоскутов И. Г. Межвидовые скрещивания в роде *Avena* L. // Генетика. 2001. Т. 37. № 5. С. 581–590.
2. Перчук И. Н., Лоскутов И. Г., Окуно К. Изучение видового разнообразия овса с использованием RAPD-анализа // Аграрная Россия. 2002. № 3. С. 41–44.
3. Родионов А. В., Тюпа Н. Б., Ким Е. С., Мачс Э. М., Лоскутов И. Г. Геномная конституция автотетраплоидного овса *Avena macrostachya*, выявленная путем сравнительного анализа последовательностей ITS1 и ITS2: к вопросу об эволюции кариотипов овсов и овсюгов на ранних этапах дивергенции видов рода *Avena* // Генетика. 2005. Т. 41. №5. С. 646–656.
4. Родионова Н. Г., Солдатов В. Н., Мережко В. Е. и др. Овес // Культурная флора. 1994. Т. II, ч. 3. – 368 с.
5. Тюпа Н. Б. Кариосистематическое и молекулярно-филогенетическое исследование дикорастущих представителей рода *Avena* L. Автореф. Дисс... уч. степени канд. биол. наук. СПб. 2006. 152 с.
6. Шелухина О. Ю. Хромосомное и молекулярное маркирование видов рода *Avena* L. Дисс. ... канд. биол. наук. Москва. 2008, 195 с.
7. Шелухина О. Ю., Бадаева Е. Д., Лоскутов И. Г. и др. Сравнительное цитогенетическое исследование тетраплоидных видов овса с АС-геномным составом: *A. insularis*, *A. magna* и *A. murphyi* // Генетика. 2007. Т. 43. № 6. С. 747-761.
8. Шелухина О. Ю., Бадаева Е. Д., Брежнева Т. А. и др. Сравнительное исследование диплоидных видов рода *Avena* L. с использованием цитогенетических и биохимических маркеров: *A. pilosa* М.В. и *A. clauda* Dur. // Генетика. 2008. Т. 44. № 9. С. 1246-1251.
9. Baum B. R., Rajhathy T. A study of *Avena macrostachya* // Can. J. Bot. 1976. Vol. 54. P. 2434–2439.
10. Blattner P.R. Phylogenetic analysis of *Hordeum* (*Poaceae*) as inferred by nuclear rDNA ITS sequences // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2004. Vol. 33. P. 289-299.
11. Chen Q., Armstrong, K. Genomic in situ hybridization in *Avena sativa* // Genome. 1994. Vol. 37. P. 607–612.
12. Doyle J. J., Doyle J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochem. Bull. 1987. V. 19. P. 11–15.
13. Drossou A., Katsiotis A., Leggett J. M. et al. Genome and species relationships in genus *Avena* based on RAPD and AFLP molecular markers // Theor. Appl. Genet. 2004. Vol. 109. P. 48-54.
14. Fabjanski S., Fedak G., Armstrong K., Altosaar I. A repeated sequence probe for the C-genome in *Avena* (oats) // Theor. Appl. Genet. 1990. Vol. 79. P. 1–7.
15. Fominaya A., Vega C., Ferrer E. Giemsa C-banded karyotypes of *Avena* species // Genome. 1988. Vol. 30. P.627-632.
16. Fominaya A., Hueros G., Loarce Y. et al. Chromosomal distribution of repeated DNA sequence from C-genome heterochromatin and the identification of a new ribosomal DNA locus in the *Avena* genus // Genome. 1995. Vol. 38. P. 548-557.
17. Fu Y.-B., Williams D. J. AFLP variation in 25 *Avena* species // Theor. Appl. Genet. 2008. Vol. 117. P. 333-342.
18. Fominaya A., Hueros G., Loarce Y. et al. Chromosomal distribution of a repeated DNA sequence from C-genome heterochromatin and the identification of a new ribosomal DNA locus in the *Avena* genus // Genome. 1995. Vol. 38. P. 548-557.
19. Gardes M., Brunes T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts // Mol. Ecol. 1993. V. 2. P. 130–138.
20. Grebenstein B., Roser M., Sauer W., Hemleben V. Molecular phylogenetic relationships in *Aveneae* (*Poaceae*) species and other grasses as inferred from ITS1 and ITS2 rDNA sequences // Plant Syst. Evol. 1998. V. 213. P. 233-250.
21. Irigoyen M. L., Loarce Y., Linares C. et al. Discrimination of the closely related A and B genomes in AABB tetraploid species of *Avena* // Theor. Appl. Genet. 2001. Vol. 103. P. 1160–1166.
22. Jellen E. N., Gill B. S., Cox T. S. Genomic in situ hybridization differentiates between A/D- and C-genome chromatin and detects intergenomic translocation in polyploidy oat species (genus *Avena*) // Genome. 1994. Vol. 37. P. 613-618.
23. Katsiotis A., Hagidimitriou M., Heslop-Harrison J. S. The close relationship between the A and B genomes in *Avena* L. (*Poaceae*) determined by molecular cytogenetic analysis of total genomic, tandemly and dispersed repetitive DNA sequences // Ann. Bot. 1997. Vol. 79. P. 103–109.

24. Kovarik A., Pires J. C., Leitch A. R. et al. Rapid concerted evolution of nuclear ribosomal DNA in two Tragopogon allopolyploids of recent and recurrent origin // Genetics. 2005. Vol. 169. P. 931–944.
25. Ladizinsky G. A new species of *Avena* from Sicily, possibly the tetraploid progenitor of hexaploid oats // Genet. Resour. Crop Evol. 1998. Vol. 45. P. 263-269.
26. Leggett J. M. A new triploid between *Avena eriantha* and *A. macrostachya* // Cereal Res. Commun. 1990. Vol. 18. P. 97-101.
27. Leggett J. M., Markhand G. S. The genomic structure of *Avena* revealed by GISH // Kew Chromosome Conference IV. 1995. P. 133–139.
28. Linares C., Ferrer E., Fominaya A. Discrimination of the closely related A and D genomes of the hexaploid *Avena sativa* L. // Pros. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. Vol. 95. P. 12450 – 12455.
29. Loskutov I. G. On evolutionary pathways of *Avena* species // Gen. et Resour. Crop Evol. 2008. Vol. 55. P. 211-220.
30. Messing J. M13 cloning vehicles. Their contribution to DNA sequencing // Methods Mol. Biol. 1993. Vol. 23. P. 9–22.
31. Nikoloudakis N., Katsiotis A. The origin of the C-genome and cytoplasm of *Avena* polyploids // Theor. Appl. Genet. 2008. Vol. 117. P. 273–281.
32. Nikoloudakis N., Skaracis G., Katsiotis A. Evolutionary insights inferred by molecular analysis of the ITS1-5.8S-ITS2 and IGS *Avena* sp. sequences // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2008. Vol. 46. P. 102-115.
33. Rajhathy T., Thomas H. Cytogenetics of Oats (*Avena* L.) // Ottawa: Genet. Soc. Can. Misc. Publ. 1974. No. 2. P. 1–90.
34. Sanger F., Niclein S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. P. 5463–5467.
35. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 // Molecular Biology and Evolution. 2007. Vol. 24. P. 1596–1599.
36. 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 Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. San Diego: Acad. Press, 1990. P. 315–322.

N. B. TYUPA,
E. S. KIM,
I. G. LOSKUTOV,
A. V. RODIONOV

ON THE ORIGIN POLYPLOIDS IN THE AVENA L. GENUS: A MOLECULAR-PHYLOGENETIC INVESTIGATION

Summary

In order to identify diploid species that could serve as a potential donor of the C genome for the polyploid species of *Avena* L. (oat), the ITS1 and ITS2 sequences of nuclear 45S RNA genes from the tetraploid *A. magna* (syn. *A. maroccana*) (AACC or CCDD), *A. murphyi* (AACC or CCDD), *A. insularis* (AACC or CCDD), *A. vaviloviana* (AABB), *A. barbata* (AABB), *A. agadiriana* (AABB), hexaploid *A. fatua* (AACCDD), *A. sativa* (AACCDD), *A. occidentalis* (AACCDD), as well as ITS from the diploid oat species *A. strigosa* (AsAs) and *A. prostrata* (ApAp) have been sequenced. The SCAR analysis employing original C genome ITS-specific primers (constructed by the authors) has shown that the most possible ancestor that had passed the C subgenome to the tetraploids *A. magna*, and *A. murphyi* and hexaploids *A. sativa* and *A. occidentalis*, was the species *A. ventricosa*.