

Санкт-Петербургский государственный университет

Каф. цитологии и гистологии

НАГНИБЕДА

Николай Николаевич

**Молекулярно-филогенетическое исследование знаков круга родства
рода *Catabrosa* P. Beauv.**

Магистерская диссертация

Работа выполнена в лаборатории биосистематики и цитологии ФГБУН

Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН

Научный руководитель:

д.б.н., проф. А.В. Родионов

Санкт-Петербург

2016

Содержание

| | | |
|----|---|----|
| 1. | Введение | 3 |
| 2. | Обзор литературы | 6 |
| | 2.1. Описание объекта исследования: <i>Catabrosa aquatica</i> sensu lato и ее системе злаков с точки зрения ботанической систематики. | 6 |
| | 2.2. Место рода <i>Catabrosa</i> в системе сем. Poaceae. | 10 |
| | 2.3. Молекулярные маркеры, используемые в филогенетических исследованиях в ботанике | 11 |
| 3. | Материал и методы .. | 14 |
| | 3.1. Материал для исследования. | 14 |
| | 3.2. Секвенирование последовательностей ITS1–5.8S рДНК–ITS2 | 14 |
| | 3.2.1. Выделение геномной (тотальной) ДНК | 14 |
| | 3.2.2. Амплификация участка гена пре-рРНК | 14 |
| | 3.2.3. Установление нуклеотидной последовательности (секвенирование) | |
| | 3.3. Методы первичной обработки полученных последовательностей | 15 |
| | 3.4. Сравнимые последовательности. | 15 |
| | 3.5. Алгоритмы построения филогенетических древ. | 16 |
| | 3.6. Метод сравнительного анализа вторичных структур РНК-копий генов ITS1, ITS2 и 5.8S рРНК | 18 |
| 4. | Результаты и обсуждение | 19 |
| 5. | Выводы | 30 |
| 6. | Благодарности | 30 |
| 7. | Список литературы | 32 |

1. Введение.

Современный этап развития эволюционной цитологии растений характеризуется принципиально новыми возможностями, появившимися с развитием новых технологий определения последовательностей ДНК, развитием математических моделей, описывающих процесс накопления нуклеотидных замен в ДНК при дивергенции таксонов и появлением компьютерной техники, позволяющей обрабатывать большие массивы данных методами биоинформатики. При этом очевидно, что корректная интерпретация данных геносистематики требует изучения молекулярно-генетических механизмов формо- и видообразования, правильного понимания общих и частных закономерностей в эволюции геномов у представителей исследуемых филогенетических групп (Ней, Кумар, 2004; Антонов, 2006).

Появление методов сравнительного изучения геномов дало в руки исследователей, работающих в области систематики животных и растений, новый инструмент для изучения родственных отношений между видами. Методы геносистематики позволяют оценивать степень генетического родства между видами и родами исследуемых организмов, верифицировать существующие и предлагать новые, основанные на сравнительном исследовании ДНК, филогенетические гипотезы. Особенно актуально использование этого экспериментального подхода когда исследователь имеет дело с таксономически сложными видами и родами, с таксонами, о системе и границах которых существуют противоречивые, иногда диаметрально противоречивые мнения.

Одна из таких групп - семейство Злаки (Poaceae) и, в частности, основной объект нашего исследования – злаки небольшого рода *Catabrosa* (Поручейница).

До недавнего времени считалось, что в составе рода всего один или

несколько видов. Монотипным родом с единственным видом *C. aquatica* считал род Н.Н. Цвелев (1976). Другие исследователи полагали, что помимо широко распространенного вида с несколькими подвидами *C. aquatica* (Европа, Азия, Сев.и Южн. Америки, Африка) существует еще и южно-американский вид *C. werdermannii* (Боливия, Аргентина, Чили) (Soreng, Fish, 2011). Так как *C. aquatica* считалась видом полиморфным, с несколькими подвидами (Цвелев, 1976), иногда некоторые из подвидов *C. aquatica* рассматривались как виды, в частности выделяли азиатский вид *C. carusii* (Китай, Иран, Ирак, Киргизия, Таджикистан, Турция, Узбекистан) и *C. pseudoaeroides* (побережья Каспийского моря и Арала) (Soreng, Fish, 2011).

Однако недавно система этого рода была радикально пересмотрена Н.Н. Цвелевым (2013), который выделил из рода *C. aquatica* 12 новых видов, 8 из которых встречаются во флоре России и сопредельных территорий. Затем Пунина и соавт. (2015) высказали предположение, что вид *C. aquatica* почти не встречается в Сибири (доходит из Европы только до Тюмени) и замещен в западной Сибири другим видом, для которого было предложено название *C. ledebourii*. Эти же авторы нашли еще один вид Поручейницы в Горном Алтае. Все это определило цель и задачи нашей работы.

Цель исследования:

использовать методы секвенирования ДНК и методы сравнительного анализа нуклеиновых кислот для исследования филогенетических отношений между видами рода *Catabrosa* P. Beauv., в частности, определить место в системе рода двух новых видов рода *Catabrosa*, недавно открытых на Алтае.

Кроме того, представляло интерес определить место рода *Catabrosa* среди других родов сем. Злаков.

Для достижения этой цели перед нами были поставлены следующие

задачи:

Выделить ДНК из 4 новых и 2 ранее описанных видов рода *Catabrosa*.

Секвенировать район внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1 и ITS2, а также последовательность гена 5.8S рРНК исследуемых видов.

Сравнить последовательности района ITS1-5.8S рДНК-ITS2 секвенированных нами видов с соответствующими районами генома еще 3-х видов *Catabrosa*, секвенированных ранее и, используя методы молекулярной филогении, оценить генетические расстояния между новыми видами *C. ledebourii* и *C. bogutensis* и ранее описанными видами *C. aquatica* и *C. minor*, а также определить положение этих видов в системе рода *Catabrosa*.

Используя методы молекулярной филогении определить положение группы видов *Catabrosa* в системе сем. Poaceae.

2. Обзор литературы

2.1. Описание объекта исследования: *Catabrosa aquatica* sensu lato и ее место в системе злаков с точки зрения ботанической систематики.

Catabrosa или Поручейница – это небольшой космополитный род околоводных злаков, относящийся к трибе Мятликовых (Poeae). Название происходит от греческого *katabrosis* – «выгрызенный» и указывает на специфическую форму колосковых чешуй. Долгое время род считался монотипным, включающим только один описанный из Европы вид *Catabrosa aquatica* (L.) P. Beauv. Линней описал его как *Aira aquatica* L. (рис. 1, 2).



Рисунок 1. *Aira aquatica* из гербария К. Линнея (<http://www.linnean-online.org/27797/>)



Рисунок 2. *Catabrosa aquatica* (L.) P. Beauv.

Иллюстрация из книги Curtis W., *Flora Londinensis*, vol. 1: t. 5, 1775-1777

Позднее, в 1812 г., А.-М.-Ф.-Ж. Палисот де Бевуа (1812) предложил выделить линнеевский вид *Aira aquatica* в отдельный новый род *Catabrosa*. В 1884 г. Франше (цит. по: Цвелев, 2013) описал еще один вид поручейницы из Таджикистана, которому он дал название *C. capusii*. Растения этого вида отличаются очень узкой сжатой метелкой и почти черными колосками. Видовой статус *C. capusii* признавался не всегда и не всеми. Так в монографии 1976 г. Н.Н. Цвелёв считал род *Catabrosa* монотипным, включающим только вид *Catabrosa aquatica*, но в пределах этого вида он выделял три подвида:

1. *C. aquatica* subsp. *pseudoiroides* (Herrm.) Tzvel.– встречается у берегов водоёмов, на влажных песчаных местах. Ареал: Европейская часть: Нижний Кавказ: Дагестан, Восточное Закавказье, Талыш; Средняя Азия: Арало-Каспий (полуостров Мангышлак). Вне СССР: Иран (северный). Описан из дельты Волги – тип (“Circum Astrachan humidis, leg. Blume”), $2n=10$.

2. *C. aquatica* subsp. *aquatica* – *Aira aquatica* L.1753 – встречается по берегам водоёмов, на болотистых лугах, болотах, галечниках; до верхнего горного пояса.

Ареал: Европейская часть РФ: Арктика (полуостров Колгуев близ села Бугрино и заносима в Воркуте), Кольский полуостров, Карелия, Прибалтика, Ладога-Ильмень, Дв.-Печора (западная) Верхене-Днепровье, Волжско-Донск, Заволжье, Молдова, Причерноморье, Нижн.-Дон., Крым. Кавказ.

3. *C. aquatica* subsp. *capusii* (Franch.) Tzvel. – вид распространен в горах Средней Азии. Вне РФ – Иран¹, $2n=20$ (Цвелев, 1976).

В 2013 г. Н.Н. Цвелев пересмотрел свои взгляды на систему рода *Catabrosa*. По его мнению, с точки зрения изучения биоразнообразия флоры, предпочтительно понимать виды монотипически и придавать бывшим подвидам видовой статус. На этом основании, Н.Н. Цвелев выделил из состава вида *C. aquatica* 12 видов в Евразии, кроме того, он признавал существование в высокогорьях Анд вида *C. werdermannii* (Pilg.) Nicora et Rugolo (Цвелев, 2013). Из них во флоре России встречаются виды:

1. *C. aquatica* (L.) Beauv.
2. *C. pseudoiroides* (Herrm.) Tzvel.
3. *C. atrata* (Tzvel.) Tzvel. – новый вид, распространенный на Зап.-, Центр.- и Вост.-Кавказе; вне России: Юго-Зап. Азия (горы). – Описан из Армении,

¹ Так у Цвелева (1976). Соренг и Фиш пишут, что этот вид (подвид) распространен в Китае, Иране, Ираке, Киргизии, Таджикистане, Турции, Узбекистане (Soreng, Fish, 2011).

тип («Armenia, ripa lac. Sevan, pag. Gjunej, 9 VIII 1986, G. Menitsky, T. Rorova»). По буроватым колючкам и более густым метёлкам приближается к высокогорному среднеазиатскому виду *C. capusii*.

4. *C. kneuckeri* Tzvelev - новый вид, распространенный по южному побережью Балтийского моря. В РФ найден в Ленинградской области.

5. *C. minor* (Bab.) Tzvelev – новый, выделенный Цвелевым арктический вид, возможно сформировавшийся в плейстоцене из *C. kneuckeri* (Цвелев, 2013).

6. *C. longissima* Tzvelev – новый вид, отличающийся крупными размерами и широкими листьями, в РФ найден в горах Большого Кавказа, распространен также в Армении, Азербайджане, Турции, Иране (Цвелев, 2013).

В 2015 г. Е.О. Пунина и соавт. опубликовали сообщение, согласно которому *C. aquatica* не растет в Сибири; все образцы, определенные как *C. aquatica* с территорий восточнее Тюмени, по мнению этих авторов обладают особой морфологией и относятся к новому виду *C. ledebourii* Punina et Nosov. Кроме того, эти же авторы описали еще один вид поручейниц из Горного Алтая – *C. bogutensis* (Пунина и др., 2015). Интересно, что эти два вида были октоплоидами ($2n=40$) – уровень пloidности, который никогда не встречался ранее среди поручейниц (Пунина и др., 2015).

С молекулярно-филогенетической точки зрения, обоснованность разделения вида *C. aquatica* на несколько (много) разных видов, равно как и обоснованность выделения сибирских образцов *C. aquatica* в новый вид *C. ledebourii* ранее не исследовалась. Кроме того, существуют разные мнения относительно того, относится ли к роду *Catabrosa* вид из южноафриканских гор *C. drakensbergensis* (Hedberg et I. Hedberg) Soreng et Fish. Соренг и Фиш отнесли этот вид к роду *Catabrosa* (Soreng, Fish, 2011), а Н.Н. Цвелев (2013) полагает, что это не поручейница, а дюпонтия – *Dupontia drakenbergensis* (Hedberg et I. Hedberg) Tzvelev.

2.2. Место рода *Catabrosa* в системе сем. Poaceae.

К настоящему времени можно выделить две основных точки зрения на положение рода *Catabrosa* в семействе *Poaceae*. Род *Catabrosa* отечественные систематики относят к подтрибе *Poinae* Dumort. (Цвелев, 1976, 2013; Tzvelev, 1989), в которую кроме рода *Catabrosa* включают *Poa* L., *Eremopoa* Roshev., *Hyalopoa* (Tzvelev) Tzvelev, *Paracolpodium* (Tzvelev) Tzvelev, *Arctophila* (Rupr.) Andersson, *Dupontia* R. Br., *Catabrosella* (Tzvelev) Tzvelev, *Catabrosa* P. Beauv., *Phippsia* (Trin.) R. Br., *Puccinellia* Parl., *Sclerochloa* P. Beauv., *Colpodium* Trin, *Torreyochloa* G.L. Church., *Zingeria* P.A. Smirn.

По мнению Соренга и Девиса, основанному на молекулярно-филогенетических данных, род Поручейница следует выделить из подтрибы *Poinae* в подтрибу *Puccinelliinae*, включающую рода *Catabrosa*, *Colpodium*, *Paracolpodium*, *Phippsia*, *Puccinellia* и *Sclerochloa* (Soreng et al. 2003). Позднее Гиллеспи с соавт. (Gillespie et al., 2010) предложила несколько другой состав подтрибы *Puccinelliinae*: *Catabrosa*, *Catabrosella*, *Hyalopoa*, *Oreopoa*, *Paracolpodium*, *Phippsia*, *Pseudosclerochloa*, *Puccinellia*, *Sclerochloa*.

Цвелёв (2013) выразил несогласие с выделением подтрибы *Puccinelliinae*, мотивировав это морфологическим сходством *Catabrosa* и *Catabrosella* (*Catabrosella* не рассматривалась в первом варианте состава подтрибы, предложенной Соренгом), а также тем, что *Catabrosella* морфологически близка части видов *Puccinellia*, например *P. subspicata*, и *Poa*. Он допускал вынесение в отдельную подтрибу только родов *Colpodium* и *Zingeria* в силу числа хромосом и морфологической обособленности.

Таким образом, проблема положения рода *Catabrosa* в сем. Poaceae, возможно, еще не решена.

2.3. Молекулярные маркеры, используемые в филогенетических исследованиях в ботанике.

Работа, в которых впервые высказывалась мысль о том, что ДНК может быть видоспецифичной, была опубликована Чаргаффом еще в 1950 г. (Шнеер, 2007). Но в систематике животных и растений различия в ней начали использоваться лишь после того, как были разработаны методы фрагментного анализа ДНК, такие как анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ – RFLP), затем, после внедрения ПЦР, анализ амплификатов, полученных со случайными праймерами (RAPD), анализ полиморфизма микросателлитов, участков, находящихся между микросателлитами (ISSR-PCR) и др. (Шнеер, 2007). Затем появились эффективные методы секвенирования ДНК, при этом в ботанике исследовались в качестве маркеров чаще всего некодирующие участки хлоропластного генома – интроны генов *rpl16*, *rps16*, *rpoC1*, *trnK*, *trnL* и межгенные спейсеры (*trnL-trnF*, *trnT-trnL*, *atpB-rbcL*, *psbA-trnH*), репертуар ядерных участков был весьма ограничен, преимущественно использовались внутренние транскрибируемые спейсеры (ITS1 и ITS2) рРНК, реже - интроны РНК-полимераз, гены алкогольдегидрогеназ (*Adh*) и другие (Антонов, 2006; Шнеер, 2007). Среди последних, несомненно, чаще всего секвенируются и анализируются последовательности внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1 и ITS2 ядерных генов рРНК. Это определяется несколькими причинами: 1) наличием специфичных для высших растений праймеров, позволяющих амплифицировать район ITS1–5.8S рДНК–ITS2 у широкого круга растений, не амплифицируя при этом рДНК эндогенных и экзогенных грибов, случайно попавших в образец последовательностей ДНК млекопитающих и т.п.; 2) мультикопийностью ядерных генов рРНК в геноме, что повышает вероятность успешной амплификации при работе даже со старыми гербарными образцами; 3) оптимальным размером ампликонов района ITS1–5.8S рДНК–ITS2 (около 700 п.н. у большинства растений; 4)

оптимальным для межвидовых сравнений уровнем дивергенции ITS (Feliner, Rossello, 2007; Шнеер, 2007, 2009).

Положение спейсеров ITS1 и ITS2 в составе гена 35S рРНК приведено на рис. 3. Видно, что амплифицируемый фрагмент лежит между консервативными генами.

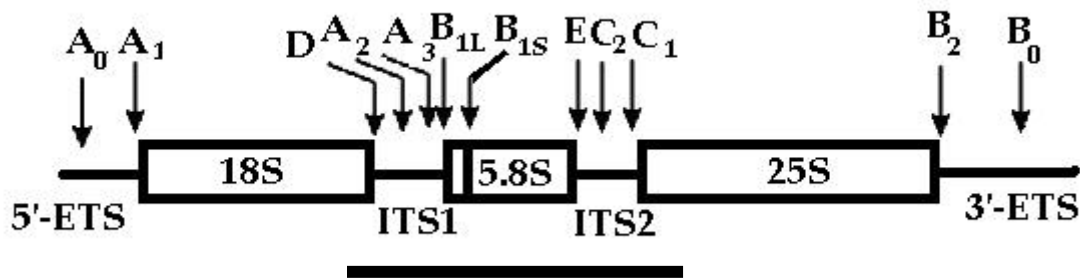


Рисунок 3. Организация генов 35S-рРНК растений. ITS – внутренние транскрибируемые спейсеры (*internal transcribed spacers*), ETS – внешние транскрибируемые спейсеры (*external transcribed spacers*). А-Е - сайты разрезания пре-рРНК в ходе процессинга. Линия в нижней части рисунка – амплифицируемый участок ДНК (по Henras et al., 2008, модифицировано).

При процессинге пре-рРНК спейсеры ITS1 и ITS2 вырезаются. Первоначально от пре-рРНК отрезается 5'-ETS и затем происходит разрезание пре-рРНК между 18S рРНК и ITS1 - тем самым формируется РНК-компонент малой субъединицы рибосомы. Затем происходит разрезание молекулы между 26S рРНК и 3'-ETS, 26 S рРНК и ITS2, 5.8S рРНК и ITS2. По крайней мере, вырезание 5'-ETS и ITS1 происходит в ядрышке. Разрезание пре-РНК сопряжено с процессами метилирования рибозных остатков и псевдоуридинирования пре-р-РНК - какое значение имеют эти модификации для процессинга пока неизвестно. Начальные этапы этого процесса идут в ядрышке, а затем в особых внутриядерных компартментах – производных ядрышка, называемых NDF (*nucleolus-derived foci*) и в

окружающем хромосомы пространстве, завершающие – в цитоплазме (Henras et al., 2008).

В момент транскрипции пре-рРНК определенным образом складывается, формируя вторичную структуру с протяженными двунитевыми участками и относительно короткими однонитевыми треками. Такая структура характерна и для участков транскрипта, которые станут молекулами 26-27S рРНК, 5.8S рРНК, 18S рРНК, так и для транскрибируемых спейсеров ITS1 и ITS2 (Coleman, 2007; Henras et al., 2008).

Показано, что филогенетические гипотезы, построенные на основании секвенирования последовательностей ITS1 – 5.8S-рДНК – ITS2, как правило, выглядят вполне правдоподобно, ведется ли сравнение на межвидовом и межродовом уровнях, или при изучении групп организмов, имеющих более высокие таксономические ранги (Шнеер, 2009).

3. Материал и методы

3.1 Материал для исследования.

Для секвенирования последовательностей ITS видов мы использовали гербарные образцы *Catabrosa*, собранные на Алтае и в Ленинградской области. Гербарные образцы хранятся в гербарии лаборатории биосистематики и цитологии БИН РАН. Растительный материал для исследования были также взят из гербарных коллекций БИН РАН (LE). Для проведения молекулярно-филогенетического исследования мы также использовали последовательности, депонированные в базу данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites>) .

3.2. Секвенирование последовательностей ITS1–5.8S рДНК–ITS2

3.2.1. Выделение геномной (тотальной) ДНК

Выделение геномной ДНК из гербарных образцов проводилось по общепринятой методике СТАВ (Doyle, Doyle, 1987). Эта методика заключается в последовательной ферментативной обработке размолотого образца ткани растения, чередуемой с центрифугированием для отделения ДНК от прочих компонентов и получения её чистого раствора.

3.2.2. Амплификация участка гена пре-рРНК

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) —метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе). Для амплификации использовали праймеры ITS 1P (Ridgway et al., 2003) и ITS4 (White et al, 1990).

Полимеразная цепная реакция была проведена по стандартным методикам на амплификаторе «Techne TC412» (Barloworld Scientific, UK). Параметры циклов амплификации: 1 цикл: 10 мин 94 °С; 35 циклов: 1 мин 94 °С; 1 мин 48 °С; 1 мин 72 °С; 1 цикл: 1 мин 72 °С. Для выделения ДНК из геля пользовались набором QIAquick Gel Extraction Kit (250) (Qiagen) по соответствующему протоколу. Для контроля качества амплификации и выделения геномной ДНК необходимого фрагмента и при подготовке образца для секвенирования использовался метод электрофореза в агарозном геле и анализ на спектрофотометре «Nanodrop».

3.2.3 Установление нуклеотидной последовательности (секвенирование)

Секвенирование нуклеиновых кислот — ДНК и РНК — определение их аминокислотной или нуклеотидной последовательности (от лат. sequentum — последовательность). В результате секвенирования получают формальное описание первичной структуры линейной макромолекулы в виде последовательности мономеров в текстовом виде. Секвенирование проводили на секвенаторе Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer в ЦКП БИН РАН. Для секвенирования применялся метод Сэнгера с дидезоксинуклеозидтрифосфатами (ddNTP) (Sanger et al., 1977). Секвенирование проводилось в обоих направлениях.

3.3. Методы первичной обработки полученных последовательностей

Для конвертации последовательности, полученной с обратного праймера, использовалась программа «Простые операции с нуклеотидными последовательностями», расположенная на молекулярно-биологическом ресурсе http://www.molbiol.ru/scripts/01_12.html. При объединении последовательностей, полученных с разнонаправленных праймеров, использовались программы Microsoft Office Word 2003 (v. 11) и MEGA6.

(www.megasoftware.net). Полученные последовательности сравнивались с имеющимися в базе данных GenBank с помощью программы поиска BLAST, расположенной на сервере NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>; Altschul et al., 1997). Выравнивание полученных последовательностей выполнялось с помощью программы Clustal W, входящей в пакет программ MEGA6. Полученные нами последовательности были депонированы в международную базу данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Кроме полученных нами последовательностей при построении филогенетических деревьев нами использовались последовательности из этой базы данных. Ввиду затруднённого расчёта одновременно большого числа последовательностей, при определении положения рода Поручейница среди всех Poaceae, были взяты по одному представителю каждого рода злаков.

3.4. Сравнимые последовательности.

Для установления филогенетических отношений использовались последовательности ITS1 и ITS2, а также ген 5,8S РНК, расположенный между ними.

3.5. Алгоритмы построения филогенетических деревьев.

Результат выравнивания проверялся вручную и затем рассчитывали топологию филогенетического дерева, используя для этого четыре разных метода – метод расстояний, метод максимальной парсимонии, метод максимального правдоподобия и байесовский метод.

Для определения наиболее вероятной модели накопления мутаций в ITS использовалась программа ModelTest 3.7. Использовалась модель с наименьшим значением Akaike Information Criterion, в нашем случае это была модель GTR+I+G (General Time Reversible, с гамма-распределением). Для

построения дерева методом максимальной парсимонии использовалась программа RAUP 4.0b10.

В качестве метода расстояний был выбран метод объединения ближайших соседей (*neighbour-joining*), встроенный в программу MEGA6. Статистическая достоверность полученных клад оценивалась путем расчета бутстреп-индекса при 1000 репликациях, в качестве модели замен использовалась двухпараметрическая модель Кимуры с попарным удалением гэпов (пробелов).

Метод максимального правдоподобия или метод наибольшего правдоподобия (ML — англ. *maximum likelihood estimation*) в математической статистике — это метод оценивания неизвестного параметра путём максимизации функции правдоподобия. Основан на предположении о том, что вся информация о статистической выборке содержится в функции правдоподобия. Метод максимального правдоподобия был проанализирован, рекомендован и значительно популяризирован Р. Фишером между 1912 и 1922 годами (хотя ранее он был использован Гауссом, Лапласом и другими). Оценка максимального правдоподобия является популярным статистическим методом, который используется для создания статистической модели на основе данных, и обеспечения оценки параметров модели (Ней, Кумар, 2004).

Метод максимальной парсимонии основывается на том, что, если два организма обладают некоторым общим признаком, они должны быть более близки генетически, чем третий организм, у которого этого признака нет. Для расчета филогенетического древа этим методом используют матрицу дискретных филогенетических признаков, далее рассчитывается такая топология древа, одного или нескольких, у которых длина ветвей минимальна. Такое древо с наиболее благоприятным счетом принимается за наиболее вероятное с точки зрения оценки филогенетических отношений исследуемых таксонов (Ней, Кумар, 2004).

Байесовский подход является развитием вероятностного метода, разработанного английским математиком и священником Томасом Байесом

на основе теоремы Байеса. Позднее современную формулировку теоремы вывел Пьер-Симон Лаплас. В 1953 году Николас Метрополис ввел методы Монте-Карло для Марковских цепей (МСМС, Markov chain Monte Carlo). Преимущества в скорости вычислений и возможность интеграции с методами МСМС позволили Байесовскому подходу стать одним из самых популярных методов статистического вывода. Для построения деревьев байесовским методом мы использовали программу Mr.Bayes 3.1 (Ronquist, Huelsenbeck, 2003). Данные предварительно переводились в формат NEXUS, и выполнялся анализ с использованием модели GTR+I+G в течение 500 тысяч генераций.

По сравнению с другими методами построения филогенетических деревьев (метод максимальной экономии, метод максимального правдоподобия), он позволяет учитывать филогенетическую неопределенность, использовать априорную информацию и сложные модели эволюции, для которых традиционные методы имеют вычислительные ограничения.

3.6.Метод сравнительного анализа вторичных структур РНК-копий генов ITS1, ITS2 и 5.8S рРНК

Возможные вторичные структуры РНК рассчитывали с помощью программы Mfold, работающей на основе алгоритма Цукера (Zuker, 1989, 2003).

4. Результаты и обсуждение.

Мы секвенировали район ITS1-ген 5.8S рРНК- ITS2 генов 35S рРНК у 6 видов рода *Catabrosa*. Сравнительное исследование этих последовательностей у всех видов рода *Catabrosa* показало, что длина ITS1 у *Catabrosa* составляет 217-218 п.н., длина ITS2 – 214-215 п.н., длина 5.8S рРНК – 161 п.н. Из них вариабельных позиций в пределах рода позиций - 12 в ITS1, 9 в 5,8S рРНК и 17 в ITS2. Консенсусные последовательности ITS1 и ITS2 приведены на рис. 4 и 5.

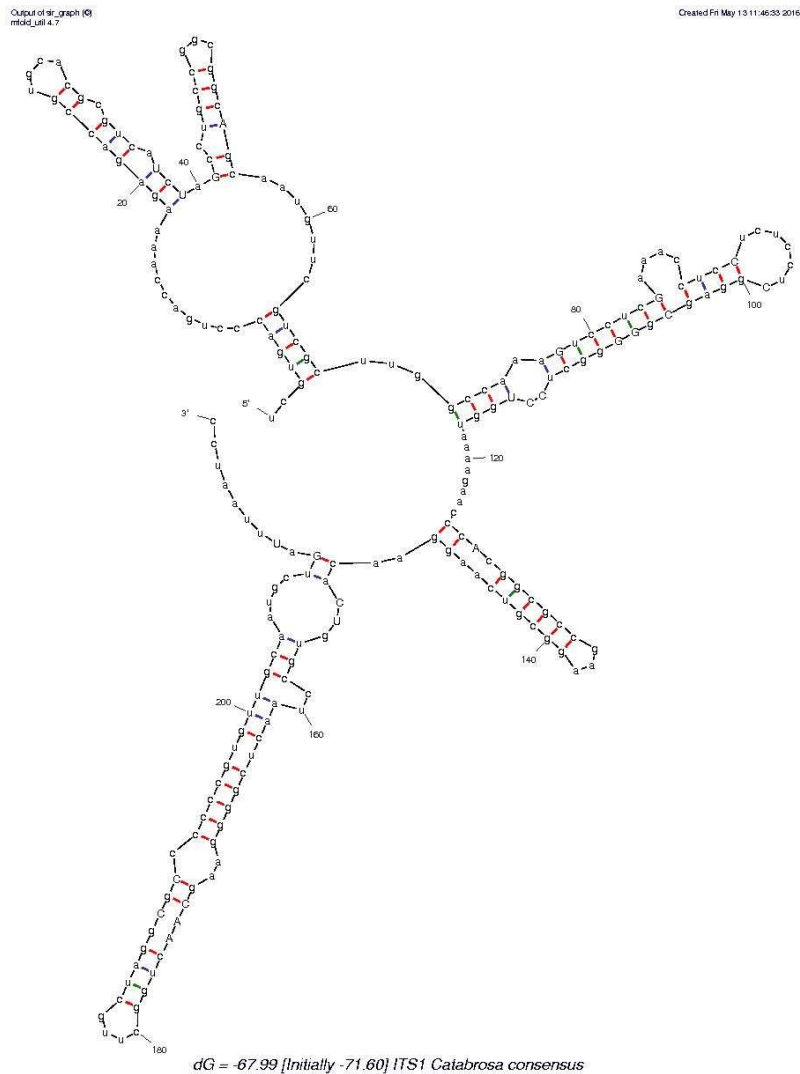
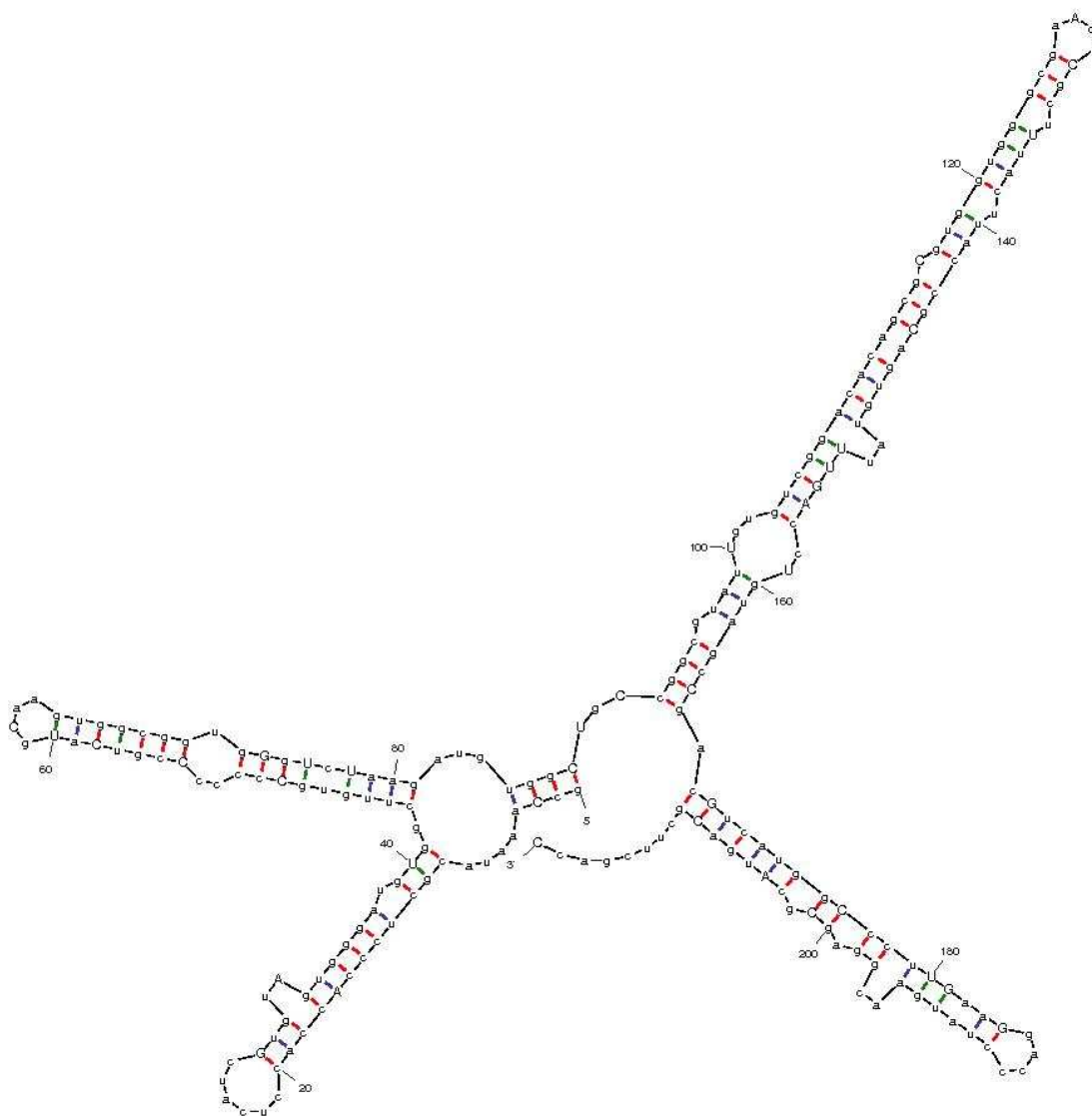


Рисунок 4. Наиболее энергетически выгодная вторичная структура ITS1 гена 35S рРНК у видов рода *Catabrosa* (консенсусная последовательность для рода), рассчитанная нами в программе Mfold по алгоритму Zuker'a.



$dG = -79.48$ [Initially -81.10] ITS2 consensus

Рисунок 5. Наиболее энергетически выгодная вторичная структура ITS2 гена 35S рРНК у видов рода *Catabrosa* (консенсусная последовательность для рода), рассчитанная нами в программе Mfold по алгоритму Zuker'а.

Мы сравнили последовательности ITS разных видов и нашли, что сравнение переменных сайтов у видов рода *Catabrosa* показывает, что выделенные Н.Н. Цвелевым из *C. aquatica* виды, как правило, отличаются друг от друга по последовательностям ITS (рис. 6 и 7). При этом *Catabrosa ledebourii* и *C. bogutensis* по нескольким значимым позициям отличаются от всех других видов *Catabrosa* – то есть выделение этих видов из вида *C. aquatica* обосновано с молекулярно-филогенетической точки зрения. При этом вид эндемик Алтая *C. bogutensis* отличается от североевропейского вида *C. minor* – это важно, так как при описании вида *C. bogutensis* ботаники испытывали некоторые трудности и сомнения – по морфологии *C. bogutensis* довольно сильно похож на арктический вид *C. minor* (Н.Н. Носов, личное сообщение).

Из рис. 6 и 7 видно, что виды *C. kneuckeri* и *C. minor* отличаются по ITS от *C. aquatica*, но по последовательностям ITS они близки или идентичны, хотя и различаются по морфологии, что согласуется с гипотезой Н.Н. Цвелева, что *C. minor* является северным дериватом *C. kneuckeri* (Цвелев, 2013).

На рис. 8 представлены переменные позиции в относительно консервативном гене 5.8S рРНК. Их анализ позволяет прийти к тем же выводам: 1. *Catabrosa ledebourii* и *C. bogutensis* по нескольким значимым позициям отличаются от всех других видов *Catabrosa*; 2. Несмотря на морфологическое сходство, вид эндемик Алтая *C. bogutensis* отличается от североевропейского вида *C. minor*; 3. *C. minor* и *C. kneuckeri* близкие виды.

Далее нами были рассчитаны генетические расстояния (p-distance – см. Ней, Кумар, 2004) между видами рода *Catabrosa* и круга их родства, на основании сравнения последовательностей района ITS1-5.8SpДНК-ITS2. Эти данные приведены нами в табл. на рис. 9. Из таблицы видно, что виды рода *Catabrosa*, судя по маркеру ITS – филогенетически компактная группа. P-расстояния между ними в пределах 2%, а между видами рода *Catabrosa* и видами рода *Puccinellia* – 5-6%.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|
| 1. <i>Catabrosa aquatica</i> Georgia | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2. <i>Catabrosa kneuckeri</i> | 0.014 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3. <i>Catabrosa minor</i> Chinenko | 0.013 | 0.000 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4. <i>Catabrosa minor</i> Y2 | 0.013 | 0.000 | 0.000 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5. <i>Catabrosa minor</i> | 0.011 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | | | | | | | | | | | | | | |
| 6. <i>Catabrosa bogutensis</i> Alt 11-73 | 0.012 | 0.015 | 0.015 | 0.015 | 0.011 | | | | | | | | | | | | | |
| 7. <i>Catabrosa ledebouri</i> | 0.022 | 0.019 | 0.019 | 0.019 | 0.011 | 0.007 | | | | | | | | | | | | |
| 8. <i>Catabrosa ledebourii</i> alt 10-113 | 0.014 | 0.017 | 0.017 | 0.017 | 0.015 | 0.000 | 0.007 | | | | | | | | | | | |
| 9. <i>Catabrosa capusii</i> | 0.015 | 0.019 | 0.019 | 0.017 | 0.019 | 0.017 | 0.030 | 0.019 | | | | | | | | | | |
| 10. <i>Catabrosa pseudairoides</i> Lenkoran | 0.014 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.015 | 0.019 | 0.017 | 0.019 | | | | | | | | | |
| 11. <i>Catabrosa werdermannii</i> EU792333 | 0.020 | 0.024 | 0.024 | 0.024 | 0.011 | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.025 | 0.024 | | | | | | | | |
| 12. <i>Catabrosa aquatica</i> KM523773 | 0.005 | 0.009 | 0.008 | 0.008 | 0.004 | 0.007 | 0.015 | 0.009 | 0.010 | 0.009 | 0.014 | | | | | | | |
| 13. <i>Catabrosa aquatica</i> DQ539564 | 0.012 | 0.014 | 0.015 | 0.015 | 0.004 | 0.014 | 0.015 | 0.016 | 0.010 | 0.014 | 0.022 | 0.007 | | | | | | |
| 14. <i>Puccinellia pumila</i> KC483780 | 0.057 | 0.063 | 0.063 | 0.063 | 0.042 | 0.058 | 0.052 | 0.060 | 0.064 | 0.063 | 0.066 | 0.054 | 0.061 | | | | | |
| 15. <i>Puccinellia phryganodes</i> KT960640 | 0.059 | 0.065 | 0.064 | 0.064 | 0.049 | 0.058 | 0.056 | 0.061 | 0.066 | 0.065 | 0.068 | 0.056 | 0.063 | 0.008 | | | | |
| 16. <i>Puccinellia hauptiana</i> GQ283159 | 0.059 | 0.064 | 0.064 | 0.064 | 0.045 | 0.059 | 0.056 | 0.062 | 0.066 | 0.064 | 0.067 | 0.056 | 0.063 | 0.002 | 0.010 | | | |
| 17. <i>Puccinellia bruggemannii</i> KM523806 | 0.061 | 0.066 | 0.066 | 0.066 | 0.045 | 0.059 | 0.052 | 0.062 | 0.067 | 0.066 | 0.069 | 0.058 | 0.064 | 0.007 | 0.005 | 0.008 | | |
| 18. <i>Puccinellia borealis</i> KM523805 | 0.059 | 0.065 | 0.065 | 0.065 | 0.038 | 0.060 | 0.049 | 0.062 | 0.066 | 0.065 | 0.068 | 0.056 | 0.063 | 0.007 | 0.012 | 0.008 | 0.010 | |

Рисунок 9. Генетические расстояния между видами рода *Catabrosa* и круга их родства, рассчитанная нами на основании сравнения последовательностей района ITS1-5.8S рДНК-ITS2.

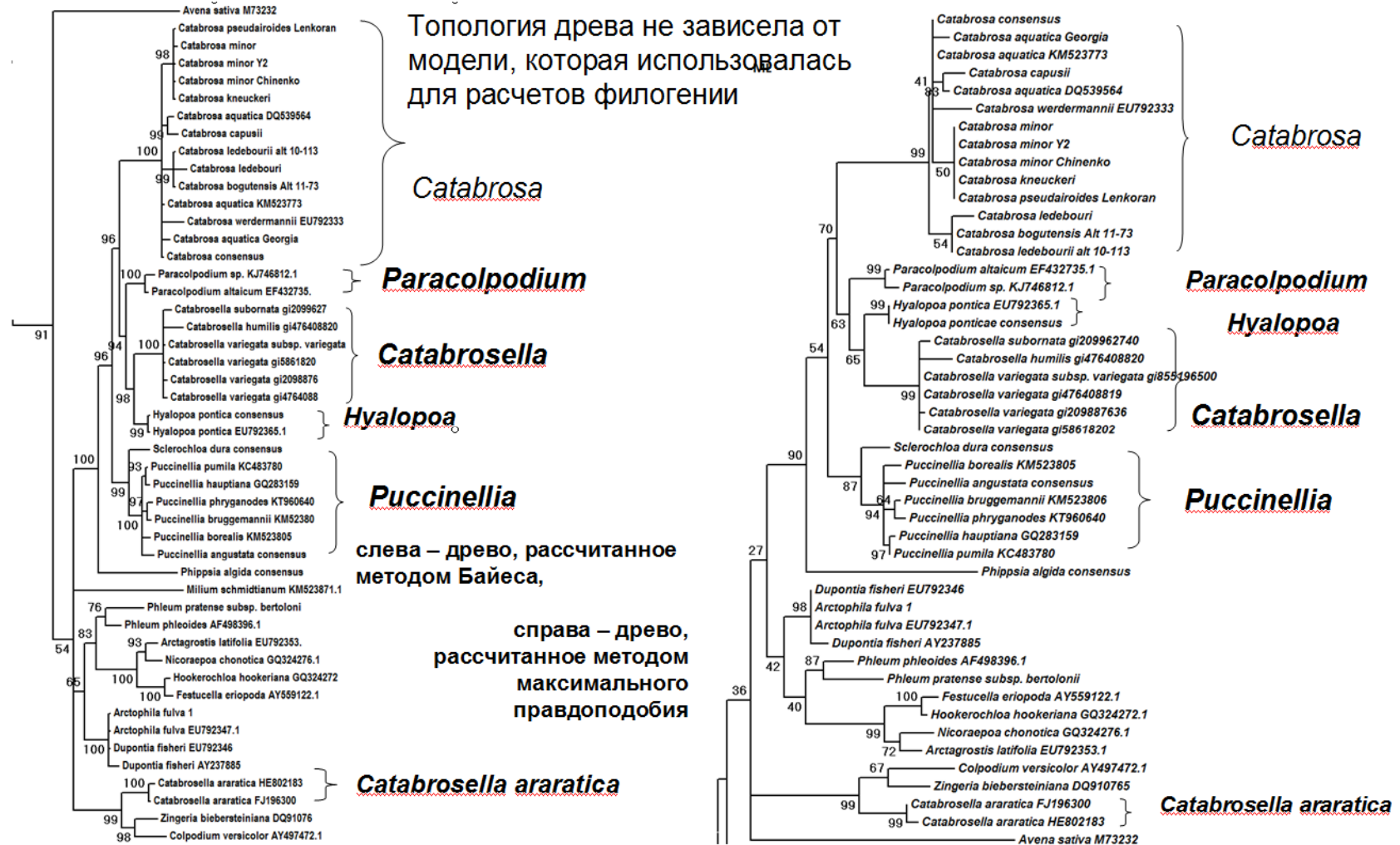


Рисунок 10. Филогенетические деревья, построенные методом Байеса и методом максимального правдоподобия.

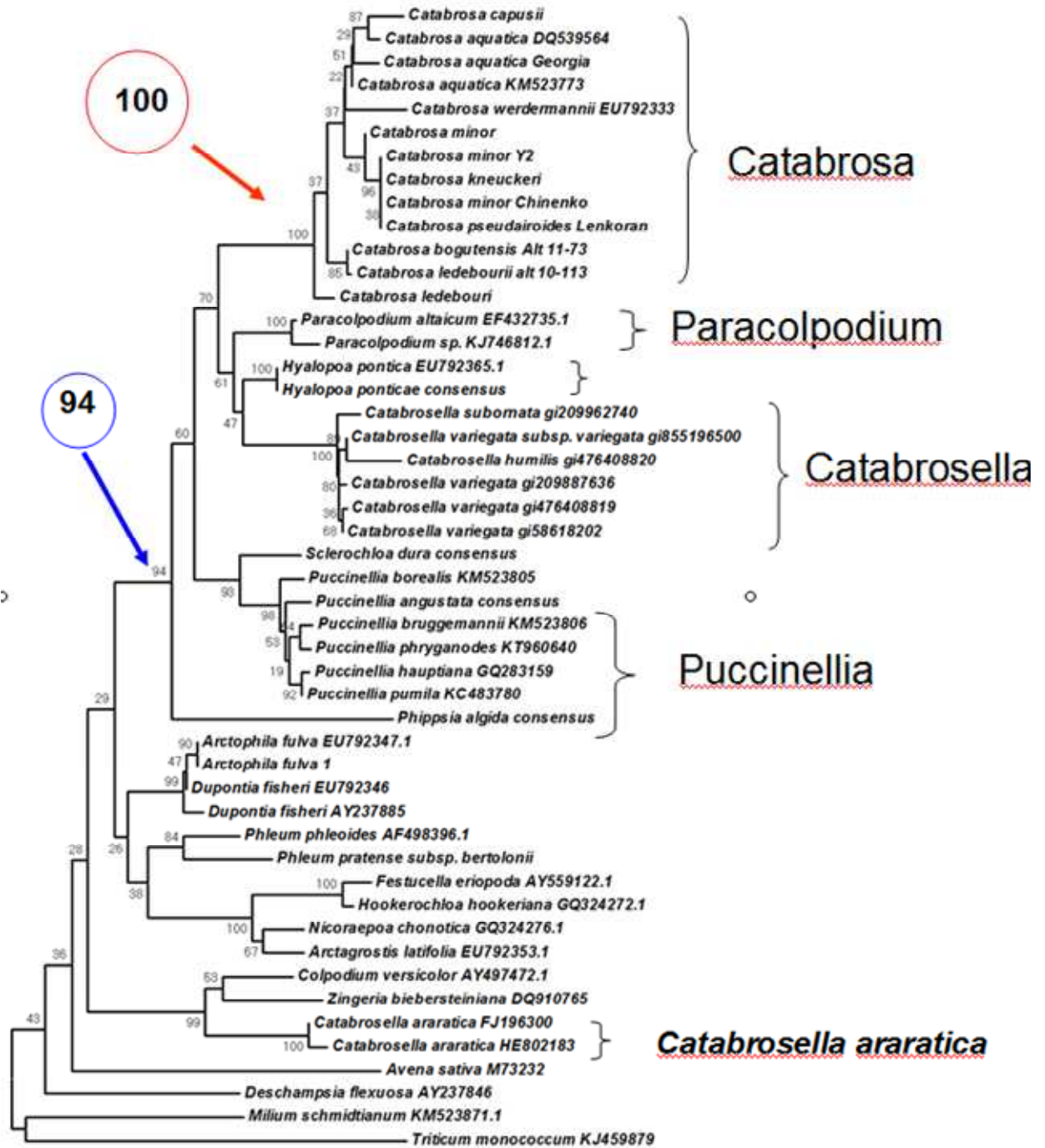


Рисунок 11. Филогенетическое дерево, построенное методом объединения ближайших соседей.

Взяв за основу генетические расстояния между видами и рассчитав на их основе показатель расстояний Кимура-2 (Ней, Кумар, 2004), мы разными способами построили филогенетические деревья, показывающие генетическую связь между сравниваемыми последовательностями и, экстраполируя, между видами. Эти деревья приведены на рис. 10-11.

Видно, что топология, получаемая при разных расчетах, практически идентична. Все виды рода *Catabrosa* представляют на древе монофилетическую кладу с высокой бутстрэп-поддержкой.

Рода *Catabrosa*, *Paracolpodium*, *Hyalopoa*, *Catabrosella*, *Sclerochloa*, *Puccinellia* на древе Злаков формируют монофилетическую кладу.

Вид *Catabrosella araratica* не родственен другим видам из группы родства *Catabrosa* и *Catabrosella* и должен быть выделен в особый род *Nevskia* или отнесен к роду *Colpodium*, что, на новом материале, подтверждает сделанное ранее заключение (Ким и др., 2008).

Для того, чтобы определить положение рода *Catabrosa* среди других злаков, мы взяли в анализ ITS-последовательности всех родов злаков (по одному виду каждого рода) и, добавив к ним секвенированные нами последовательности поручейниц, построили филогенетическое древо (рис. 12).

Традиционно, ботаники относили род *Catabrosa*, также как близкие к нему рода *Hyalopoa*, *Catabrosella*, *Paracolpodium*, *Puccinellia*, к подтрибе *Poinae* (Цвелев, 1976 и др.). Наши результаты, также как данные других авторов (Родионов и др., 2010; Soreng et al., 2010; Hoffmann et al., 2013) показывают, что эти рода лишь отдаленно родственны *Poa*, представляют собой отдельную монофилетическую кладу, и потому заслуживают выделения в отдельную подтрибу.

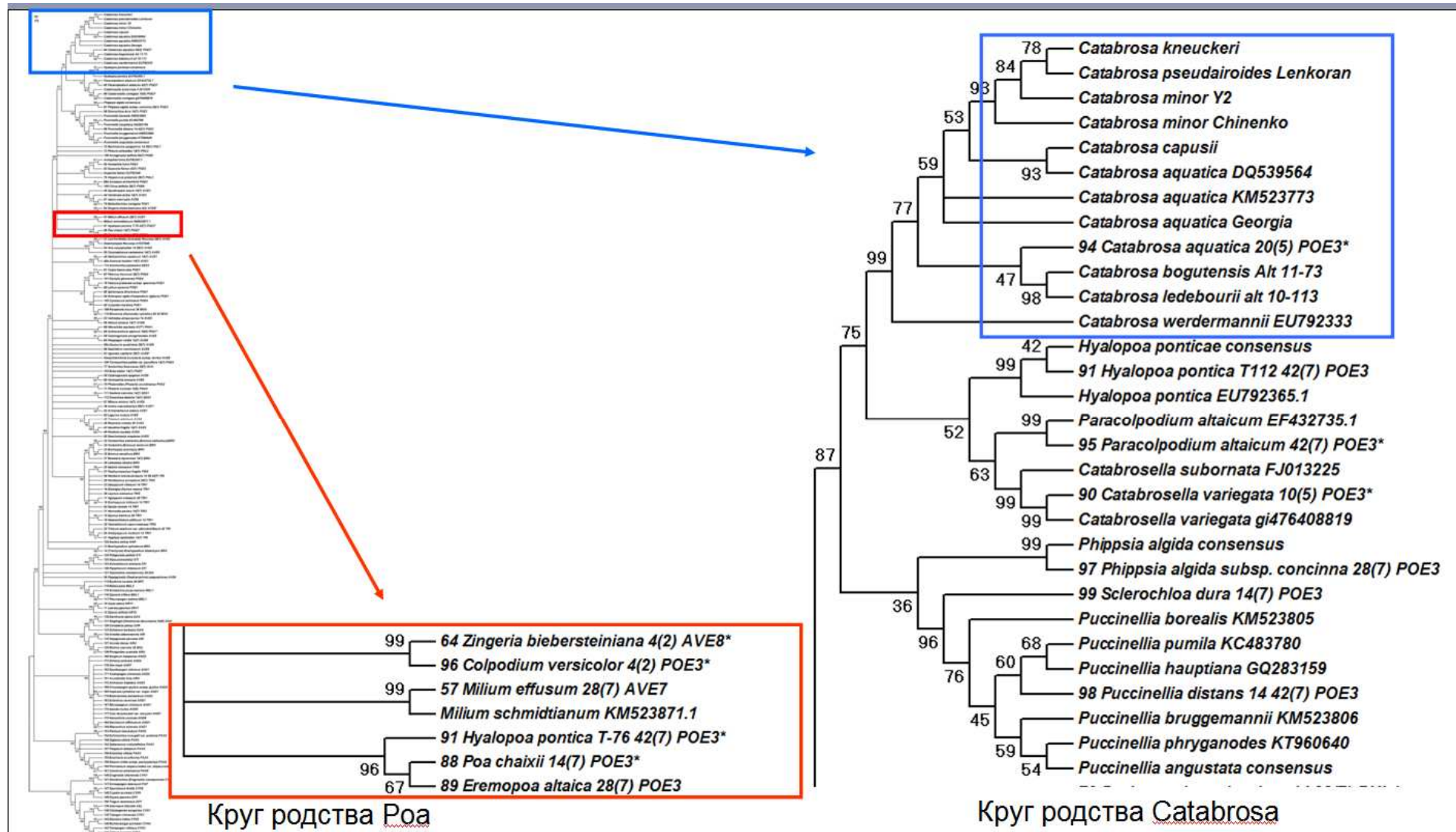


Рисунок 12. Филогенетическое дерево злаков (слева) и положение на нем видов из круга родства *Catabrosa* и *Poa*.

ВЫВОДЫ.

1. Сравнительное исследование последовательностей района ITS1-5.8S рРНК-ITS2 генов 35S рРНК видов рода *Catabrosa* показало, что это филогенетически компактная группа видов, генетические расстояния между которыми (p-distance) находятся в пределах 2%, а между видами *Catabrosa* и видами близкого рода *Puccinellia* – 5-6%.

2. На филогенетических деревьях, построенных методами объединения ближайших соседей, методами максимального правдоподобия, парсимонии и методами Байеса все виды рода *Catabrosa* формируют монофилетическую кладу с высокой бутстрэп-поддержкой.

3. ITS-последовательности видов *Catabrosa ledebourii* и *C. bogutensis* по нескольким значимым позициям отличаются от всех других видов *Catabrosa*. Несмотря на морфологическое сходство, вид эндемик Алтая *C. bogutensis* отличается от североевропейского вида *C. minor*.

4. Рода *Catabrosa*, *Paracolpodium*, *Hyalopoa*, *Catabrosella*, *Sclerochloa*, *Puccinellia* на древе Злаков формируют монофилетическую кладу. Эти рода лишь отдаленно родственны *Poa* и потому заслуживают выделения в отдельную подтрибу.

5. Вид *Catabrosella araratica* не родственен другим видам из группы родства *Catabrosa* и *Catabrosella* и должен быть выделен в особый род или отнесен к роду *Colpodium*.

- Благодарности. Автор выражает глубокую признательность научному руководителю – д.б.н., проф. А.В. Родионову за постоянное внимание и поддержку, коллективу Лаборатории Биосистематики и цитологии: с. н. с., к. б. н. Е.О. Пуниной, с. н. с., к. б. н. Э. М. Мачсу, в. н. с., д. б. н. В.С. Чупову, в. н. с., д. б. н. В.С. Шнеер, н. с., к. б. н. Н.Н. Носову, инж. Е.Е.Крапивской, м. н. с. Ю.В. Михайловой, асп. Л.Ю. Терентьевой за важные консультации и помощь в работе.

- Работа была выполнена на средства грантов РФФИ № 12-04-31524, 12-04-01470, 14-04-01416, 15-04-06438 и программы «Динамика генофондов».

Список литературы

- Антонов А.С. Геносистематика растений. М., 2006. 293 с.
- Ким Е.С., Носов Н.Н., Доброрадова М.А., Пунина Е.О., Тюпа Н.Б., Родионов А.В. Близость *Catabrosella araratica* ($2n=6x=42$) к злакам с двуххромосомными геномами *Zingieria biebersteiniana* и *Colpodium versicolor* ($2n=2x=4x$) – род *Nevskia* Tzvel. действительно существует? // Хромосомы и эволюция. Симпозиум памяти Григория Андреевича Левитского (1878-1942). Санкт-Петербург, 2008. С.58-59.
- Ней М., Кумар С. Молекулярная эволюция и филогенетика. Киев: КВИЦ, 2004. 405 с.
- Пунина Е.О., Носов Н.Н., Мякошина Ю.А., Гнутиков А.А., Шмаков А.И., Олонова М.В., Родионов А.В. О роде *Catabrosa* на Алтае // «Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии» – Сборник научных статей четырнадцатой международной научно-практической конференции. Барнаул. 2015. С. 152-156
- Родионов А.В., Носов Н.Н., Ким Е.С. и др. Происхождение полиплоидных геномов мятликов (*Poa* L.) и феномен потока генов между Северной Пацификой и суб-антарктическими островами // Генетика. 2010. Т. 46. №12. С. 1 – 11
- Цвелёв Н.Н. Злаки СССР. Л 1976. 788 с.
- Цвелев Н.Н. Заметки о новых родах семейства злаков (Poaceae) // Новости систематики высших растений. 2013. Т. 44. С. 26-38
- Шнеер В.С. О видоспецифичности ДНК: 50 лет спустя // Биохимия. 2007. Т. 72. № 12. С. 1690 – 1699
- Шнеер В.С. ДНК штрихкодирование – новое направление в сравнительной геномике растений // Генетика. 2009. Т. 54. №11. С. 1436-1448

- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // *Nucleic Acids Res.* 1997. 25: 3389–3402.
- Coleman A.W. Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure// *Nucl. Acids Res.* 2007. V. 35. P. 3322-3329.
- Curtis W., *Flora Londinensis*. V. 1. T. 5. P. 1775-1777.
- 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.
- Feliner G.N., Rossello J.A. Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants// *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2007. V. 44 P. 911–919.
- Henras A.K., Soudet J., Gêrus M., et al. The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis // *Cell. Mol. Life Sci.* 2008. V. 65. P. 2334 – 2359.
- Hoffmann M.H., Schneider J., Hase P., Roser M. Rapid and recent world-wide diversification of bluegrasses (*Poa*, Poaceae) and related genera// *PLoS ONE*. 2013. V. 8(3). P. e60061. doi:10.1371
- Palisot de Beauvois de A.-M.-F.-J. *Essai d'une nouvelle agrostographie, ou Nouveaux genres des graminées.* – Paris, 1812. P. 97
- 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, 3: 8. <http://www.biomedcentral.com/1472-6785/3/8>
- Ronquist F., Huelsenbeck J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // *Bioinformatics*. 2003. V. 19. P.1572-1574.
- Sanger F., Niclein S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *Pros. Natl. Acad. Sci. USA*. 1977. V. 74. P. 5493 – 5467.
- Soreng R.J., Bull R.D., Gillespie L.J. Phylogeny and reticulation in *Poa* based on plastid trnF and nrITS sequences with attention to diploids // *Diversity, Phylogeny, and Evolution in the Monocotyledons.* - O. Seberg, G.

- Petersen, A.S. Barfod, J.I. Davis* (eds.). Aarhus, Denmark: Aarhus University Press, 2010. P. 619 – 643.
- Soreng R.J., Fish L. *Catabrosa* versus *Colpodium* (Poaceae: Poeae) in southern Africa, with a key to these genera and their species in Africa.// Kew bulletin. 2011. V. 66. P. 1 – 10.
- Soreng R.J., Peterson P. M., Davidse G., Judziewicz E. J., Zuloaga F. O., Filgueiras T. S., Morrone O. Catalogue of New World grasses (Poaceae): IV. Subfamily *Pooideae* // Contr. U.S. Natl. Herb. 2003. V. 48. P. 1 – 725.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. 1990. In M.A.Innis, D.H.Gelfand, J.J.Sninsky, White T.J., eds., PCR protocols: a Guide to methods and Applications. Academic Press, San Diego. P. 315 – 322
- Zuker M. On finding all suboptimal foldings of a RNA molecule. Science. 1989. V. 244. P. 48-52.
- Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. // Nucleic Acids Res. 2003 V. 31. P. 3406 – 3615.