

Исследование риботипов экспериментально полученных гибридов полиплоидных видов рода *Avena* L.

Study of ribotypes of experimentally obtained hybrids of polyploid species of the genus *Avena* L.

Гнутиков А. А.^{1,3}, Носов Н. Н.^{2,3}, Лоскутов И. Г.^{1,3}, Блинова Е. В.¹, Родионов А. В.^{2,3}

Gnutikov A. A.^{1,3}, Nosov N. N.^{2,3}, Loskutov I. G.^{1,3}, Blinova E. V.¹, Rodionov A. V.^{2,3}

¹ Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова, г. Санкт-Петербург, Россия.
E-mails: alexandr2911@yandex.ru; i.loskutov@vir.nw.ru; e-blinova.blinova2017@yandex.ru

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

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

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

³ Биологический факультет, Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург, Россия

³ Biological faculty, Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

Реферат. Впервые с помощью секвенирования следующего поколения (NGS) на платформе Illumina последовательности ITS1 и начала гена 5.8S рРНК исследовано современное состояние геномных композиций сложных культурных гибридов овса на основе вида *Avena macrostachya*. Показано, что гибрид *A. sativa* × *A. macrostachya*, используемый для дальнейшей гибридизации с другими видами овса, на самом деле выступает в следующих поколениях гибридизации как «чистый» *A. sativa*. Наиболее представленные риботипы (массовые по количеству прочтений маркерных последовательностей) у них наследуются от гексаплоидного *A. sativa* (ACD-геном). Другие родительские таксоны, такие как гексаплоиды *A. byzantina*, *A. sterilis* (геном ACD), тетраплоиды *A. magna*, *A. murphyi* (геном AC), как правило, формируют второй по представленности риботип у гибридов, в который входят также минорные компоненты рДНК *A. sativa* (вероятно, оставшиеся от общих предков). Полагаем, что это связано с жесткими последствиями реорганизации геномов у межвидовых гибридов от скрещивания культурного овса с дикорастущими, в результате чего количество последовательностей этих видов в геномном наборе гибридов закономерно градуально уменьшается. Особенно ярко это проявляется при искусственной гибридизации гексаплоидов группы *A. sativa* (*A. sativa* и *A. fatua*, ACD-геном) и *A. macrostachya* (гомотетраплоид CmCm). В таких гибридах, по нашим данным, иногда происходит утрата целых хромосом *A. macrostachya*, из-за чего мы совсем не видим и последовательностей рДНК этого вида.

Ключевые слова. Гибриды, овес, полиплоиды, ITS, NGS.

Summary. For the first time, using next generation sequencing (NGS) on the Illumina platform of the ITS1 sequence and the beginning of the 5.8S rRNA gene, the current state of genomic compositions of complex cultivated oat hybrids based on the *Avena macrostachya* was studied. It was shown that *A. sativa* × *A. macrostachya* hybrid used for further hybridization with other oat species actually acts as a “pure” *A. sativa* in the next generations of hybridization. The most represented ribotypes (abundant by the number of marker sequences reads) are inherited from the hexaploid *A. sativa* (ACD genome). Other parental taxa, such as hexaploids *A. byzantina*, *A. sterilis* (ACD-genome), tetraploids *A. magna*, *A. murphyi* (AC-genome), as a rule, form the second most abundant ribotype in hybrids. Also, this ribotype includes the minor components of *A. sativa* rDNA (probably left over from common ancestors). We assume that this is due to the harsh consequences of the reorganization of genomes in interspecific hybrids from crossing cultivated oat with wild ones, as a result of which the number of sequences of these species in the genomic set of hybrids naturally gradually decreases. It especially manifests in the artificial hybridization of hexaploids of the *A. sativa* group (*A. sativa* and *A. fatua*, ACD-genome) and *A. macrostachya* (homotetraploid CmCm). In such hybrids, according to our data, the loss of entire chromosomes of *A. macrostachya* sometimes occurs, due to which we do not see rDNA sequences of this species at all.

Key words. Hybrids, ITS, NGS, oats, polyploids.

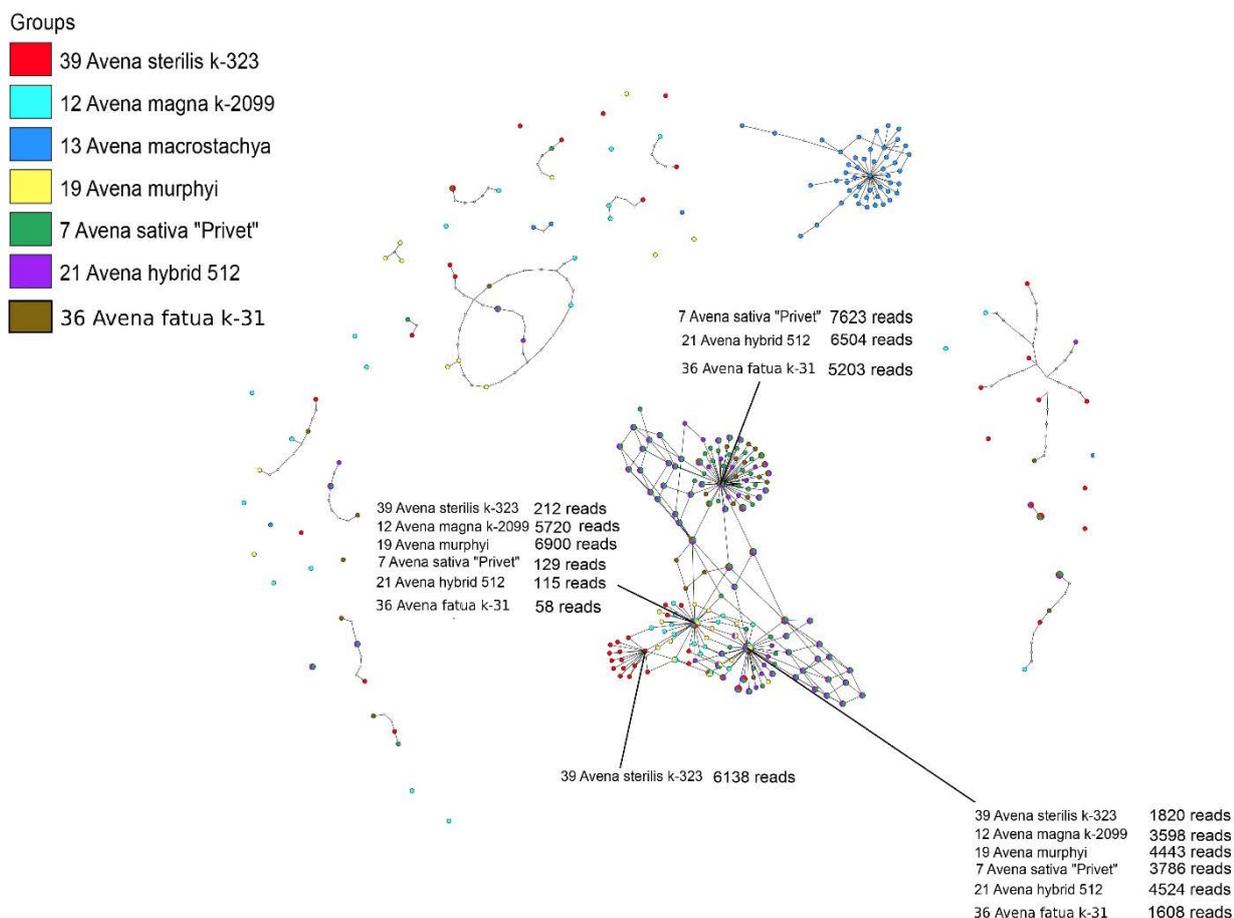


Рис. 1. Схема, отражающая разнообразие и родство риботипов сложного гибрида Г/О-512, построенная с помощью программы TCS 2.1.

Для выведения зимостойких сортов овса селекционерами была проведена серия экспериментов по скрещиванию *Avena macrostachya* Balansa ex Coss. et Durieu (единственный многолетний перекрестноопыляющийся вид в роде, эндемик Атласских гор) с различными полиплоидными видами овсов и овсюгов.

Мы изучили полученные гибриды при помощи секвенирования следующего поколения (NGS) с целью описать современное состояние их геномных композиций. Для этого 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 (ВНИИСХМ).

Образцы гибридов овса для анализа были получены из коллекций Федерального исследовательского центра Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР). Полученные последовательности были обрезаны с использованием программного обеспечения Trimmomatic PE (Bolger et al., 2014). Последовательности были объединены с помощью программы fastq-join (Aronesty, 2013). Затем все последовательности отсортировали при помощи алгоритма «bubble sorting». Далее мы обработали результаты секвенирования «популяционных» ITS-последовательностей изучаемых гибридов с помощью программы TCS, которая использовалась для построения сети гаплотипов (Clement et al., 2000). Результаты расчетов TCS визуализировались в программе TCS BU (Múrias dos Santos et al., 2016).

По нашим данным, Гибрид Г/О-512 имеет в своем составе два наиболее массовых риботипа (тип последовательностей рибосомной ДНК 18S–ITS1) (рис. 1). Первый из них (7623 рид (прочтений)) со-

ответствует гексаплоидам (ACD) *A. sativa* L. (6504 рида) и *A. fatua* L. (5203 ридов). Второй по представленности маркерных сиквенсов риботип (4524 рида) объединяется со вторыми по массовости риботипами тетраплоидов (AC) *A. magna* H. C. Murphy et Terrell (3598 ридов), *A. murphyi* Ladiz. (4443 рида), гексаплоидов (ACD) *A. sterilis* L. (1820 ридов), *A. fatua* (1608 ридов) и *A. sativa* (3786 ридов). Наиболее представленные варианты риботипов *A. magna* (6900 ридов) и *A. murphyi* (5720 ридов) соответствуют минорным вариантам у *A. sativa*, *A. fatua* и гибрида 512, главный риботип *A. sterilis* формирует отдельную группу (6138 ридов).

В сложном гибриде Г/О-514 родительскими таксонами являются виды с геномной конституцией ACD (6x) – *A. sativa* и *A. byzantina* K. Koch, последовательности тетраплоида (CmCm) *A. macrostachya* элиминированы из гибридного генома (рис. 2). Они формируют два наиболее массовых риботипа совместно с риботипами самого гибрида. При этом *A. byzantina* также формирует один отдельный вариант массовых риботипов (2716 ридов).

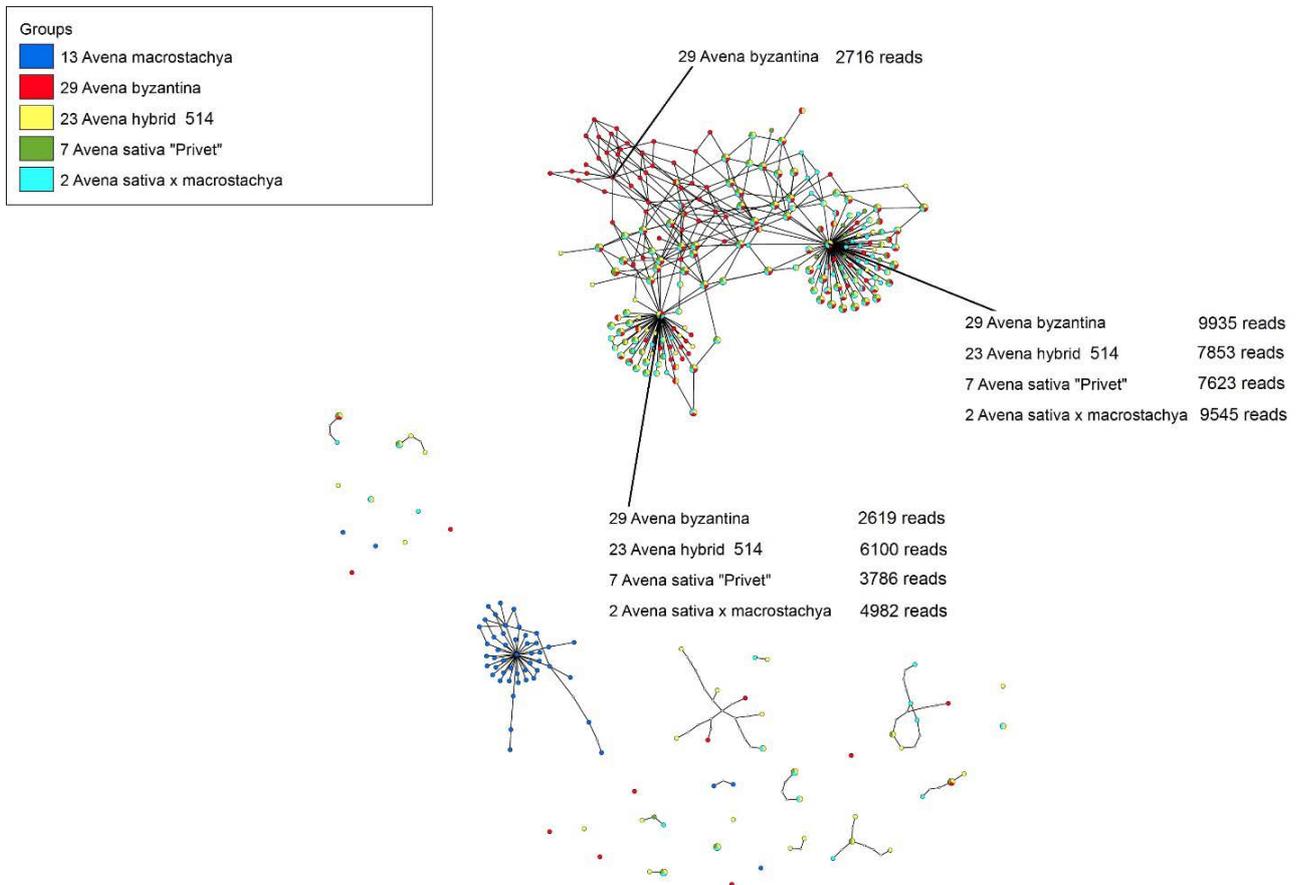


Рис. 2. Схема, отражающая разнообразие и родство риботипов сложного гибрида Г/О-514, построенная с помощью программы TCS 2.1.

Сложный гибрид Г/О-516 отличается разнообразием риботипов. На рис. 3 мы видим 6 наиболее массовых по частоте риботипов. Самый массовый риботип этого гибрида (6561 рид) закономерно общий с *A. sativa* (7623 рида). Второй по представленности последовательностей вариант субгенома гибрида 516 (4489 ридов) группируется со вторыми по массовости субгеномами *A. sativa* (3786 ридов), *A. murphyi* (4443 рида), *A. sterilis* (1820 ридов) и одного из образцов *A. magna* k-2099 (3598 ридов). Второй изученный образец, *A. magna* k-145, представлен здесь лишь минорным компонентом: 467 ридами. Наиболее массовые варианты последовательностей *A. murphyi* (6900 ридов) и *A. magna* k-2099 (5720 ридов) аналогичны очень малому числу ридов *A. sativa* (129) и гибрида Г/О-516 (124 рида). Также в этот вариант субгенома попадает третий по массовости риботип *A. magna* k-145 (3847 ридов). Наиболее представленные риботипы *A. sterilis* (6138 ридов) и *A. magna* k-145 (6067 ридов) формируют отдельные субгеномы.

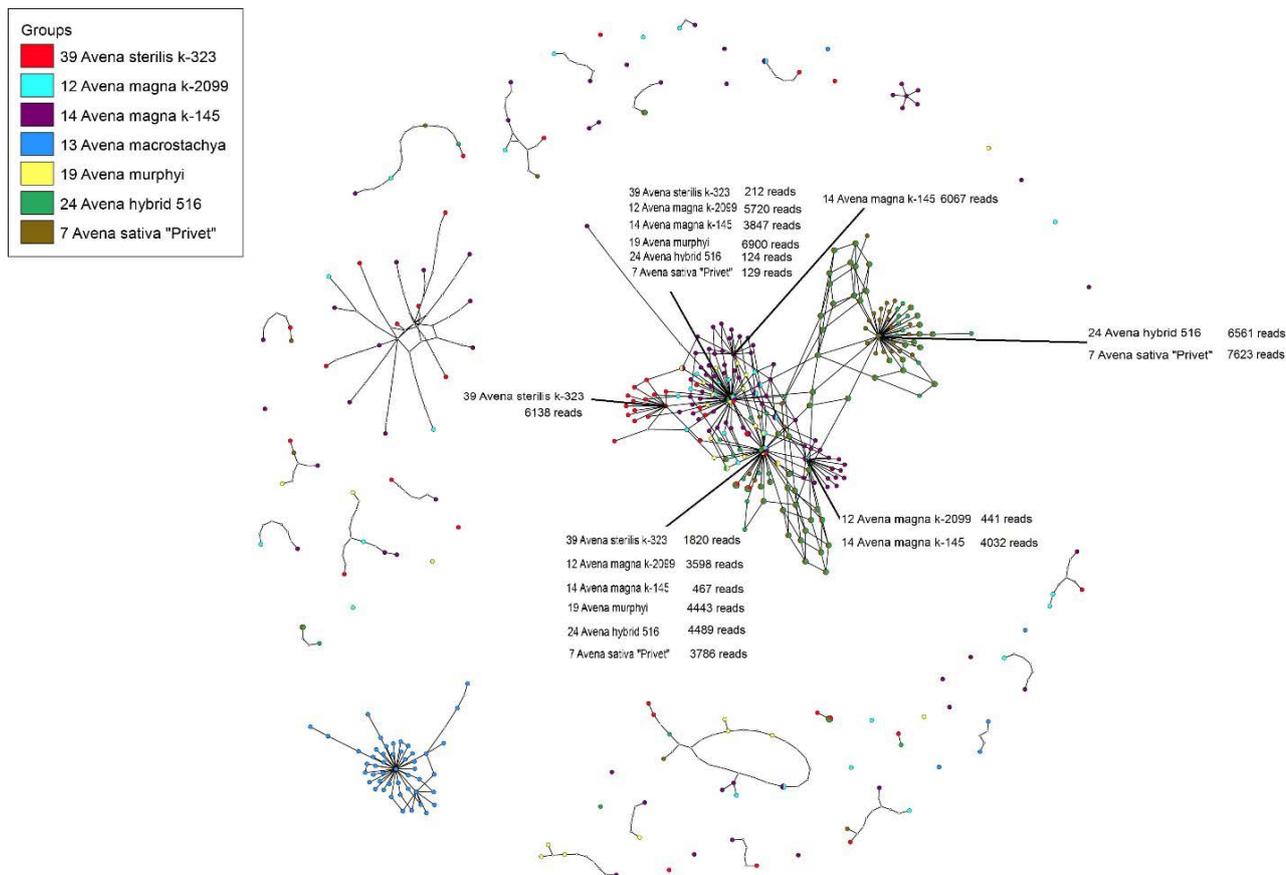


Рис. 3. Схема, отражающая разнообразие и родство риботипов сложного гибрида Г/О-516, построенная с помощью программы TCS 2.1.

Один из предварительных выводов изучения геномных композиций сложных гибридов овса ($ACD \times AC \times AB$) в том, что наиболее представленные риботипы (массовые по количеству прочтенных маркерных последовательностей) у них наследуются от гексаплоидного *A. sativa*. Другие родительские таксоны, такие как *A. byzantina*, *A. sterilis*, *A. magna*, *A. murphyi*, как правило, формируют второй по представленности риботип у гибридов, в который входят также минорные компоненты рДНК *A. sativa* (вероятно, оставшиеся от общих предков). Наиболее массовые типы последовательностей рДНК у *A. byzantina*, *A. sterilis*, *A. magna*, *A. murphyi* не найдены в геномах гибридов. Вероятно, это связано жесткими последствиями реорганизации геномов у межвидовых гибридов от скрещивания культурного овса *A. sativa* с другими, отличающимися значительной специализацией видами дикорастущих овсов, достаточно далеко отстоящих друг от друга и от группы *A. sativa* на филогенетическом древе (Лоскутов, 2007), в результате чего количество последовательностей этих видов в геномном наборе гибридов закономерно градуально уменьшается (Родионов и др., 2019, 2020). Особенно ярко это проявляется при искусственной гибридизации гексаплоидов группы *A. sativa* (*A. sativa* и *A. fatua*, ACD-геном) и *A. macrostachya* (гомотетраплоид CmCm), по ряду признаков считавшимся представителем отдельного рода *Helictotrichon* Besser. В таких гибридах, по нашим данным, иногда происходит утрата целых хромосом *A. macrostachya*, из-за чего мы совсем не видим и последовательностей рДНК этого вида. В результате гибрид *A. sativa* \times *A. macrostachya*, используемый для дальнейшей гибридизации с другими видами овса, на самом деле выступает в следующих поколениях гибридизации как «чистый» *A. sativa*.

Благодарности. Работа выполнена на оборудовании ЦКП «Клеточные и молекулярные технологии изучения растений и грибов» в рамках гос. задания по проекту № 0481-2022-0001 и при поддержке гранта РНФ № 22-24-01117 и, на начальных этапах исследования, гранта СПбГУ PURE ID 60256916.

ЛИТЕРАТУРА

- Лоскутов И. Г.** Овес (*Avena L.*). Распространение, систематика, эволюция и селекционная ценность. – СПб.: ГНЦ РФ ВИР, 2007. – 336 с.
- Родионов А. В., Амосова А. В., Беляков Е. А., Журбенко П. М., Михайлова Ю. В., Пунина Е. О., Шнеер В. С., Лоскутов И. Г., Муравенко О. В.** Генетические последствия межвидовой гибридизации, ее роль в видообразовании и фенотипическом разнообразии растений // Генетика, 2019. – Т. 55, № 3. – С. 255–272. DOI: 10.1134/S0016675819030159
- Родионов А. В., Шнеер В. С., Гнутиков А. А., Носов Н. Н., Пунина Е. О., Журбенко П. М., Лоскутов И. Г., Муравенко О. В.** Диалектика видов: от исходного единообразия, через максимально возможное разнообразие к конечному единообразию // Бот. журн., 2020. – Т. 105, № 9. – С. 835–853. DOI: 10.31857/S0006813620070091
- Aronesty E.** (2013) Comparison of sequencing utility program // Open Bioinform J., 2013. – Vol. 7. – P. 1–8. DOI: 10.2174/1875036201307010001
- Bolger A. M., Lohse M., Usadel B.** Trimmomatic: a flexible trimmer for illumina sequence data // Bioinformatics, 2014. – Vol. 30. – P. 2114–2120. DOI: 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. DOI: 10.1046/j.1365-294x.2000.01020.x
- Ladizinsky G., Zohary D.** Notes on species delimitation species relationships and poliploidy in *Avena L.* // Euphytica, 1971. – Vol. 20, № 3. – P. 380–395.
- Loskutov I. G., Rines H. W.** *Avena L.* // Wild crop relatives: genomic and breeding resources / C. Kole (ed.) –Heidelberg: Springer, 2011. – P. 109–184.
- 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. DOI: 10.1093/bioinformatics/btv636