

Правительство Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(СПбГУ)

Индекс УДК 633/635:58

Рег. № НИОКТР АААА-А20-120073190040-5

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по научной работе
СПбГУ

С.В. Микушев
«19» декабря 2022 г.



ОТЧЁТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОИСХОЖДЕНИЯ И СОВРЕМЕННОГО СОСТОЯНИЯ СОРТОВ И
ВИДОВ ЗЛАКОВЫХ КУЛЬТУР И ИХ ДИКОРАСТУЩИХ ПРЕДКОВ С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛОКУС-СПЕЦИФИЧНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ НОВОГО
ПОКОЛЕНИЯ (TAG-NGS)
(заключительный)

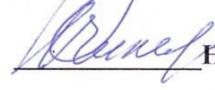
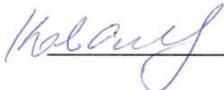
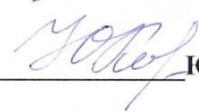
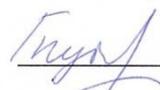
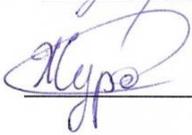
Руководитель НИР,
главный научный сотрудник,
доктор биологических наук

А.В. Родионов

подпись, дата 24.11.2022

Санкт-Петербург 2022

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель темы заведующий лабораторией д-р биол. наук, профессор	 А.В. Родионов
Исполнители темы	
главный науч. сотр.	
д-р биол. наук	 И.Г. Лоскутов
Вед. науч. сотр.	
канд. биол. наук	 Н.Н. Чикида
Вед. научн. сотр.	
канд. биол. наук	 О.Н. Ковалева
Ст. науч. сотр.	
канд. биол. наук	 В.В. Коцеруба
Ст. научн. сотр.	
канд. биол. наук	 Н.Н. Носов
Мл. научн. сотр.	
канд. биол. наук	 Ю.И. Карабицина
Науч. сотр.	 А.А. Гнутиков
Младший научн. сотр.	 П.М. Журбенко
Мл. научн. сотр.	 К.А. Лукина
Мл. научн. сотр.	 Е.Е. Крапивская
Нормоконтроль	 Н.В. Квадрициус

30.11.2022

РЕФЕРАТ

В ходе работ по проекту в 2022 году нами изучено происхождение культурные и некоторых дикорастущих видов рода Овес (*Avena*). Виды этого рода факультативно вступают в межвидовые скрещивания образуя сеть с общими семействами риботипов, представленными в геномах разных видов с разной частотой. Выявляя филогенетические связи дикорастущих видов овса, мы показали, что *Avena bruhsiana*, по набору риботипов отличаются от риботипов, найденных в геноме вида *A. ventricosa* – это родственные, но разные виды. *A. ventricosa* – лишь один из предков вида *A. bruhsiana*. Вероятными предками культурного вида *Avena abyssinica*, передавшими ему свои гены рРНК, были диплоидный вид *A. atlantica* и тетраплоидный *A. vaviloviana*. Ранее предложенная гипотеза, о том, что вид *Avena byzantina* получил геномы А и С от *A. magna*, а D-геном (вариант А-генома) – от *A. sterilis* не находит прямого подтверждения в результатах секвенирования рДНК этого вида. Самые представленные последовательности рДНК *A. byzantina* имеют независимое происхождение: вероятно, от ныне вымершего предка либо в результате постгибридизационной трансформации. Риботипы С-геномного диплоида *A. ventricosa* не принимали участия в формировании кластера генов 35S рРНК в геноме полиплоидного вида *A. sativa* или были утрачены из него в ходе эволюции генома этого полиплоида. Межвидовые гибриды тетраплоида *Avena macrostachya* и гексаплоида *A. sativa* утратили все гены 35S рРНК, полученные от *Avena macrostachya*. В результате фенотипирования широкого спектра промышленных и староместных сортов был выделен материал для селекции с повышенной зерновой продуктивностью и устойчивостью к болезням среди культурных и диких видов овса. Изучение кариотипов *Aegilops comosa* subsp. *heldreichii* и *Ae. comosa* subsp. *comosa* показало генетическую близость этих двух подвидов. Несмотря на общее кариотипическое сходство, мы наблюдаем внутривидовую изменчивость числа и морфологии ядрышкообразующих (ЯОР) хромосом. Большинство образцов имеют две пары ЯОР-хромосом, различающихся по морфологии, но найдены генотипы, которые несут только одну пару хромосом с ЯОР.

Отчет: 40 страниц, 13 рисунков, 1 таблица, 31 процитированный источник.

Ключевые слова: ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНОМОВ И КАРИОТИПОВ, МЕЖВИДОВАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ, ПОЛИПЛОИДИЯ, СЕЛЕКЦИЯ, ГЕНЕТИЧЕСКИЕ РЕСУРСЫ РАСТЕНИЙ, РДНК, ОВЕС, ЗЛАКОЦВЕТНЫЕ, ПШЕНИЦЕВЫЕ.

СОДЕРЖАНИЕ

Список исполнителей	2
Реферат	3
Содержание	4
Список рисунков	5
Список таблиц	5
Введение	6
Основная часть отчета о НИР	7
1. Вторичная диплоидизация геномов и кариотипов у дикорастущих и культурных злаков.	7
2. Родственные связи дикорастущих диплоидных видов овсов (<i>Avena</i>) с геномами с- типа.	8
3. Исследование филогенетических связей диких диплоидных видов с геномами а- и с- и культурных полиплоидных видов овса (<i>Avena</i> L.)	13
4. Исследование риботипов экспериментально полученных межвидовых гибридов полиплоидных видов рода <i>Avena</i> L.	17
5. Проведение фенотипирования культурных и диких видов овса..	21
6. Изучение генетического разнообразия видов рода <i>Aegilops</i> .	23
7/ Исследование процессов межвидовой гибридизации у отдаленных родственников культурных злаков - видов рода <i>Sparganium</i> L., сем. Typhaceae, порядок злакоцветные (лат. Poales).	27
Публикации по проекту	36
Заключение	37
Список использованных источников	38

СПИСОК РИСУНКОВ

- Рисунок 1. Схема родства риботипов культурного *A. abyssinica* и дикорастущих видов, построенная с помощью программы TCS 2.1.
- Рисунок 2. Схема родства риботипов культурного *A. byzantina* и дикорастущих видов, построенная с помощью программы TCS 2.1.
- Рисунок 3. Схема родства риботипов культурного *A. sativa* и дикорастущих видов, построенная с помощью программы TCS 2.1.
- Рисунок 4. Схема, показывающая вклад генома диплоида (Cp) *A. clauda* в общий геномный набор гексаплоида (ACD) *A. sativa* и родственных видов.
- Рисунок 5. Схема, отражающая разнообразие и родство риботипов сложного гибрида Г/О-512, построенная с помощью программы TCS 2.1.
- Рисунок 6. Схема, отражающая разнообразие и родство риботипов сложного гибрида Г/О-514, построенная с помощью программы TCS 2.1.
- Рисунок 7. Схема, отражающая разнообразие и родство риботипов сложного гибрида Г/О-516, построенная с помощью программы TCS 2.1.
- Рисунок 8. Внутривидовое разнообразие вида *Aegilops taushii*.
- Рисунок 9. Морфологическое разнообразие *Aegilops comosa*.
- Рисунок 10. Хромосомные наборы *Ae. comosa* subsp. *heldreichii*, AE 783 (a) и *Ae. comosa* subsp. *comosa*, AE 1258 (b) and AE 1254 (c). Хромосомы, несущие ЯОР показаны стрелками. Scale bar – 10 mm.
- Рисунок 11. Разнообразие и видоспецифичность риботипов у видов секции *Erecta* подрода *Sparaganium* рода *Sparganium*.
- Рисунок 12. Риботипы видов секции *Natantia* подрода *Xanthosparganium*.
- Рисунок 13. Система риботипов видов секции *Minima* подрода *Xanthosparganium*

СПИСОК ТАБЛИЦ

- Таблица 1. Разнообразие риботипов у диплоидных видов рода *Avena* с кариотипами CC.

ВВЕДЕНИЕ

Геномное разнообразие сортов и видов культурных злаков значительно выше, чем это считалось ранее. Исследовать его в ходе настоящего проекта и использовать как индикатор происхождения видов – наша задача. Для ее решения нами предпринято изучение филогенетических отношений нескольких экономически важных видов культурных растений и их предполагаемых дикорастущих предков на основании изучения происхождения их геномов путем секвенирования ДНК по Сэнгеру и локус-специфичного секвенирования нового поколения (NGS). Изучая полиморфизм нескольких маркерных участков ядерного и хлоропластного геномов, мы на этой основе попытались реконструировать пути формирования их геномов. В 2022 году основные исследования проводились на нескольких в разной степени родственных объектах. Это были дикорастущие и культурные виды рода *Avena*, дикорастущий предок мягкой пшеницы *Aegilops* и виды отдаленно родственного культурным злакам представителя порядка Злакоцветные (Poales) рода *Sparganium*, некоторые представители которого используются в традиционной медицине.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ ОТЧЕТА О НИР

1. ВТОРИЧНАЯ ДИПЛОИДИЗАЦИЯ ГЕНОМОВ И КАРИОТИПОВ У ДИКОРАСТУЩИХ И КУЛЬТУРНЫХ ЗЛАКОВ.

По оценкам кариосистематиков от 30 до 50% видов дикорастущих растений имеют полиплоидные кариотипы, соответственно, у 50 до 70% растений кариотипы диплоидные. Поскольку данные сравнительной геномики показывают, что представители всех филогенетических ветвей высших растений прошли через один, а чаще через несколько раундов полногеномных дупликаций, пути и механизмы вторичной диплоидизации геномов и кариотипов у многих современных растений требует изучения (Родионов, 2022). Один из механизмов диплоидизации неополплоидного кариотипа – хромосомные перестройки, ведущие к изменению числа хромосом в кариотипе. Этот процесс называют дисплоидией. Параллельно с процессами диплоидизации кариотипа, способствуя ей и дополняя ее, по мере дивергенции видов растений идут процессы структурной и эпигенетической диплоидизации генома, утраты части дублированных генов. Есть основание думать, что роль полиплоидии геномов в эволюции растений состоит, прежде всего, в том, что переход в это эфемерное состояние прежде всего является эффективным способом дестабилизации генома, дестабилизации, которая служит источником множества новых комбинаций аллелей, проходящих затем через жесткое решето отбора и реализующихся позже на стадии вторичного диплоида.

Переход от полиплоида к диплоидному состоянию генома и кариотипа обоснован тем, что неополплоиды не могут обеспечить высокий процент сбалансированных гамет из-за проблем с конъюгацией хромосом, а механизмы перехода к строгой попарной конъюгации хромосом таковы, что закономерно ведут к диплоидизации как генома, так и кариотипа. Немаловажно и то, что диплоидный кариотип обеспечивает более жесткий, быстрый, эффективный отбор адаптивно-важных новых комбинаций аллелей, тем самым способствуя накоплению таксономически значимых признаков, видообразованию, и, в конце концов, прогрессивной эволюции.

2. РОДСТВЕННЫЕ СВЯЗИ ДИКОРАСТУЩИХ ДИПЛОИДНЫХ ВИДОВ ОВСОВ (AVENA) С ГЕНОМАМИ С-ТИПА.

В роде *Avena* L. систематики выделяют около 25 видов, которые имеют три уровня пloidности ($2n = 14, 28, 42$) и различаются по геномному составу (известны геномы А, С, АВ, АС, АСD и, возможно, CD). Большинство видов рода *Avena*, овсов и овсюгов, являются дикорастущими видами, произрастающими либо в ненарушенных фитоценозах, либо как сеgetальные сорняки (Ladizinsky, 2012, Loskutov, Rines, 2011). В то же время нет единого мнения о происхождении видов овса, доместикиации, их систематическом положении и родственных связях. Для выявления путей эволюции и одомашнивания овса, а также прояснения филогенетических связей между культурными (*A. abyssinica* Hochst., *A. sativa* L., *A. byzantina* K. Koch) и дикорастущими видами нами был проведен анализ внутригеномного полиморфизма последовательностей рДНК видов овсов и овсюгов. В работе был использован метод локус-специфичного секвенирования следующего поколения (NGS) на платформе Illumina. NGS проводили в ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии (ВНИИСХМ).

Сравнительный анализ морфологии митотических хромосом показал, что диплоидные виды овса имеют геномы двух типов: различают А- или С-тип. Диплоидные виды с геном D не известны. При этом предложено различать два варианта С-геномов, C_v и C_p , и пять вариантов А-геномов (Loskutov, Rines 2011). На сегодняшний день выявлен один тетраплоидный вид *Avena* с С-геномами - это *Avena macrostachya* Balansa ex Durieu (Родионов и др., 2005) и четыре диплоидных вида с С-геномами — *A. ventricosa* Balansa, *A. pilosa* Scop. (синоним: *A. eriantha* Durieu), *A. clauda* Durieu и *A. bruhnsiana* Gruner. Виды с разными вариантами С-генома различаются по центромерным индексам хромосом. В частности, геном C_v *A. ventricosa* состоит только из субacroцентрических хромосом (Rajhathy, 1971; Лоскутов, Абрамова, 2006; Badaeva et al., 2010). Геномы *A. pilosa* и *A. clauda*, называемые геномом C_p , более сложны по морфологии хромосом. В состав их кариотипа входят два крупных субmetaцентрика, один metaцентрик среднего размера, два acroцентрика среднего размера и два субtelоцентрика малого размера (Шелухина и др., 2008). В геноме C_v выявлен один ядрышковый организатор (ЯОР), а в геномах C_p их может быть два (Лоскутов, Абрамова, 2006; Шелухина и др., 2008; Badaeva et al., 2010). Что касается *A. bruhnsiana*, четвертого диплоидного вида с С-

геномом, то он имеет кариотип $2n = 14$ с одной или двумя парами субметацентриков (Emme, 1930; Rajhathy, 1971; Лоскутов, Абрамова, 2006).

Начальные этапы эволюции кариотипов овсов можно представить следующим образом: общий предок *Avena* имел семь субметацентрических хромосом в гаплоидном геноме двумя ЯОР, сходный в этом отношении с геномом вида *Arrhenatherum P. Beauv.* кариотип. Затем произошло разделение филогенетических линий видов с геномами А и С, сопровождавшееся накоплением различий в рассеянных повторах (по-видимому, определяющих результаты GISH-гибридизации), и накоплением характерных для каждой ветви хромосомных перестроек (Родионов и др., 2005; Badaeva et al., 2010). В частности, в филогенетической ветви С-геномных видов произошла амплификация некоторых тандемных повторов, что привело к появлению как немногочисленных крупных С-гетерохроматиновых полос, так и характерного «диффузного гетерохроматина» на плечах хромосом (Badaeva et al., 2010). В филогенетической ветви видов с С-геномами диплоидный предок *A. macrostachya* был первым видом, который дивергировал от общей ветви видов с С-геномами (Родионов и др., 2005). Затем у общего предка современных диплоидных видов с С-геномом произошло несколько транслокаций или инверсий, что привело к значительным изменениям в морфологии кариотипа С-генома и А-генома. *Avena ventricosa*, вид, геном которого потерял один из ЯОР, был первым диплоидным видом с С-геномом, дивергировавшим в этой ветви. С-бэндинг и картирование рДНК показали, что два остальных вида - *A. clauda* и *A. pilosa* являются близко родственными (Шелухина и др., 2008; Badaeva et al., 2010).

Мы исследовали вопрос о родственных связях диплоидных видов *Avena* с С-геномами. Ранее систематиками было показано, что по морфологии *A. bruhnsiana* близок к *A. ventricosa*, однако растения *A. bruhnsiana*, как правило, крупнее, особенно заметны более крупные колоски этого вида (Musaev, Isaev, 1971; Цвелев, 1976). Растения этого вида ранее встречались среди прибрежной растительности на Апшеронском полуострове, но экспедиция ВИР в конце 1980-х годов не смогла найти ни одного растения - привычные места обитания *A. bruhnsiana* в природе сейчас застроены. По данным кариосистматиков известно, что кариотип *A. bruhnsiana* отличается от кариотипа *A. ventricosa* по морфологии по крайней мере одной пары хромосом (Emme, 1930; Rajhathy, 1971; Лоскутов, Абрамова, 2006). В отличие от *A. ventricosa*, у этого вида имеется только один ЯОР в гаплоидном геноме (Лоскутов, Абрамова, 2006). *A. bruhnsiana* и *A. ventricosa* при

гибридизации дают плодовитое потомство, а с видами *A. clauda* и *A. pilosa* *A. bruhnsiana* не скрещивается (Nishiyama and Yabuno, 1975). Выдающийся специалист по роду *Avena* Мальцев (1930) объединил *A. ventricosa* и *A. bruhnsiana* в один вид *A. ventricosa* Balansa с двумя подвидами: *subsp. ventricosa* и *subsp. bruhnsiana*. Н.Н. Цвелёв (1976) рассматривал *A. bruhnsiana* как синоним более распространённого *A. ventricosa*. Rajhathy (1971) считал, что кариологические данные и отсутствие репродуктивной изоляции между видами поддерживают мнение Мальцева (1930) о целесообразности рассматривать *A. ventricosa* Balansa и *A. bruhnsiana* Gruner как один вид. В то же время азербайджанские ботаники Мусаев и Исаев (1971) предположили, что *A. bruhnsiana*, возможно, является межвидовым гибридом.

Методы современной генетики позволяют доказать или опровергнуть гипотезу о гибридном происхождении рода или вида путем исследования их рДНК, в частности, генов 35S рРНК (Kovarík et al., 2005 и др.). В геноме растений гены 35S рРНК организованы в виде нескольких повторяющихся единиц транскрипции, кодирующих пре-рРНК (45S пре-рРНК у животных, 35-37S прерРНК у дрожжей и растений) (Kovarík et al. 2005; Garcia et al. , 2017). У исследованных видов растений число цистронов 35S рДНК варьировало от 150 до 26048 на гаплоидный геном (Rogers, Bendich 1987). В частности, среди злаков у *Secale cereale* L. этих генов 2900, у *Hordeum vulgare* L. 2900–4200, у *Aegilops umbellulata* Zhuk. 2500 копий генов (Rogers, Bendich 1987).

Чтобы изучить вероятные родственные отношения дикорастущих видов *Avena* мы исследовали внутригеномный полиморфизм локусов 18S рДНК (частичная последовательность) - внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1 и последовательность 5.8S рДНК (частичная последовательность) с использованием локус-специфического секвенирования этого участка генома на платформе Illumina. Образцы овса для анализа были получены из коллекций Федерального исследовательского центра Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР). Овес в коллекциях ВИР собирали в естественных местообитаниях, а затем поддерживали пересевом. ДНК из листового материала выделяли в соответствии с модифицированным протоколом Doyle and Doyle (1987) и с использованием набора Qiagen Plant Mini Kit (Qiagen inc., Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Секвенирование 18S рДНК (фрагмент)–внутреннего спейсера ITS1 и гена 5.8S рРНК (фрагмент) методом NGS проведено в Центре коллективного пользования «Геномные технологии,

протеомика и клеточная биология» Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии. Полученные последовательности готовили к анализу с использованием программного обеспечения Trimmomatic PE (Bolger et al. 2014) и программы fastq-join (Aronesty 2013). Затем все последовательности были отсортированы с использованием алгоритма «пузырьковой сортировки». Мы проанализировали связанные последовательности с помощью пакета программ MEGA X (Kumar et al. 2016). Затем мы обработали результаты секвенирования внутригеномной «популяции» ITS-последовательностей изучаемых видов *Avena* с помощью программы TCS, которая использовалась для построения сети гаплотипов (Clement et al., 2000). Алгоритм ТКС основан на вероятностном методе статистической экономии и позволяет определить вероятность родства между всеми гаплотипами с указанием количества мутаций, которыми различаются изучаемые гаплотипы. Результаты расчетов TCS визуализировались в TCS BU (Murias dos Santos et al. 2016). В анализ были включены последовательности, имеющие не менее 10 прочтений на геном. Прочитанная и проанализированная область рДНК в наших экспериментах включала 3'-конец 18S рДНК (71 п.н.), область ITS1 (224 п.н.) и частичную последовательность 5.8S рДНК (54 п.н.).

Таблица 1. Разнообразие риботипов у диплоидных видов рода *Avena* с кариотипами CC.

Table 1 Major ribotypes of wild species of the genus *Avena* L. with C-genomes

Species	Ploidy	Genome	Number of NORs in haploid genome	Ribotype	Number of the reads	% from the total number of the reads
<i>Avena macrosiachya</i>	4	Cm	4	Cm1A	4971	52
				Cm1B	3039	32
<i>Avena ventricosa</i>	2	Cv	1	Cv1	12,560	81
<i>Avena pilosa</i>	2	Cp	2	Cp1A	13,566	82
				Cp1B/Ctotal c1A	1749	11
<i>Avena clauda</i>	2	Cp	2	Ce1A	5320	21
				Ce1B	2695	10
				Ce2A	3195	12
				Ce2B	1777	7
				Ce2C	1305	5
<i>Avena bruhnsiana</i>	2	?	2	Cv1	10,350	67
				Ce1B	1675	11
				Cp1B/Ce1A	519	2

Изучение внутригеномного полиморфизма этой последовательности у видов с C-геномом показало (таблица 1), что виды с одной NOR-A. *ventricosa* демонстрирует один доминирующий вариант рДНК риботипа Cm1 (81% всех прочтений). 19% прочтений в этом геноме являются минорными вариантами основной версии рДНК. У

тетраплоидного вида *A. macrostachya* мы видим два близкородственных основных риботипа (Cm1A – 52% и Cm1B – 32%) (табл. 1). У диплоидного вида с двумя ЯОР, *A. pilosa*, мы обнаружили 2 основных риботипа — Cp1A (82%) и Cp1B (11%). Этим двум основным версиям рДНК близки минорные варианты. Уровень различий между разными риботипами невелик — один или несколько SNP и делеции олигонуклеотидов.

Совершенно иная картина риботипов у вида *A. clauda*. рДНК этого вида удивительно разнообразна. Во-первых, это риботип Cc1A, который идентичен риботипу Cp1B (21% прочтений) и близкородственному риботипу Cc1B (10% прочтений) (табл. 1). Затем ряд риботипов Cc2A, Cc2B и Cc2C, последовательность которых близка к рДНК видов с геномами типа A. Паттерн рДНК этого вида характеризуется большим количеством минорных вариантов, одна группа которых образует «облако» вокруг мажорных вариантов Cc1B–Cp1B/Cc1A, а вторая группа близка к вариантам риботипов из Cc2-семейство. Характер риботипов *A. bruhnsiana* показывает, что это вид гибридного происхождения, в геноме которого основная часть рДНК (67%) представлена риботипом C1v, но 11% генома приходится на риботип Cc1B (11%) и 2% прочтений приходится на риботип Cp1B/Cc1A (табл. 1). Отметим, что близкое родство между *A. bruhnsiana* и *A. ventricosa* подтверждается тем, что минорный вариант рДНК с протяженной делецией в районе ITS1 длиной 70 п.н. (107 и 105 прочтений у *A. ventricosa* и *A. bruhnsiana* соответственно — 0,7% прочтений в обоих геномах) обнаружен только в геномах этих двух видов. Вопрос о втором предке этого вида не решен. Можно предположить, что это была *A. clauda*, поскольку нами обнаружены риботипы *A. clauda*, общие с риботипами *A. bruhnsiana*. В геноме *A. bruhnsiana*, помимо рДНК варианта Cc1B, мы можем видеть минорные варианты, близкие к риботипам Cc2B — 1,7% таких прочтений в геноме.

Таким образом, сравнительный анализ внутригеномного полиморфизма генов 35S рРНК дикорастущих диплоидных видов рода *Avena* с С-геномами показал, что среди них факультативно происходят явления межвидовой гибридизации. Образцы овсов, определенные как *Avena bruhnsiana* по набору риботипов отличаются от риботипов, найденных в геноме вида *A. ventricosa*— это родственные, но разные виды. *A. ventricosa* — один из предков вида *A. bruhnsiana*.

3. ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИХ СВЯЗЕЙ ДИКИХ ДИПЛОИДНЫХ ВИДОВ с ГЕНОМАМИ А- и С- И КУЛЬТУРНЫХ ПОЛИПЛОИДНЫХ ВИДОВ ОВСА (*AVENA L.*)

Результаты targeted-секвенирования «популяции» ITS-последовательностей полиплоидных геномов *Avena* были обработаны с помощью программы TCS (Clement et al., 2000). Алгоритм TCS основан на вероятностном методе статистической парсимонии и позволяет определять вероятность связи между всеми гаплотипами с индикацией числа мутаций, по которым различаются исследуемые гаплотипы. Результаты TCS-расчетов были обработаны в программе tcsBU (Múrias dos Santos et al., 2016).

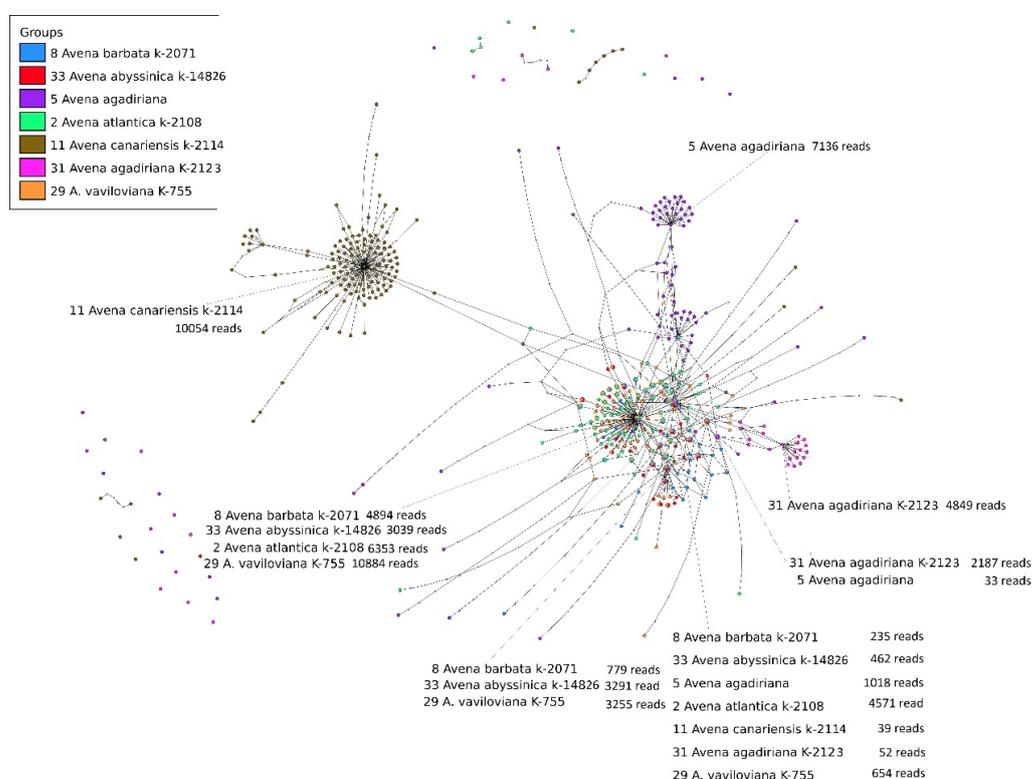


Рис. 1. Схема родства риботипов культурного *A. abyssinica* и дикорастущих видов, построенная с помощью программы TCS 2.1.

Наши данные по исследованию геномной структуры тетраплоида (AB) *A. abyssinica* подтверждают ранее предложенную схему эволюции вида (Лоскутов, 2007). А-геном получен этим видом от диплоидного *A. atlantica* В. R. Baum et Fedak (As, 6353 рида) через тетраплоидный *A. vaviloviana* (Malzev) Mordv. (10884 рида) (рис. 1). Предположительно В-геном включает вторые по массовости риботипы *A. abyssinica*

(3291 рид) и *A. vaviloviana* (3255 ридов). Однако тетраплоид *A. agadiriana* В. R. Baum et Fedak, считавшийся предком для *A. vaviloviana* и *A. abyssinica*, формирует уникальное семейство риботипов, к которому принадлежат самые массовые варианты последовательностей.

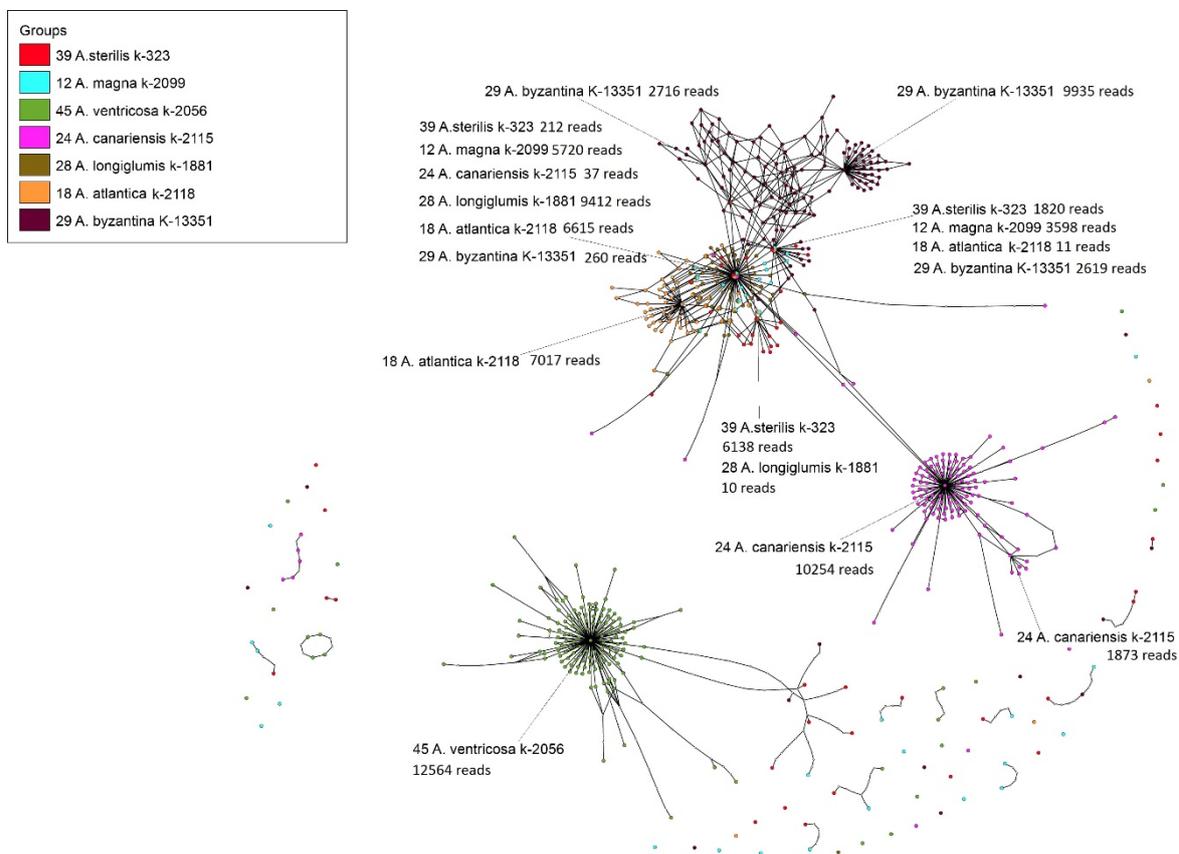


Рис. 2. Схема родства риботипов культурного *A. byzantina* и дикорастущих видов, построенная с помощью программы TCS 2.1.

Второй по представленности риботип *A. agadiriana* гомологичен второму по численности последовательностей риботипу *A. atlantica*. Культурный гексаплоид *A. byzantina* (ACD-геном) рядом исследователей считается близким к *A. sativa* (Лоскутов, 2007). Наш анализ NGS показал, что наиболее массовые риботипы (9935 и 2716 ридов) являются уникальными, образуя собственную сеть (рис. 2). В то же время третий по представленности риботип объединяется со вторыми по массовости риботипами *A. magna* Н. С. Murphy et Terrell и *A. sterilis* L. (3598 и 1820 ридов соответственно). *A. ventricosa* Balansa ex Coss. (Cv), ранее считавшийся донором С-генома для гексаплоидов, не вносит свои риботипы в общий набор для *A. byzantina*. Согласно ранее предложенным схемам, *A. byzantina* получил AC-геном от *A. magna*, а D-геном (вариант А-генома) – от *A. sterilis*. Но мы видим, что самые представленные последовательности *A. byzantina*, по

нашим данным, имеют независимое происхождение: вероятно, от ныне вымершего предка либо в результате постгибридизационной трансформации. Лишь третий по представленности в геноме *A. byzantina* риботип гомологичен характерным для *A. magna* и *A. sterilis*, но при этом самый массовый риботип *A. sterilis* также уникален и формирует собственное семейство.

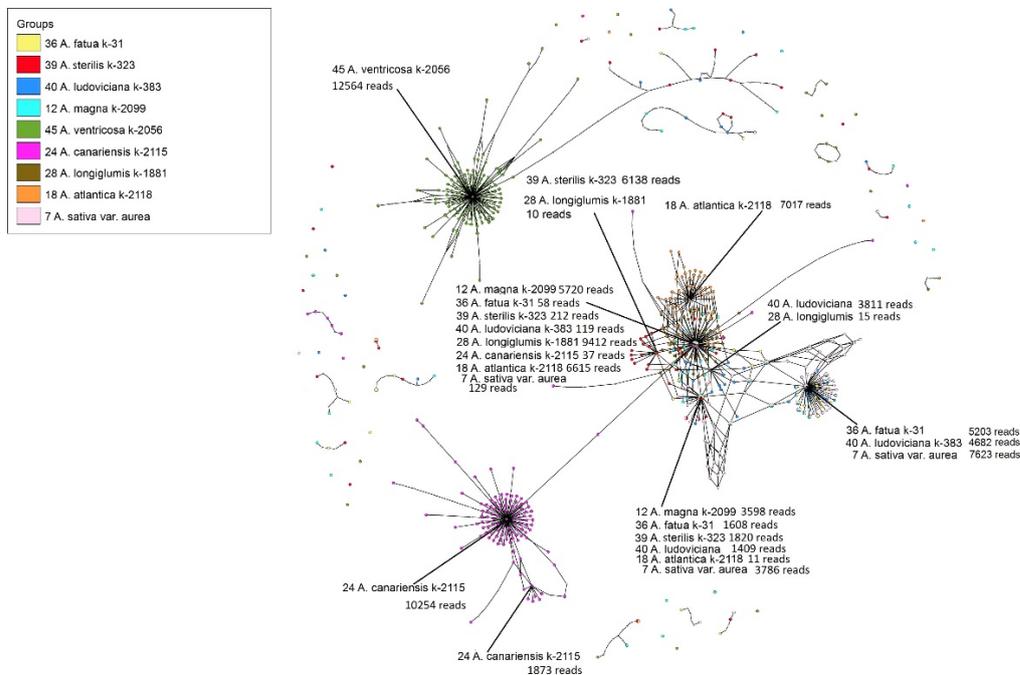


Рис. 3. Схема родства риботипов культурного *A. sativa* и дикорастущих видов, построенная с помощью программы TCS 2.1.

На нашей схеме сложно выделить геном D, данные NGS говорят, скорее, о разных вариантах генома A. Сами риботипы A-генома, вероятнее всего, были унаследованы *A. byzantina* от диплоидного вида *A. atlantica* (As-геном), но были также серьезно изменены, поскольку массовому риботипу *A. atlantica* (6615 ридов) гомологична лишь минорная фракция *A. byzantina* (260 ридов). *A. sativa* (в анализ взята разновидность *A. sativa* var. aurea) – гексаплоид с геномным набором ACD. Наши данные отчасти подтверждают ранее предложенную схему филогении этого вида (Лоскутов, 2007). A-геном *A. sativa* (3786 ридов) получен от тетраплоида *A. magna* (3598 ридов) (рис. 3). Но самым массовым по количеству прочтений (ридов) является риботип, соответствующий геному D (7623 рида). Он гомологичен таковому у гексаплоида *A. ludoviciana* Durieu (4682

рида). Тем не менее второй по представленности риботип *A. ludoviciana* (3811 ридов) не гомологичен предполагаемому А-геному у *A. sativa*.

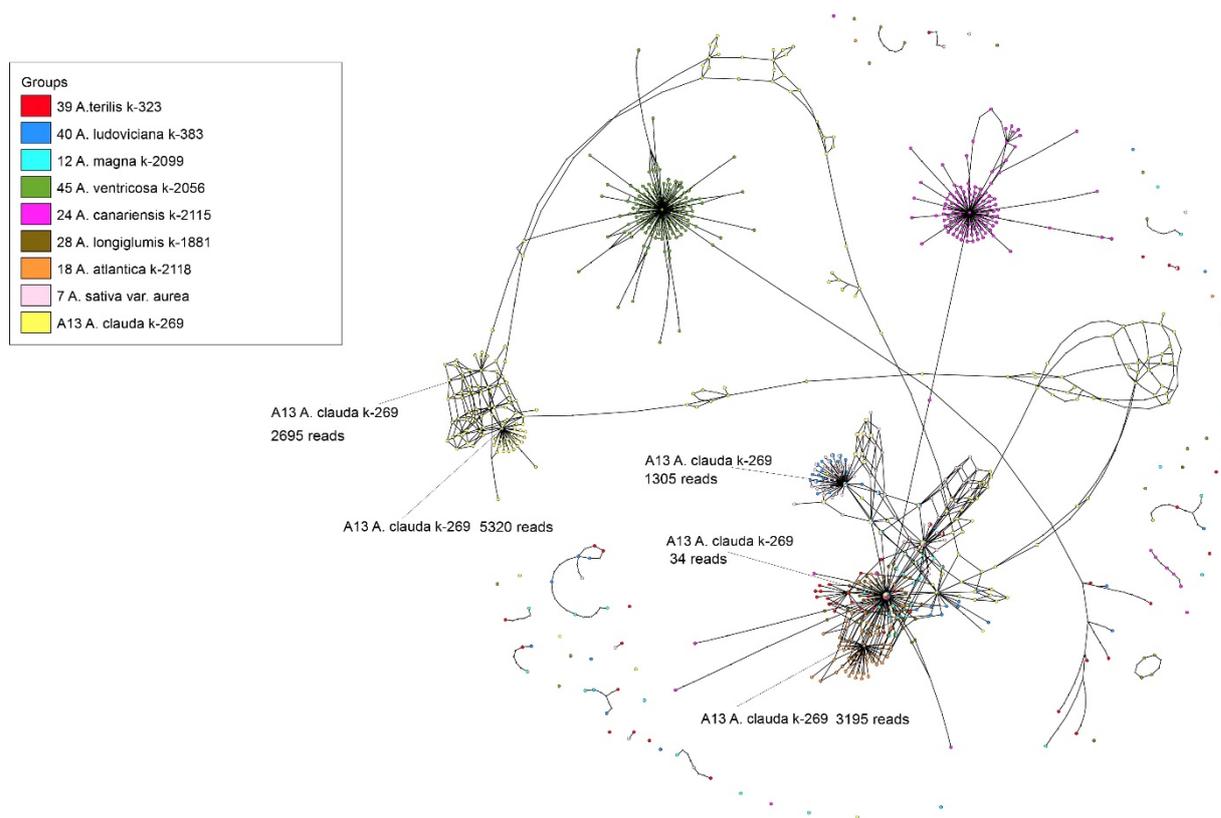


Рис. 4. Схема, показывающая вклад генома диплоида (Cp) *A. clauda* в общий геномный набор гексаплоида (ACD) *A. sativa* и родственных видов.

Чтобы выявить происхождение С-субгенома в геномном наборе гексаплоида *A. sativa*, нами были взяты в анализ диплоидные виды с С-геномом *A. ventricosa* (Cv) и *A. clauda* Durieu (Cp) (рис. 4). Риботипы С-геномного *A. ventricosa* не принимали участия в формировании ЯОР генома полиплоидного *A. sativa* или были утрачены из него в ходе фракционирования генома этого полиплоида. *A. clauda* дает неожиданную картину родства. Его С-геном, в который входит самый массовый риботип (5320 ридов), также удален от *A. sativa* и родственных видов. Однако в геномном составе диплоида *A. clauda* оказываются и семейства риботипов, гомологичные А-геномам. Второй по массовости риботип *A. clauda* (3195 ридов) гомологичен А-геному *A. ludoviciana* (3811 ридов). Также один из массовых риботипов *A. clauda* (1305 ридов) входит и в предполагаемый D-субгеном *A. sativa*. Можно предположить, что *A. clauda* – это либо палеополиплоид с диплоидным хромосомным набором, либо гомоплоидный гибрид С- и А-геномного овса. Вполне возможно также, что мы видим здесь на примере *A. clauda* акт эволюционного

преобразования от С-генома, который, по некоторым данным, наиболее примитивен в роде *Avena* (Loskutov, Rines 2011) к А-геному.

Таким образом, впервые методом NGS проведен филогенетический анализ путей одомашнивания трех культурных видов овса: *A. abyssinica*, *A. sativa*, *A. byzantina*. Показано, что наиболее массовый риботип гексаплоида *A. sativa* унаследован от *A. ludoviciana*, а второй по массовости – от *A. magna*. *A. byzantina* обладает двумя уникальными семействами риботипов, скорее всего, унаследованными от вымершего вида овса или криптовида, до сегодняшнего момента не обнаруженного. Тетраплоид *A. abyssinica*, вероятнее всего, происходит от дикорастущего *A. vaviloviana*. При этом *A. agadiriana*, считавшийся ранее предковым для *A. abyssinica* и его группы родства, формирует отдельные уникальные субгеномы (семейства риботипов).

4. ИССЛЕДОВАНИЕ РИБОТИПОВ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ПОЛУЧЕННЫХ МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДОВ ПОЛИПЛОИДНЫХ ВИДОВ РОДА *AVENA* L.

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).

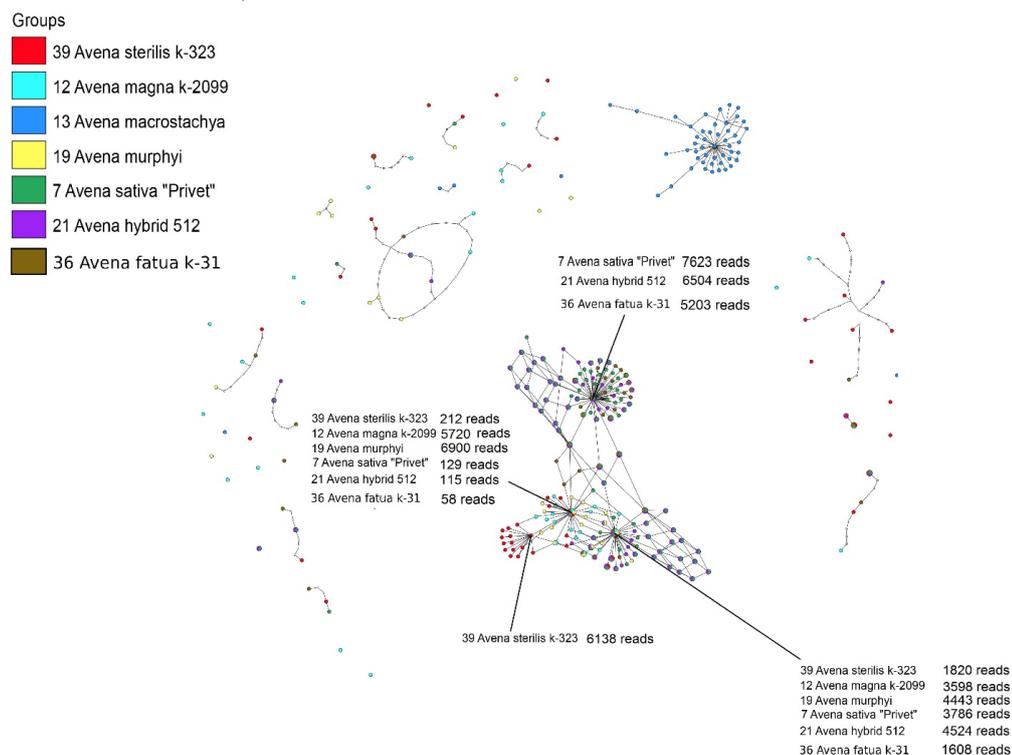


Рис. 5. Схема, отражающая разнообразие и родство риботипов сложного гибрида Г/О-512, построенная с помощью программы TCS 2.1.

По нашим данным, Гибрид Г/О-512 имеет в своем составе два наиболее массовых риботипа (тип последовательностей рибосомной ДНК 18S–ITS1) (рис. 5). Первый из них (7623 рида (прочтений)) соответствует 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).

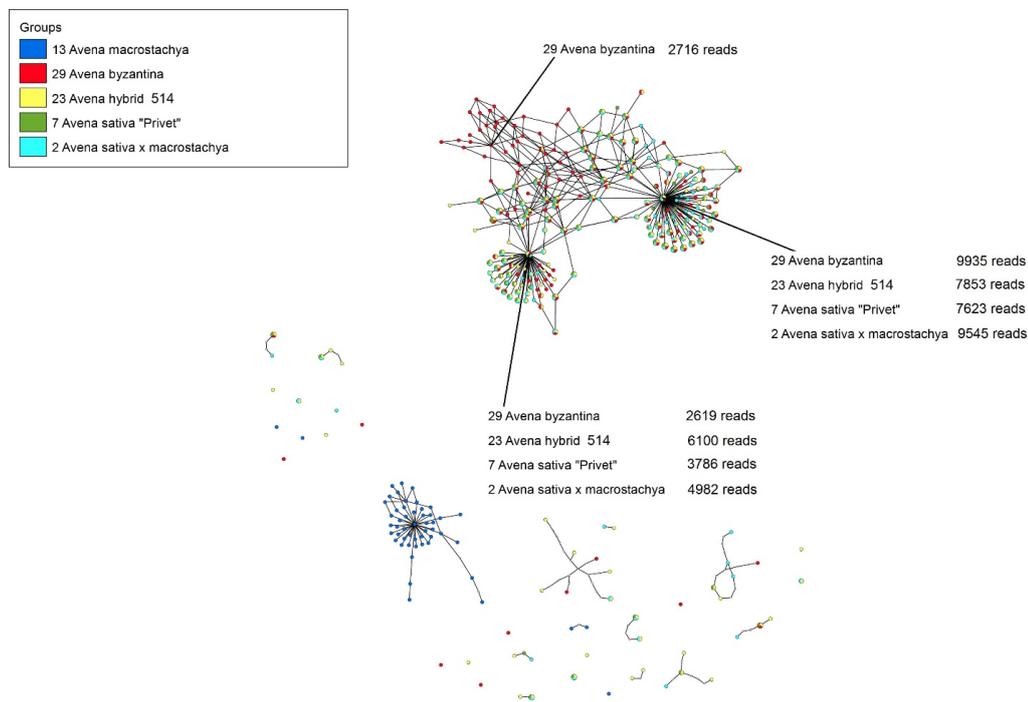


Рисунок 6. Схема, отражающая разнообразие и родство риботипов сложного гибрида Г/О-514, построенная с помощью программы TCS 2.1.

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. 6). Они формируют два наиболее массовых риботипа совместно с риботипами самого гибрида. При этом *A. byzantina* также формирует один отдельный вариант массовых риботипов (2716 ридов).

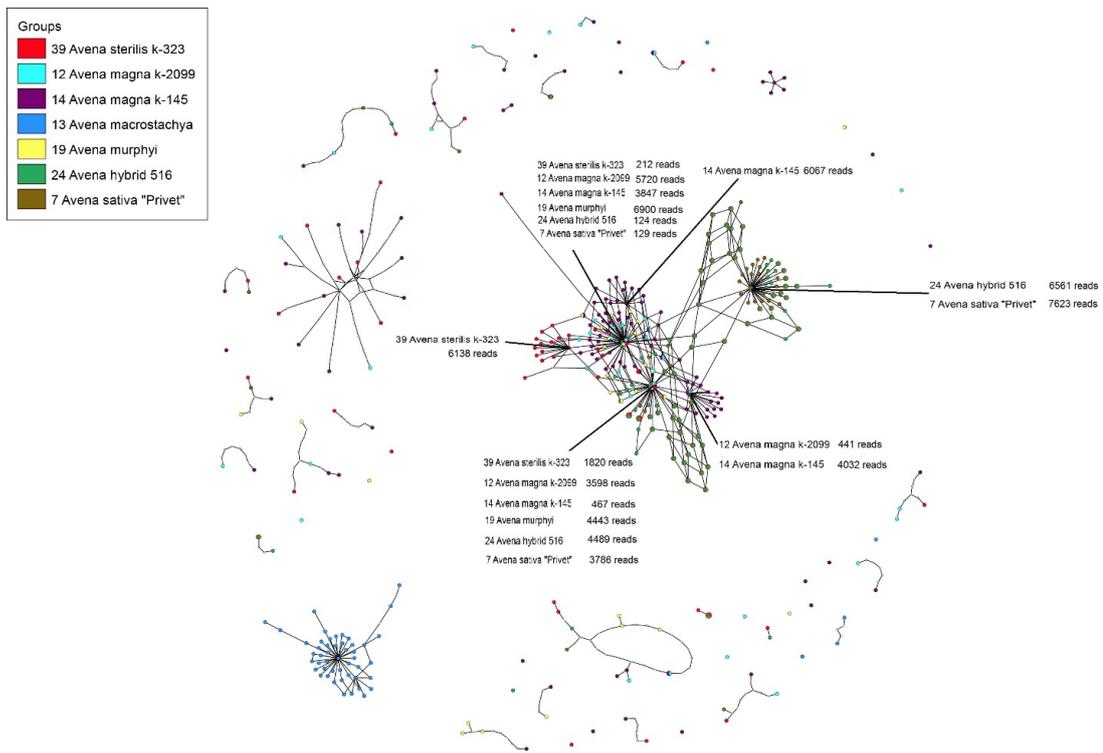


Рисунок 7. Схема, отражающая разнообразие и родство риботипов сложного гибрида Г/О-516, построенная с помощью программы TCS 2.1.

Сложный гибрид Г/О-516 отличается разнообразием риботипов. На рис. 7 мы видим 6 наиболее массовых по частоте риботипов. Самый массовый риботип этого гибрида (6561 прочтение) закономерно общий с *A. sativa* (7823 ридов). Второй по представленности последовательностей вариант субгенома гибрида 516 (4489 ридов) группируется со вторыми по массовости субгеномами *A. sativa* (3786 ридов), *A. murphyi* (4443 ридов), *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 ридов. 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 ридов). 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.

Один из предварительных выводов изучения геномных композиций сложных гибридов овса ($ACD \times AC \times AB$) в том, что наиболее представленные риботипы (массовые по количеству прочтений 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 или сальтационно 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* × *A. macrostachya*, используемый для дальнейшей гибридизации с другими видами овса, на самом деле выступает в следующих поколениях гибридизации как «чистый» *A. sativa*.

Кариологический анализ исследуемого материала проводился на всех стадиях вышеописанных экспериментов, результаты этой части исследований, в части, касающейся дикорастущих видов, опубликованы в высокорейтинговом журнале *Taxon* в разделе "Хромосомные числа".

5. ПРОВЕДЕНИЕ ФЕНОТИПИРОВАНИЯ КУЛЬТУРНЫХ И ДИКИХ ВИДОВ ОВСА.

Показано, что дикие сородичи сельскохозяйственных культур могут являться источником ценных признаков для новых сортов. В ВИР хранится богатая коллекция видов дикорастущих видов овса, которая много лет изучается, в том числе анализируется биохимические показатели качества, устойчивости к биотическим и абиотическим стрессорам и др. (Лоскутов, 2007).

В 2022 г. было продолжено полевое фенотипирование и размножение с целью выделения ДНК для создания геномной коллекции образцов культурных и диких видов овса из мировой коллекции ВИР на полях Пушкинских лабораторий ВИР. Стандартом служил районированный в Ленинградской области сорт Привет (к-14787, Московская обл.), который располагался в посевах через каждые 20 делянок. Посев проведен в оптимальный срок – 10 мая на делянках 1 м². Всходы отмечены 17 мая.

В полевое изучение были 25 местных образцов овса, относящихся к четырем культурным видам с различным уровнем ploидности: *A. strigosa* Schreb. (диплоид) subsp. *brevis*, subsp. *strigosa*, subsp. *nudibrevis*; *A. abyssinica* Hochst.; *A. byzantina* C. Koch. (гексаплоид); *A. sativa* L. (гексаплоид) subsp. *sativa* и subsp. *nudisativa*. Образцы из 10 стран Европы, Азии, Африки и Америки. Образцы высевались на делянках площадью 0,5 м² в полевом севообороте. Кроме того, материалом исследования послужили 34 образца диких видов овса из коллекции ВИР, относящиеся к 4 видам из 10 стран мира. Образцы с различным уровнем ploидности: тетраплоидные – *A. barbata* Pott. из Ирана, *A. magna* Murph. et Terr. из Марокко; гексаплоидные – *A. ludoviciana* Dur. из Краснодарского кр., Турции, Израиля, Ирана, Ирака и Сирии, *A. sterilis* L. из Алжира, Турции, Израиля, Ирака, Ирана, Ливана и Туниса. Образцы высевали на опытном поле Пушкинских лаб. ВИР на делянках 0,2 м². В течении вегетации проводились фенологические наблюдения и оценки по методике ВИР (Лоскутов? 2007).

Продолжительность периода вегетации у образцов диких видов сравнивали со стандартом – районированным в Ленинградской обл. сортом Привет (к-14787, Московская обл.). В 2022 г. продолжительность периода вегетации у диких видов овса была длиннее, чем у стандарта и колебалась от 78 до 136 дней. Первая половина вегетации от всходов до выметывания продолжилась от 46 до 108 дней, от выметывания до созревания – от 24 до 49 дней. Самыми позднеспелыми в изучении были образцы *A. ludoviciana* из Краснодарского края с периодом вегетации от 122 до 136 дней. Самым ранним был образец *A. ludoviciana* из Ирана (к-403), который созрел за 78 дней на 15 дней позже стандарта. Период вегетации у образцов *A. sterilis* составил 85-92 дня, у *A. barbata* – 122 дня, у *A. magna* – 85 и 89 дней.

Высота растений у образцов была ниже, чем в предыдущие годы и изменялась в пределах от 40 до 110 см, что связано с высокой температурой воздуха и недостатком

влаги в июне и июле. Среднюю высоту (90-110 см) имели 21 образец. Самыми короткими были образцы *A. ludoviciana* (к-432, к-435) из Ирака с высотой растений 40 и 50 см. Образец *A. barbata* имел высоту 110 см, образцы *A. magna* – 85 и 90 см, у образцов *A. sterilis* – от 60 до 110 см, у *A. ludoviciana* – от 40 до 100 см. Проведена полевая оценка устойчивости овса к болезням на естественном инфекционном фоне. Основным заболеванием на растениях овса в 2022 г. был вирус желтой карликовости ячменя (ВЖКЯ). Поражение составило от 1 до 5 баллов, у стандарта – 7 баллов. Корончатая ржавчина появилась с опозданием и задела только позднеспелые образцы *A. ludoviciana* из Краснодарского кр., у которых поражение составило 3-5 баллов.

В результате изучения был выделен интересный исходный материал для селекции с повышенной зерновой продуктивностью и устойчивостью к болезням среди культурных и диких видов овса. Из размноженных образцов выделено ДНК для создания геномной коллекции ВИР. Создание геномной коллекции староместных сортов овса и диких видов рода *Avena* в расширенном виде. Из 40 образцов была выделена геномная ДНК (из семян) СТАВ методом (Doyle & Doyle 1987) с модификациями. Для образцов с слишком низкой концентрацией ДНК, выделение проводили повторно, используя Qiagen DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA). Для амплификации района ITS1-5.8S рДНК-ITS2 ядерного генома в ходе полимеразной цепной реакции использовались праймеры: Its-1P AACCTTATCATTTAGAGGAAGG (Ridgway et al., 2003) и Its-4 CCTCCGCTTATTGATATGC (White et al., 1990). ПЦР производили на амплификаторах «PCR-Sprint» (Hybaid Inc., Великобритания), «Techne TC412» (BarloworldScientific, Великобритания). Параметры циклов амплификации: 1 цикл: 5 мин 95°C; 30 циклов: 1 мин 94°C; 1 мин 55-56°C; 1 мин. 72° C; 1 цикл: 10 мин 72°C. Полученные в ходе амплификации фрагменты выделялись из 1-1.5% агарозного геля с помощью набора QiaGen Extraction Kit (Qiagen, Inc., Германия).

6. ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ВИДОВ РОДА *AEGILOPS*.

Несколько дикорастущих диплоидных видов рода *Aegilops* являются предками двух важнейших культурных видов злаков – гексаплоидной мягкой и тетраплоидной твердой пшениц. Виды этого рода являются носителями ряда ценных в сельскохозяйственном отношении признаков, которые могут использоваться в селекции. Так вид *Aegilops tauschii* Coss (syn. *Ae. squarrosa* L.) – это диплоидный злак ($2n = 14$, DD) является одним

из предков мягкой пшеницы. Он также участвовал в образовании ряда полиплоидных видов *Aegilops* секции *Vertebrata* (Zhuk.) Kihara, являясь при этом донором их цитоплазматического генома. Считается, что центр образования и генетического разнообразия *Ae. taushii* находится в Иране – на южном побережье Каспийского моря и в прилегающих районах Азербайджана. Оттуда он распространился на восток в виде “широкой полосы”, простирающейся от гор Копетдага (Туркменистан) до Алматы (Казахстан) на северо-востоке и до Индии и бассейна реки Хуанхэ в Китае. Продвижение *Ae. taushii* из центра образования в западном направлении шло в основном в Закавказье и Восточную Турцию, в меньшей степени – в северную и восточную части Дуги плодородия (Сирия и Ирак). Экспедицией ВИР им. Н.И. Вавилова в 2003 году на территории Краснодарского края были найдены формы *Ae. taushii*, различающиеся по морфологии колоса, окраске, высоте растений, что является самой северо-западной точкой ареала вида. В качестве заносного вида *Ae. taushii* зарегистрирован в США. и некоторых странах Европы – Хорватии, Франции, Германии, Греции, Италии и Нидерландах. *Ae. taushii* из разных местообитаний характеризуется высокой изменчивостью морфологических, генетических и физиологических признаков (рис. 8).

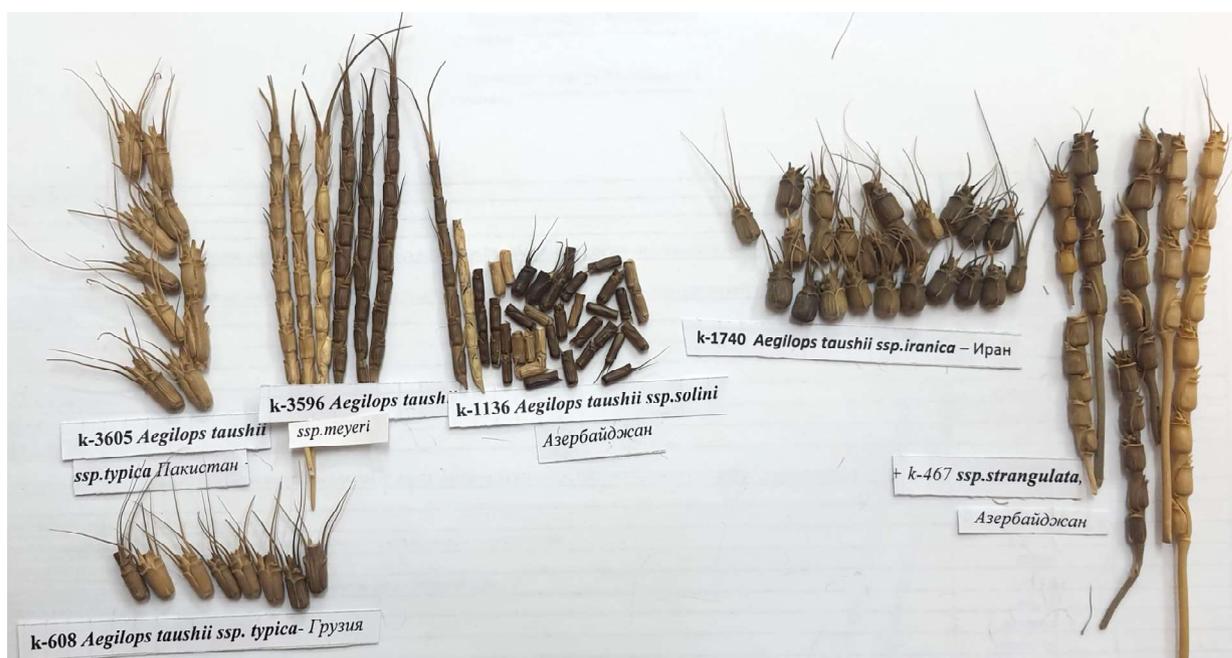


Рисунок 8. Внутривидовое разнообразие вида *Aegilops taushii*.

Еще один вид этого рода, *Aegilops comosa*, обладает устойчивостью к вредителям и болезням (Riley et al., 1968; Kishi, 2019) и солеустойчивостью (Kishi, 2019). В конце

1960-х годов селекционеры Райли, Чепмен и Джонсон путем межвидовых скрещиваний привнесли гены устойчивости к желтой ржавчине от *Ae. comosa* в сорт пшеницы Compair (Riley et al., 1968). *Ae. comosa* сыграл важную роль и в эволюции полиплоидных эгилопсов. На основании анализа поведения хромосом в мейозе Кихара (Kihara, 1954) предположил, что этот вид был одним из диплоидных предков пяти тетраплоидных видов этого рода. Недавние исследования с использованием данных сравнительной геномики подтвердили наличие М-генома, происходящего от *Ae. comosa* в кариотипах *Ae. biuncialis* и *Ae. geniculata* (Abdolmalaki et al. 2019). В то же время эти исследования выявили значительные перестройки хромосом М-генома в кариотипах потомков - тетраплоидных видов, которые, по-видимому, по-разному изменяли геном у *Ae. biuncialis* и *Ae. geniculata* (Said et al., 2021).

Нами был изучен полиморфизм кариотипов *Ae. comosa*, в том числе 16 образцов подвида *Ae. comosa* subsp. *heldreichii*, АЕ 783 (а) и 20 образцов *Ae. comosa* subsp. *comosa*, собранных в различных регионах Греции и Турции и хранящихся в генетических коллекциях Всероссийского института генетических ресурсов растений (ВИР) им. Н.И. Вавилова. Семена проращивали на влажной фильтровальной бумаге в чашках Петри при 24°C. Проростки с корнями ~0,5 см переносили в 1,25 мМ раствор гидроксимочевины на 18 ч, тщательно промывали дистиллированной водой и выращивали в чашках Петри с дистиллированной водой в течение 5 часов. Корни нарезали и предварительно обрабатывали ледяной водой в течение 24 ч, а затем фиксировали в растворе этанол-ледяная уксусная кислота (3:1). Фиксированные корни до использования хранили в растворе фиксатора при -20°C. Препараты метафазных хромосом готовили раздавливанием, покровные стекла удаляли после замораживания в жидком азоте, а предметные стекла выдерживали в 96%-ном этаноле при -20°C. Препараты исследовали на эпифлуоресцентном микроскопе Zeiss Imager D1. Метафазные хромосомы фотографировали с объективом 100x с помощью черно-белой цифровой камеры AxioCam HRm с использованием программного обеспечения AxioVision, версия 4.8. Изображения обработаны с помощью Adobe Photoshop версии 7.0. Образцы COMOSA и HELDREICHII демонстрируют явные различия в морфологии колоса (рис. 9) и хромосомный полиморфизм (рис. 10).

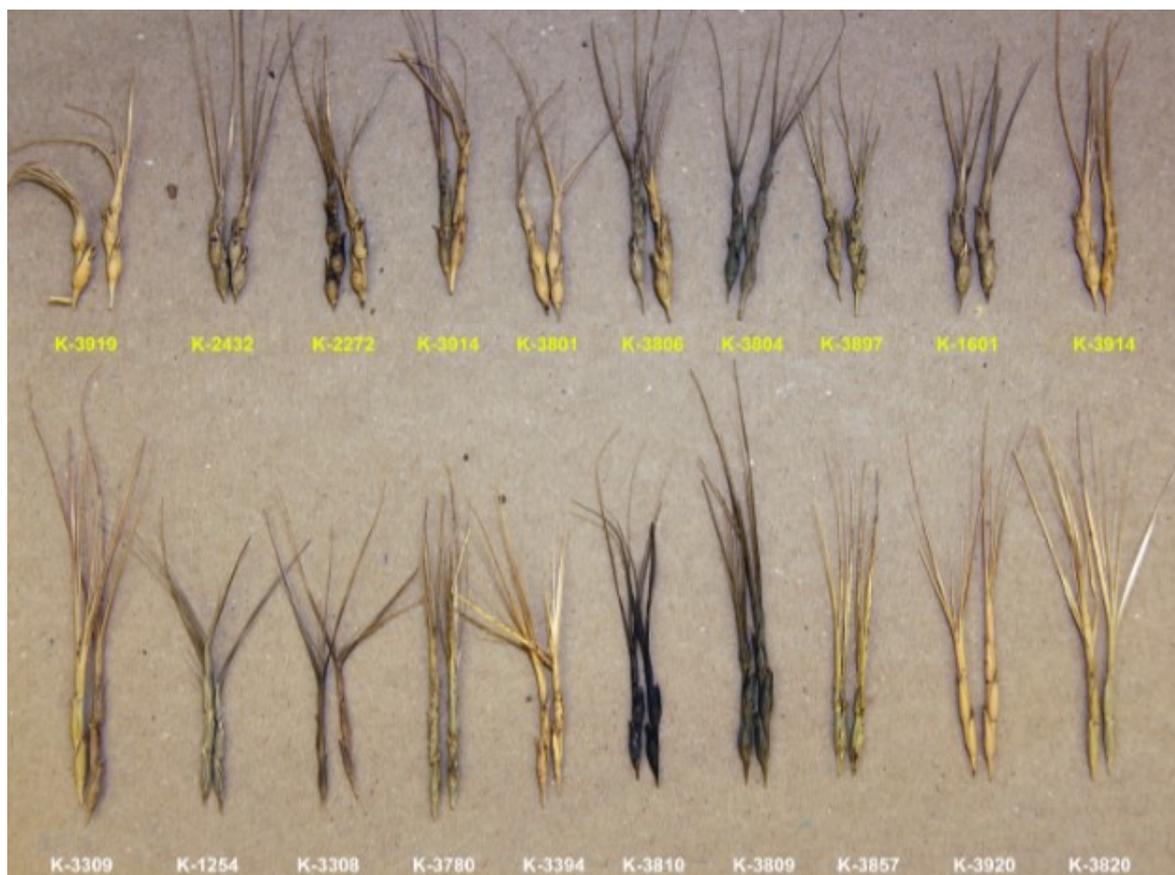


Рисунок 9. Морфологическое разнообразие *Aegilops comosa*.

Кариотипы *Ae. comosa* subsp. *heldreichii*, АЕ 783 (а) и *Ae. comosa* subsp. *comosa* имеют сходное строение и состоят из метацентрических, субметацентрических и субacroцентрических хромосом (рис. 10 а-в). Несмотря на общее кариотипическое сходство, мы наблюдаем внутривидовую изменчивость числа и морфологии сателлитных (ЯОР) хромосом (рис. 10г). Большинство образцов имеют две пары сателлитных хромосом, различающихся по морфологии (рис. 10а, б), но немногие генотипы несут только одну пару хромосом с ЯОР (рис. 10б). Одна пара сателлитных хромосом обнаружена у одного из трех проанализированных генотипов АЕ 1254, у одного из двух проанализированных генотипов каждого К-3824 и К-3920 (*Ae. comosa* subsp. *comosa*) и у обоих изученных генотипов К-3806 (*Ae. comosa* subsp. *heldreichii*).

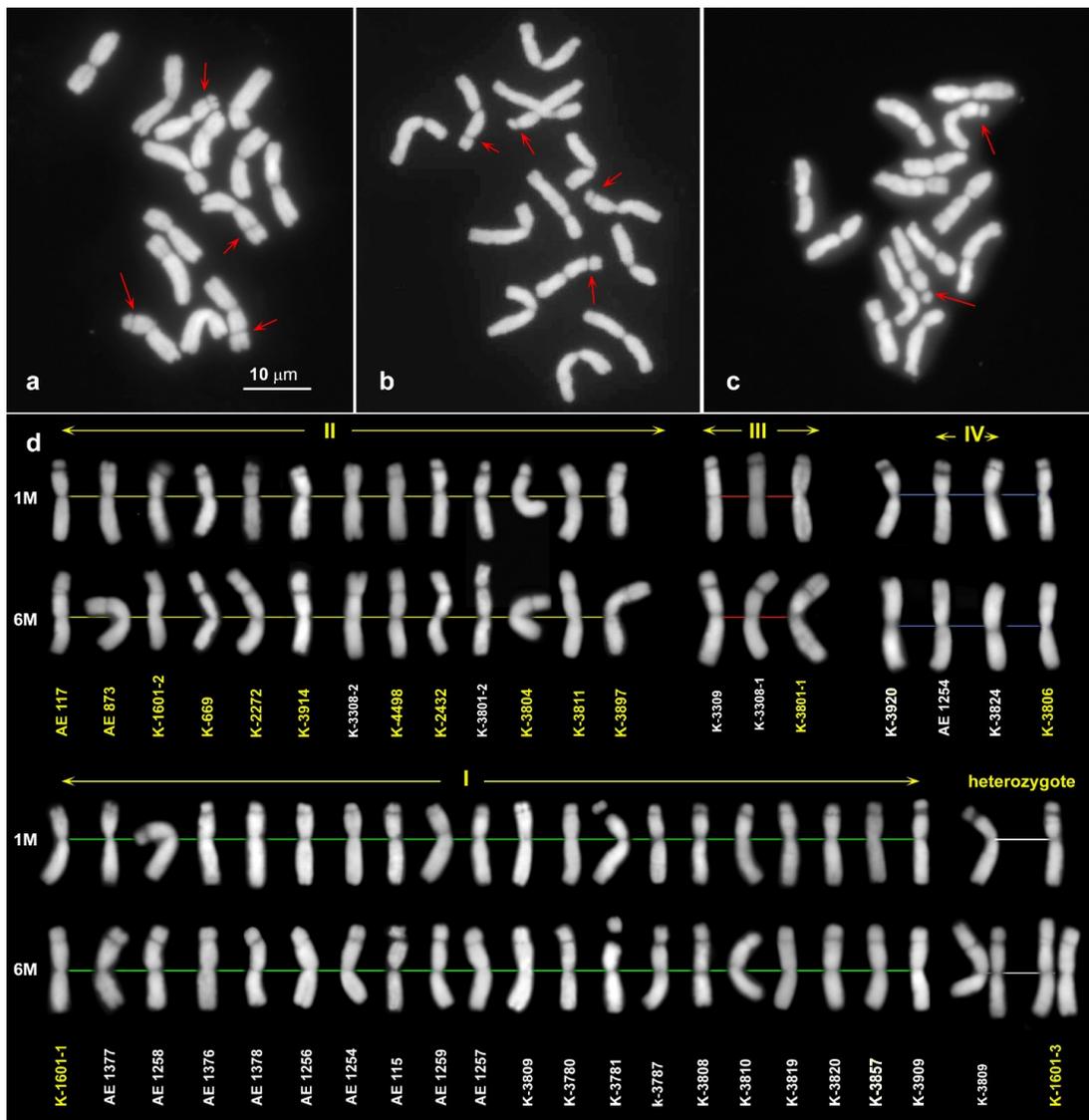


Рисунок 10. Хромосомные наборы *Ae. comosa* subsp. *heldreichii*, AE 783 (a) и *Ae. comosa* subsp. *comosa*, AE 1258 (b) and AE 1254 (c). Хромосомы, несущие гены 35S рРНК (ЯОР) показаны стрелками. Scale bar – 10 mm.

7. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ МЕЖВИДОВОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ У ОТДАЛЕННЫХ РОДСТВЕННИКОВ КУЛЬТУРНЫХ ЗЛАКОВ - ВИДОВ РОДА SPARGANIUM L., СЕМ. ТУРНАСЕАЕ, ПОРЯДОК ЗЛАКОЦВЕТНЫЕ (лат. POALES).

Виды рода *Sparganium* L. – водные растения, широко распространенные в умеренной и субтропической зонах Северного и Южного полушарий. Виды *Sparganium* представляют собой важную часть пресноводной растительности. Они служат растениями-эдификаторами и влияют на геоморфологию русел рек. *Sparganium stoloniferum* и, в

меньшей степени, некоторые другие виды ежеголовников используются в традиционной китайской медицине. Сообщалось, что они оказывают терапевтическое воздействие на тромбы, опухоли, эндометриоз и так далее. *S. stoloniferum* обычно используется для лечения эндометриоза и хронического атрофического гастрита. За последнее десятилетие интенсифицированы исследования его химического состава и механизмы фармакологического действия полученных из него химических соединений. Многие виды ежеголовника служат кормом водным пушным зверям (нутрии, ондатре и другим) и водоплавающим птицам. Некоторые виды ценятся в пчеловодстве как перга носы. Как декоративное растение может использоваться при оформлении береговой зоны в искусственных водоёмах.

Количество видов и подвидов в пределах рода *Sparganium* и их таксономическое положение являются предметом давних научных дискуссий. Разные исследователи оценивают количество видов в роде *Sparganium* от 15 до 20. Причина разногласий в том, что, подобно ряду других водных родов, некоторые виды и подвиды *Sparganium* не имеют четких морфологических различий. По этой причине одни исследователи рассматривают морфотип/группу определенных природных популяций в ранге видов, а другие относят их только к рангу подвидов или форм. Например, таксоны *S. emersum* Rehm. (Евразия и запад Северной Америки), *S. acaule* (Beeby ex Macoun) Rydb. (восток Северной Америки) и *S. rothertii* Tzvelev (Евразия) можно рассматривать как отдельные виды или как подвиды полиморфного вида *S. emersum sensu lato*. Другим примером являются таксоны *S. ignorenum* Beeby и *S. microcarpum* (Neum.) Domin; их можно рассматривать как разные виды или как подвиды в виде *S. erectum* L. Кроме того, промежуточные морфологические формы широко распространены у *Sparganium*. Представляется, что репродуктивная изоляция между видами в роде не является полной и допускает межвидовую гибридизацию. Гибриды *Sparganium* могут быть стерильными, частично фертильными или полностью фертильными. Однако значение и распространение межвидовой гибридизации в видообразовании *Sparganium* до сих пор мало изучены.

Эффективным инструментом для обнаружения гибридов растений в природе является изучение внутригеномного полиморфизма рДНК (см. выше). Основная цель нашего исследования заключалась в изучении роли событий гибридизации в роде *Sparganium*. Мы применили метод NGS-секвенирования для анализа внутригеномного полиморфизма

области ITS1 гена 35S рРНК. Было изучено пятнадцать видов и подвидов *Sparganium*, включая как морфологически хорошо идентифицированные виды и подвиды, некоторые из которых, вероятно, имеют гибридное происхождение, а также образцы растений, которые проявляли морфологические признаки, промежуточные между двумя видами (т.е. вероятные гибриды).

Мы поставили перед собой следующие вопросы: 1) Доказывает ли молекулярный анализ гибридное происхождение морфологически промежуточных форм, выявленных на основе морфологического анализа? (2) Могут ли хорошо идентифицированные виды иметь в своем геноме признаки гибридного происхождения? (3) Возможна ли гибридизация между видами из разных отделов и видами из разных подродов в роде *Sparganium*?

Чтобы оценить внутривидовое разнообразие рДНК видов *Sparganium*, мы проанализировали полиморфизм ITS1 в 37 образцах, принадлежащих к 15 видам и подвидам, с помощью высокопроизводительного секвенирования Illumina. Изучено четыре вида и подвида из секции *Erecta*, два вида из секции *Minima* и 9 видов из секции *Natantia*. Алгоритмы USERCH 45 и UNOISE 46 использовались для обработки данных высокопроизводительного секвенирования Illumina для идентификации уникальных вариантов последовательностей ITS1, фланкированных 18S рДНК и 5,8S рДНК, а также для расчета их сравнительной частоты (количество пар прочтений, однозначно картированных).

Полученные варианты последовательности рДНК называются ZOTU (OTU нулевого радиуса) или риботипами. В дальнейшем анализе использовались ZOTU с числом прочтений 10 и более. В нашем исследовании мы разделили риботипы на основные, на долю которых приходилось не менее 2% прочтений в выборке, и минорные. Всего было идентифицировано 64 основных риботипа и около 150 минорных риботипов. Каждому основному риботипу было присвоено уникальное имя. Некоторые основные риботипы отличались друг от друга на 1-2 SNPs; мы обозначили эти варианты буквами, объединив их в семейства (например, Negle-3A и Negle-3B). Некоторые последовательности имеют большие вставки или делеции; например, Roth-1 и Long-3 имеют делецию 70 п.н., Negle-4 имеет делецию 13 нуклеотидов, а последовательности Hyper-1 и Hyper-2 содержат 3-нуклеотидные вставки CCC.

Для проведения филогенетического анализа использовали основные риботипы наряду с последовательностями из базы данных NCBI. На филогенетическом дереве большинство основных риботипов каждой секции сгруппированы вместе, образуя три клады. Последовательности ITS1 подрода *Sparganium*, по-видимому, расположены ближе к последовательностям рода *Typha*, таким образом занимая базальное положение в роде *Sparganium*. Самая длинная ветвь разделяет два подрода, *Sparganium* и *Xanthosparganium*, и имеет высокую статистическую поддержку.

В подрode *Xanthosparganium* основные риботипы секции *Minima* также образуют одну кладу с высоким значением бутстрепа. Основные риботипы секции *Natantia* сгруппированы вместе, но получить точные филогенетические отношения между ними сложно из-за низкого бутстреп-индекса. Некоторые виды имеют видоспецифические риботипы, родственные риботипам других секций. Например, это относится к риботипу «Natan-3», обнаруженному у вида *S. natans* (секция *Minima*) - он родственен с риботипами секции *Natantia*, и риботип «Prob-1», обнаруженном у вида *S. probatovae* (секция *Natantia*) и родственен с риботипами секции *Minima*.

Количество основных риботипов, обнаруженных в геномах разных видов, неодинаково. Изученные виды можно разделить на три группы, содержащие один, два и более двух основных риботипов. Так, *S. angustifolium* Michx., *S. fallax* Graebn. и *S. subglobosum* Morong в секции *Natantia* подрода *Xanthosparganium* имеют один основной риботип. Образцы *S. glomeratum* (Laest. ex Beurl.) Beurl. имеют как один, так и два основных риботипа. Китайские образцы *S. emersum* (№ 4 и № 5), *S. gramineum* Georgi и *S. probatovae* № 20 обнаруживают два основных риботипа. Образцы *S. ×longifolium* Turcz. ex Ledeb., европейские *S. emersum* (№ 6), *S. probatovae* № 21 и *S. rothertii* имеют от трех до пяти основных риботипов. Образцы обоих видов *S. hyperboreum* Laest. и *S. natans* L. в секции *Minima* подрода *Xanthosparganium* содержат от двух до шести основных риботипов. В секции *Erecta* подрода *Sparganium* образцы *S. erectum* subsp. *erectum* L. имеют от пяти до семи основных риботипов, *S. erectum* subsp. *microcarpum* (Neuman) Domin от одного до трех, *S. erectum* subsp. (Beeby) Schinz & Thell. от двух до семи, а *S. stoloniferum* subsp. *choui* (D. Yu) K. Sun содержит три риботипа (рис. 11).

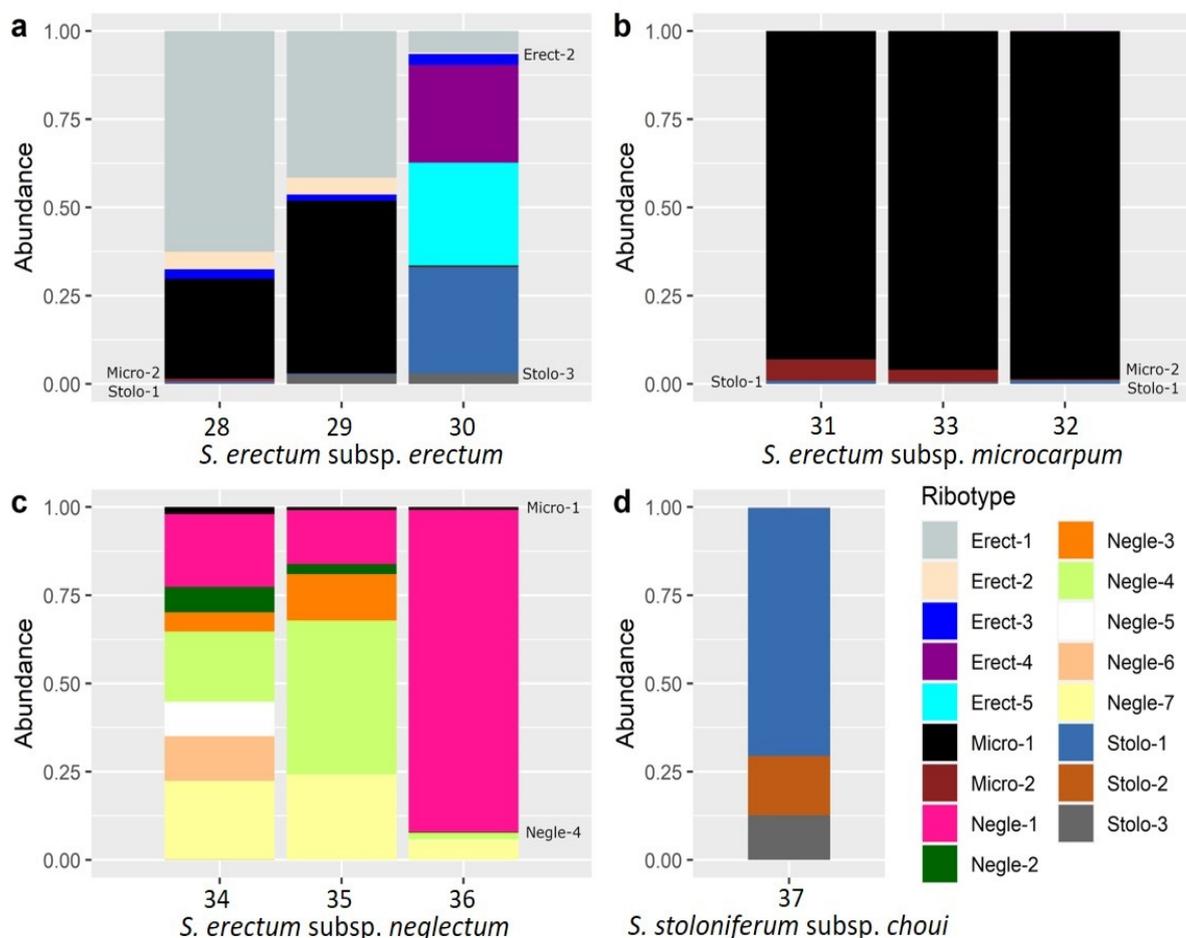


Рисунок 11. Разнообразие и видоспецифичность риботипов у видов секции *Erecta* подрода *Sparganium* рода *Sparganium*.

Многие риботипы не являются видоспецифичными и встречаются одновременно у нескольких видов. Например, *S. glomeratum* из секции *Natantia* имеет три риботипа, принадлежащих к секции *Minima*. Образцы *S. ×longifolium* содержат большинство риботипов *S. emersum* (образец № 6) и один минорный риботип *S. gramineum*. *S. rothertii* имеет как риботипы *S. emersum* № 4 и № 5, так и *S. emersum* № 6. Образцы *S. probatovae* имеют филогенетически разнообразные риботипы, принадлежащие всем трем секциям рода *Sparganium*. Таким образом, *S. probatovae* № 20 содержит риботипы, обнаруженные у *S. emersum/S.rothertii*, риботип «Prob-1» секции *Minima*, не обнаруженный у других видов, незначительное количество *S. hyperboreum/S. natans* риботипы из секции *Minima* и незначительное количество рДНК *S. erectum subsp. erectum* из секции *Erecta*. *S. probatovae* № 21 имеет риботипы *S. gramineum*, *S. emersum/S. rothertii* и *S. erectum sensu lato*.

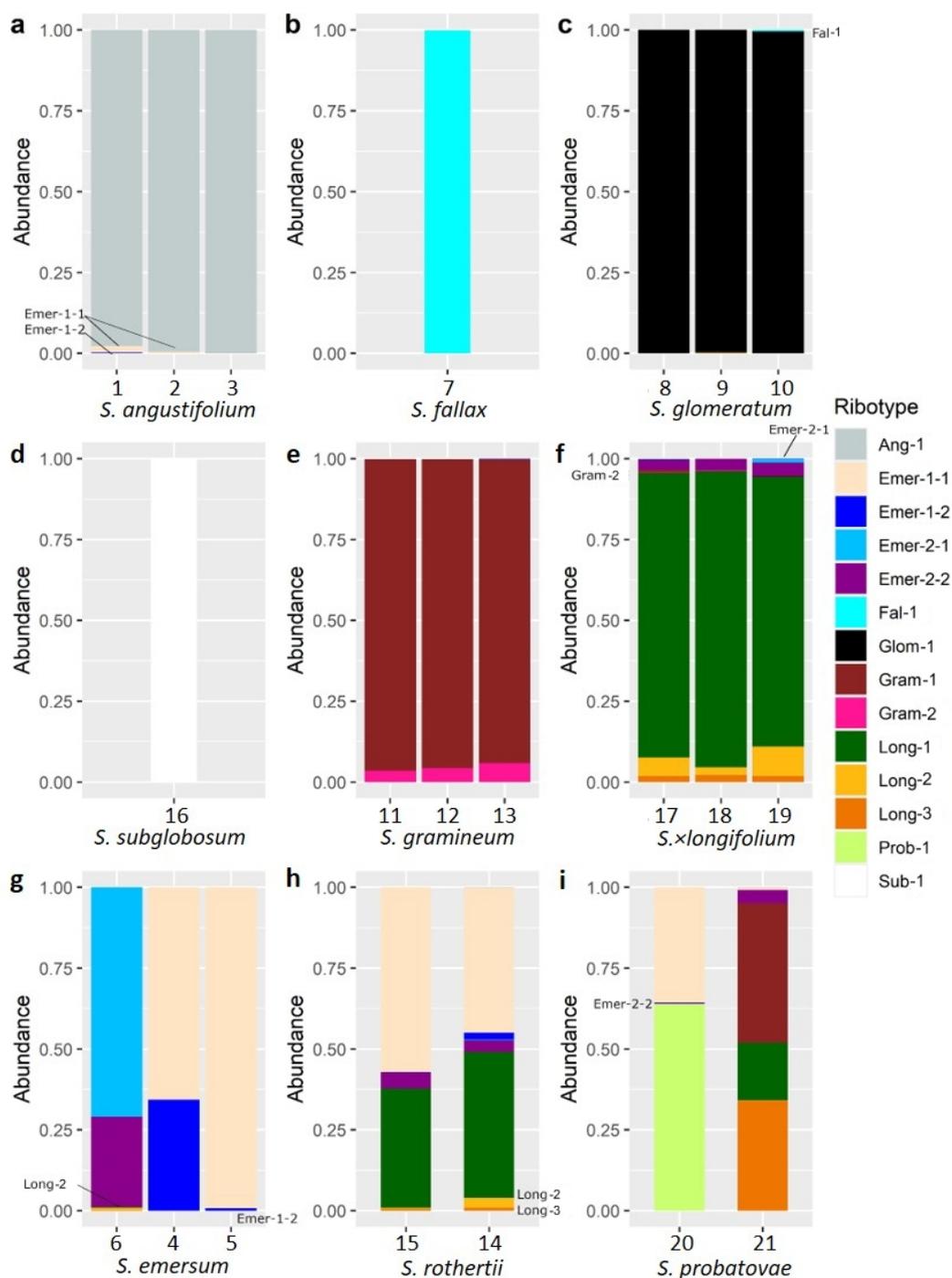


Рисунок 12. Риботипы видов секции *Natantia* подрода *Xanthosparganium*.

Виды *S. emersum* и *S. probatovae* секции *Natantia* обнаруживают значительные внутривидовые различия между выборками по составу рДНК. Обращает на себя внимание, что образец *S. emersum* № 6 из Ярославской области европейской части России и образцы *S. emersum* № 4 и 5 из Внутренней Монголии (Китай), не имеют общих риботипов - их рДНК имеет разное происхождение. Образцы *S. probatovae* № 20 из

Магаданской области и *S. probatovae* № 21 из Тюменской области содержат всего шесть основных риботипов, из которых только два являются общими (рис. 12).

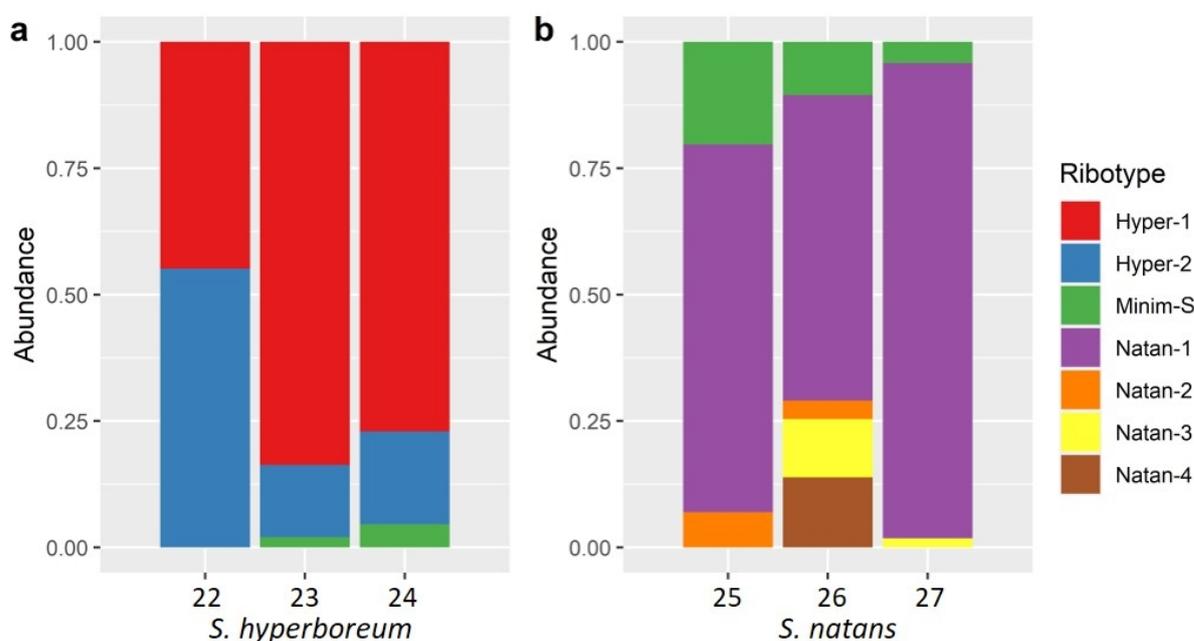


Рисунок 13. Система риботипов видов секции *Minima* подрода *Xanthosparganium*.

Виды секции *Minima* сильно отличаются друг от друга по последовательностям рДНК и имеют только два общих риботипа (рис. 14). Оба вида несут в своем геноме риботипы рДНК секции *Natantia*, вероятно происходящие от *S. emersum*, причем *S. hyperboreum* также имеет риботипы *S. glomeratum*. Кроме того, *S. hyperboreum* № 22 показывает незначительное количество рДНК *S. erectum* s.l. из секции *Erecta*.

Подвиды *S. erectum* различаются набором и относительными количествами разных риботипов, причем наиболее заметные различия наблюдаются у *S. erectum* subsp. *ignorenum*, который имеет только один риботип. *S. erectum* subsp. *microcarpum* имеет более гомогенизированную рДНК по сравнению с другими подвидами (рис. 11). Некоторые образцы *S. erectum* содержат варианты рДНК секции *Natantia*. Например, *S. erectum* subsp. *erectum* содержит незначительное количество рДНК *S. emersum*, при этом *S. erectum* subsp. *ignorenum*, содержащий незначительное количество рДНК *S. glomeratum*. *S. stoloniferum* subsp. *choui*, помимо видоспецифичных риботипов, несет риботипы, общие для *S. erectum* subsp. *erectum* и *S. erectum* subsp. *microcarpum*.

На основании представленных результатов проведенного исследования мы предполагаем, что виды *Sparganium* с одним основным риботипом и низким внутригеномным полиморфизмом, такие как *S. angustifolium*, *S. fallax* и *S. subglobosum*, могли сформироваться и дивергировать от общего ствола *Sparganium* раньше, чем другие представители секции *Natantia*. Эти виды сильно отличаются друг от друга по морфологии генеративной сферы. Популяции этого вида обычно географически или экологически облигатно или факультативно репродуктивно изолированы. Это согласуется с общей закономерностью: популяции водных растений считаются более репродуктивно изолированными в географическом и экологическом плане по сравнению с популяциями наземных растений. Весьма вероятно, что даже если они гибридного происхождения, процесс гомогенизации рДНК у этих растений завершен. Следует отметить, что большинство минорных вариантов *S. fallax* оказываются филогенетически близкими к основному, за исключением небольшого числа отдаленных вариантов, которые могут свидетельствовать о древних гибридизациях. Отметим, что в геноме *S. fallax* выявлена только одна пара локусов Ag-ЯОР. К сожалению, это единственный вид рода *Sparganium* с известным количеством активных ЯОР. Другие виды могут иметь от одной до двух вторичных перетяжек, как мы видим у видов *Typha*, близких к *Sparganium*.

Резюме: проведенный нами сравнительный анализ внутригеномного полиморфизма района 18S рДНК-ITS1-5.8S рДНК у 15 видов и подвидов *Sparganium* показал, что эти виды и подвиды различаются по количеству и составу вариантов ITS1. Образцы *S. probatovae* содержат разные наборы разнообразных риботипов, поэтому их можно рассматривать как гибриды разного происхождения. Китайские экземпляры *S. emersum* имеют принципиально иной набор риботипов по сравнению с европейскими образцами этого вида и могут рассматриваться как отдельный или новый криптический вид. *S. rothertii* отличается от всех экземпляров *S. emersum* наличием риботипов обеих популяций и поэтому может рассматриваться как отдельный вид. Кроме того, мы предполагаем, что подвиды *S. erectum* также можно рассматривать как отдельные виды. Такие виды, как *S. angustifolium*, *S. fallax* и *S. subglobosum*, имеют гомогенизированную рДНК, несущую один основной риботип. Виды с двумя основными риботипами также найдены, это *S. gramineum* и китайские образцы *S. emersum*. Однако большинство таксонов содержат три или более основных риботипа. Таксоны с двумя или более основными риботипами, вероятно, имеют гибридное происхождение. Их

репродуктивные барьеры могут быть недостаточно строгими для того, чтобы препятствовать факультативной межвидовой гибридизации, особенно тогда, когда ареалы видов перекрываются. В большинстве случаев между видами наблюдается гибридизация на подродовом уровне. Тот факт, что каждый подрод содержит незначительное количество рДНК из другого подрода, предполагает возможность редких случаев гибридизации между ними.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ПРОЕКТУ.

1. Лоскутов И.Г., Шеленга Т.В., Конарев А.В., Хорева В.И., Керв Ю.А., Блинова Е.В., Гнутиков А.А., Родионов А.В., Малышев Л.Л. Дифференциация сортов овса из коллекции ВИР по степени селекционной проработки на основе метаболомного профилирования // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2022. Т. 183. №1. С.104-117 РИНЦ
2. Gnutikov A. A., N. N. Nosov, I. G. Loskutov, E. M. Machs, E. V. Blinova, N. S. Probatova, T. Langdon, A. V. Rodionov. New insights into the genomic structure of the oats (*Avena* L., Poaceae): intragenomic polymorphism of ITS1 sequences of rare endemic species *Avena bruhnsiana* Gruner and its relationship to other species with C-genomes // *Euphytica*. 2022. Vol. 218. P. 3. DOI: 10.1007/s10681-021-02956-z Q1
3. Гнутиков А. А., Носов Н. Н., Лоскутов И. Г., Блинова Е. В., Родионов А. В. Исследование филогенетических связей диких и культурных видов овса (*Avena* L.) // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии. 2022. Т. 21. №2. С. 16-20. DOI: 10.14258/pbssm.2022046. РИНЦ
4. Гнутиков А. А., Носов Н. Н., Лоскутов И. Г., Блинова Е. В., Родионов А. В. Исследование риботипов экспериментально полученных гибридов полиплоидных видов рода *Avena* L. // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии, 2022. Т. 21, № 2. С. 21-25 DOI: 10.14258/pbssm.2022047. РИНЦ
5. Родионов А.В. Об особенностях эволюционного процесса у растений: диплоидизация геномов и кариотипов// Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии. 2022. – Т. 21, №2 С. 166-170. DOI: 10.14258/pbssm.2022076. РИНЦ
6. Dyubenko T.V., Aleksandrova T.G., Dzyubenko E.A., Kotseruba V.V., Machs E.M., Rodionov A.V. IAPT chromosome data 38/3. In: Marhold, K. & Kučera, J. (eds.) & al., IAPT chromosome data. 38. *Taxon* 2022, Vol. 71, №6. P. 00-00 DOI: 10.1002/tax.00000 (ВЫЙДЕТ В ДЕКАБРЕ). Q1 РИНЦ
7. 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, декабрь. Q1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работ по проекту в 2022 году нами изучены процессы видообразования в роде *Avena*. Виды этого рода факультативно вступают в межвидовые скрещивания образуя сеть с общими семействами риботипов, представленными в геномах разных видов с разной частотой. Выявляя филогенетические связи дикорастущих видов овса, мы показали, что образцы овсов, определенные как *Avena bruhsiana*, по набору риботипов отличаются от риботипов, найденных в геноме вида *A. ventricosa* – это родственные, но разные виды. *A. ventricosa* – лишь один из предков вида *A. bruhsiana*. Вероятными предками культурного вида *Avena abyssinica*, передавшими ему свои гены рРНК, были диплоидный вид *A. atlantica* и тетраплоидный *A. vaviloviana*. Ранее предложенная гипотеза, о том, что вид *Avena byzantina* получил геномы А и С от *A. magna*, а D-геном (вариант А-генома) – от *A. sterilis* не находит прямого подтверждения в результатах секвенирования рДНК этого вида. Самые представленные последовательности рДНК *A. byzantina* имеют независимое происхождение: вероятно, от ныне вымершего предка либо в результате постгибридизационной трансформации. Лишь третий по представленности в геноме *A. byzantina* риботип гомологичен риботипам, характерным для *A. magna* и *A. sterilis*, но при этом самый массовый риботип *A. sterilis* также уникален и формирует собственное семейство. Риботипы С-геномного диплоида *A. ventricosa* не принимали участия в формировании кластера генов 35S рРНК в геноме полиплоидного вида *A. sativa* или были утрачены из него в ходе фракционирования генома этого полиплоида. Межвидовые гибриды тетраплоида *Avena macrostachya* и гексаплоида *A. sativa* утратили все гены 35S рРНК, послученные от *Avena macrostachya*. В результате фенотипирования широкого спектра промышленных и староместных сортов был выделен интересный исходный материал для селекции с повышенной зерновой продуктивностью и устойчивостью к болезням среди культурных и диких видов овса. Изучение кариотипов *Aegilops comosa* subsp. *heldreichii* и *Ae. comosa* subsp. *comosa* показало генетическую близость этих двух подвидов, кариотипы которых имеют сходное строение и состоят из метацентрических, субметацентрических и субacroцентрических хромосом. Несмотря на общее кариотипическое сходство, мы наблюдаем внутривидовую изменчивость числа и морфологии ядрышкообразующих (ЯОР) хромосом. Большинство образцов имеют две пары ЯОР-хромосом, различающихся по морфологии, но найдены генотипы, которые несут только одну пару хромосом с ЯОР.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Конарев, А.В. Seed proteins as markers in resolving the problems of genetic plant resources, selection and seed production / Конарев А.В., Конарев В.Г., Губарева Н.К., Пенева Т.И. // Цитология и генетика – 2000. – Т. 34. - № 2. - С. 91-104.
2. Лоскутов, И.Г. Овес (*Avena L.*). Распространение, систематика, эволюция и селекционная ценность. - СПб., 2007.- 336 с.
3. Лоскутов, И.Г., Абрамова, Л.И. Морфологическое и кариологическое изучение дикорастущих видов рода *Avena L.* // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2006. Т. 162. - С. 108-113.
4. Мальцев, А.И. Овсяги и овсы sectio *Euavena Griseb* / Мальцев, А.И. // Тр. по прикл. бот., ген. и сел. (приложение 38-е). Л, 1930.
5. 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](https://doi.org/10.1134/S0016675819030159)
6. Родионов, А.В., Амосова, А.В., Крайнова, Л.М., Мачс, Э.М., Михайлова, Ю.В., Гнутиков, А.А., Муравенко, О.В., Лоскутов, И.Г. Феномен высокой частоты мутаций в генах 35S рРНК С-субгенома у полиплоидных видов *Avena L.* // Генетика. – 2020. – Т. 56. – № 6. – С. 657–666.
7. Родионов, А.В., Тюпа, Н.Б., Ким, Е.С. и др. Геномная конституция автотетраплоидного овса *Avena macrostachya*, выявленная путем сравнительного анализа последовательностей ITS1 и ITS2: к вопросу об эволюции кариотипов овсов и овсягов на ранних этапах дивергенции видов рода *Avena* // Генетика. – 2005. – Т. 41. – № 5. – С. 646-656.
8. Цвелев, Н.Н. Злаки СССР. - М.-Л. - 1976
9. Шелухина, О.Ю., Бадаева, Е.Д., Брежнева, Т.А., Лоскутов, И.Г., Пухальский, В.А. Сравнительное исследование диплоидных видов рода *Avena L.* с использованием цитогенетических и биохимических маркеров: *A. pilosa* MB и *A. clauda* Dur. /. // Генетика. - 2008. - Т. 44. - № 9. - С. 1246-1251.
10. Abdolmalaki Z., Mirzaghaderi G., Mason A.S., Badaeva E.D. Molecular cytogenetic analysis reveals evolutionary relationships between polyploid *Aegilops* species // Plant Systematics and Evolution. - 2019. - V. 305(6). - P.459-475.

11. Aronesty, E. Comparison of sequencing utility programs // The open bioinformatics journal. - 2013. - V. 7. - № 1. - P. 1-8.
12. Badaeva E.D., Shelukhina O.Y., Goryunova S.V. et al. Phylogenetic relationships of tetraploid AB-genome *Avena* species evaluated by means of cytogenetic (C-banding and FISH) and RAPD analyses // J. Botany. – 2010b. – V. 2010. – P. 742307. DOI: 10.1155/2010/742307
13. Bolger, A.M. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data / Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B. // *Bioinformatics*, 2014. V. 30 - № 15. - P. 2114-2120.
14. Clement, M. TCS: a computer program to estimate gene genealogies/ Clement, M., Posada, D.C.K.A., Crandall, K.A. // *Mol. Ecol.* – 2000. – V. 9. – P. 1657–1659.
15. Doyle & Doyle (1987), цит. по: Doyle, J. 1991. DNA protocols for plants // *Molecular techniques in taxonomy*. - Springer, Berlin, Heidelberg, 1991. - P. 283-293.
16. Emme, H. Über Chromosomen von Hafer und Haferbastarden/ Emme, H.// *Der Züchter*, - 1930. - T. 2. - №3. - S. 65-72.
17. Garcia, S., Kovařík, A., Leitch, A. R. & Garnatje, T. Cytogenetic features of rRNA genes across land plants: analysis of the Plant rDNA database // *Plant J.* - 2017. - Vol. 89. - P. 1020–1030. <https://doi.org/10.1111/tpj.13442> (2017).
18. Huson, D.H. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies/ Huson, D.H., Bryant, D. // *Molecular biology and evolution*. - 2006. - V. 23. - № 2. - P. 254-267.
19. 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. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.032839>
20. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms // *Mol. Biol. Evol.* - 2018. - Vol. 35. - P. 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.
21. Kihara H. Considerations on the evolution and distribution of *Aegilops* species based on the analyser-method // *Cytologia*. - 1954. - Vol. 19(4). - 336-357.
22. Kishii M. An update of recent use of *Aegilops* species in wheat breeding // *Frontiers in Plant Science*. - 2019. - Vol. 10. - P. 585.
23. Ladizinsky G. *Studies in Oats Evolution*. / Heidelberg e.a.: Springer. – 2012. – 87 p.
24. Loskutov I.G., Rines H.W. *Wild crop relatives: genomic and breeding resources* //, 2011. – Berlin. Heidelberg: Springer-Verlag. – P. 109-183.\

25. Murias dos Santos A., Cabezas M.P., Tavares A.I. et al. tcsBU: a tool to extend TCS network layout and visualization visualization // *Bioinformatics*. – 2015. – V. 32. – P. 627–628. – <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv636>
26. Musaev S.G., Isaev Y.M. Bruns' Oat—an endemic species of the flora of Azerbaijan // *Reports AS Azerb SSR*. - 1971. - Vol. 27. - P. 64–65.
27. Nishiyama, I., Yabuno, T. Meiotic chromosome pairing in two interspecific hybrids and a criticism of the evolutionary relationship of diploid *Avena*/ // *The Japanese Journal of Genetics*. -1975. - V. 50. - P. 443-451.
28. Rajhathy, T., The allopoloid model in *Avena* // *Stadler Symposia*. Vol. 3 (1971) University of Missouri, Columbia, - 1971. - P. 71-88.
29. Riley R, Chapman V, Johnson RO. Introduction of yellow rust resistance of *Aegilops comosa* into wheat by genetically induced homoeologous recombination // *Nature*. - 1968 - Vol. 217(5126). - P. 383-384.
30. Rogers, S. O., Bendich, A. J. Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer // *Plant Mol. Biol*. - 1987. - Vol. 9. - P. 509–520. <https://doi.org/10.1007/BF00015882>.
31. Said M., Holušová K., Farkas A., et al. Development of DNA markers from physically mapped loci in *Aegilops comosa* and *Aegilops umbellulata* using single-gene FISH and chromosome sequences // *Frontiers in Plant Science*. - 2021. - Vol. 12. - P.689031.