

На правах рукописи

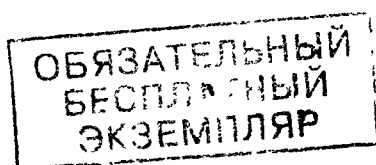
ГОРЮНОВА СВЕТЛАНА ВАЛЕРЬЕВНА

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ
ПОЛИМОРФИЗМА РОДА *AEGILOPS* L.**

03.00.15 – генетика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Москва - 2005



Работа выполнена в лаборатории генетики растений Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН.

НАУЧНЫЕ РУКОВОДИТЕЛИ

доктор биологических наук, профессор
доктор биологических наук, доцент

Виталий Анатольевич Пухальский
Елена Зауровна Кочиева

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ

доктор биологических наук
кандидат биологических наук

Сергей Александрович Гостимский
Ольга Александровна Огаркова

ВЕДУЩЕЕ УЧРЕЖДЕНИЕ

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

Защита состоится «_____» _____ 2004 г. в _____ на заседании Диссертационного совета Д 002.214.01 в Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН по адресу: 119991, ГСП-1, Москва, ул. Губкина, 3. Факс: (095) 132-8962.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН.

Автореферат разослан «_____» _____ 2004 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета

Кандидат биологических наук

Галина Николаевна Полухина

2006-4
10066

2160732

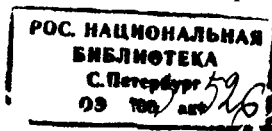
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

Актуальность проблемы. *Aegilops* L. – род однолетних злаков трибы *Triticeae* Dum. На основании данных цитогенетического анализа у видов эгилопса выделяют семь основных типов генома: D, S, C, N, U, M и T. При этом виды рода обладают геномами различного уровня пloidности (ди-, тетра- и гексаплоидный). Для рода *Aegilops* характерен сетчатый тип эволюции и полиплоидные виды рода представляют собой типичные аллополиплоиды. При этом наблюдается способность к обмену генетическим материалом между родственными видами, что сопровождается повышенной внутривидовой изменчивостью и, в ряде случаев, отсутствием четких границ между видами.

Виды рода *Aegilops* являются ближайшими родичами культурной пшеницы (*T. durum* Desl. и *T. aestivum* L.), и составляют основную часть вторичного генофонда пшеницы (род *Triticum* L.), при этом виды эгилопса секции *Sitopsis* и вид *Aegilops tauschii* считаются донорами соответственно В и D геномов культурной пшеницы. Этот факт обусловил повышенный интерес к изучению видов *Aegilops*. Изучению рода способствовала возможность достаточно легкого получения гибридов, а также малое число и большой размер хромосом. Благодаря этому, на данный момент род *Aegilops* является одним из наиболее исследованных в семействе злаков как морфологически, так и методами цитогенетики (Жуковский, 1928; Eig, 1929; Kimber and Feldman, 1987; Slageren 1994; Kihara, 1954; Chennaveeraiah, 1960; Badaeva et al., 2002, 2004). Однако, несмотря на постоянный и длительный интерес к роду *Aegilops*, до сих пор не существует однозначного взгляда на систематику и эволюцию данного рода. Что касается исследования рода *Aegilops* с применением новейших молекулярных методов, его нельзя считать хорошо изученным, поскольку до сих пор молекулярный анализ рода затрагивал лишь некоторые области генома или отдельные виды эгилопса. В то же время достаточная охарактеризованность рода с точки зрения морфологии и цитогенетики, а также специфический характер эволюции в данной группе делают род *Aegilops* идеальным модельным объектом для изучения молекулярной изменчивости при сетчатой эволюции.

Цель работы. Основной целью работы был комплексный молекулярный анализ меж- и внутривидового полиморфизма, сравнение уровней варибельности генома у диплоидных и аллоплоидных видов рода, определение границ видов, а также исследование родства геномов всех 26 видов рода *Aegilops*, с применением различных молекулярных методов анализа генома и сравнение полученных данных с данными морфологических и цитогенетических исследований. Для достижения поставленных целей решались следующие задачи:

1. Используя методы молекулярного анализа, маркирующие как уникальные, так и повторяющиеся участки генома (AFLP, RAPD, ISSR) определить уровни внутри- и межвидовой варибельности у представителей рода *Aegilops*.
2. На основе комплексного молекулярного маркирования генома установить филогенетические связи между видами рода *Aegilops*.
3. Охарактеризовать последовательности внутренних транскрибируемых спейсерных участков (ITS1, ITS2) рибосомной ДНК и гена 5.8S рРНК у видов рода *Aegilops*. Исследовать нуклеотидный полиморфизм данных последовательностей.
4. С помощью метода домен-направленного маркирования (DDP-profiling) исследовать полиморфизм последовательностей семейства генов резистентности (RGA) в геноме эгилопса.



5. Исследовать полиморфизм нуклеотидных последовательностей одного из семейств генов запасных белков семян, а именно – генов гамма-глиадинов, у диплоидных видов группы *Triticum-Aegilops*, имеющих различные типы геномов.

Научная новизна. Впервые с использованием различных систем молекулярного маркирования проведен комплексный анализ генома всех 26 видов рода *Aegilops* L., для которого характерна сетчатая эволюция. На основе данных анализа определены уровни внутри- и межвидового полиморфизма и показаны существенные различия по геномной вариабельности у видов рода, а также определено родство геномов видов эгилопса. Полученные данные сопоставлены с данными о морфологической и цитогенетической изменчивости видов *Aegilops* и существующими системами рода.

На примере исследованных видов *Aegilops* впервые выявлен внутривидовой полиморфизм по последовательности внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS) рибосомного оперона и гена 5,8S рРНК у диплоидных видов трибы *Triticeae*, а также полиморфизм ITS участка внутри одного образца.

Впервые проанализирован полиморфизм нуклеотидных последовательностей семейства генов гамма-глиадинов у диплоидных видов группы *Triticum-Aegilops*, представляющих все основные типы геномов, что позволило уточнить структуру данного семейства генов и предложить возможную схему эволюции основных типов гамма-глиадинов в геноме видов исследуемой группы.

Практическая значимость. Полученные данные об уровнях геномного полиморфизма видов рода *Aegilops* представляет практический интерес, поскольку виды эгилопса являются ближайшими родичами культурной пшеницы и используются в селекции как доноры хозяйственно-ценных признаков. Особую практическую значимость в связи с этим имеют результаты, касающиеся изменчивости таких семейств генов, как гены устойчивости и гамма-глиадиновые гены запасных белков эндосперма. Подобранные методы и праймеры, позволяющие наиболее эффективно выявлять меж- и внутривидовой полиморфизм у видов группы *Triticum-Aegilops*, могут быть использованы при создании новых и маркировании существующих коллекций генбанков. Кроме того, данная работа положила начало молекулярному маркированию коллекции *Aegilops* ВНИИР им. Н.И. Вавилова (Санкт-Петербург).

Апробация результатов работы. Материалы диссертации были представлены на 3-м съезде ВОГиС (Москва, 2004), на съезде МОГиС (Москва, 2003), на VIII Молодежной конференции ботаников в Санкт-Петербурге (2004), на международной конференции Allergy Matters 2004 (Wageningen, The Netherlands), на семинаре лаборатории генетики растений ИОГен им. Н.И. Вавилова РАН, на семинаре кафедры высших растений МГУ, на лабораторных и межлабораторных семинарах Plant Research International (PRI), (Wageningen, The Netherlands, 2003), на семинаре The Coeliac Disease Consortium (Leiden, The Netherlands, 2003).

По материалам диссертации опубликованы 4 статьи и 5 тезисов.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов и их обсуждения, выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на _____ стр., и включает _____ таблиц и _____ рисунков. Список использованной литературы содержит _____ наименований.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Всего было отобрано 248 образцов всех 26 видов рода *Aegilops*. Большинство образцов получены из коллекции Всероссийского Научно-исследовательского Института Растениеводства (Санкт-Петербург) и были любезно предоставлены нам к.б.н. Н.Н. Чикидой. Кроме образцов *Aegilops*, в анализ также были включены представители рода *Triticum*, а также образцы рода *Hordeum*. При отборе образцов руководствовались их географической приуроченностью с тем, чтобы максимально охватить ареал вида и, тем самым, попытаться наиболее полно охарактеризовать генетическую вариабельность каждого анализируемого вида. Для анализа генома *Aegilops* были использованы современные системы молекулярного маркирования, такие как AFLP, RAPD, ISSR, анализ полиморфизма нуклеотидных последовательностей семейств генов, а также метод домен-направленного маркирования, которые позволяют анализировать различные области генома.

Основные результаты исследований

Молекулярный анализ изменчивости и филогенетических связей групп близкородственных видов *Aegilops*, объединенных наличием D-генома. Для RAPD-анализа были использованы 74 образца ДНК 6 видов эгилопсов с D геномом: *Ae. tauschii* (D), *Ae. crassa* (геном DX и DXD), *Ae. juvenalis* (геном DXU), *Ae. vavilovii* (DXS), *Ae. ventricosa* (DN), *Ae. cylindrica* (CD). Кроме того, для сравнения в анализ были взяты представители других видов эгилопсов. Результаты проведенного RAPD-маркирования (получено 197 полиморфных фрагментов) показали, что наиболее полиморфным в данной группе является родительский диплоидный вид *Ae. tauschii*. Для *Ae. tauschii* выявлено также заметное разнообразие по характеру С-бэндинга (Badaeva et al., 2002). В то же время полиморфизм по морфологическим признакам внутри вида относительно невысок (Kimber and Feldman, 1987). Высокий уровень геномного разнообразия *Ae. tauschii*, вероятно, отражает древнее происхождение этого вида, а также обширность его ареала и разнообразие условий произрастания. Уровень различий между образцами внутри аллополиплоидных видов *Ae. ventricosa*, *Ae. cylindrica*, *Ae. crassa*, *Ae. vavilovii* и *Ae. juvenalis* был заметно меньшим. RAPD-анализ внутривидовых различий у родительских диплоидных и дочерних аллополиплоидных видов (483 полиморфных фрагмента) показал, что уровень различий между образцами вида *Ae. ventricosa* (геном DN) практически идентичен уровню различий между образцами одного из родительских видов - *Ae. uniaristata* (геном N) и существенно меньше соответствующего показателя у вида *Ae. tauschii* (D). В то же время уровень выявленных различий между образцами вида *Ae. cylindrica* (CD) ощутимо меньше уровня различий между образцами обоих родительских видов: *Ae. tauschii* (D) и *Ae. caudata* (C).

Проведенный анализ филогенетических связей видов эгилопса с D геномом (788 полиморфных фрагментов) показал, что аллополиплоидные виды *Ae. ventricosa* (DN), *Ae. crassa* (DX и DXD), *Ae. juvenalis* (DXU), *Ae. vavilovii* (DXS) образуют вместе с родительским диплоидным видом *Ae. tauschii* (D) отдельный полиморфный кластер, заметно обособленный от кластеров прочих видов (рис.1). Внутри данного кластера виды группируются в соответствии с типами геномов. Подкластер родительского диплоидного вида *Ae. tauschii* (геном D) близок к подкластеру дочернего аллотетраплоидного вида *Ae. ventricosa* (геном DN). Виды, имеющие в составе своих геномов D и X геном (*Ae. crassa* (геномы DX и DXD), *Ae. juvenalis* (геном DXU), *Ae.*

vavilovii (геном DXS)), образуют отдельный подкластер, при этом виды обособлены друг от друга, а тетраплоидные и гексаплоидные образцы *Ae. crassa* образуют единую смешанную группу. Уровень различий между видами данного подкластера (*Ae. crassa*, *Ae. juvenalis*, *Ae. vavilovii*) относительно невысок и вполне сопоставим с уровнем различий между отдельными представителями вида *Ae. tauschii*, что говорит о сходстве геномов этих видов и в пользу возможной общности происхождения. Это согласуется с тем, что виды *Ae. crassa*, *Ae. juvenalis* и *Ae. vavilovii* также очень сходны морфологически (Kimber and Feldman, 1987), а также с представлениями о том, что тетраплоидная форма *Ae. crassa* является предковой для гексаплоидных видов *Ae. juvenalis* и *Ae. vavilovii* и для гексаплоидной формы *Ae. crassa* (Badaeva et al., 2002; Zhang and Dvorak, 1992; Dubcovsky and Dvorak, 1995).

Рис. 1. Дендрограмма генетических различий и филогенетических связей диплоидных видов рода *Aegilops* и аллоплоидных видов, имеющих в составе своего генома D геном

Помимо анализа случайных последовательностей генома группы видов эгилопса с D-геномом, впервые был исследован полиморфизм такой адаптивно-значимой области генома, как семейство NBS-LRR-генов резистентности. Для характеристики разнообразия указанного семейства генов был использован метод RGA-маркирования (RGA-profiling), который представляет собой одну из модификаций метода домен-направленного маркирования (Van der Linden et al, 2004). Всего в анализ было включено 68 образцов ДНК видов рода *Aegilops* с D геномом и

родительских диплоидных видов и было получено 397 полиморфных RGA-фрагментов (рис. 2). Уровни внутривидового полиморфизма RGA-последовательностей у проанализированных видов заметно различались. Высоко полиморфные по данным RAPD-анализа диплоидные виды *Ae. tauschii* (D) и *Ae. caudata* (C) характеризовались и довольно высокой вариабельностью RGA-последовательностей. Для вида же *Ae. uniaristata*, являвшегося мало полиморфным по данным RAPD-анализа, при RGA-маркировании был также показан довольно низкий уровень внутривидовых различий. Что касается полиплоидных видов с D геномом, то по данным RGA-маркирования для видов *Ae. cylindrica*, *Ae. juvenalis*, *Ae. vavilovii* был отмечен весьма низкий уровень внутривидовой вариабельности, в то же время виды *Ae. ventricosa* и *Ae. crassa* характеризовались достаточно высоким уровнем внутривидового полиморфизма. По данным же RAPD-анализа все они были низко полиморфными.

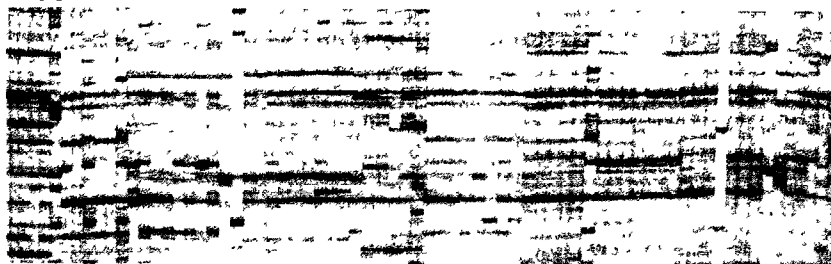


Рис. 2. RGA-спектры образцов полиплоидных видов с D геномом: *Ae. ventricosa* (геном DN), *Ae. cylindrica* (CD), *Ae. crassa* (DX DXD), *Ae. juvenalis* (DXU), *Ae. vavilovii* (DXS) и родительских диплоидных видов *Ae. tauschii* (D), *Ae. caudata* (C), *Ae. uniaristata* (N).

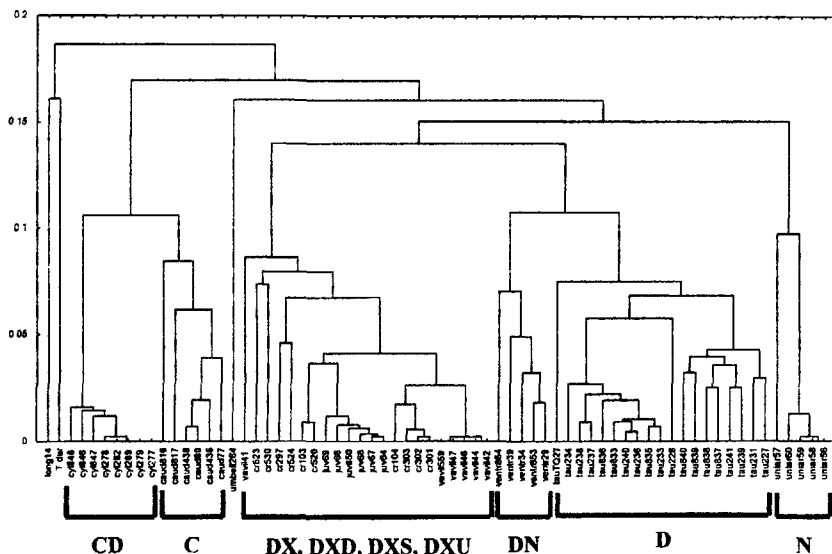


Рис. 3. Дендрограмма генетических отличий представителей видов эгилопса с D геномом и диплоидных родительских видов *Ae. uniaristata* и *Ae. caudata*, построенная методом UPGMA, на основании данных RGA-маркирования

Данные RGA-анализа были также использованы для определения филогении последовательностей NBS-LRR семейства генов резистентности и их аналогов у видов эгилопса с D геномом. На построенной дендрограмме большинство образцов составляет видоспецифичные кластеры (рис. 3) Исключением в этом отношении является вид *Ae. crassa*, некоторые представители которого оказались близки к кластерам родственных видов *Ae. juvenalis* и *Ae. vavilovii*, в то время как другие вошли в состав обособленных подкластеров. Кроме того, один образец вида *Ae. vavilovii* (vavil41, и-571177) имел совершенно особый спектр RGA-последовательностей и представлял собой обособленную кладу в составе кластера видов *Ae. crassa*, *Ae. juvenalis* и *Ae. vavilovii*. Таким образом, указанный кластер не был разделен на три подкластера, соответствующих каждому из трех видов, а имел более сложную организацию. Эти данные несколько расходятся с данными RAPD анализа, согласно которым образцы всех трех видов *Ae. crassa*, *Ae. juvenalis* и *Ae. vavilovii* входят в состав трех обособленных групп. В остальном, результаты RGA-анализа оказались схожими с данными RAPD анализа и на дендрограммах виды группировались сходным образом. Некоторые отличия данных RGA- и RAPD-маркирования, по всей видимости, отражают специфику эволюции семейства генов резистентности.

Анализ внутривидовой изменчивости и филогенетических связей видов *Aegilops*, содержащих U геном. Для молекулярного анализа группы видов эгилопса с U геномом были отобраны 114 образцов 8 полиплоидных видов, имеющие в составе своего аллоплоидного генома геном U - *Ae. triuncialis* (геном UC), *Ae. columnaris* (геном UX), *Ae. biuncialis* (UM), *Ae. ovata* (UM), *Ae. triaristata* (UX), *Ae. recta* (UXN), *Ae. kotschyi* (US), *Ae. variabilis* (US) и диплоидного вида *Ae. umbellulata* (U), который является донором U генома для данных видов.

Уровни выявляемого с помощью RAPD-маркирования (236 полиморфных фрагментов) внутривидового геномного полиморфизма у аллополиплоидных видов с U геномом различались. В отличие от полиплоидов D – геномной группы, большинство полиплоидных видов с U геномом характеризовалось значительным уровнем внутривидового полиморфизма. Так, виды *Ae. biuncialis*, *Ae. columnaris*, *Ae. ovata*, *Ae. kotschyi*, *Ae. variabilis*, *Ae. triaristata* и *Ae. recta* по данным RAPD-анализа являются высоко полиморфными. Для видов *Ae. recta*, *Ae. kotschyi*, *Ae. variabilis*, *Ae. ovata* и *Ae. triuncialis* были выявлены образцы, значительно отличающиеся от прочих, что может являться следствием возможного гибридного происхождения данных образцов.

Интересные результаты были получены для пары видов *Ae. triaristata* - *Ae. recta*. Геномы этих двух видов различной пloidности по результатам RAPD анализа оказались весьма близкими, и, несмотря на присутствие в геноме *Ae. recta* дополнительного генома N, не было выявлено строгих различий между геномами *Ae. triaristata* (UX) и *Ae. recta* (UXN). *Ae. triaristata* и *Ae. recta* также очень сходны морфологически, и многими исследователями не рассматриваются как два самостоятельных вида (Eig 1929; Kihara 1954; Slageren, 1994; Witcombe 1983; Hammer, 1980). При этом тетраплоидный вид *Ae. triaristata* (геном UX) считается предковой формой для гексаплоидного *Ae. recta* (UXN) (Kimber and Feldman, 1987). Исходя из полученных результатов, можно предположить множественное независимое происхождение гексаплоидного вида *Ae. recta* от различных значительно дивергировавших популяций предкового тетраплоидного вида *Ae. triaristata*, либо же наличие гибридизации и обмена генетическим материалом между двумя этими видами.

Единственным исключением среди высоко полиморфных полиплоидных видов с U геномом можно считать *Ae. triuncialis* (геном UC), который по данным проведенного RAPD-анализа имеет крайне низкий уровень внутривидовых различий а также является малополиморфным по данным дифференциального окрашивания хромосом и FISH (Бадаева, 2004). Этот результат кажется весьма интересным, учитывая ряд следующих фактов: *Ae. triuncialis* обладает крайне широким спектром изменчивости по целому ряду морфологических признаков и большой экологической пластичностью, а ареал данного вида можно считать самым обширным среди видов рода – он охватывает значительную часть ареала рода и, кроме этого, был занесен и распространился в США (Kimber and Feldman, 1987). Помимо этого, *Ae. triuncialis* является единственным видом в группе *Triticum-Aegilops*, чье множественное происхождение от независимых скрещиваний родительских диплоидов не вызывает сомнений и было установлено исходя из результатов анализа как цитоплазматического, так и ядерного геномов (Murai and Tsunewaki 1986; Vanichanon et al., 2003).

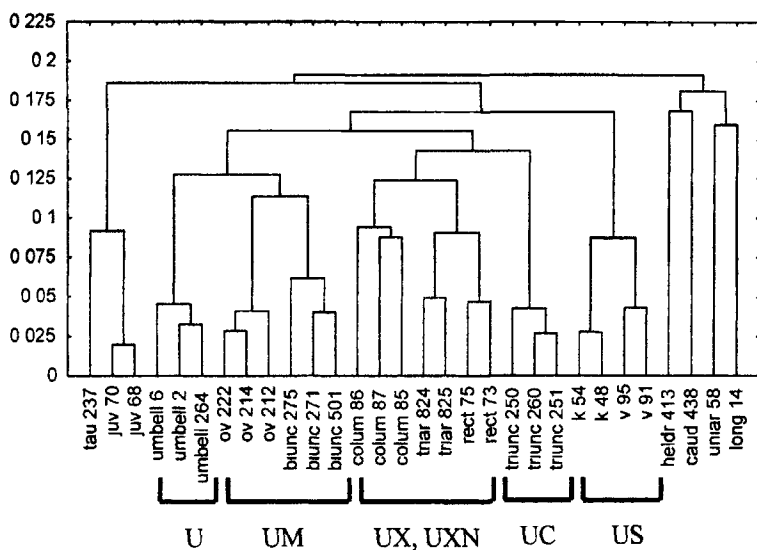


Рис. 4. Дендрограмма межвидовых генетических различий диплоидных видов рода *Aegilops* и аллополиплоидных видов, имеющих в составе своего генома U геном.

При RAPD-анализе межвидового полиморфизма видов *Aegilops* с U геномом (1265 полиморфных фрагментов) было показано, что все образцы, относящиеся к одному виду, кластеризуются вместе (рис 4) Все образцы диплоидного вида *Ae. umbellulata* и полиплоидных видов *Ae. triuncialis*, *Ae. kotschyi*, *Ae. variabilis*, *Ae. ovata*, *Ae. biuncialis*, *Ae. triaristata*, *Ae. recta* и *Ae. columnaris* объединяются в обособленный полиморфный кластер, что вполне согласуется с морфологическими и цитогенетическими данными. Все эти виды объединяются наличием слабоизмененного U генома (Kihara, 1954) и, согласно гипотезе Д. Зохари и М. Фельдмана (Zohary and Feldman, 1962), составляют самую большую из трех естественных групп в комплексе *Triticum-Aegilops*. Виды этой группы

морфологически близки к донору «осевого» генома группы – виду *Ae. umbellulata* и вместе с ним составляют секцию *Polyeides* (Kihara, 1954). Данный кластер, в свою очередь, разделяется на три основных подкластера в соответствии с типами геномов входящих в него видов. Наиболее близкими видами по результатам RAPD анализа оказываются гексаплоидный вид *Ae. recta* (геном UXN) и морфологически очень близкий предковый тетраплоид *Ae. triaristata* (UX), различие между ними оказывается меньше, чем между видами *Ae. triaristata* и *Ae. columnaris*, которые имеют одинаковый уровень пloidности и одинаковый тип генома – UX. Стоит отметить также, что по данным RAPD-анализа полиплоиды с геномной формулой на основе UX (*Ae. columnaris*, *Ae. recta* и *Ae. triaristata*) сильно отличаются от видов с UM геномом (*Ae. ovata* и *Ae. biuncialis*), хотя изначально для всех этих видов предполагался одинаковый тип генома (Kihara, 1954). Выявленное при использовании RAPD анализа сходство между UX и UC геномами может свидетельствовать о возможном участии C или близкого ему генома в формировании генома X.

Наиболее обособленными в пределах U-кластера в нашем исследовании оказались виды, обладающие US геномом – *Ae. kotschy* и *Ae. variabilis*. Данные виды несколько отличны от прочих видов с U геномом и по морфологии, на основании чего были выделены A. Эйгом в отдельную подсекцию *Adhaerens*, в то время как прочие виды с U геномом вошли в состав другой подсекции – *Libera* (Eig, 1929).

Единственным полиплоидом с U геномом, который не группировался вместе с остальными видами U группы, является вид *Ae. juvenalis*, образующий обособленный подкластер вместе с предковым диплоидным видом *Ae. tauschii* (D геном). Сходство *Ae. juvenalis* с *Ae. tauschii* и другими D-геномными видами обсуждалось выше.

В отдельную задачу был выделен анализ внутривидовой изменчивости и межвидовых различий двух близкородственных аллотетраплоидных видов *Ae. kotschy* и *Ae. variabilis*. Проведенный анализ ITS последовательности рибосомного оперона не выявил значительных отличий между 26 проанализированными образцами видов *Ae. kotschy* и *Ae. variabilis*. Однако маркирование случайных последовательностей RAPD-, AFLP- и ISSR-методами выявило значительный внутривидовой геномный полиморфизм исследуемых видов. При этом применение методов RAPD и ISSR показало несколько меньший уровень внутривидовой вариабельности *Ae. kotschy* по сравнению с *Ae. variabilis*. Интересно, что *Ae. variabilis* является более полиморфным и по морфологическим данным (Eig, 1929; Kimber and Feldman, 1987), а также по данным RFLP-анализа повторяющихся последовательностей (Zang et al., 1992). Полученные данные показали относительно небольшой уровень межвидовых различий, а также выявили значительное количество уклоняющихся образцов, причем видовая принадлежность некоторых из них не очевидна и зависит от выбранного критерия (морфологический, цитогенетический, различные молекулярные методы).

Проведенный RGA-анализ 67 представителей рода *Aegilops* с U геномом (получено 424 полиморфных фрагмента) показал высокий уровень внутривидового полиморфизма последовательностей семейства генов резистентности у видов группы. На полученной RGA-дендрограмме (рис. 5) большинство образцов входят в состав видоспецифичных кластеров. Представители некоторых близких видов, таких как *Ae. kotschy* и *Ae. variabilis*, образуют смешанные кластеры. Кроме того, для большинства видов были выявлены отдельные образцы, которые отличались от остальных представителей своего вида по представленности в их геноме RGA-последовательностей и образовывали отдельные ветви в составе кластеров близких

видов. Некоторые образцы оказались еще более обособленными. Так, например, образец piunc904 (pi487282) вида *Ae. biuncialis* имеет спектр RGA-фрагментов сильно отличающийся от спектров всех других включенных в анализ образцов, и на дендрограмме выходит за пределы всего U-геномного кластера. По всей видимости, данные факты могут быть связаны с наличием гибридизации в исследуемой группе, которая происходит не только между видами с одним типом генома, но и между более удаленными. Кроме того, было показано, что филогения семейства генов устойчивости в U группе видов эгилопса несколько отличается от филогении адаптивно нейтральных уникальных и низкокопийных последовательностей, что, вероятно, объясняется специфической адаптивной направленностью эволюции генов резистентности.

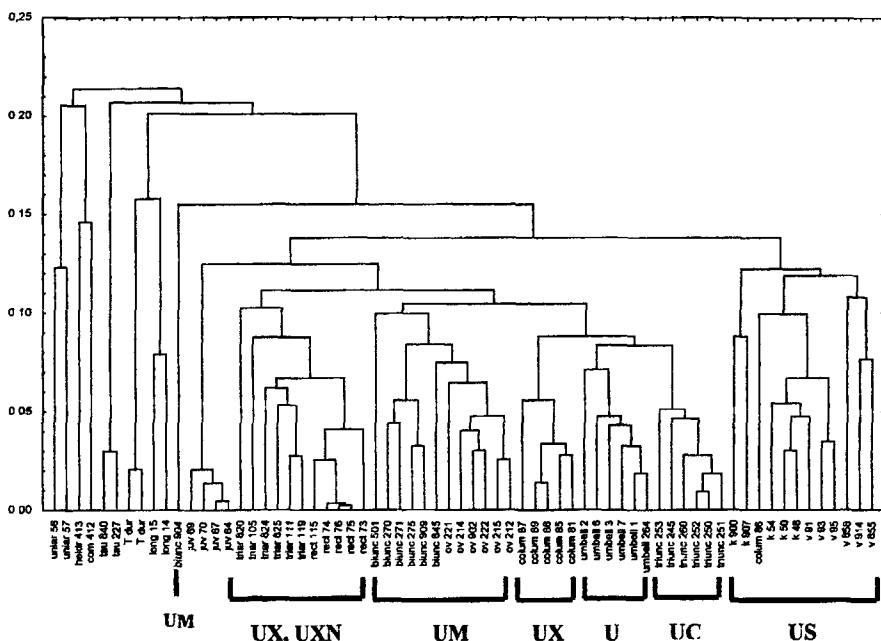


Рис. 5 Дендрограмма, построенная по результатам кластерного анализа данных RGA-маркирования видов эгилопса с U геномом.

Молекулярный анализ полиморфизма и филогенетических отношений диплоидных видов эгилопса, обладающих S геномом. Для RAPD-анализа были взяты образцы ДНК 21 представителя всех 6 диплоидных видов *Aegilops*, имеющих S геном: *Ae. speltoides*, *Ae. auscheri*, *Ae. searsii*, *Ae. bicornis*, *Ae. sharonensis* и *Ae. longissima*. В результате проведенного маркирования было получено 246 полиморфных RAPD-фрагментов. Выявленные максимальные уровни различий между образцами внутри видов *Ae. bicornis*, *Ae. longissima*, *Ae. sharonensis*, *Ae. searsii* были примерно одинаковы и равны уровню различий между кластерами видов *Ae. speltoides* и *Ae. auscheri*, которые большинством исследователей объединяются в один вид - *Ae. speltoides* (Kihara 1954; Hammer, 1980; Chennaveeraiah, 1960; Slageren, 1994).

Различия между кластерами образцов *Ae. longissima* и образцов *Ae. sharonensis*, которые часто также считают подвидами одного вида - *Ae. longissima* (Hammer, 1980; Chennaveeraiah, 1960), соответствовали скорее межвидовому уровню. Таким образом, согласно данным проведенного молекулярного анализа виды *Ae. longissima* и *Ae. sharonensis*, вероятно, стоит рассматривать как самостоятельные, а *Ae. speltoides* и *Ae. auscheri*, скорее, объединять в один вид - *Ae. speltoides*. Полученные результаты согласуются с большинством морфологических и цитогенетических данных (Kimber and Feldman, 1987; Friebe et al., 1993; Friebe and Gill 1996).

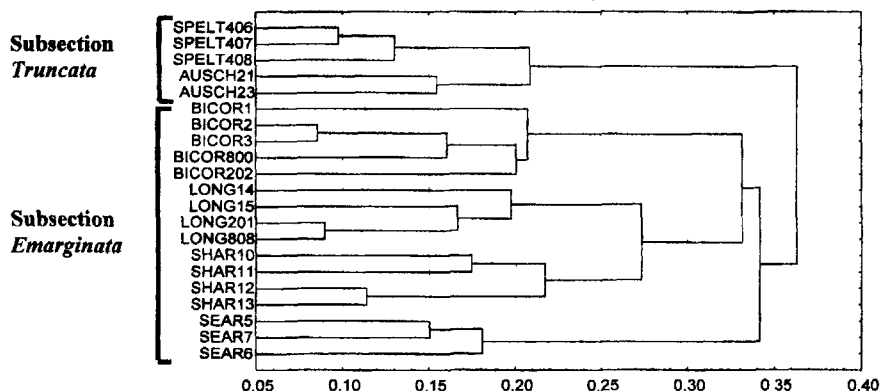


Рис 6 Дендрограмма генетических различий образцов диплоидных видов эгилопса с S геномом, построенная по результатам RAPD-маркирования методом UPGMA

На дендрограмме, построенной по результатам RAPD анализа (рис. 6), максимально обособленным является кластер образцов *Ae. speltoides* и *Ae. auscheri*, что вполне согласуется с представлениями о наиболее древнем происхождении вида *Ae. speltoides* s.l. и об его морфологической обособленности от прочих видов секции. Следует отметить, что вид *Ae. speltoides* s.l. на основании морфологических данных был выделен А. Эйгом (Eig, 1929) в отдельную подсекцию *Truncata*. Виды *Ae. searsii*, *Ae. bicornis*, *Ae. sharonensis* и *Ae. longissima* формируют второй полиморфный кластер. Образцы каждого из видов образуют видоспецифичные подкластеры. Наиболее обособлен подкластер вида *Ae. bicornis*, наиболее близкими являются подкластеры образцов *Ae. longissima* и *Ae. sharonensis*.

Таким образом, при RAPD маркировании геномов видов эгилопса с S геномом было установлено, что все виды, обладающие данным типом генома, имеют приблизительно равные уровни внутривидовой вариабельности. При этом различия между кластерами *Ae. speltoides* и *Ae. auscheri* не превышали различий между образцами одного вида, а различия между кластерами образцов *Ae. longissima* и *Ae. sharonensis* были заметно выше, чем внутривидовые. Также было показано, что вид *Ae. speltoides* является наиболее обособленным среди видов с S геномом.

Анализ внутривидового полиморфизма диплоидных видов *Ae. caudata*, *Ae. uniaristata*, *Ae. comosa*, *Ae. heldreichii* и *Ae. mutica* методом RAPD. Проведенный анализ показал, что диплоидные виды рода значительно различаются по уровням внутривидового полиморфизма. Так, вид *Ae. caudata* является высоко полиморфным, вид *Ae. uniaristata* имеет существенно меньший уровень внутривидовых различий. Для видов *Ae. comosa* и *Ae. heldreichii*, которые считаются наиболее близкими к виду *Ae. uniaristata*, был выявлен очень высокий уровень внутривидовых отличий.

Меньший полиморфизм вида *Ae. uniaristata*, по сравнению с видами *Ae. comosa* и *Ae. heldreichii*, вероятно можно связать с тем, что *Ae. uniaristata*, по-видимому, является дочерним видом *Ae. heldreichii*. Стоит отметить, что на дендрограмме образцы *Ae. comosa* и *Ae. heldreichii* образуют смешанную группу. Этот результат, в принципе, согласуется с точкой зрения некоторых исследователей, которые не выделяют *Ae. comosa* и *Ae. heldreichii* в качестве самостоятельных видов (Eig, 1929; Slageren, 1994). Для вида *Ae. mutica* также был показан высокий уровень внутривидовой изменчивости. Интересно, что вид *Ae. uniaristata*, низко полиморфный по данным RAPD анализа, характеризуется также малой морфологической изменчивостью, в то время как виды *Ae. comosa*, *Ae. heldreichii* и *Ae. mutica*, высоко полиморфные по данным RAPD анализа, являются также очень полиморфными и по морфологическим признакам. Однако, вид *Ae. caudata*, для которого также был выявлен значительный внутривидовой полиморфизм по данным молекулярного маркирования, тем не менее, по морфологическим данным не очень изменчив. При этом не было показано зависимости между ареалом и уровнем изменчивости генома видов. Так, наиболее обширным ареалом из анализируемых диплоидных видов обладает *Ae. caudata*, для которого был показан высокий уровень внутривидовых различий, однако такие высокополиморфные виды, как *Ae. comosa*, *Ae. heldreichii* и *Ae. mutica* имеют заметно меньшие ареалы. В то же время, были выявлены существенные различия в уровнях полиморфизма для *Ae. comosa*, *Ae. heldreichii* и *Ae. mutica* с одной стороны и *Ae. uniaristata*, хотя все они имеют довольно небольшие ареалы.

Молекулярный анализ полиморфизма генома и филогенетических связей видов рода *Aegilops*.

Анализ полиморфизма и филогенетических отношений видов эгилоса с использованием AFLP. Для анализа полиморфизма генома рода *Aegilops*, а также для определения филогенетических отношений между видами рода был использован AFLP-метод, который позволяет маркировать обширную, преимущественно селективно нейтральную часть генома, представленную, главным образом, уникальными и умеренно повторяющимися последовательностями. В анализ были взяты образцы ДНК 63 представителей всех 26 видов рода *Aegilops*, а также образцы ДНК трех различных видов пшеницы (*T. monococcum*, *T. durum*, *T. aestivum*) и один образец ячменя. Образцы для AFLP анализа были отобраны на основании данных о внутривидовой изменчивости, полученных RAPD методом.

В результате проведенного AFLP анализа было выявлено 2144 полиморфных AFLP фрагмента и каждый вид и образец был охарактеризован специфичным спектром AFLP фрагментов (рис. 7).

Проведенный кластерный анализ (Ней-Ли, UPGMA, с последующим бутстрепированием) показал что образцы видов группы *Triticum-Aegilops* формируют четыре основных кластера (рис. 8), хорошо поддерживаемых бутстрепом (76-100%). Наиболее обособлен кластер (А), в который входят образцы различных видов пшеницы. Три оставшихся кластера сформированы представителями разных видов *Aegilops*. Первый из этих кластеров (S) включает в себя образцы видов секции *Sitopsis*. Во второй кластер входят два хорошо обособленных подкластера, первый из которых (D) включает в себя диплоидный вид *Ae. tauschii*, обладающий D геномом и дочерние аллополиплоидные виды *Ae. ventricosa* (DN), *Ae. crassa* (DXD), *Ae. juvenalis* (DXU) и *Ae. vavilovii* (DXS). Второй подкластер (C) этого кластера включает в себя два вида, объединенных наличием C генома – диплоид *Ae. caudata* и дочерний аллотетраплоид *Ae. cylindrica* (CD). Стоит отметить что, также как и по данным

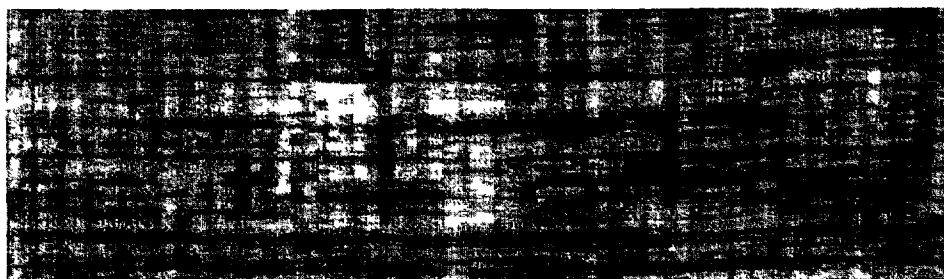


Рис. 7. AFLP-спектры образцов видов рода *Aegilops* и представителей рода *Triticum*

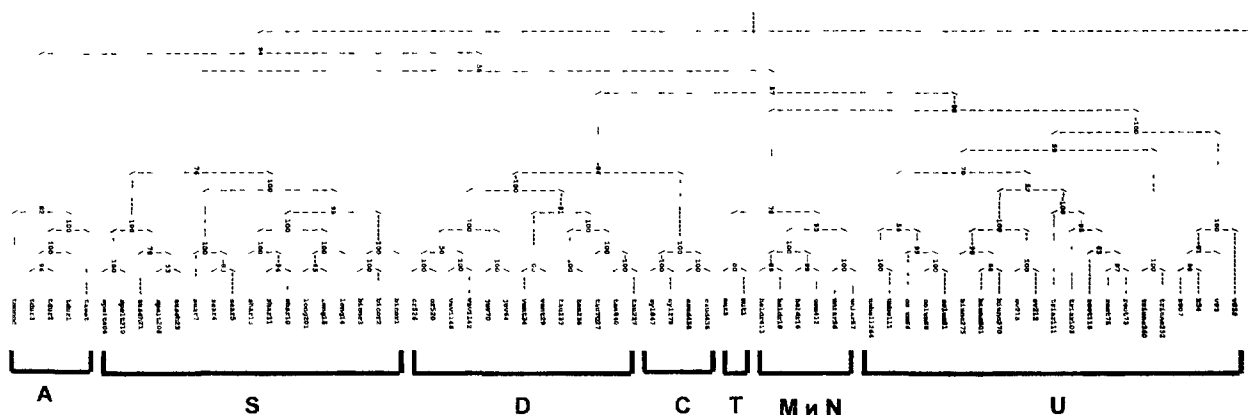


Рис. 8. Дендрограмма построенная по результатам AFLP-анализа видов рода *Aegilops* и представителей рода *Triticum*. (Числа в точках ветвления показывают индекс бутстрепа.)

RAPD анализа, вид *Ae. cylindrica*, имея в составе своего генома D геном, обособлен от других полиплоидов с D геномом и более сходен с донором С генома – видом *Ae. caudata*. На построенной по AFLP-данным дендрограмме объединение подкластера видов *Ae. caudata* (C) и *Ae. cylindrica* (CD) в один кластер с видами D группы обусловлено присутствием в геноме *Ae. cylindrica* D генома. При исключении же данного вида из кластерного анализа, *Ae. caudata* входит в состав группы видов с U геномом, хотя и остается более дистанцированным от U генома, чем виды с M и N геномами. Таким образом, полученные данные свидетельствуют не только о большем родстве С генома с геномами M, N и U, чем с геномом D или S, но и о достаточных отличиях С генома от всех прочих, в том числе и от U генома. Этот результат интересен также в связи с тем, что в ранних исследованиях предполагалось значительное сходство между С и U геномами по цитогенетическим данным. Так, два этих генома в работе Х. Кихары (Kihara, 1954) были обозначены одним символом – С.

Третий, наиболее крупный из всех, кластер состоит из двух главных подкластеров. В первый из них входят образцы диплоидных видов *Ae. mutica* (Т геном), *Ae. uniaristata* (N геном), *Ae. comosa* и *Ae. heldreichii* (М геном), причем наиболее обособленным является вид *Ae. mutica*. Образцы вида *Ae. uniaristata* формируют отдельный подкластер, в то время как *Ae. comosa* и *Ae. heldreichii*, как и в случае RAPD-анализа, не обособлены друг от друга и входят в состав одного полиморфного подкластера. Также результаты AFLP-маркирования показали значительное сходство между видом *Ae. uniaristata* (N геном) и видами *Ae. comosa* и *Ae. heldreichii* (М геном); различие между группой образцов *Ae. comosa* и *Ae. heldreichii* и образцами вида *Ae. uniaristata* сопоставимо с различиями между некоторыми диплоидными видами с S геномом, или между полиплоидными видами с U геномом. Сходство геномов *Ae. comosa* и *Ae. uniaristata* было также показано на основании данных RFLP анализа повторяющихся ДНК последовательностей (Dvorak and Zhang, 1992), а на основании морфологических признаков они были отнесены к одной секции такими исследователями, как П.М. Жуковский и А. Эйг (Жуковский, 1928; Eig, 1929). Второй подкластер образуют диплоидный вид *Ae. umbellulata* и родственные ему полиплоиды – *Ae. columnaris*, *Ae. biuncialis*, *Ae. ovata*, *Ae. triaristata*, *Ae. recta*, *Ae. triuncialis*, *Ae. kotschyi*, *Ae. variabilis*. В пределах этого кластера наиболее обособленным является кластер видов *Ae. kotschyi*-*Ae. variabilis*, обладающих US геномом. Еще одну обособленную кладу образуют представители вида *Ae. triuncialis* (UC геном), который также несколько обособлен от прочих видов морфологически. Последнее обусловило выделение данного вида П. М. Жуковским в отдельную секцию (1928). Прочие же виды группы – *Ae. umbellulata*, *Ae. columnaris*, *Ae. biuncialis*, *Ae. ovata*, *Ae. triaristata*, *Ae. recta* кластеризуются совместно.

Таким образом, впервые был проведен AFLP-анализ всех видов рода *Aegilops* и по результатам маркирования было выделено несколько групп, каждая из которых включает в себя либо несколько видов с родственными диплоидными геномами, либо диплоидный и родственные ему полиплоидные виды. Также было выявлено заметное различие между С и U геномами.

Использование RAPD системы молекулярного маркирования для определения филогении видов рода *Aegilops*. Дендрограмма, построенная по данным RAPD-анализа (было получено 1114 полиморфных фрагментов) в значительной степени схожа с AFLP-дендрограммой, и основные группы, на которые разделяются виды *Aegilops* остаются неизменными. Однако наблюдаются и некоторые различия. Так, стоит отметить, что по результатам RAPD-маркирования вид *Ae. mutica* группируется не с U,

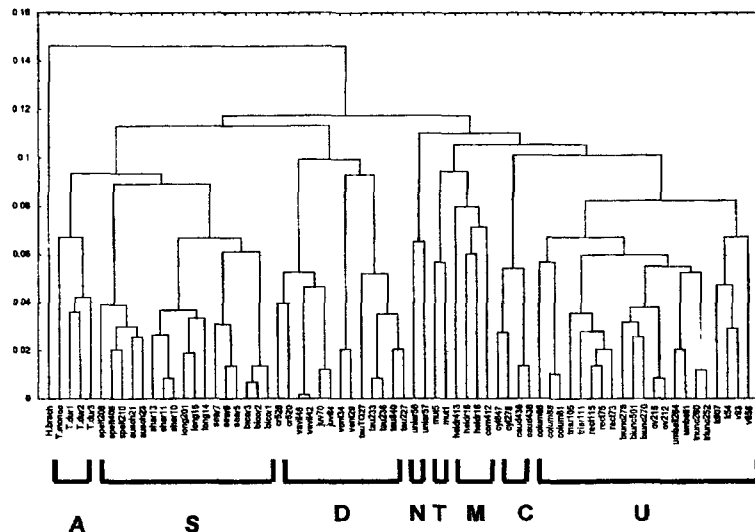


Рис. 9. Дендрограмма, построенная по результатам кластерного анализа данных RGA- маркирования видов рода *Aegilops*

Табл.1. Внутривидовые генетические расстояния ($p = 1 - J$, где J - коэффициент Жаккарда), рассчитанные на основании данных AFLP- и RGA-анализа.

Вид	AFLP	RGA
<i>Ae. speltoides</i>	0,02-0,035	0,02-0,04
<i>Ae. auschen</i>	0,03	0,026
<i>Ae. longissima</i>	0,015-0,023	0,02-0,033
<i>Ae. sharonensis</i>	0,007-0,014	0,007-0,026
<i>Ae. bicornis</i>	0,004-0,018	0,007-0,015
<i>Ae. searsii</i>	0,009-0,011	0,013-0,032
<i>Ae. tauschii</i>	0,007-0,045	0,008-0,053
<i>Ae. ventricosa</i>	0,011	0,021
<i>Ae. crassa</i>	0,012	0,04
<i>Ae. vavilovii</i>	0,002	0,002
<i>Ae. juvenalis</i>	0,008	0,011
<i>Ae. cylindrica</i>	0,009	0,027
<i>Ae. caudata</i>	0,014	0,015
<i>Ae. mutica</i>	0,039	0,058
<i>Ae. heldreichii</i>	0,03-0,036	0,08
<i>Ae. umianstata</i>	0,024	0,063
<i>Ae. umbellulata</i>	0,012	0,021
<i>Ae. kotschyii</i>	0,018	0,047
<i>Ae. vanabilis</i>	0,037	0,068
<i>Ae. truncialis</i>	0,009	0,012
<i>Ae. biuncialis</i>	0,026-0,031	0,024-0,032
<i>Ae. ovata</i>	0,011	0,009
<i>Ae. columnaris</i>	0,018-0,052	0,011-0,058
<i>Ae. transtata</i>	0,029	0,038
<i>Ae. recta</i>	0,01-0,018	0,013-0,021

М и N-геномными видами, как при AFLP-анализе, а образует хорошо поддерживаемый бутстрепом (100%) кластер вместе с видами D группы. По всей видимости, геном *Ae. mutica* стоит считать отличным от геномов прочих видов рода. *Ae. mutica* обособлен от прочих видов эгилопсов также и на основании морфологических признаков, и относится систематиками к отдельной монотипной секции или даже отдельному роду *Amblyopyrum* (Жуковский, 1928; Eig, 1929; Slageren, 1994). Однако в нашем исследовании не было получено данных о значительной обособленности *Ae. mutica* от других видов рода *Aegilops*. Таким образом, по молекулярным данным *Ae. mutica* вряд ли заслуживает выделения в обособленный род *Amblyopyrum*.

Анализ полиморфизма и филогении NBS-LRR семейства генов резистентности у видов рода *Aegilops* методом RGA-маркирования. Для исследования полиморфизма и филогении последовательностей семейства NBS-LRR генов резистентности у видов рода *Aegilops* были использованы те же образцы, что и при AFLP-анализе генома рода *Aegilops*. Это позволило сопоставить генетические расстояния, полученные при RGA- и AFLP-анализе и было показано, что полиморфизм последовательностей семейства генов устойчивости несколько выше по сравнению с нейтральными последовательностями, охарактеризованными с помощью метода AFLP (табл. 1). Всего при анализе было получено 576 полиморфных RGA-маркеров.

Что касается филогении последовательностей семейства генов резистентности, то в целом, она была сходна с таковой, построенной по результатам AFLP-маркирования (рис. 9). Наиболее принципиальными отличиями являются гораздо большая обособленность N-геномного вида *Ae. uniaristata* от *Ae. heldreichii* (М геном) и *Ae. comosa* (М), в то время как вид *Ae. mutica* (Т геном) оказывается, наоборот более сходным с М-геномными видами. Кроме того, кластер видов с С-геномом (*Ae. caudata* и *Ae. cylindrica*) при RGA-анализе, также как и при RAPD маркировании, оказался более близким к кластеру видов с U геномом, в то время как при AFLP-анализе, виды с С геномом были более удалены от U-геномного кластера, чем виды *Ae. uniaristata*, *Ae. heldreichii*, *Ae. comosa* и *Ae. mutica*. Также наблюдались некоторые отличия в кластеризации видов с U геномом и с S геномом.

В результате проведенного молекулярного маркирования геномов видов рода *Aegilops* было показано значительное сходство дендрограмм, построенных по результатам AFLP- и RAPD- и RGA-анализа. Также был выявлен несколько больший полиморфизм последовательностей семейства генов устойчивости по сравнению с селективно-нейтральными последовательностями генома.

Анализ полиморфизма внутренних транскрибируемых спейсеров рибосомной ДНК у диплоидных видов *Aegilops*, имеющих различные типы генома. Исследование внутривидового полиморфизма и межвидовых различий последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров рибосомной ДНК у видов рода *Aegilops* было проведено на 22 образцах 5 диплоидных видов эгилопсов с различными типами геномов: *Ae. caudata* (С геном), *Ae. uniaristata* (N геном), *Ae. heldreichii* (геном М), *Ae. mutica* (Т геном) и *Ae. tauschii* (D геном). Были определены нуклеотидные последовательности фрагмента ITS рДНК, включающего ITS1 и ген 5.8S рРНК, а также частичную последовательность ITS2 отобранных для анализа образцов. Нуклеотидные последовательности были депонированы в базе данных GenBank. Общая длина выравнивания ITS составила 524 п.н. При этом наблюдалась низкая вариабельность ITS последовательностей, и различия между последовательностями анализируемых образцов были крайне малы. Всего было выявлено 26 вариабельных участков, 12 из которых информативны: 15 вариабельных

участков найдены в ITS1 (длина выравнивания 221 п.н.), семь - в ITS2 (длина выравнивания 139 п.н.) (табл. 2.). Нуклеотидная последовательность гена 5.8S рРНК (164 п.н.), как и ожидалось, была высоко консервативной и содержала лишь четыре переменных участка. Из общего количества выявленных 26 переменных участков 9 проявляли межвидовой полиморфизм, 16 - внутривидовой полиморфизм, а один характеризовался одновременно и внутри, и межвидовым полиморфизмом. Анализ нуклеотидной последовательности ITS рДНК у исследуемых представителей рода *Aegilops* позволил выявить ряд видоспецифичных замсн, причем у большинства видов подобные замены расположены в ITS1 (рис. 10).

последовательность	длина (п.н.)	Содержание оснований (%)				Число вариабельных сайтов (%) /число информативных сайтов
		А	С	G	Т	
ITS1	221	20.1	34.1	28.2	17.7	15(6.8%) / 9
5.8 S	164	22.6	31.1	28.6	17.8	4(2.4%) / 0
ITS2	139	18.1	32.8	31.8	17.3	7(4.3%) / 3

	↓ TS1																↓ TS2															
	47	50	59	68	99	107	111	122	129	135	149	170	206	211	214	225	249	247	361	372	424	447	494	499	470	517						
caud1	T	C	C	C	C	G	G	A	W	G	A	G	C	T	T	C	A	G	G	C	K	G	G	T	C	C						
caud2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
caud3	-	-	-	H	-	-	-	-	-	R	-	A	-	-	-	H	W	D	D	-	T	-	-	-	-	-						
heldr1	-	-	-	-	T	-	-	-	A	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-						
heldr2	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	D	-	-	T	-	-	-	W	H	-					
heldr3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	W	D	D	-	T	-	-	-	-	-						
mut1	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	C	-	-	-	G	A	-	-	-	G	T	-	-	-	-	-						
mut2	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	C	-	-	-	G	A	-	-	-	G	T	-	-	-	-	-						
mut3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	A	-	D	-	-	-	-	-	-	W	-						
mut4	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	C	-	-	-	G	A	-	-	-	G	T	-	-	-	-	-						
mut5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	G	A	-	D	-	G	-	-	-	-	W	-						
tau1	-	T	T	-	T	A	-	-	A	-	C	-	T	G	-	-	-	-	-	-	T	-	A	-	-	-						
tau2	-	T	T	-	-	-	T	-	A	-	C	-	T	G	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-						
tau3	-	T	T	-	-	-	-	-	A	-	C	-	T	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
tau4	-	T	T	-	-	-	-	-	A	-	C	-	T	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
tau5	-	T	T	-	-	-	-	-	A	-	C	-	T	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
tau6	-	T	T	-	T	A	-	-	A	-	C	-	T	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
tau7	-	T	T	-	-	-	T	A	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-						
tau8	-	T	T	-	-	-	T	-	A	-	C	-	T	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
uniar1	-	-	T	-	T	-	-	-	A	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	T	T					
uniar2	-	-	T	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-						
uniar3	-	-	T	-	T	-	-	-	A	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	T	T					

Рис. 10. Вариабельные сайты в последовательности ITS участка рДНК диплоидных видов *Aegilops*

Triticeae и малых различий между видами, внутривидовой полиморфизм был выявлен у большинства изученных нами видов *Aegilops*. У видов *Ae. caudata*, *Ae. heldreichii* и *Ae. mutica* был отмечен и полиморфизм ITS внутри одного образца. Полученные данные представляют интерес, поскольку ранее (Wang et al., 2000) ни у одного из диплоидных видов *Aegilops* внутривидового полиморфизма ITS не было выявлено. Отсутствие внутривидового полиморфизма ITS у диплоидных представителей трибы *Triticeae* было показано даже в том случае, если анализировали образцы одного вида, взятые из географически удаленных точек (Hsiao et al., 1995). Полиморфизм ITS-последовательностей у видов *Aegilops* оказался недостаточным для достоверных филогенетических реконструкций, и на построенной методом максимальной экономии дендрограмме хорошо поддерживаются бутстрепом только видовые кластеры; кластеры же надвидового уровня бутстрепом не поддерживаются.

Молекулярный анализ полиморфизма семейства генов гамма-глиадинов у видов рода *Aegilops* и *T. monoccoccum*. Целью данной части работы явилось исследование полиморфизма одно из семейств генов запасных белков семян злаков - семейства генов гамма-глиадинов - у видов комплекса *Triticum-Aegilops*, имеющих различные геномы. Анализ семейства глиадиновых генов осуществлялся непосредственно сравнением их нуклеотидных последовательностей. Для анализа были отобраны образцы ДНК 7 диплоидных видов *Aegilops* и культурного диплоидного вида пшеницы *T. monoccoccum*. Таким образом, в исследовании были представлены все основные типы диплоидных геномов в группе *Triticum-Aegilops*.

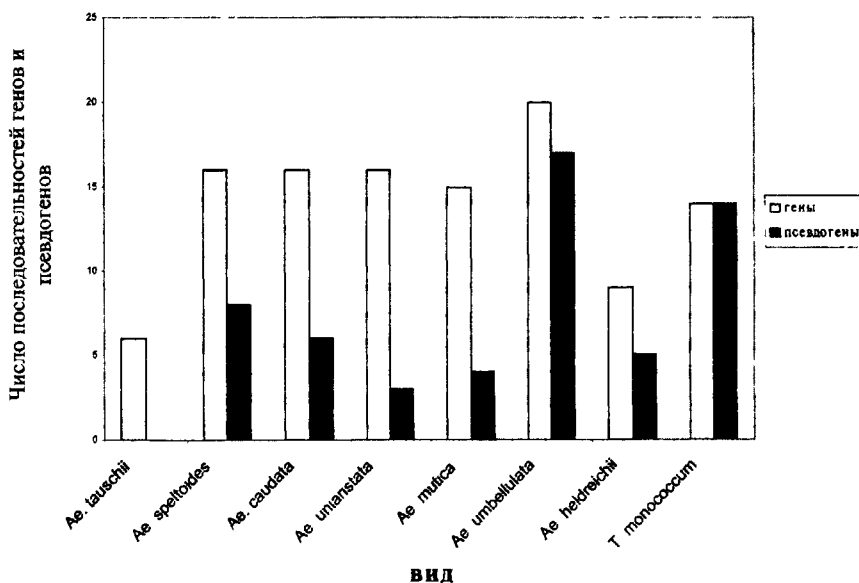


Рис 11 Соотношение полученных различных последовательностей генов и псевдогенов гамма-глиадинов для разных видов эгилопса и вида пшеницы *T. monoccoccum*

Всего было проанализировано 384 клон, содержащих вставку PCR-продуктов, полученных с использованием гамма-глиадиновых праймеров. В результате проведенного анализа было показано, что из последовательностей вставок всех

проанализированных 384 клонов гамма-глиадиновых генов были представлены 204 ДНК-последовательностями. Из полученных последовательностей гамма-глиадинов, 169 оказались различными. При этом число полученных для каждого из видов различных последовательностей было неодинаковым. Максимальное число (37 последовательностей) было получено для вида *Ae. umbellulata*, минимальное (6) – для вида *Ae. tauschii*. 143 последовательности, из которых 112 различных, представляли собой последовательности генов, а 61 (57 различных) – последовательности псевдогенов. Таким образом, количество псевдогенов составляло 33,7% от общего числа полученных различных последовательностей. По этому показателю семейство генов гамма-глиадинов заметно отличается от родственного ему семейства альфа-глиадиновых генов. При анализе семейства генов альфа-глиадинов количество псевдогенов достигало 88,2% от общего количества полученных последовательностей (247 из 280). Ранее уже высказывалось мнение о том, что в семействе генов гамма-глиадинов, присутствуют только единичные псевдогены, в то время как для альфа-глиадинов характерен весьма значительный процент псевдогенов (Anderson, 2000). Однако в нашем исследовании число псевдогенов в семействе гамма-глиадинов оказалось большим, и составляло 1/3 от общего числа.

Интересно отметить, что выявленное соотношение последовательностей генов и псевдогенов гамма-глиадинов для разных видов заметно отличалось (рис. 11). Так, половина всех полученных последовательностей вида *T. monococcum* оказалась последовательностями псевдогенов, в то время как для вида *Ae. tauschii* псевдогенов выявлено не было. Большая часть последовательностей псевдогенов содержит стоп-кодон, и гораздо меньшее их число характеризуется мутациями сдвига рамки считывания.

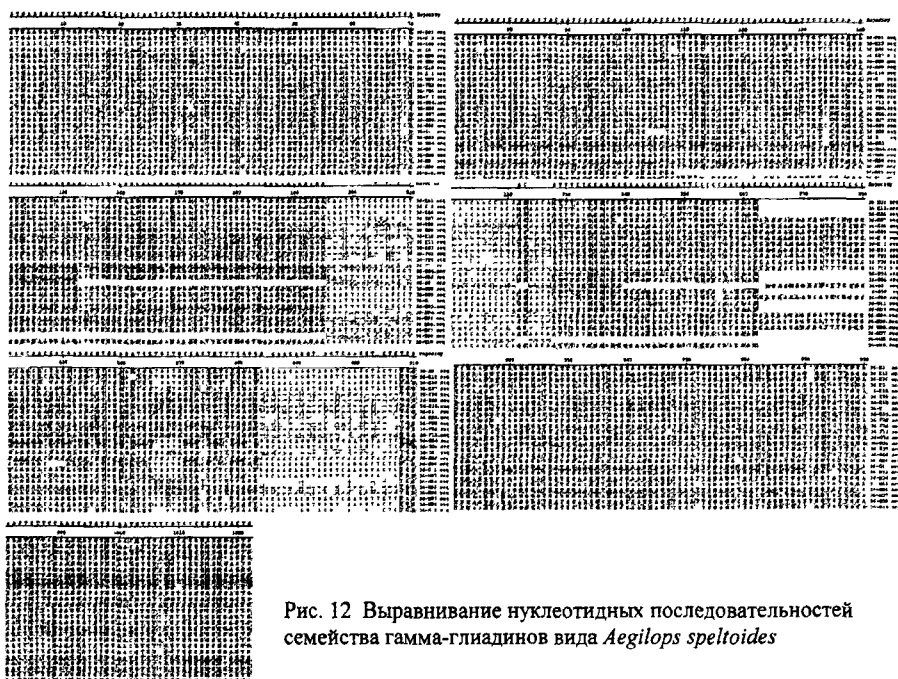


Рис. 12 Выравнивание нуклеотидных последовательностей семейства гамма-глиадинов вида *Aegilops speltoides*

При анализе для большинства проанализированных образцов было выявлено присутствие нескольких различных типов последовательностей (рис. 12). Такая картина, по всей видимости, объясняется наличием нескольких подсемейств генов гамма-глиадинов в геноме каждого вида, подобно тому, как это ранее было показано для генов альфа-глиадинов. По всей видимости, некоторые такие подсемейства представлены только генами, другие – исключительно псевдогенами, однако большая часть включает как гены, так и псевдогены. Длина полученных последовательностей гамма-глиадинов варьировала в пределах от 555 н. до 1020 н., причем распределение их по длине было не равномерным. Наиболее многочисленными оказались последовательности длиной 852 п.н., 840 п.н., 867 и 816 п.н., которые составляли 59,8 % от общего количества различных последовательностей.

Полученная нами картина кластеризации нуклеотидных последовательностей генов гамма-глиадинов и существующие представления об эволюции пшениц позволяют нам предположить возможную схему эволюции основных групп генов гамма-глиадинов (рис. 13).

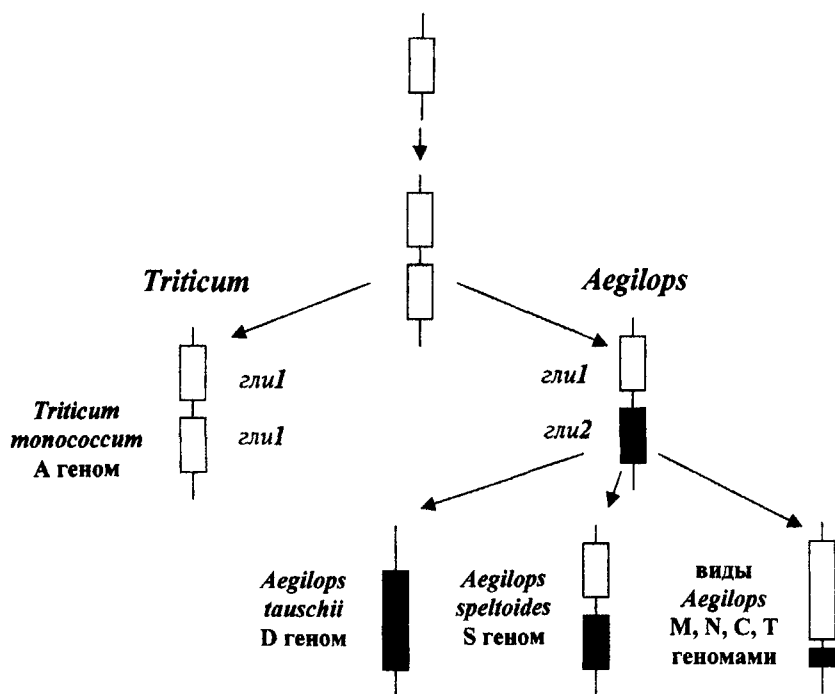


Рис. 13. Схема эволюции основных групп генов гамма-глиадинов.

Можно предположить существование у гипотетического общего предка пшениц и эгилопов одного типа подсемейства гамма-глиадинов. Далее имеющийся локус гамма-глиадинов дуплицируется в геноме либо самого гипотетического предка, либо при обособлении групп собственно пшениц и эгилопов.

Дальнейшая эволюция образовавшихся локусов гамма-глиадинов была независимой в каждой из групп. У обособившейся пшеницы оба глиадиновых семейства оказываются схожи друг с другом и похожи на гамма-глиадины предковой формы. У отделившихся эгилопсов одно из подсемейств (*gli2*) приобретает существенные отличия от предкового типа и, соответственно, от другого подсемейства (*gli1*). При этом первоначально оба подсемейства имеют равную представленность в геноме.

Затем в группе эгилопсов параллельно, или же последовательно выделяются три основные эволюционные линии. Первая ведет к современному виду *Ae. tauschii*, при этом происходит увеличение количества гамма-глиадиновых последовательностей типа *gli2* и исчезновение, либо сильное изменение, последовательностей типа *gli1*, которая исходно более близка к предковой. Вторая линия ведет к современному виду *Ae. speltoides*. В геноме этого вида сохраняется примерно равное соотношение между последовательностями гамма-глиадинов обоих типов. Третья линия дает начало остальным видам эгилопсов. При этом происходит увеличение количества последовательностей предкового типа *gli1* и уменьшение количества, или исчезновение последовательностей второго типа *gli2*. Параллельно с этим, оба гамма-глиадиновых локуса эволюционируют независимо, в результате чего каждый дает начало новым подсемействам, которые в дальнейшем становятся видоспецифичными. Помимо этого, внутри геномов наблюдается расхождение паралогичных подсемейств гамма глиадинов.

Использование данных молекулярного маркирования для анализа систематики и эволюции рода *Aegilops*. Результаты проведенного молекулярного маркирования показывают существенное различие между видами рода *Aegilops* по уровням внутривидового геномного полиморфизма. При этом в нашем исследовании не наблюдается прямой взаимосвязи уровня геномного разнообразия и присущего виду типа опыления. Полученные данные показывают также, что в определении уровня внутривидовой изменчивости, по всей видимости, играет роль уровень ploидности генома. Так, например, аллополиплоидные виды с D геномом являются менее полиморфными по сравнению с родительским диплоидным видом *Ae. tauschii*. Однако, влияние этого фактора не однозначно. Так, в нашем исследовании были получены результаты о низком уровне внутривидового полиморфизма по молекулярным маркерам у полиплоидных видов с D геномом, в то время как, для большинства полиплоидов с U геномом (за исключением вида *Ae. triuncialis*) был характерен значительный внутривидовой полиморфизм. Интересно отметить, что подобные различия в характере внутривидовой изменчивости для видов эгилопса D и U групп были показаны также с использованием цитогенетических методов (Бадаева, 2004). Выявленное отличие в уровнях полиморфизма у полиплоидов D-геномной и U-геномной групп достаточно интересно, так как для полиплоидных видов эгилопса в целом неоднократно отмечалась большая морфологическая и экологическая изменчивость. По-видимому, уровни внутривидового полиморфизма генома зависят от целого ряда факторов: типа системы опыления, возраста вида и ареала, ploидности генома, характера образования полиплоида (происхождение от единичного, или от множественных скрещиваний) и от свойств самого генома вида.

Результаты проведенного нами молекулярного маркирования различных последовательностей генома позволили выделить в комплексе *Triticum-Aegilops* несколько обособленных групп видов, каждая из которых включает в себя либо виды с родственными диплоидными геномами, либо диплоидный вид и родственные ему

полиплоидные. Группа видов с А геномом, группа с S геномом и группа с D геномом являются обособленными друг от друга и от прочих, хотя за счет присутствия В генома в геноме полиплоидных видов пшениц, наблюдается некоторое сходство между А и S группами. Группы видов с U, С, М и N геномами обнаруживают некоторое сходство друг с другом, хотя родство С и U геномов оказалось заметно меньшим, чем принято было считать. Что касается представляющего последнюю выделенную группу вида *Ae. mutica*, то, как уже было отмечено, положение его относительно видов других групп по результатам проведенного молекулярного анализа, также как и по морфологическим данным, неоднозначно, и требует дополнительного исследования.

Выделенные на основании данных молекулярного анализа группы видов, согласуются с положением Д. Зохари и М. Фельдмана (Zohary and Feldman, 1962) о существовании в пределах комплекса *Triticum-Aegilops* трех естественных полиплоидных комплексов, виды которых объединены наличием одного общего генома и связаны друг с другом посредством гибридизации и потока генов, что приводит к отсутствию четких разрывов на морфологическом уровне и к тому, что каждый такой полиплоид, по существу, не является генетически изолированным от прочих видов комплекса. Выделенные нами с помощью молекулярных методов группы видов с D геномом, с U геномом и с А геномом (в которую входят представители рода *Triticum*) соответствуют охарактеризованным ранее Д. Зохари и М. Фельдманом (Zohary and Feldman, 1962) трем полиплоидным комплексам. Однако, Д. Зохари и М. Фельдманом в комплекс видов с D геномом был включен также вид *Ae. cylindrica*, полученные же нами данные говорят о значительной обособленности данного вида от прочих видов с D геномом.

Помимо того, что группировка видов эгилопса по данным молекулярного анализа согласуется с цитогенетическими данными о геномном родстве видов, наблюдается также заметное соответствие выявленных групп таким таксономическим единицам, как секции, которые первоначально были выделены в роде *Aegilops* на основании результатов исследования морфологии. В последствии морфологические данные были дополнены данными цитогенетики, и приводимые в работе Х. Кихары секции полностью соответствуют выделенным нами группам (Kihara, 1959). Сложившаяся ситуация, когда выделенные изначально на основании морфологических данных секции, представляют собой хорошо обособленные кластеры и по данным цитогенетики, и по молекулярным данным, говорит в пользу реальности данных групп видов и неформального выделения секций в пределах рода *Aegilops*.

Сравнение выделенных на различных (морфологическом, цитогенетическом и молекулярном) уровнях групп видов *Triticum-Aegilops* с родами выделяемыми А. Лёве (Löve, 1984) на основе геномных формул, выявило заметные разногласия. В исследовании А. Лёве род *Aegilops* был разделен на 13 независимых родов, при этом в один род помещались виды, обладающие сходными геномами. Наблюдаемое противоречие между выделяемыми А. Лёве исключительно на основе геномной формулы родами и выделяемыми прочими исследователями на основании морфологических, цитогенетических и молекулярных данных группами видов, обусловлено, на наш взгляд, совместной эволюцией геномов в составе аллоплоидного, а также и видов со сходными типами геномов.

Вероятно, в случае с полиплоидными видами (по крайней мере, в пределах группы *Triticum-Aegilops*) наиболее естественной таксономической единицей

надвидового уровня можно считать группу видов, включающую диплоидный вид и родственные ему полиплоидные, как это предполагалось Д. Зохари и М. Фельдманом (Zohary and Feldman, 1962). Однако, такое единство, на наш взгляд, обусловлено не только наличием гибридизации между родственными полиплоидами, но и вероятным специфическим изменением геномов в составе аллополиплоидного, которое может происходить, как было показано, уже на первых стадиях после формирования полиплоидов (в гибридах первого поколения и/или в первом поколении после удвоения хромосом) (Ozkan et al., 2001; Shaked et al., 2001; Belyaev et al., 2000; Mizumoto et al., 2003). Как было установлено, направление этих процессов определяется преимущественно свойствами самих геномов (Salina et al., 2000). Кроме того, морфологическое сходство видов каждой группы может также быть обусловлено геном-специфичной экспрессией некоторых генов, а также, вероятно, и доминированием продуктов генов одного из геномов. Имея в виду все эти процессы, протекающие при полиплоидизации, можно предположить, что именно свойства самого генома, общего для ряда полиплоидов (в нашем случае А, D или U генома), заставляют этот геном, войдя в состав аллополиплоидного, оставаться неизменным, и приводят к изменениям всех других сочетающихся с ним геномов. Таким образом, уже на первом этапе после образования полиплоидов может обеспечиваться большее сходство с донором постоянного генома, а, следовательно, и с другими полиплоидами, несущими тот же геном.

Однако, как было показано при исследовании растений рода *Brassica*, а также недавно произошедшего вида *Spartina anglica*, в некоторых случаях формирование полиплоидов не сопровождается существенными изменениями геномов (Axelsson et al., 2000; Baumel et al., 2002). Вероятно, в таком случае является возможным возникновение нового аллополиплоида, который будет либо сильно отличаться от обоих родителей, так что не сможет быть включен в какой-либо родительский таксон, либо же будет представлять переходную форму, которая заполнит собой существовавший ранее разрыв между родительскими таксонами. Кроме того, к образованию форм, отличающихся от обоих родительских, может приводить и изменение геномов, поскольку при полиплоидизации также было показано на ранних этапах формирование «новых» признаков, не характерных для родительских форм, в том числе и таких эволюционно важных, как изменение времени цветения (Schranz and Osborn, 2000).

ВЫВОДЫ

1. Впервые с использованием различных молекулярных методов определены уровни меж- и внутривидового полиморфизма всех 26 видов рода *Aegilops*. Показано существенное различие между видами рода *Aegilops* по уровням внутривидового полиморфизма генома. Наиболее полиморфными являются диплоидные виды *Ae. tauschii*, *Ae. comosa* и *Ae. heldreichii*, *Ae. mutica*, *Ae. speltoides* s.l., *Ae. caudata* и полиплоидные виды с U геномом - *Ae. kotschyi*, *Ae. variabilis*, *Ae. columnaris*, *Ae. biuncialis*, *Ae. ovata*, *Ae. triaristata*, *Ae. recta*. Диплоидные виды *Ae. uniaristata*, *Ae. umbellulata*, *Ae. longissima*, *Ae. sharonensis*, *Ae. searsii*, *Ae. bicornis*, полиплоидные виды с D геномом - *Ae. crassa*, *Ae. juvenalis*, *Ae. vavilovii*, *Ae. ventricosa*, *Ae. cylindrica*, а также один из полиплоидных видов U-геномной группы - *Ae. triuncialis*, - обладают более низким уровнем внутривидовых различий. Не наблюдалось полного соответствия между уровнем геномного полиморфизма вида и степенью внутривидовой вариабельности морфологических признаков.

2. В пределах рода *Aegilops* методами молекулярного маркирования выделено 6 групп, каждая из которых включает в себя либо виды с родственными диплоидными геномами, либо диплоидный вид и родственные ему полиплоиды:

- группа, включающая 5 диплоидных видов, обладающих S геномом (*Ae. speltoides* s.l., *Ae. longissima*, *Ae. sharonensis*, *Ae. searsii*, *Ae. bicornis*);
- группа, включающая 5 видов различного уровня плоидности, объединенных наличием D генома (*Ae. tauschii*, *Ae. crassa*, *Ae. juvenalis*, *Ae. vavilovii*, *Ae. ventricosa*);
- группа из 9 видов различного уровня плоидности, объединенных наличием U генома (*Ae. umbellulata*, *Ae. kotschyi*, *Ae. variabilis*, *Ae. columnaris*, *Ae. bujnialis*, *Ae. ovata*, *Ae. triaristata*, *Ae. recta*, *Ae. triuncialis*);
- виды *Ae. caudata* и *Ae. cylindrica*, обладающие C геномом;
- диплоидные виды с геномами M (*Ae. comosa* и *Ae. heldreichii*) и N (*Ae. uniaristata*);
- вид *Ae. mutica*, обладающий T- типом генома

3. Группы видов *Aegilops*, выделенные по результатам молекулярного анализа, совпадают с большинством таксонов внутриродовой систематики, выделяемых разными авторами на основании морфологических и цитогенетических данных. Наблюдается практически полное соответствие полученных молекулярными методами данных системам рода *Aegilops*, которые были предложены Х Кихарой (1954) и М.В. Слагереном (1994); более всего результатам проведенного молекулярного исследования противоречит система рода, предложенная А. Лёве (1984).

4. Охарактеризованы нуклеотидные последовательности внутренних транскрибируемых спейсерных участков (ITS1, ITS2) рибосомного оперона и гена 5.8S рРНК у 22 образцов пяти диплоидных видов рода *Aegilops*, а также у 26 образцов двух аллополиплоидных видов *Ae. kotschyi* и *Ae. variabilis*. Установлена низкая межвидовая вариабельность ITS-районов. Впервые выявлен внутривидовой полиморфизм ITS-последовательности у диплоидных видов рода *Aegilops*.

5. Впервые с помощью метода домен-направленного маркирования (DDP-profiling) охарактеризован полиморфизм семейства NBS-LRR генов резистентности у видов *Aegilops*; показано наличие высокого уровня изменчивости генов данного семейства, по сравнению с другими проанализированными последовательностями генома *Aegilops*.

6. Клонировано и секвенировано 204 последовательности одного из семейств генов запасных белков эндосперма злаков - генов гамма-глиадинов у 7 диплоидных видов группы *Triticum-Aegilops* с разными типами генома. Показано наличие в геноме нескольких подсемейств гамма-глиадинов; установлены межвидовые различия по соотношению последовательностей генов и псевдогенов в геноме. На основании анализа полученных данных предложена возможная схема эволюции генов семейства гамма-глиадинов в группе *Triticum-Aegilops*.

ПУБЛИКАЦИИ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

1. Кочисва Е.З., Горюнова С.В., Поморцев А.А. RAPD – маркирование геномов представителей рода *Hordeum*. Генетика. 2001. Т.37. № 8. С.1088-1094.
2. Рыжова Н.Н., Горюнова С.В., Томилов А.А., Кочисва Е.З. Выявление двух типов внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS) рДНК в геноме представителей рода *Capsicum*. Доклады Академии Наук. 2002. Т. 38. №2. С.282-285.
3. Горюнова С.В., Чикида Н.Н. Молекулярное маркирование популяций видов *Aegilops kotschy* и *Aegilops variabilis* Тезисы МОГиС. 2003. Т.1 С.58-59
4. Горюнова С.В., Кочисва Е.З., Чикида Н.Н., Пухальский В.А. RAPD анализ внутривидовой изменчивости и филогенетических связей видов эгилопса (*Aegilops* L.), содержащих D геном. Генетика. 2004. Т. 40. №5. С.642-651
5. Горюнова С.В., Salentijn E, Smulders M. Полиморфизм аминокислотной последовательности альфа-глиадинов у представителя *Aegilops tauschii*. Тезисы докладов III съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров. Москва. 2004. Т.1. С.164.
6. Горюнова С.В., Чикида Н.Н., Кочисва Е.З. Полиморфизм нуклеотидной последовательности ITS1 региона рДНК у 5 диплоидных видов рода *Aegilops*. Тезисы докладов III съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров. Москва. 2004. Т.1. С.165.
7. Горюнова С.В., Кочисва Е.З. Анализ внутривидовой изменчивости и филогенетических связей видов *Aegilops* L. с D-геномом методом RAPD. Материалы VIII Молодежной конференции ботаников в Санкт-Петербурге. 2004. С.243.
8. Salentijn E.M.J, Goryunova S., Herpen T.W.J.M van , Schoot J. van der, Gilissen L.J.W.J., Soest L.J.M. van & M.J.M. Smulders. Alpha-gliadin variety among wheat genomes in relation to toxicity in Coeliac Disease. Allergy Matters! 2004. The International Conference of Allergy Prevention. Wageningen, The Netherlands. P 132.
9. Горюнова С.В., Чикида Н.Н., Gori M., Кочисва Е.З. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров рибосомных генов диплоидных видов эгилопса (*Aegilops* L.). Молекулярная биология. 2005. Т. 39. №2. С.193-197.

Напечатано с готового оригинал-макета

Издательство ООО "МАКС Пресс"

Лицензия ИД N 00510 от 01.12.99 г.

Подписано к печати 16.05.2005 г.

Формат 60х90 1/16. Усл.печ.л.1,75. Тираж 100 экз. Заказ 299.

Тел. 939-3890. Тел./Факс 939-3891.

**119992, ГСП-2, Москва, Ленинские горы, МГУ им. М.В. Ломоносова,
2-й учебный корпус, 627 к.**

№ 1 3 1 3 3

РНБ Русский фонд

2006-4

10066