

УДК 575.174.015.3:582.599

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОТНОШЕНИЯ У ВИДОВ *FAGOPYRUM*, ОСНОВАННЫЕ НА ДАННЫХ АНАЛИЗА b/c ИНТРОНА ГЕНА *NAD1*

Г.Д. Кадырова^{1,2}, Н.Н. Рыжова¹, Е.З. Кочиева¹

(¹Центр “Биоинженерия” РАН, г. Москва, ²Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, г. Казань; e-mail: guzel_asd@rambler.ru)

Впервые был охарактеризован b/c интрон гена *nad1* 13 видов *Fagopyrum* и показана возможность использования интрона гена *nad1* для идентификации видов гречихи. Размеры b/c интрона гена *nad1* варьировали от 1217 п.н. (*F. tataricum*, *F. cymosum*) до 1239 п.н. (*F. capillatum*). Были определены видоспецифичные SNPs и индели. Полученная филогения рода совпала с основанной на морфологических признаках. NJ и MP дендрограммы выявили четкое разделение анализируемых видов на две основные группы: *cymosum* и *urophyllum*. Группа видов *urophyllum* характеризовалась присутствием нескольких синапоморфных замен и инделей, включая 11-нуклеотидную вставку, фланкированную прямыми повторами.

Ключевые слова: гречиха, полиморфизм, митохондриальный геном, эволюция.

Гречиха (род *Fagopyrum* Mill, сем. *Polygonaceae*) — одна из ценнейших крупяных культур. Согласно последним данным, принято выделять 16 видов *Fagopyrum*, которые подразделяются на две главные филогенетические группы: ***cymosum*** и ***urophyllum***. Группа ***cymosum*** характеризуется крупными плодами и включает два культурных (*F. esculentum* Moench, *F. tataricum* Gaertn) и два диких вида (*F. homotropicum* Ohnishi, *F. cymosum* Meissn) гречихи. Вторая группа, или группа ***urophyllum***, с мелкими плодами, включает вид *F. urophyllum* (Bur. et Franch) Gross и 11 оставшихся диких видов [1]. Из 16 видов гречихи, культивируется два вида — посевная (*F. esculentum*) и татарская (*F. tataricum*) [2]. Однако состав и филогенетические отношения рода *Fagopyrum* окончательно не определены, что связано еще и с тем, что с 1990 по 2002 г. было обнаружено более 10 новых видов и подвидов [3].

В настоящее время для решения таксономических и филогенетических вопросов у рода *Fagopyrum* широко используются методы как мультилокусного анализа, так и исследования отдельных участков ядерного и хлоропластного геномов [4]. Однако до настоящего момента не было данных о митохондриальном геноме гречихи.

Второй (b/c) интрон гена *nad1* митохондриальной ДНК (мтДНК) считается наиболее полиморфным и используется для филогенетических исследований у растений [5].

Целью данной работы стал анализ степени вариабельности интрона b/c гена *nad1* (мтДНК) у *Fagopyrum*: характеристика нуклеотидной последовательности этого интрона у представителей различных видов и оценка возможности его использования для решения таксономических проблем и выявления филогенетических отношений в роде *Fagopyrum*.

Материалы и методы

Для молекулярного анализа генома из коллекций ГНУ ГНЦ РФ ВИР и ГНУ ТатНИИСХ были подобраны 23 образца 13 видов рода *Fagopyrum* различного географического происхождения.

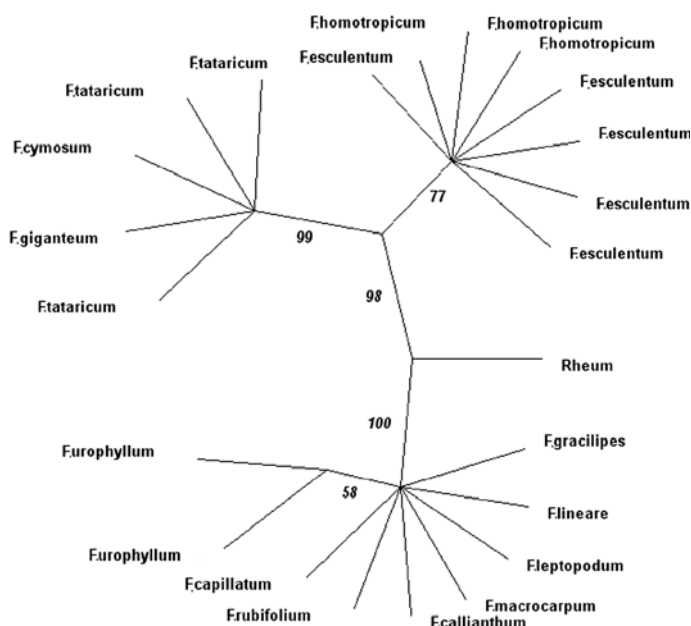
ДНК выделяли по стандартной методике [6]. Для амплификации b/c интрона гена *nad1* мтДНК последовательности праймеров были взяты из статьи Demesure et al. [7]. Все амплифицированные фрагменты секвенировали с использованием ABI 310 capillary DNA Analyzer (Центр “Биоинженерия” РАН).

Последовательности выравнивали и анализировали с помощью программы MEGA 3.0. Филогенетические деревья строили методами объединения соседей (Neighbor-Joining, NJ) и максимальной экономии (Maximum Parsimony, MP) в программе PAUP 4.0b10. Устойчивость филогенетических деревьев в NJ и MP анализах оценивали методом бутстрепа, используя 1000 реплик.

Результаты и обсуждение

Размеры b/c интрона гена *nad1* варьировали от 1217 п.н. у представителей видов *F. tataricum*, *F. cymosum* и *F. giganteum* до 1239 п.н. у представителей вида *F. capillatum*. Общая длина выравненной последовательности составила 1244 п.н.

Анализ b/c интрона *nad1* мтДНК гречихи показал, что данный участок достаточно вариабелен и по присутствию нуклеотидных замен все виды гречихи могут быть легко различимы и, следовательно, b/c интрон гена *nad1* может быть использован для идентификации видов *Fagopyrum*. При этом выявленные точковые нуклеотидные замены (SNP) и индели позволили определить генетически родственные группы видов. Так, например, были выяв-



MP-дендрограмма, построенная по последовательностям интрона *nad1* митохондриального генома *Fagopyrum* (CI = 0,963; RI = 0,975). Указаны значения бутстреп-поддержки > 50%

лены нуклеотидные замены, специфичные для филогенетических групп **cymosum** и **urophyllum**. Группа **cymosum** (*F. cymosum*, *F. tataricum*, *F. giganteum*, *F. esculentum* и *F. homotropicum*) характеризовалась присутствием замен С₃₇₈ и А₇₄₃ (от начала интрона), тогда как для группы **urophyllum** (*F. gracilipes*, *F. capillatum*, *F. rubifolium*, *F. callianthum*, *F. macrocarpum*, *F. leptopodium*, *F. lineare*, *F. urophyllum*) в этих же позициях были нуклеотидные замены А₃₇₈ и Т₇₄₃. Для *F. esculentum* и *F. homotropicum* детектированы замены, специфичные лишь для этих двух видов (А₁₃₇, G₅₇₀).

Несмотря на небольшое число видоспецифичных замен, последовательность интрона оказалась весьма интересной. Так, было показано, что при относительной консервативности 5'- и 3'- концов интрона последовательности его центральной части значительно различались прежде всего за счет видоспецифичных инделей. Так, все виды группы **urophyllum**, взятые в анализ, характеризовались наличием 11-нуклеотидной GA-богатой синапоморфной вставки в позиции 343 от начала интрона, фланкированной прямыми GAGG-повторами. Также хотелось бы отметить последовательность AGAAA в позиции 949. У всех видов группы **cymosum** данный пентануклеотид присутствовал в последовательности один раз. У всех анализируемых видов группы **urophyllum** последовательность AGAAA была повторена тандемно, кроме вида *F. capillatum*, у которого этот пентануклеотид повторялся трижды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yamane K., Yasui Y., Ohnishi O. Intraspecific cpDNA variation of diploid and tetraploid perennial buckwheat, *Fa-*

gopyrum cymosum (Polygonaceae) // Am. J. Bot. 2003. Vol. 90. P. 339—346.

Помимо инсерций, которые были описаны выше, для некоторых видов рода *Fagopyrum* были выявлены специфичные делеции. Так, виды *F. tataricum*, *F. cymosum* и *F. giganteum* характеризовались делецией 6-нуклеотидной последовательности TTGAAC в позиции 707, тогда как у всех остальных анализируемых видов групп *cymosum* и *urophyllum* данная последовательность присутствовала. Кроме этого в положении 632 была обнаружена делеция 10-нуклеотидной последовательности (TCTAGAGAGG), специфичная для вида *F. lineare*.

Дендрограммы (NJ и MP), построенные на основе полученных результатов, показали четкое разделение анализируемых видов на две группы (рисунок). Один кластер объединил все виды, относящиеся к группе **cymosum**, другой кластер образовали виды группы **urophyllum**. Анализ b/c интрона гена *nad1* мтДНК на обеих дендрограммах выявил четкую дифференциацию группы **cymosum** на два субкластера, поддерживаемых высокими значениями бутстреп (99 и 77%). Первый субкластер объединил виды *F. esculentum* и *F. homotropicum*, а второй — *F. tataricum*, *F. cymosum* и *F. giganteum*. Аналогичное деление видов группы **cymosum** было показано ранее при исследовании полиморфизма *rbcL-accD* спейсера хлДНК и ITS-района ядерной ДНК [4]. В то же время группа **urophyllum** не разделилась на субкластеры, которые были выявлены при анализе хлоропластного генома [8].

Проведенный анализ b/c интрона гена *nad1* мтДНК не подтвердил гипотезу о происхождении вида *F. esculentum* от *F. cymosum* и совпал с результатом анализа хлоропластного генома, предлагающим *F. homotropicum* в качестве одного из предков гречи-хи посевной [2].

Таким образом, в данной работе впервые проведен анализ полиморфизма участка митохондриального генома гречи-хи. Для всех анализируемых видов выявлены специфичные замены и индели и, следовательно, показана возможность использования интрона гена *nad1* для идентификации видов *Fagopyrum* и выявления филогенетических отношений представителей рода. Полученная филогения рода в целом совпала с основанной на морфологических признаках. Также показано совпадение эволюционной направленности хлоропластного и митохондриального геномов, что выражается в выделении группы видов **cymosum** и **urophyllum**.

* * *

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 10-04-01564-а).

2. Campbell C.G. Buckwheat. *Fagopyrum esculentum* Moench // International Plant Genetic Resources Institute. Rome, Italy, 1997. 95 p.
3. Ohsako T., Yamane K., Ohnishi O. Two new *Fagopyrum* (Polygonaceae) species *F.gracilipedoides* and *F.jinshaense* from Yunnan, China // Genes and Genet. Syst. 2002. N 77. P. 399–408.
4. Yasui Y., Ohnishi O. Interspecific relationships in *Fagopyrum* (Polygonaceae) revealed by the nucleotide sequences of the *rbcL* and *accD* genes and their intergenic region // Am. J. Bot. 1998a. Vol. 85. P. 1134–1142.
5. Cameron K.M. On the value of nuclear and mitochondrial gene sequences for reconstructing the phylogeny of vanilloid orchids (Vanilloideae, Orchidaceae) // Ann. Bot. 2009. Vol. 104(3). P. 377–385.
6. Edwards K., Johnstone C., Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis // Nucl. Acids Res. 1991. Vol. 19(6). P. 1349.
7. Demesure B., Sodji N., Petit R.J. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants // Molec. Ecol. 1995. Vol. 4. P. 129–131.
8. Sharma T.R., Jana S. Species relationships in *Fagopyrum* revealed by PCR-based DNA fingerprinting // Theor. Appl. Genet. 2002. Vol. 105. P. 306–312.

Поступила в редакцию
04.04.2010

PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS IN *FAGOPYRUM* SPECIES BASED ON NUCLEOTIDE POLYMORPHISM OF b/c INTRON OF *NAD1* GENE

G.D. Kadyrova, N.N. Ryzhova, E.Z. Kochieva

The sequence analysis of b/c intron of *nad1* mitochondrial gene in 13 *Fagopyrum* species was carried out and demonstrated ability of this intron to use in phylogenetic studies. The length of the mitochondrial *nad1* b/c intron varied from 1217 bp in *F. tataricum*, *F. cymosum*, *F. giganteum* to 1239 bp in *F. capillatum*. Species- and accession- specific SNPs and indels were detected. For obtained molecular phylogeny of *Fagopyrum* species a good agreement with the recognized taxonomic divisions within the genus was observed. NJ and MP trees showed a clear clustering into two major genetic groups: **cymosum** and **urophyllum**. The **urophyllum** group was characterized by the presence of several synapomorphic characters including 11 bp insert flanked by directrepeats.

Key words: buckwheat, polymorphism, mitochondrial genome, evolution.

Сведения об авторах

Кадырова Гузель Дамировна — науч. сотр., ГНУ Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, 420059, Казань, Оренбургский тракт, 48. E-mail: guzel_asd@rambler.ru

Рыжова Наталья Николаевна — науч. сотр. Центра “Биоинженерия” РАН, 117312, Москва, ул. 60-летия Октября, д. 7, корп. 1. E-mail: gynatalia@yandex.ru

Кочиева Елена Зауровна — вед. науч. сотр. Центра “Биоинженерия” РАН, 117312, Москва, ул. 60-летия Октября, д. 7, корп. 1. E-mail: ekochieva@yandex.ru