

внутри Альфа-Протеобактерий и показывают, что они формируют самостоятельную ветвь, рано дивергировавшую от основного ствола Rickettsia.

При сравнении последовательностей двух изолятов *Holospira undulata* было выявлено отличие по 1 нуклеотиду (из 1492). Различия между разными видами *Holospira* составляет от 3% (48 замен *H. curviuscula* vs *H. undulata*) до 1,6% (*H. undulata* vs *H. obtusa*). Среди исследованных нами видов *Holospira* был представлен один штамм *H. elegans*. Полученная нами последовательность 16S рДНК (1235 п.н.) отличалась на 1 и на 2 нуклеотида (< 0,01% и 0,015% соответственно) от последовательностей двух изолятов *H. undulata*. Сравнение полученной последовательности с небольшим фрагментом (346 п.н.) 16S рДНК *H. elegans* в BLAST показал, что этот фрагмент полностью идентичен соответствующему фрагменту нашей последовательности. Полученные данные показывают, что уровень различий между *Holospira undulata* и *H. elegans* по крайней мере на два порядка меньше уровня межвидовых различий. Это позволяет нам утверждать, что они представляют собой один вид. То, что *Holospira undulata* и *H. elegans* в действительности представляют один вид мы предполагали ранее, т.к. они выделены на основании только морфологических отличий инфекционных форм (ИФ) этих симбионтов: ИФ извитые, тогда как у *H. elegans* они прямые. В нашей коллекции линий симбионтов был представлен клон *Holospira undulata*, популяция симбионтов в котором была представлена смесью прямых и извитых ИФ бактерий. Используя метод предельных разведений, была экспериментально получена клетка *P. caudatum*, инфицированная единственной извитой формой. Процесс инфекции контролировался под микроскопом с интерференционным контрастом Номарского и хорошо документирован. Полученный от этой клетки клон первоначально содержал лишь извитые ИФ, но затем начали появляться и прямые, доля которых постепенно возрастала. Таким образом, прямые ИФ могут образовываться у обычных *H. undulata*, возможно, в результате геномных перестроек.

Построенная филогения показывает, что сестринскими парами являются *H. undulata* - *H. obtusa* и *H. acuminata* – *H. curviuscula*, микро- и макронуклеарный симбионт *P. caudatum* и микро- и макронуклеарный симбионт *P. bursaria* (рис.1). Этот результат показывает, что в исследуемом «кусте» симбиотических систем сначала сформировалась видовая специфичность партнеров, а затем, внутри вида и независимо в каждом виде хозяина дивергировали виды симбионтов, специфичные к разным ядрам – микронуклеусу и макронуклеусу.

РОДИОНОВ А.В., МАЧС Э.М., ТЮПА Н.Б., КИМ Е.С., НОСОВ Н.Н., ПУНИНА Е.О., КОРЧАГИНА Ю.Ю., КРАСИЛЬНИКОВ Е.М., КРЮКОВ А.А., РАЙКО М.П.

Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург, ул. Проф/ Попова 2.

e-mail: avrodionov@mail.ru

ВНУТРИВИДОВАЯ И МЕЖВИДОВАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ITS В ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ ЦВЕТКОВЫХ РАСТЕНИЙ

Основными последовательностями ядерного генома, которые используются при сравнительном исследовании ДНК растений, являются внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1 и ITS2 генов 45S рРНК (Шнеер, 2008). Достоинства ITS как одного из основных индикаторов степени межвидовой дивергенции геномов растений определяются тем, что ITS1 и ITS2 представляют собой две быстро изменяющиеся в эволюции последовательности ДНК длиной порядка 220 п.н. каждая, окаймленные медленно эволюционирующими генами 18S-, 26S- и 5.8S-рРНК. По числу видов

растений, у которых эти последовательности секвенированы, район ITS1-5.8S-rPHK-ITS2 -наиболее исследованная последовательность эукариотического генома.

Цель нашей работы - изучение уровня и спектра внутривидовой и межвидовой изменчивости района ITS1-5.8S рДНК-ITS2 ядерных генов 45S рPHK в природных популяциях цветковых растений. В частности, мы исследовали внутривидовой и межвидовой полиморфизм ITS представителей родов *Avena*, *Anthoxanthum*, *Zingeria*, *Colpodium sensu lato*, *Poa*, *Glyceria* (Однодольные) и *Euphorbia* subsp. *Esula*, *Quillaja* (Двудольные) и некоторых других видов (Родионов и др., 2005; Носов, Родионов, 2008; Красильников, Родионов, 2008; Пунина и др., 2008 и др.).

В наших исследованиях амплификация проводилась с помощью праймеров ITS1-F, ITS5, ITS1-P и ITS4. Наши расчеты показали, что длина ITS1 у 119 представителей триб *Aveneae* и *Poeae* от мотива «TCGWGRCC» до «WTWTAA(A)TCN» варьирует от 211 (у *Trisetum youngii*) до 221 п.н. (у *Phalaris truncata*) и, в среднем, составляет 217 п.н. Среднее содержание G+C равно 60.9%. Длина ITS2 у 123 представителей триб *Aveneae* и *Poeae* от мотива «HWAAYACGCTY» до «YGYYYHGACS» варьирует от 209 (у *Poa trivialis*) до 221 п.н. (у *Vahlodea atropurpurea*, *Phalaris truncata*, *Helictotrichon asiaticum* и *Hierochloë* spp.) и, в среднем, составляет 212.7 п.н. Среднее содержание G+C равно 63.4%.

Доля GC-пар в последовательностях ITS – важная с биологической точки зрения, но мало изученная характеристика транскрибируемых спейсеров генов 45S рPHK. Важность её связана с тем, что один из механизмов регуляции работы генов эукариот связан с метилированием цитозина в последовательностях CpG и CpNpG (Ванюшин, 2005). Следствием изменения нуклеотидного состава ITS может быть изменение числа потенциально метилируемых динуклеотидов 5'-CpG-3' и 5'-CpNpG-3' в рДНК. По этой причине изменение нуклеотидного состава может влиять на физиологию генетических процессов. Кроме того, увеличение числа dC+dG пар нуклеотидов в рДНК увеличивает стабильность вторичной структуры РНК-транскрипта не только потому, что пара G:C энергетически более стабильна, чем A:U, но и потому, что G образует в РНК пару не только с C, но и с U – так называемую воббл-пару G:U – сравнимую по силе связи с таковой в паре G:C.

Гребенштейн и соавт. (Greibenstein et al., 1998), исследуя ITS-последовательности *Helictotrichon*, обнаружили корреляцию между нуклеотидным составом ITS1 и ITS2 и жизненной формой: у многолетних форм овсецов процент G+C в ITS был выше, чем у однолетних. Наши данные показывают, что, не смотря на то, что по широте вариаций % G+C однолетние и многолетние злаки триб *Aveneae* и *Poeae* не различаются, модальный класс и средний % G+C в ITS1 и ITS2 у многолетних *Aveneae* и *Poeae* действительно выше чем у однолетних. Таким образом, закономерность, обнаруженная впервые Гребенштейн и соавторами, справедлива не только для овсецов, а носит более общий характер. Причины и природа наблюдаемых корреляций между нуклеотидным составом ITS и однолетним и многолетним жизненными циклами пока не понятны, но, возможно, связаны с закономерностями накопления нуклеотидных замен в ДНК, определяемыми такими эпигенетическими механизмами регуляции работы генетического аппарата, как метилирование dC в рДНК (Ванюшин, 2006).

Распределение мутаций вдоль по длине района ITS1-5.8S рДНК-ITS2 неравномерно. Продемонстрируем это на примере мутаций, накопившихся в ходе дивергенции 25 видов рода *Avena*, у которых удастся однозначно реконструировать анцестральную последовательность ITS1 и, за исключением одной позиции (149), предковую последовательность ITS2. Исследованные нами диплоидные представители *Avena* по степени сходства их ITS определенно разделились на две группы - группа ((*clauda*, *pilosa*) *ventricosa*) (геном C), ITS которых были видоспецифичны (степень сходства ITS видов этой группы была в пределах 96.5-99.5%), и группу видов с

геномом А, у которых сходство последовательностей ITS достигало 99.7-100%. Некоторые из видов с геномом А, по мнению ряда систематиков, представляют собой "таксономические виды" (фактически, эколого-географические расы), не являясь "биологическими" видами. Различие между ITS геномов А и С достигало 9-10%. У всех полиплоидов кроме *A. macrostachia* при геномном секвенировании выявляется только ITS второго типа.

Тип мутаций в ITS2, закрепившийся у современных представителей рода *Avena*, заметно отличается от мутаций, закрепившихся в ITS1. Отношение частоты транзиций к частоте трансверсий ($\check{R}=P^*/Q^*$, где P^* и Q^* - измеряемые частоты транзиций и трансверсий, соответственно) в ITS1 18:3 ($\check{R}=6$), а в ITS2 - 12:12 ($\check{R}=1$). Теоретически, частота трансверсий при равной вероятности замен и неизменяющемся GC-составе должна быть в два раза выше, чем частота транзиций ($\check{R}=0.5$), однако для многих ядерных генов эта величина находится в интервале 0.5-2 (Ней, Кумар, 2004). Причина заметных различий между ITS1 и ITS2 по индексу \check{R} остается неясной и требует дальнейших исследований.

Для того, чтобы выяснить, влияют ли мутации в ITS1 и ITS2, накопившиеся в ходе дивергенции видов *Avena*, на вторичную структуру пре-рРНК и если влияют, то какого рода изменения вторичной структуры ITS при этом происходят, мы, используя программу RNAstructure, рассчитали вероятные вторичные структуры ITS1 и ITS2 у всех исследованных видов *Avena*. При этом мы наблюдали многообразие форм ITS1 (примерно равных по минимальной свободной энергии) - вторичная структура ITS1, по-видимому, неоднозначна; возможно, она может меняться в ходе процессинга пре-рРНК.

Аналогичные закономерности выявлены нами и при исследовании ITS двудольных (на примере ITS *Euphorbia*). Генетические расстояния между видами внутри подрода *Esula* варьировали от 1 до 30%. В пределах подрода *Esula* ITS1 более изменчив, чем ITS2 (среднее р-расстояние между видами по этим последовательностям в пределах подрода 23 и 17%, соответственно). В пределах отдельных секции межвидовые различия по ITS составляли 5-17%.

Полученные данные показывают, что частота изменений нуклеотидных последовательностей в разных районах ITS различна. При дивергенции видов закрепляются преимущественно такие мутации, которые не меняют вторичной структуры пре-рРНК, то есть, на возможные (совместимые с жизнью) типы мутаций в некоторых позициях ITS наложены ограничения, связанные, по-видимому, с ролью первичной и вторичной структуры ITS в процессинге рРНК. Необходимость сохранения вторичной структуры ITS и ограничения на мутационные изменения первичной последовательности ITS связаны с процессингом пре-рРНК.

Сравнительный анализ ядерных 5.8S рРНК позволил обнаружить две характерные синапоморфии, подтверждающие раннее разделение *Poaceae* на две филогенетических ветви - на группу арундиноидных триб, называемую, обычно, кладой PACCAD (то есть, *Panicoideae-Aristidoideae-Centothecoideae-Chloridoideae-Arundinoideae-Danthonioideae*) и кладу ВЕР (*Bambusoideae-Ehrhartoideae-Pooideae*), что согласуется с представлениями, основанными на анализе хлоропластных генов (Grass Phylogeny Working Group, 2001). Последовательности 5.8S рРНК растений клады ВЕР, также как 5.8S рРНК *Joinvillea plicata* и примитивных, занимающих базальное положение на древе *Poaceae* злаков *Streptochaeta sodiroana* и *Pharus latifolius*, несут G в положении 55 и C в положении 103. У всех арундиноидных злаков в положении 55 стоит A, а в положении 103 - U. То, что две, по-видимому независимые, мутации успели накопиться в очень консервативном районе гена 5.8S рРНК у общего предка всех представителей PACCAD за время, прошедшее после разделения филогенетических ветвей предков ВЕР и PACCAD, но до дивергенции филогенетических ветвей, давших современных *Panicoideae*, *Aristidoideae*,

Centothecoideae, Chloridoideae, Arundinoideae u Danthonioideae может означать, что период существования общего предка РАССАD был очень продолжительным.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант) и Программы «Динамика генофондов».

Литература

Ванюшин Б.Ф. Энзиматическое метилирование ДНК – эпигенетический контроль за генетическими функциями клетки // Биохимия. 2005. Т. 70. № 5. С. 598–611.

Красильников Е.М., Родионов А.В. Филогенетические отношения рода *Quillaja* с другими таксонами порядков *Rosales* и *Fabales* по результатам сравнительного исследования ядерных ITS и районов *trnL-trnF* и *psbA-trnH* генома хлоропластов // Фундаментальные и прикладные проблемы ботаники в начале XXI века. Часть 3. Петрозаводск, 2008. С. 42-45.

Ней М., Кумар С. Молекулярная эволюция и филогенетика. Киев: КВІЦ. 2004. 418 с.

Носов Н.Н., Родионов А.В. Молекулярно-филогенетическое изучение взаимоотношений между некоторыми представителями рода *Poa* L. (*Poaceae*) по результатам сравнения последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1 И ITS2 ядерных генов 45S Р-РНК // Ботан. Журн. 2008. Т. 93. №12

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 овсюгов на ранних этапах дивергенции видов рода *Avena* // Генетика. 2005. Т. 41. N. 5. С. 646-656.

Шнеер В.С. О видоспецифичности ДНК: 50 лет спустя// Биохимия. 2007. Т.72. № 12. С. 1690 – 1699.

Grebenstein B., Roser M., Sauer W., Hemleben V. Molecular phylogenetic relationships in *Aveneae* (*Poaceae*) species and other grasses as inferred from ITS1 and ITS2 rDNA sequences // Plant Syst. Evol. 1998. Vol. 213. P. 233--250.

СИВОЛАП Ю.М,

Південний біотехнологічний центр в рослинництві УААН

Україна, 65036, Одеса, Овідіопольська дорога , 3, e-mail: genome2006@mail.ru

МІКРОЕВОЛЮЦІЯ ГЕНОМУ І СЕЛЕКЦІЯ РОСЛИН.

Селекція є могутнім фактором підвищення врожайності сільськогосподарських рослин. Рівень і ефективність селекції залежить від розвитку біологічних наук і, перш за все, генетики - науки про спадковість і її мінливість. Уявлення про мінливість і еволюцію живої природи формувалось впродовж всієї історії розвитку природознавства. Відомі роботи Емпедокла, Арістотеля, Ламарка, але засновником еволюційної теорії в біології вважається Ч. Дарвін. З часу виходу в світ чудової книги «Походження видів шляхом природного відбору» дискусії з питань еволюції набули систематичного характеру і продовжуються у наш час. Розвиток генетики дозволив поглибити розуміння процесів мінливості і доповнити еволюційні уявлення формуванням синтетичної теорії еволюції.

Мікроеволюція, сукупність еволюційних процесів, що протікають в межах окремих або суміжних популяцій виду, що приводять до зміни генетичної структури цих популяцій, виникнення відмінностей між організмами і утворення нового виду. Вважається, що мікроеволюція пов'язана з розповсюдженням на внутрішньовидовому рівні в популяції малих змін в частотах алелів серед декількох поколінь.