

© А. В. Родионов,
А. Р. Коцинян, А. А. Гнутиков,
М. А. Доброрадова, Э. М. Мачс

Учреждение Российской академии наук Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург

✿ Секвенирование и сравнительный анализ района ITS1-ген 5.8S рРНК-ITS2 ядерного генома 13 видов рода *Glyceria*, 4 видов рода *Melica* и 1 вида монотипного рода *Pleuropogon* показало, что виды рода *Glyceria* имеют три гаплотипа: 1) Гаплотипы группы А найдены только у видов подрода *Glyceria* секции *Glyceria* (*G. septentrionalis*, *G. fluitans*, *G. declinata*, *G. occidentalis*, *G. notata*, *G. borealis*, *G. leptostachya*) и у вида *Pleuropogon sabinii*; 2) Гаплотипы группы С характерны для видов подрода *Hydroglossa* секции *Hydroglossa* (*G. grandis*, *G. x amurensis*, *G. triflora*, *G. maxima*) и *G. leptolepis*, относимая к sect. *Lithuanicae*; 3) Гаплотипы группы В — для видов подрода *Hydroglossa* секций *Striatae* (*G. elata*, *G. striata*, *G. neogaea*, *G. canadensis*), *Scolochloiformes* (*G. alnasteretum*, *G. spiculosa*) и *G. lithuanica* из sect. *Lithuanicae*. Виды с гаплотипами группы В при разных моделях построения филогенетического древа располагаются в основании древа рода и группируются в кладу всегда с низкими бутстрэп-индексами. Судя по нуклеотидным последовательностям ITS и гена 5.8S рРНК, виды секций *Hydroglossa* и *Glyceria* представляют собой две независимо возникшие монофилетичные ветви в эволюции рода *Glyceria*, к последней из которых относится и *Pleuropogon sabinii*.

✿ Ключевые слова: *Poaceae*; молекулярная филогения; дивергенция геномов; межвидовые гибриды.

Поступила в редакцию 26.07.2011
Принята к публикации 20.10.2011

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ITS1-ГЕН 5.8S рРНК-ITS2 В ХОДЕ ДИВЕРГЕНЦИИ ВИДОВ РОДА МАННИК (*GLYCERIA R. BR.*)

На территории европейской части России встречаются 11–12 из 55 известных видов рода Манник (*Glyceria R. Br.*) (Цвелев, 2006). Род *Glyceria* наряду с родами *Melica*, *Pleuropogon* и *Schizachne* относится к трибе *Meliceae* (Tzvelev, 1989). В последней обработке рода *Glyceria* Н. Н. Цвелев (2006) разделяет род *Glyceria* на три подрода: 1) подрод *Hydroglossa*, включающий секции *Hydroglossa*, *Scolochloiformes*, *Lithuanicae*, *Striatae*; 2) подрод *Glyceria* с секциями *Leptorhiza*, *Glyceria*, *Hemibromus*; 3) подрод *Porroteranthe* — с единственным видом — *G. drummondii*. Из видов *Glyceria* 15 диплоиды с $2n = 20$, 12 тетраплоиды ($2n = 40$), три вида гексаплоиды ($2n = 60$), у 24 видов хромосомные числа пока не определены (Цвелев, 2006). Сравнение хлоропластной ДНК *Glyceria* показало, что род *Glyceria* распадается на 3 хорошо поддерживаемые клады, соответствующие sect. *Glyceria*, sect. *Striatae* и sect. *Hydrochloa* (последняя соответствует sect. *Hydroglossa* в обработке Н. Н. Цвелева) (Whipple et al., 2007). Сравнительное исследование района ITS1-ген 5.8S рРНК-ITS2 у видов рода *Glyceria* до сих пор не проводилось. Между тем последовательности внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1 и ITS2 генов ядерных рРНК — маркер, наиболее широко используемый в настоящее время в систематике растений и беспозвоночных животных (Nieto Feliner, Rossello, 2007; Calonje et al., 2009; Coleman, 2009). По подсчетам Альварес и Венделя (Alvarez, Wendel, 2003), сравнительное исследование района ITS1-5.8S рДНК-ITS2 проводилось в 66 % статей, касающихся вопросов ДНК-филогении растений. Несмотря на то, что биологические функции районов ITS до сих пор не вполне понятны (но они определенно играют важную роль в процессинге пре-рРНК и, возможно, некоторых иных РНК) (Calonje et al., 2009; Coleman, 2009; Koš, Tollervey, 2010), практика показывает, что филогенетические гипотезы, построенные на основании сравнения последовательностей ITS1 и ITS2, как правило, выглядят вполне правдоподобно, ведется ли сравнение на межвидовом и межродовом уровнях, или при изучении групп организмов, имеющих более высокие таксономические ранги (Nieto Feliner, Rossello, 2007; Шнеер, 2009; Coleman, 2009). Исследование ITS1 и ITS2 может позволить выяснить или ограничить круг предков объекта исследования не только по материнской линии родства, как это происходит при исследовании хлоропластных последовательностей, но, с некоторой вероятностью, и по отцовской линии. Последнее обстоятельство имеет большое значение для понимания филогении таксона, так как процессы межвидовых и межродовых гибридизаций имеют большое значение в эволюции геномов высших растений и, в частности, геномов злаков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В представленной работе секвенированы последовательности района ITS1-ген 5.8S рРНК-ITS2 14 видов рода *Glyceria* флоры России. Для того, чтобы определить их место в системе рода и в составе трибы *Meliceae* секвенированы и включены в анализ район ITS 4 видов *Melica* и вида *Pleuropogon sabinii* (представляющего монотипный род из трибы *Meliceae*) (табл. 1). Из Генбанка взяты данные о *Schizachne* — род, также относимый к *Meliceae* в узком смысле. Проведено сравнение последовательностей ITS и гена 5.8S

Таблица 1

Исследованные нами виды, источники материала и индексы депонированных нуклеотидных последовательностей ITS1-5.8S рДНК-ITS2 в GenBank

№	Номер в GenBank	Вид, номер ваучера в коллекции гербарных образцов лаборатории биосистематики и цитологии БИН РАН и отдела гербария БИН РАН (LE)	Информация о месте и дате сбора и определении образца
1	JN832686	<i>Melica altissima</i> L. Alt-111	Респ. Алтай, Онгудайский р-н, Левый берег р. Чуя. Опушка леса напротив скалы Белый Бом. 50022' 87002' 1300 м н. у. м 04.09.2004 Собр.: А. В. Родионов, Е. О. Пунина, С. А. Дьяченко. Опр.: Е. О. Пунина, Н. Н. Цвелев
2	JN832684	<i>Melica nutans</i> L. T-85	Карачаево-Черкесская Респ., Тебердинский государственный заповедник, в лесу на берегу р. Малая Хатипара. 21.08.2003. Собр.: А. В. Родионов, Е. О. Пунина, С. В. Бондаренко, Ю. М. Пунин. Опр.: Н. Н. Цвелёв, С. В. Бондаренко, Е. О. Пунина
3	JN832685	<i>Melica picta</i> C. Koch	Окрестности Пятигорска, склон горы Машук. Собрала Е. О. Пунина, 2.05.2006; Опр.: Н. Н. Цвелев
4	JN171864	<i>Melica transsilvanica</i> Schur. Alt-126	Респ. Алтай, Онгудайский р-н. Левый берег р. Чуя. Опушка леса напротив скалы Белый Бом. 50022' 87002' 1300 м н. у. м 04.09.2004. Собр.: А. В. Родионов, Е. О. Пунина, С. А. Дьяченко. Опр.: Е. О. Пунина, Н. Н. Цвелев
5	JN172096	<i>Melica transsilvanica</i> Schur. T-110	Карачаево-Черкесская Респ., Тебердинский государственный заповедник. Ущелье реки Кышкаджер. 2200 м н. у. м. 25.08.2003. Собр.: Родионов А. В., Пунина Е. О., Бондаренко С. В., Пунин Ю. М. Опр.: Цвелев Н. Н.
6	JN832691	<i>Glyceria alnasteretum</i> Kom.	Камчатка (южн.). Усть-Большерецкий район, сырые участки в пойме реки Правой Паужетки у пос. Паужетка. 19.07.63. Н. С. Пробатова
7	JN832696	<i>Glyceria x amurensis</i> Prob.	Дальний Восток, долина реки Тау, остров Талан (сев. часть Охотского моря), Васильев
8	JN832687	<i>Glyceria fluitans</i> R. Br.	Молдавия: Сирець, Страшенский район (сейчас: Sireți, raionul Strășeni, Moldova), на лугу, 31.05.1955. Собр.: Владимирова
9	JN832695	<i>Glyceria grandis</i> S. Watson	Петрозаводск. 1996. А. Кравченко. Опр. Н. Н. Цвелев
10	JN832698	<i>Glyceria leptolepis</i> Ohwi	Приморский край, Лазовский район. 1988
11	JN832690	<i>Glyceria lithuanica</i> (Gorski) Lindm.	Петуховский совхоз, Ишимский округ Уральской области. Лес в 2 км. к сев. от Волчьего озера (сейчас: Частоозерный район Курганской области), 1929, Н. И. Кузнецов
12	JN832699	<i>Glyceria maxima</i> (Hartm.) Holmb.	Липецкая обл. Добринский район. Село Лебедянка. Сырая луговина по берегу реки Пластица. 28.06.1996
13	JN832694	<i>Glyceria neogaea</i> Steud.	Гербарий лаб. биосистематики Латвийской академии наук. 1989. Алуksne, Латвия (Alūksnē, Latvia)
14	JN832688	<i>Glyceria notata</i> Chevall.	Томская обл. Томский район, окр. села Новомихайловка, заболоченный луг по опушке березового леса возле грунтовой дороги. 05.08.2004. Собр.: А. Л. Эбель
15	JN832689	<i>Glyceria plicata</i> (Fries) Fries	Ленинградская обл. (на образце: Санкт-Петербургская обл.), болотистый берег Волхова у северной окраины пос. Старая Ладога. 5.08.1997. Собрал и определил Н. Н. Цвелев
16	JN832693	<i>Glyceria spiculosa</i> (F. Schmidt) Roshev.	Кабанский район. Между озером Байкал и рекой Семичой и железной дорогой. В 5 км к западу от села Темлюй, на болоте. 22.08.1933
17	JN832692	<i>Glyceria striata</i> (Lam.) Hitchc.	Смоленская обл. Демидовский район. Берег озера Мутное у протоки к озеру Рытое. 26.06.2000
18	JN832697	<i>Glyceria triflora</i> (Korsh.) Kom. 4.1 Alt-108	Респ. Алтай, Кош-Агачский р-н, Чуйская степь, 50001' 88030', 1750 м н. у. м., в воде у моста через реку Чуй. 4.08.2006. Собр.: А. В. Родионов, Е. О. Пунина, С. А. Дьяченко. Опр.: Цвелев Н. Н.
19	JN832703	<i>Glyceria triflora</i> (Korsh.) Kom. 4.2	Красноярский край, Шушенский район, окр. дер. Козлово, долина реки Оя. Осоковые болота. 28.07.1964. А. Кушина, Э. Ефремова
20	JN832702	<i>Glyceria triflora</i> (Korsh.) Kom. 4.3	Томск. губ. Бийский уезд, в протоке реки Чарыш, у устья реки Топчуган. Кузнецов. 1913. (Сейчас — Алтайский край, Бийский район)
21	JN832701	<i>Glyceria triflora</i> (Korsh.) Kom. 4.4	Алтай, Ойротия, Чуйская степь, долина р. Юстыт, урочище Кара-Тюргун, пос. Кокоря (сейчас: Кош-Агачский р-н), в воде. 29.07.1937. А. В. Калинина
22	JN832700	<i>Pleuropogon sabinii</i> R. Br. Alt-452	Респ. Алтай, Кош-Агачский р-н, Дорога от р. Жумалы к перевалу Аккол. В русле каменистого ручья. 490. 31'715" 870. 52'685" 2718 м н. у. м. 24.08.2006. Собр.: А. В. Родионов, Е. О. Пунина, М. П. Райко, С. А. Дьяченко. Опр. Е. О. Пунина, С. А. Дьяченко

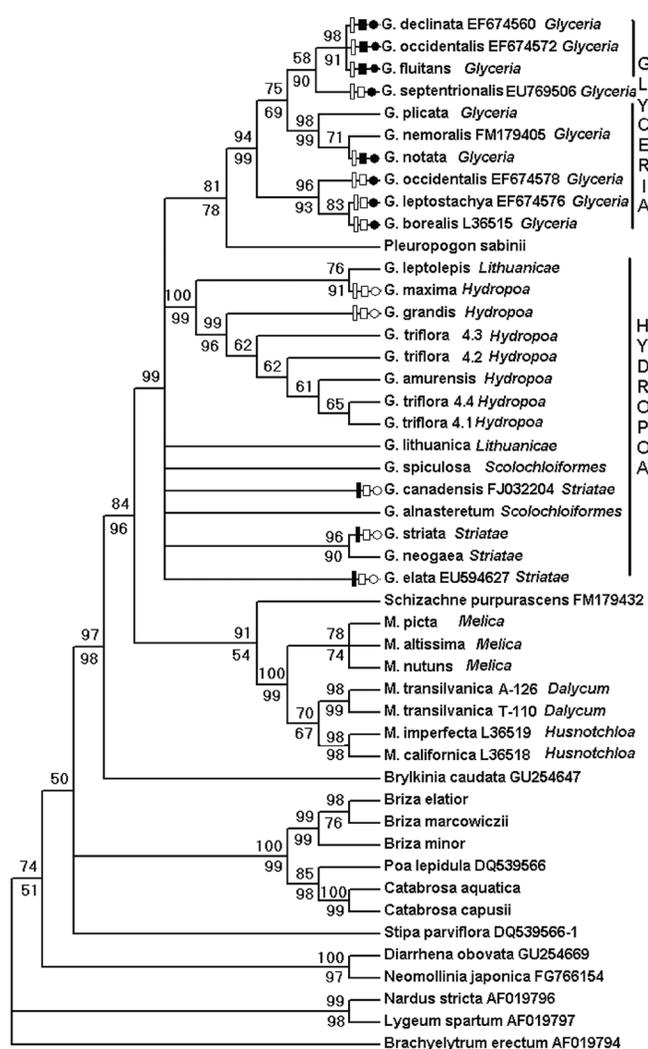


Рис. 1. Молекулярно-филогенетическое древо, построенное методом NJ.

Бутстрэп-индексы над ветвями древа — древо-построенное методом NJ, бутстрэп-индексы под ветвями древа — те же самые узлы при построении консенсусного древа методом максимальной парсимонии. Прямоугольники, квадраты и круги на ветвях древа — делеции и инсерции в хлоропластной ДНК, по данным Whipple I. G. et al. Molecular insights into the taxonomy of *Glyceria* (Poaceae: Meliceae) in North America // Am. J. Bot. 2007. Vol. 94. P. 551 — 557. Прямоугольники — виды несут 34-нуклеотидную делецию 5'-acg ccctgtcaaaacattgaaactagcacaacatc-3' в начале межгенного спейсера trnK(AAA)-rps16.; квадраты — имеют 14-нуклеотидную инсерцию в межгенном спейсере trnK(AAA)-rps16 5'-aaaaagaccsgat-3'; круги — вставка G43 в межгенном спейсере trnC (UGC)-cytochrome b6/i complex subunit VIII ucf6. Черная фигура — наличие признака, белая — отсутствие

рРНК с секвенированными нами ранее последовательностями ITS родов *Briza* и *Catabrosa* (Ким и др., 2009), а также последовательностями *Brylkinia* и *Anthochloa* —

родов, также относимых некоторыми систематиками к трибе *Meliceae* (обзор: Mejia-Saules, Bisby, 2000). Амплификацию проводили с праймерами ITS1-P (Ridgway et al., 2003) и ITS4 (White et al., 1990), как описано нами ранее (Родионов и др., 2005; 2008). Параметры циклов ПЦР-амплификации: денатурация 2 минуты 94°C; 35 циклов амплификации: 50 сек. 94°C; 50 сек. 48–58°C (в зависимости от образца температура отжига менялась); 1 мин 72°C; элонгация 3 минуты 72°C. Выравнивание матрицы данных и филогенетические построения выполняли с использованием пакета программ MEGA 4.0 (Tamura et al., 2007).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение секвенированных нами и взятых из GenBank последовательностей участка ITS1 — гена 5,8S рРНК — ITS2 рода *Glyceria* показало, что эти последовательности делятся на три группы гаплотипов: 1) Гаплотипы группы А — виды подрода *Glyceria* секции *Glyceria* (*G. septentrionalis*, *G. fluitans*, *G. declinata*, *G. occidentalis*, *G. notata*, *G. borealis*, *G. leptostachya*) + *Pleuropogon sabinii*; 2) Гаплотипы группы С — виды подрода *Hydropona* секции *Hydropona* (*G. grandis*, *G. x amurensis*, *G. triflora*, *G. maxima*) + *G. leptolepis*, относимая к sect. *Lithuanicae*; 3) Гаплотипы группы В — виды подрода *Hydropona* секций *Striatae* (*G. elata*, *G. striata*, *G. neogaea*, *G. canadensis*), *Scolochloiformes* (*G. alnasteretum*, *G. spiculosa*) и *G. lithuanicae* из sect. *Lithuanicae* (рис. 1, табл. 2). Виды с гаплотипами группы В при разных моделях построения деревьев располагаются в основании рода на филогенетическом древе и группируются в кладе всегда с низкими бутстрэп-индексами. Судя по нуклеотидным последовательностям ITS и гена 5.8S рРНК, виды секций *Hydropona* и *Glyceria*, каждую из которых отличает особый набор гаплотипов (табл. 2), представляют собой две независимо возникшие монофилетичные ветви в эволюции рода *Glyceria*. Напротив, последовательности ITS и генов 5.8S рРНК видов секций *Striatae* и *Scolochloiformes* не имеют очевидных апоморфий, они близки к предковым для рода *Glyceria*.

Последовательности ITS1 — ген 5.8S рРНК — ITS2 *Pleuropogon* близки последовательностям *Glyceria* подрода *Glyceria*. Виды рода *Melica* формируют отдельную кладу, в основании которой лежит род *Schizachne*. Наши расчеты подтверждают данные Шнайдер и соавт. (Schneider et al., 2009) о том, что из всех других родов злаков наиболее близок к *Glyceria*, *Melica*, *Pleuropogon* и *Schizachne* монотипный род *Brylkinia*, единственный вид которого *B. caudata* (Munro) Fr. Schmidt растет в Японии, Китае, на Сахалине и Курилах. Рода *Catabrosa*, *Anthochloa* и *Briza*, также относимые иногда к *Meliceae* определенно находятся с типичными *Meliceae* в более отдаленном родстве, чем *Brylkinia* (рис. 1).

Таблица 2

Внутривидовой полиморфизм района ITS1-ген 5.8S рРНК-ITS2 у видов рода *Glyceria* и *Pleuropogon sabinii*¹

Вид и гаплотип	Внутренний транскрибируемый спейсер ITS1				5.8S рРНК	Внутренний транскрибируемый спейсер ITS1					
	11111	11111111	11111112	11111111	111111	111111111	1111111111	1111111111	122		
ancestral sequence	1123344445	5556666777	7888901111	2335566	67778990	1023333	112233445	5666678889	9000133344	4667778899	901
Pleuropogon sabinii A	1941902590	14934670136	8346761237	9781167	83455094	47220256	3592356471	5567922380	7046014637	8031687808	987
ancestral sequence	gscacactg	ccccctctcga	ccg-cctctg	cgctag	gcgtgccc	ccccccc	ctccc-tcgc	ccacatcggt	cccgcgctag	gcctcatagg	tc
<i>G. septentrionalis</i> A1A a.t.... t..	ata...t..a	..ta... ..t.t.t.	t.att.t..	tt..a...t	t..a...a	c..
<i>G. fluitans</i> A1A	.gttat..a	at..tc..t..	..a...t-c	aa.cg.	..a.t.tg	-
<i>G. declinata</i> A1A	.gttat..a	at..tc..t..	..t...t-c	aa.c..	..aat.tg	..a.t..	t..a.....	t.gtg....	..y..a...t	...cgg-	a. ct.
<i>G. occidentalis</i> A1A	.gttat..a	at..tc..t..	..t...t-c	aa.c..	..aat.tg	-
<i>G. nemoralis</i> A1B	.g..a...a	at..tc..t..gt..c	a.a.c..	..a.t.tg	..a.t..	t..a.c...	ttgtga...	..t..a...t	..a.tg..a	ct.
<i>G. notata</i> A1B	.g..a...a	at..tc..t..gt..c	a.a.c..	..a.t.tg	..a.t..	t..m.c...	ttgtga.r...	..t..a...t	..a.yg..a	ct.
<i>G. plicata</i> A1B	.g..a...a	at..tc..t..gt..c	a.a.c..	..a.t.tg	..a.t..	t..a.c...	tygtga...	..y..a...t	..a.yg..a	ct.
<i>G. leptostachya</i> A2	agt.a...a	a.t.tct.t..t-c	..a...	..a.t.tg	-
<i>G. occidentalis</i> A2	agt.a...a	a.t.tct.t..t-c	..a...	..a.t.tg	-
<i>G. borealis</i> A2	agt.a...a	a.t.tct.t..t-c	..a...	..a.t.tg	t.a.tt..	t..a...t..	t.gtg..a..	t..a.a...t	...ctga..a	c..
<i>G. elata</i> Bt...g	t-
<i>G. lithuanica</i> Bt.tc.gg.c.	t..y..t..a.a.c	tt.y.c..	t...-..a	c
<i>G. alnosteretum</i> Bc..	t..y..tc...a.t...	t..a.c.c.	at...-..	...
<i>G. spiculosa</i> Byt..y..m	yt...m..	t-y...ta..y?t..t.yc..	y...-..	...
<i>G. canadensis</i> Bt...t...t...	t..
<i>G. striata</i> Bt...t...t...	t-.....c...a....c	t...t.c..	t...-..	...
<i>G. neogaea</i> Bt...t...t...	t-.....c..ta....c	t...t.c..	t...-..	...
<i>G. triflora</i> 4.1 C1tg.a	t.t...tett.	a.ttt.g...	a.a.gt	t-...-..	t..t..tt	aa.t...aat...g.	t.a.tat.	a.c.-..t	..t
<i>G. triflora</i> 4.2 C1tg.a	t.t...tett.	a.ttt.g...	a.a.gt	t-...-..	t..t..tt	aa.t...aat...g.	t.a.tat.	a.c.-..t	..t
<i>G. triflora</i> 4.3 C1tg.a	t.t...tett.	a.ttt.g...	a.a.gt	t-...-..	t..t..tt	aa.t...aat...g.	t.a.tat.	a.c.-..t	..t
<i>G. triflora</i> 4.4 C1tg.a	t.t...tett.	a.ttt.g...	a.a.gt	t-...-..	t..t..tt	aa.t...aat...g.	t.a.tat.	a.c.-..t	..t
<i>G. grandis</i> C1tg.a	t.t...tett.	a.ttt.g...	a.a.gt	t-...-..	t..t..tt	aa.t...aat...g.	t.a.tat.	a.c.-..t	..t
<i>G. amurensis</i> C1tg.a	t.t...tett.	a.ttt.g...	a.a.gt	t-...-..	t..t..tt	aa.t...aat...g.	t.a.tat.	a.c.-..t	..t
<i>G. maxima</i> C2tg.a	t.c...tett.	a.ttc.g...	a.a.gt	t-...-..	t..t..tt	aa.tg..at...a-	t..a.at.	aa.c.-..t	..t
<i>G. leptolepis</i> C2tg.a	t.c...tett.	a.ttc.g...	a.a.gt	t-...-..	t..t..tt	aa.tg..at...a..	t...t.at.	ag.c.-..t	..t

¹ Нумерация нуклеотидов отдельно для ITS1, гена 5.8S рРНК (подчеркнут) и ITS2

Монофилетичность секции *Glyceria* подтверждается сравнением наших данных с результатами Уипли и соавт. (Whipple et al., 2007), изучавших полиморфизм хлоропластных геномов *Glyceria* (рис. 1). Из изученных последовательностей только виды секции *Glyceria* имеют вставку G43 в межгенном спейсере trnC (UGC)-cytochrome b6/f complex subunit VIII *ycf6* (Whipple et al., 2007). С другой стороны, только виды секции *Striatae* имеют большую 34-нуклеотидную делецию 5'-acgccc tgcataaacattgaactagcacaacatc-3' в начале межгенного спейсера trnK (AAA)-rps16. Следовательно, будущее исследование этого района у представителей секций *Scolochloiformes* и *Lithuanicae* может дать ответ на вопрос о монофилетичности базальной группы видов рода *Glyceria*, имеющих архаичный гаплотип района ITS типа В (табл. 2, рис. 1).

Внутрисекционный полиморфизм гаплотипов района ITS1-ген 5.8S рРНК-ITS2 позволяет уверенно разделить секцию *Glyceria* на две сестринские группы, к одной из которых относятся *G. septentrionalis*, *G. fluitans*, *G. declinata* и образцы *G. occidentalis*, представленные последовательностями EF674572, EF674570 и EF674571, к другой *G. leptostachya*, *G. borealis* и образцы *G. occidentalis*, представленные последовательностями EF674578, EF674583, EF674581, EF674582, EF674580, EF674579, секвенированными Уипли и соавт. (Whipple et al., 2007). Все виды первой из этих групп, кроме *G. septentrionalis*, и только они имеют 14-нуклеотидную инсерцию в межгенном спейсере trnK(AAA)-rps16 5'-aaaaagaccgat-3' (рис. 1). Единственное исключение — тетраплоидный вид (2n = 40) вид *G. septentrionalis*. Все проанализированные хлоропласт-

ные последовательности участков trnK-rps16 и trnC-ycf6 *G. septentrionalis* относятся к группе последовательностей секции *Glyceria* подгруппы *leptostachya-borealis*. Но по участку ITS1-ген 5.8S рРНК-ITS2 все последовательности *G. septentrionalis* попадают в подгруппу *declinata-fluitans*. Мы предполагаем, что *G. septentrionalis* — аллотетраплоид, вид гибридного происхождения, по материнской линии происходящий от вида, чьи хлоропластные последовательности относились к подгруппе родства *declinata-fluitans*. У *G. septentrionalis*, по-видимому, произошла гомогенизация кластера рДНК в сторону «отцовского» генотипа.

Полученные молекулярно-филогенетические данные, в общем, хорошо согласуются с представлениями агроэкологов о секционном делении рода *Glyceria* (Цвелев, 2006). Исключение — секция *Lithuanicae*, два вида которой *G. leptolepis* и *G. lithuanica* по результатам анализа района ITS1-гена 5,8S рРНК-ITS2 оказались в разных кладах — *G. leptolepis* имеет гаплотип А, характерный для *Hydropoa*, а *G. lithuanica* — «примитивный» гаплотип В, типичный для *Striatae* и *Scolochloiformes*. Отметим, что оба эти вида — диплоиды (обзор: Цвелев, 2006), поэтому аллополиплоидной природой одного из этих или обоих видов объяснить расхождение нельзя. Впрочем, Н. Н. Цвелев (2006) отмечает, что и морфологически виды секции *Lithuanicae* похожи как на виды секции *Hydropoa*, так и на виды секции *Striatae*. При этом Чарч (Church, 1949) относил *G. lithuanica* к секции *Striatae*, а В. Л. Комаров (1934) поместил *G. ussuriensis* (синоним *G. leptolepis*) в одну группу родства (названную им ряд *Spectabiles*) с *G. aquatica* (синоним *G. maxima*) и *G. triflora*, что полностью согласуется с нашими данными (табл. 2, рис. 1).

Таблица 3

Нуклеотидные апоморфии трибы *Meliceae* для участка ITS1-ген 5.8S рРНК-ITS2 (номера нуклеотидных позиций отличны от таковых в таблице 2)

Название вида и № в Genbank	3	4	8	9	9	9	9	1	1	2	2	2	7	0	7	0	1	1			
Brachyelytrum_erectum_AF019794	0	2	4	9	0	1	3	5	0	2	1	3	4	2	2	7	4	5	6	8	
Nardus_stricta_FM179420	a	g	c	s	a	a	c	c	-	a	t	c	g	g	t	g	a	-	t	t	
Lygeum_spartum_FM179417	.	.	.	t	-	g	.	c	t	c	a	.	
Catabrosella_araratica_FJ196300	.	.	.	t	-	a	g	a	.	c	a	.	
Ccatabrosa_aquatica_EU792334	.	.	.	-	.	.	.	-	g	g	c	t	c	a	.	a	
Ccatabrosa_werdermannii_EU792333	.	.	.	-	.	.	.	-	g	g	c	t	c	a	.	a	
Anthochloa_lepidula_DQ539566	.	a	t	t	.	.	.	-	g	g	c	t	c	a	.	a	
Briza_marcowicsii_FJ008711	.	.	.	g	.	.	.	-	g	g	c	t	c	a	.	a	
Diarrhena_obovata_GU254669	.	.	.	t	c	.	.	-	c	g	c	a	c	g	c	.	
Brylkinia_caudata_FM179442	t	.	.	-	c	.	-	g	t	a	g	t	a	a	t	.	c	a	.	.	
Brylkinia_caudata_GU254647	t	.	.	-	c	.	-	g	t	a	g	t	a	a	t	.	t	a	.	.	
Schizachne_purpurascens_FM179432	t	a	a	-	c	a	a	t	t	a	g	t	a	a	a	a	a	a	a	a	c
Pleuropogon_sabinii_	t	a	a	-	c	a	t	c	t	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	c
M. transsilvanica_	t	a	a	-	c	a	g	c	t	a	g	t	a	a	a	a	a	a	a	a	c
M. nutans_	t	a	a	-	c	a	a	c	t	a	g	t	a	a	a	a	a	a	a	a	c
M. picta_	t	a	a	-	c	a	a	c	t	a	g	t	a	a	a	a	a	a	a	a	c
M. altissima_	t	a	a	-	c	a	a	c	t	a	g	c	.	a	a	a	a	a	a	a	c
M. imperfecta_	t	a	a	-	c	a	g	c	t	a	g	t	a	a	a	a	a	a	a	a	c
M. californica_	t	a	a	-	c	a	g	c	t	a	g	c	a	a	a	a	a	a	a	a	c
G. septentrionalis_EU769506	t	t	a	-	c	a	a	c	t	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	
G. fluitans_	t	t	a	-	c	a	a	c	t	a	g	t	a	a	a	a	a	a	a	a	c
G. declinata_EF674560	t	t	a	-	c	a	a	c	t	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	
G. occidentalis_AF674572	t	t	a	-	c	a	a	c	t	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	
G. nemoralis_FM179405	t	t	a	-	c	a	a	g	t	a	g	t	a	a	a	a	a	a	a	a	c
G. notata_	t	t	a	-	c	a	a	g	t	a	g	t	a	a	a	a	a	a	a	a	c
G. plicata_	t	t	a	-	c	a	a	g	t	a	g	t	a	a	a	a	a	a	a	a	c
G. notata_EF674585	t	t	a	-	c	a	a	g	t	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	
G. leptostachya_EF674576	t	t	a	-	c	a	a	c	t	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	
G. occidentalis_EF674582	t	t	a	-	c	a	a	c	t	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	
G. borealis_I36515	t	t	a	-	c	a	a	c	t	a	g	t	a	a	a	a	a	a	a	a	c
G. leptostachya_EF674577	t	t	a	-	c	a	a	c	t	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	
G. elata_EU594637	t	a	t	-	c	a	a	c	t	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	
G. striata_I36516	t	a	a	-	c	a	a	c	t	a	g	t	a	a	a	a	a	a	a	a	c
G. lithuanica_	t	a	a	-	c	a	a	c	t	a	g	t	a	a	a	a	a	a	a	a	c
G. alnasteretum_	t	a	a	-	c	a	a	c	t	a	g	t	a	a	a	a	a	a	a	a	c
G. striata_	t	a	a	-	c	a	a	c	t	a	g	t	a	a	a	a	a	a	a	a	c
G. spiculosa_	t	a	a	-	c	a	a	c	t	a	g	t	a	a	a	a	a	a	a	a	c
G. neogaea_	t	a	a	-	c	a	a	c	t	a	g	t	a	a	a	a	a	a	a	a	c
G. canadensis_FJ032204	t	a	a	-	c	a	a	c	t	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	
G. grandis_	t	a	a	-	c	a	a	c	t	a	g	t	a	a	a	a	a	a	a	a	c
G. amurensis_	t	a	a	-	c	a	a	c	t	a	g	t	a	a	a	a	a	a	a	a	c
G. triflora_	t	a	a	-	c	a	a	c	t	a	g	t	a	a	a	a	a	a	a	a	c
G. leptolepis_	t	a	a	-	c	a	a	c	t	a	g	t	a	a	a	a	a	a	a	a	c
G. maxima_	t	a	a	-	c	a	a	c	t	a	g	t	a	a	a	a	a	a	a	a	c

Мехиа-Саулес и Бисби (Mejia-Saules, Bisby, 2000), используя фенетический и кладистический методы анализа морфологических и анатомических данных, исследовали 12 родов (*Anthochloa*, *Briza*, *Brylkinia*, *Catabrosa*, *Glyceria*, *Lycchloa*, *Melica*, *Neostapfia*, *Pleuropogon*, *Shizachne*, *Streblochaete* и *Triniochloa*) на предмет их возможного включения в состав трибы

Meliceae. Результаты фенетического анализа показали, что триба *Meliceae* при широком ее понимании состоит из двух кластеров. Кластер I включал в себя роды *Anthochloa*, *Catabrosa*, *Glyceria* и *Pleuropogon*. Кластер II — роды *Lycchloa*, *Shizachne*, *Streblochaete*, *Triniochloa* и *Melica*. Нам представлялось интересным, используя последовательности участка

ITS1-ген 5,8S рРНК-ITS2, секвенированные у *Anthochloa*, *Catabrosa*, *Glyceria* и *Pleuropogon*, *Shizachne*, *Melica* и не попавшей в этот список *Brylkinia*, ответить на поставленный авторами вопрос о правомерности объединения указанных родов в одну трибу. Нами на всём протяжении исследуемого участка ITS1-ген 5,8S рРНК-ITS2 были выявлены 20 нуклеотидных апоморфий трибы *Meliceae* (табл. 3).

Из таблицы 3 видно, что последовательности *Brylkinia caudata* из 20 нуклеотидных апоморфий трибы *Meliceae* имеет 12. Среди остальных рассмотренных последовательностей совпадений с апоморфиями трибы *Meliceae* практически нет. Таким образом, в трибу *Meliceae* определено входят рода *Glyceria*, *Melica*, *Pleuropogon*, *Schizachne* и не входят *Catabrosa* и *Anthochloa*. При более расширенном понимании границ трибы *Meliceae*, она может быть объединена с монотипной трибой *Brylkinieae* Tateoka.

Благодарности: Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 09-04--01469). Авторы благодарны Н. Н. Цвелеву за неоценимые консультации и внимание к работе, А. И. Шмакову, А. фон Боку, З. С. Соловецкому, Е. О. Пуниной, А. П. Шалимову за помощь в сборе образцов для исследования.

Литература

1. Ким Е. С., Большева Н. Л., Саматадзе Т. Е. и др., 2009. Уникальный геном двуххромосомных злаков *Zingeria* и *Colpodium*, его происхождение и эволюция // Генетика. Т. 45. С. 1506–1515.
2. Комаров В. Л., 1934. Род 176. Манник — *Glyceria* R. Вг. // Флора СССР. Т. 2 / Ред. В. Л. Комаров, Ленинград: Издательство Академии наук СССР. С. 449–460.
3. Родионов А. В., Ким Е. С., Носов Н. Н. и др., 2008. Молекулярно-филогенетическое исследование видов рода *Colpodium sensu lato* (Poaceae, Poaceae) // Экологическая генетика. Т. 6. № 4. С. 34–46.
4. Родионов А. В., Тюпа Н. Б., Ким Е. С. и др., 2005. 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. Т. 41. С. 646–656.
5. Цвелев Н. Н., 2006. Краткий обзор рода манник *Glyceria* (Poaceae) // Бот. журн. Т. 91. С. 255–276.
6. Шнеер В. С., 2009. ДНК штрихкодирование — новое направление в сравнительной геномике растений // Генетика. Т. 54. С. 1436–1448.
7. Alvarez A. E., Wendel J. F., 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference // Molec. Phylogenet. Evol. Vol. 29. P. 417–434.
8. Calonje M., Martin-Bravo S., Dobeš C. et al., 2009. Non-coding nuclear DNA markers in phylogenetic reconstruction // Plant Syst. Evol. Vol. 282. P. 257–280.
9. Charch G. L., 1949. A cytotaxonomic study of *Glyceria* and *Puccinellia* // Am. J. Bot. Vol. 36. P. 155–165.
10. Coleman A. W., 2009. Is there a molecular key to the level of “biological species” in eukaryotes? A DNA guide // Molec. Phylogenet. Evol. Vol. 50. P. 197–203.
11. Gillespie L. J., Archambault A., Soreng R. J., 2007. Phylogeny of Poa (Poaceae) based on trnT-trnP sequence data: major clades and basal relationships // Monocots: comparative biology and evolution-Poales. / Eds. J. T. Columbus, E. A. Friar, J. M. Porter et al. Claremont, Calif.: Rancho Santa Ana Botanic Garden. P. 420–434.
12. Koš M., Tollervey D., 2010. Yeast pre-rRNA processing and modification occur cotranscriptionally // Mol. Cell. Vol. 37. P. 809–820.
13. Mejia-Saules T., Bisby F., 2000. A preliminary views on the tribe *Meliceae* (Gramineae: Pooideae) // Grasses: systematics and evolution / Eds. S. W. L. Jacobs, J. Everett. Collingwood, VIC, Australia: CSIRO Publishing. P. 83–88.
14. Nieto Feliner G., Rosello J. A., 2007. Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants // Molec. Phylogenet. Evol. Vol. 44. P. 911–919.
15. Ridgway K. P., Duck J. M., Young J. P. W., 2003. Identification of roots from grass swards using PCR RFLP and FFLP of the plastid trnL (UAA) intron // BMC Ecol. Vol. 3. P. 8.
16. Schneider J., Doring E., Hilu K. W., Roser M. 2009. Phylogenetic structure of the grass subfamily Pooideae based on comparison of plastid matK gene-3' trnK exon and nuclear ITS sequences // Taxon. Vol. 58. P. 405–424.
17. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 // Mol. Biol. Evol. Vol. 24. P. 1596–1599.
18. Tzvelev N. N., 1989. The system of Grasses (Poaceae) and their evolution // Botanical Review. Vol. 55. P. 141–203.
19. Whipple I. G., Barkworth M. E., Bushman B. S., 2007. Molecular insights into the taxonomy of *Glyceria* (Poaceae: Meliceae) in North America // Am. J. Bot. Vol. 94. P. 551–557.
20. White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications / Eds M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White. San Diego: Academic Press Inc. P. 315–322.

THE ITS1-5.8S RRNA GENE-ITS2 SEQUENCE VARIABILITY
DURING THE DIVERGENCE OF SWEET-GRASS SPECIES
(GENUS *GLYCERIA* R. BR.)

Rodionov A. V., Cotsinian A. R., Gnutikov A. A., Dobroradova M. A.,
Machs E. M.

✿ **SUMMARY:** Comparative analysis of the sequence ITS1-5.8S rRNA gene-ITS2 of the nuclear genome of 13 species of genus *Glyceria*, 4 species of *Melica* and a species of monotypic genus *Pleuropogon* showed that the species of the genus *Glyceria* have 3 haplotypes: 1) Haplotype A was found only in species of the subgenus *Glyceria* section *Glyceria* (*G. septentrionalis*, *G. fluitans*, *G. declinata*, *G. occidentalis*, *G. notata*, *G. borealis*, *G. leptostachya*) and in *Pleuropogon sabinii*; 2) Haplotype C is characteristic of the subgenus *Hydropoa*,

section *Hydropoa* (*G. grandis*, *G. x amurensis*, *G. triflora*, *G. maxima*) and sect. *Lithuanicae* (*G. leptolepis*); 3) Haplotype B is found in the species of the subgenus *Hydropoa* sections *Striatae* (*G. elata*, *G. striata*, *G. neogaea*, *G. canadensis*), *Scolochloiformes* (*G. alnasteretum*, *G. spiculosa*) and *G. lithuanica* of sect. *Lithuanicae*. Species carrying haplotype B are located at the base of the phylogenetic tree of the genus *Glyceria* and/or clustered with low bootstrap indices. On the phylogenetic trees inferred by the analysis of the sequences ITS and 5.8S rDNA both sect. *Glyceria* and sect. *Hydropoa* represented two sister monophyly branches. The species *Pleuropogon sabinii* belong to the branch of subgenus *Glyceria* as a sister monotypic branch to the branch of the sect. *Glyceria*.

✿ **KEY WORDS:** *Poaceae*; molecular phylogeny; molecular evolution; hybrids; genome evolution.

✿ Информация об авторах

Родионов Александр Викентьевич — д. б. н., профессор, зав. лабораторией биосистематики и цитологии Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН. 197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 2. E-mail: avrodionov@mail.ru.

Кочинян Армен Размикевич — аспирант лабораторией биосистематики и цитологии Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН. E-mail: avrodionov@mail.ru.

Гнутиков Александр Александрович — аспирант лабораторией биосистематики и цитологии Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН. E-mail: alexandr2911@yandex.ru.

Добrorадова Марина Александровна — студентка каф. цитологии и гистологии СПбГУ. Биолого-почвенный факультет. Санкт-Петербургский государственный университет. 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9. E-mail: avrodionov@mail.ru.

Мачс Эдуард Модрисович — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаб. биосистематики и цитологии Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН. E-mail: edmachs@gmail.com.

Rodionov Alexandr Vikentevich — doctor of biological science, professor, head of the department. Komarov Botanical Institute RAS. Professora Popova st., 2., St.Petersburg, 197376, Russia. E-mail: avrodionov@mail.ru.

Cotsinian Armen Razmikovich — aspirant. Komarov Botanical institute RAS. Professora Popova st., 2., St.Petersburg, 197376, Russia. E-mail: avrodionov@mail.ru.

Gnutikov Alexandr Alexandrovich — aspirant. Komarov Botanical institute RAS. Professora Popova st., 2., St.Petersburg, 197376, Russia. E-mail: avrodionov@mail.ru.

Dobroradova Marina Alexandrovna — junior research fellow. Department of cytology and gistology. Faculty of biological and soil sciences. St. Petersburg State University. 7-9, Universitetskaya nab., St.Petersburg, 199034, Russia. E-mail: avrodionov@mail.ru.

Machs Eduard Modrisovich — candidate of biological science, senior researcher. Komarov Botanical Institute RAS. Professora Popova st., 2., St.Petersburg, 197376, Russia. E-mail: avrodionov@mail.ru.