

Аннотация

В настоящей работе проведена сборка геномов клеточных органелл, пластид и митохондрий, исходя из данных высокопроизводительного секвенирования ДНК, у 26 образцов гороха (род *Pisum*) в результате чего анализируемая выборка была расширена до 64 образцов. Проведен филогенетический анализ реконструированных нуклеотидных последовательностей, построены филогенетические деревья полных пластидных геномов и полных митохондриальных геномов. Филогенетическое дерево, построенное на основе пластидных геномов, значительно отличалось от дерева, построенного на основе митохондриальных геномов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в ходе эволюции гороха клеточные органеллы наследовались дискордантно. У одного образца, происходящего из Турции, был обнаружен митохондриальный геном, несущий вставку около 13 тыс. нуклеотидов, характерную для отдаленных представителей рода, что свидетельствует о рекомбинации между митохондриальными геномами. Кроме того, сборка нуклеотидной последовательности ранее неидентифицированного ядерного гена у 20 образцов из публичных баз данных позволила идентифицировать последовательность из референсного генома гороха как ген альбумина семян, являющийся удобным маркером для филогенетических исследований.

1. Тема работы:

Анализ филогенетических отношений в роде Горох (*Pisum* L.).

2. Состав коллектива:

Костерин Олег Энгельсович, д.б.н., зав. лабораторией, Институт Цитологии и генетики СО РАН, доцент кафедры цитологии и генетики ФЕН НГУ;

Богданова Вера Сергеевна, д.б.н., с.н.с., Институт Цитологии и генетики СО РАН;

Соловьев Владимир Игоревич, ст. преподаватель НГУ

3. Информация о гранте:

Гос. задание 0259-2021-0012 (2021)

FWNR-2022-0017 (2022)

4. Научное содержание работы.

4.1. Постановка задачи.

Целью настоящего исследования является реконструкция филогенетических отношений в роде Горох (*Pisum* L.) на основе нуклеотидных последовательностей геномов клеточных органелл, хлоропластов и митохондрий, а также последовательностей ядерной ДНК и оценка роли отдаленной гибридизации и репродуктивных барьеров вследствие конфликта ядра и цитоплазмы в эволюции культурных и диких форм гороха.

4.2. Современное состояние проблемы

Реконструкция филогении рода Горох с использованием различных молекулярных подходов предпринималась неоднократно (Hoey et al., 1996, Theor. Appl. Genet. 92: 92-100; Lu et al., 1996, Theor. Appl. Genet. 93: 1103-1111; Tar'an et al., 2005, Genome 48: 257-272; Ellis et al., 1998, Mol. General Genet. 260: 9-19; Vershinin et al., 2003, Mol. Biol. Evol. 20, 2067-2075; Jing et al., 2007, Genetics 177, 2263-2275; 2010, BMC Evol. Biol. 10, 44; Zaytseva et al., 2012, Gene 504, 192-202; 2015, Gene 556, 235-244). При этом использовались в основном последовательности ядерной ДНК, тогда как реконструкции на основании первичной структуры органелльных геномов не проводилось. Тем более не

предпринималось попыток сравнения филогенетических реконструкций, основанных на последовательностях, происходящих из разных клеточных геномов. В этом отношении данное исследование является в достаточной степени уникальным и новаторским.

Несовместимость ядра и цитоплазмы является одной из причин репродуктивных барьеров, препятствующих вовлечению в селекцию обширного потенциала генетической изменчивости диких представителей и родственников культурных видов растений. Частичная или полная репродуктивная несовместимость за счет конфликта ядра и цитоплазмы известна у некоторых видов растений, таких как пшеница (Aksyonova et al., 2005, *Genome* 48:761-769), горох (Богданова, Костерин, 2006. Докл. Акад.Наук 406: 256-259), энотера (Stubbe, 1989. *Plant Mol. Biol. Rep.* 7: 245-257; Greiner et al. 2011, *Mol Ecol* 20: 671-691). Чаще всего со стороны цитоплазмы в конфликт оказываются вовлечены митохондрии (Aksyonova et al., 2005, *Genome* 48:761-769; Chase, 2007, *Trends Genet* 23:81-90), но в некоторых случаях также пластиды (Greiner et al., 2011, *Mol Ecol* 20: 671-691; Bogdanova, 2020, *Plants* 9, 23). Наличие внутриклеточного конфликта может приводить к изменению обычного способа наследования органелл, например, к двуродительскому или преимущественно отцовскому наследованию (Chiu, Sears, 1993, *Genetics* 133, 989-997; Богданова, Костерин, 2006; Bogdanova, 2007, *Theor Appl Genet* 114, 333–339). Как следствие, различные клеточные геномы могут иметь различную филогенетическую историю. Кроме того, присутствие в одной клетке органелл, происходящих от разных родителей, может служить основой для рекомбинации ДНК органелл, а также конфликт ядра и цитоплазмы может приводить к различной скорости эволюции локусов, участвующих в развитии конфликта (Osada, Akashi, 2012. *Mol. Biol. Evol.*, 29, 337-346; Rockenbach et al., 2016. *Genetics* 204: 1507-1522.).

4.3. Подробное описание работы, включая используемые алгоритмы.

В настоящей работе была проведена сборка пластидных и митохондриальных геномов 26 образцов гороха на основе сырых данных высокопроизводительного секвенирования с использованием программы MIRA4 (Chevreux et al., 1999. *Computer Science and Biology: Proceedings of GCB*, 99: 45-56), с обязательной визуальной верификацией. Сборка была осложнена тем, что митохондриальные геномы растений имеют в своем составе протяженные (до нескольких тысяч п.о.) повторенные участки, по которым идет рекомбинация, поэтому они существуют в клетке в виде набора рекомбинантных изоформ. В ходе сборки выбирался один из возможных вариантов взаимного расположения уникальных участков в реконструируемом кольцевом геноме, с учетом того, чтобы выравнивание геномов различных образцов в целях филогенетического анализа потребовало минимальное количество перестановок. Кроме того, на основании данных из публичных баз данных была проведена сборка ядерного гена, кодирующего альбумин семян. Выравнивание полученных геномов для филогенетического анализа клеточных органелл проводилось с использованием программы ClustalW (Larkin, 2007. *Bioinformatics* 23, 2947-2948) в составе пакета MEGA 6 (Tamura et al., 2013. *Mol Biol and Evolution*, 30: 2725-20729). Филогенетический анализ полученных геномов был осуществлен методом МСМС в рамках Байесового подхода с использованием программы BEAST 1.8.4 (Drummond, Rambaut, 2007, *BMC Evol. Biol.* 7, 1). С помощью программы jModelTest 2.1.10 (Darriba et al., 2012, *Nature Methods* 9, 772; Guindon, Gascuel, 2003, *Systematic Biology*. 52, 696-704) в качестве наиболее подходящей выбрана модель замен GTR+I+G; в качестве модели молекулярной эволюции выбрана модель uncorrelated lognormal relaxed clock и модель Юла для видообразования. Анализ МСМС проводился в течение 200 миллионов поколений.

4.4. Полученные результаты.

Просеквенированы и собраны пластидный и митохондриальный геномы 26 образцов рода Горох (*Pisum* L.), относящихся к видам *P. fulvum*, *P. abyssinicum* и *P. sativum*, представленному подвидами *P. sativum* subsp. *elatius* (дикорастущие формы) и *P. sativum* subsp. *sativum* (культурные формы). Вместе с ранее просеквенированными образцами анализируемая выборка составила 64 образца. Были получены филогенетические деревья, реконструированные на основе пластидных геномов (Рис. 1) и митохондриальных геномов (Рис. 2) исследованных образцов гороха.

Митохондрии и пластиды – клеточные органеллы, имеющие свой, не очень большой геном размером в сотни тысяч нуклеотидов. Митогеномы растений весьма склонны к рекомбинации внутри молекулы митохондриальной ДНК, благодаря наличию большого числа повторенных последовательностей (J.M.Gualberto et al., 2014. The plant mitochondrial genome: dynamics and maintenance, *Biochimie*, **100**: 107-120). Молекулы митохондриальной ДНК, происходящей от разных организмов, вполне могли бы рекомбинировать, если бы оказались в одной клетке, однако, этому препятствует одностороннее материнское наследование митохондрий, исключения из этого правила редки. В ходе экспериментов по скрещиванию диких и культурных подвидов гороха (*Pisum sativum*) мы наблюдали редкие случаи двуродительского наследования митохондрий, что подразумевает возможность сосуществования сильно дивергированных молекул митохондриальной ДНК в одной клетке.. Секвенирование митохондриальных геномов дикого гороха (*P. sativum* subsp. *elatius*) на платформе Illumina выявило четыре основных филогенетических ветви M1-M4, из которых ветвь M1 ранее всех других отошла от общего филогенетического древа и сильно дивергировала от остальных ветвей (Рис. 2). У одного из 64 изученных образцов, W6 2107, происходящего из Турции, была обнаружена "гибридная" митохондриальная ДНК, принадлежащая ветви M2 и при этом несущая вставку около 13 Кб ДНК, которая специфична для древней ветви M1. Данное наблюдение свидетельствует о рекомбинационном событии между отдаленными митохондриальными геномами.

4.5. Иллюстрации, визуализация результатов.



Рис. 1. Реконструкция филогении изученных образцов гороха методом ближайших соседей на основе пластидных геномов. *Vavilovia formosa* представляет внешнюю группу. Основные ветви дерева обозначены P1-P5. Шкала соответствует ожидаемому числу нуклеотидных замен на один сайт.

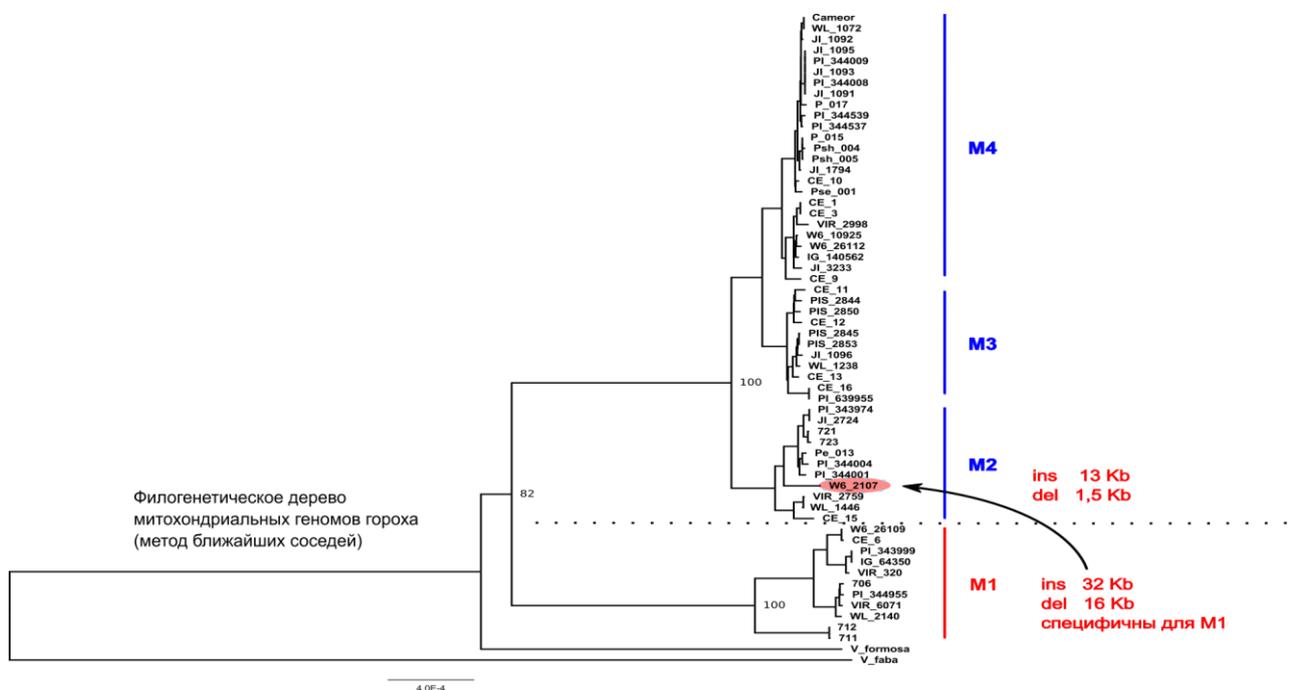


Рис. 2. Реконструкция филогении изученных образцов гороха методом ближайших соседей на основе митохондриальных геномов. *Vavilovia formosa* и *Vicia faba* представляют внешнюю группу. Основные ветви дерева обозначены M1-M4. Шкала соответствует ожидаемому числу нуклеотидных замен на один сайт. На красном фоне дан образец с "гибридным" митохондриальным геномом. ins означает вставку, del - делецию, красным шрифтом обозначены вставки и делеции, специфичные для эволюционной группы M1.

5. Эффект от использования кластера в достижении целей работы.

Сборка геномов органелл подразумевает попарное сравнение нуклеотидных последовательностей, входящих в массив данных, полученных путем высокопроизводительного секвенирования. Один массив включает 1 – 5 миллионов таких последовательностей в одном эксперименте, вследствие чего сборка геномов возможна лишь с использованием высокопроизводительного вычислительного оборудования. Построение филогенетических деревьев наиболее надежным Байесовым методом подразумевает сотни миллионов испытаний, в нашем случае 200 миллионов, что также делает необходимым использование высокопроизводительных компьютеров.

6. Перечень публикаций, содержащих результаты работы

1. **Bogdanova VS**, Shatskaya NV, Mglinets AV, Kosterin OE, Vasiliev GV. Discordant evolution of organellar genomes in peas (*Pisum L.*) *Mol Phylogenet Evol.* 2021 Jul;160:107136. doi: 10.1016/j.ympev.2021.107136 (Импакт-фактор 4.286)
2. Mglinets AV, **Bogdanova VS**, Kosterin OE. Identification of the gene coding for seed cotyledon albumin SCA in the pea (*Pisum L.*) genome. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2022;26(4):359-364; DOI 10.18699/VJGB-22-43 (РИНЦ - 1,020; Web of Science - 0,15)