

УДК 582.952.6(235.222)

Распространение эндемичного вида *Veronica* × *czemalensis* на Алтае по результатам анализа NGS (Next Generation Sequencing)

The distribution of endemic species *Veronica* × *czemalensis* Altai according to the analysis of NGS (Next Generation Sequencing)

Косачёв П. А.¹, Пфанцельт С.², Майланд-Квельхорст А.², Альбах Д.²

Kosachev P.¹, Pfanzelt S.², Mayland-Quellhorst E.², Albach D.²

¹ Алтайский государственный университет, пр-т Ленина, 61, Барнаул, 656049, Россия. E-mail: pakosachev@yandex.ru

¹Altai State University, Lenina 61, Barnaul, 656049, Russia

²Институт биологии и природопользования, Ольденбург, 26111, Германия

²Carl von Ossietzky-University Oldenburg, Carl von Ossietzky-Str. 9-11, Oldenburg, 26111, Germany

Реферат. В сообщении уточняется распространение эндемичного вида *Veronica* × *czemalensis* на территории Алтайской горной страны. Исследование популяций этого вида с помощью NGS анализа показало, что популяция этого вида из Республики Алтай относится к родительскому виду *V. incana*. Кроме того, важными диагностическими признаками, по которым отличаются *V.* × *czemalensis* и *V. incana*, являются форма соцветия, средних стеблевых листьев, а также соотношение длины тычинок и венчика.

Summary. The report detailed the distribution of endemic species *Veronica* × *czemalensis* on the territory of the Altai mountain country. Study of populations of this species using NGS analysis showed that the population of this species from the Republic of Altai belong to parent species *V. incana*. Important diagnostic features that distinguish *V.* × *czemalensis* and *V. incana* are a form of inflorescence, the middle stem leaves and the ratio of the length of the stamens and the corolla.

В последнее десятилетие вновь большое внимание уделяется исследованию представителей подрода *Pseudolysimachium* рода *Veronica*. И это не случайно, т.к. в подроде *Pseudolysimachium* выявлены значительный полиморфизм, широкое развитие явлений гибридизации и полиплоидии, что обуславливает систематическую сложность данной группы и делает ее интересным объектом таксономических исследований.

При сравнительно-морфологическом и эколого-географическом изучении подрода *Pseudolysimachium* во флоре Алтайской горной страны (АГС, в понимании Р. В. Камелина и А. И. Шмакова (Флора Алтая, 2005) было выявлено его значительное таксономическое разнообразие (Косачев, 2003; Косачев, Герман, 2004; Косачев, 2010; Косачев и др., 2013). В результате было выяснено, что большую роль при формировании видов в подроде играют гибридизационные процессы.

V. × *czemalensis* Kosachev et Albach (Косачев и др., 2013) описана нами как гибридогенный вид, возникший в результате скрещивания *V. incana* и *V. porphyriana*. От *V. incana* отличается формой и размером венчика, наличием железок по краю прицветников и долей чашечки, почти до основания рассеченной чашечкой, широко продолговато-ланцетными верхними листьями. От *V. porphyriana* отличается характером опушения всех частей растения из длинных извилистых спутанных простых волосков, округло-яйцевидными долями венчика.

В ходе совместной российско-немецкой экспедиции летом 2016 г. по территории Республики Алтай нами было обнаружено значительное число популяций, как мы предположили, этого вида.

В сентябре – декабре 2015 г. было предпринято молекулярно-генетическое исследование (SRAP анализ) семи видов вероник из подрода *Pseudolysimachium*, в том числе и все сборы *V.* × *czemalensis*, включая и растения из классического местообитания (Республика Тыва). В 2016 г. нам удалось про-

вести NGS (Next Generation Sequencing) для *V. × czemalensis* и родительских видов (*V. incana* и *V. porphyriana*).

Новые технологии секвенирования позволили усовершенствовать открытый более 30 лет назад и основанный на электрофорезе метод Сэнгера, недостатками которого являются низкая пропускная способность и относительно высокая стоимость (Sanger et al., 1977). RAD-секвенирование (Restriction site Associated DNA-Marker Sequencing). Этот метод был опубликован в 2008 г. в PLoS One (Baird et al., 2008). С тех пор известно около десятка исследований, в которых с помощью RADSeq метода были проанализированы геномы (Ree & Hipp, 2015). Технологии NGS позволяют секвенировать одновременно тысячи молекул ДНК, тем самым повышая скорость исследования и увеличивая объем получаемых данных, при этом снижая себестоимость анализа. Принцип NGS основан на массовом параллельном секвенировании специальным образом подготовленных одонитевых библиотек фрагментированной ДНК исследуемых образцов. Подготовка библиотек включает в себя фрагментирование ДНК до 300–500 нуклеотидных пар, лигирование (присоединение) секвенсовых адаптеров (синтезированные олигонуклеотиды с известной последовательностью) с концами фрагментов и амплификацию полученных библиотек. Метод амплификации может отличаться для различных платформ. Технология фирмы Illumina основана на амплификации фрагментов методом мостиковой ПЦР и формировании кластеров на проточной ячейке (Berglund et al., 2011; Quail et al., 2012). Секвенирование производится путем синтеза новых фрагментов ДНК на одноцепочечных ДНК-библиотеках, которые выполняют роль матрицы. Нуклеотиды встраиваются в новую цепь в определенном порядке, соответствующем матричной цепи, который записывается в цифровом виде. После включения в цепь каждого последующего нуклеотида прибор регистрирует сигнал. Разные платформы для NGS используют различные механизмы детекции встроенных в новую цепь нуклеотидов: детекцию флуоресцентного сигнала после включения в цепь комплементарного матрице нуклеотида (Illumina, SOLiD Applied Biosystems), изменение pH раствора в микрореакторе, связанное с выделением в среду ионов водорода в ходе синтеза ДНК ферментом (Ion torrent Thermo Fisher Scientific), или регистрацию светового сигнала после выделения пирофосфата, активирующего каскад химических реакций (Roche) (Quail et al., 2012). После секвенирования полученные данные были обработаны с помощью методов биоинфор-

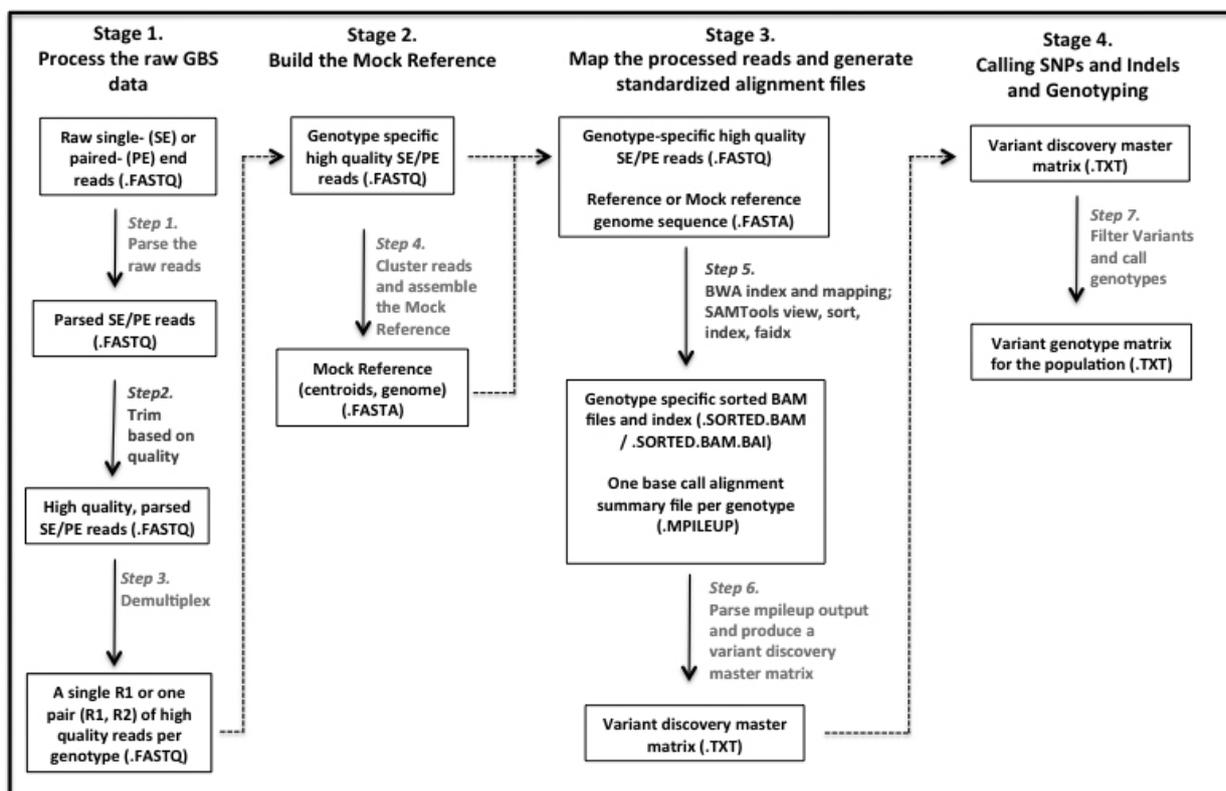


Рис. 1. Схема обработки данных GBS-SNP-CROP.

матики. Данные проходят несколько этапов обработки: исключение ридов с низким качеством прочтения, выравнивание данных относительно референсной последовательности или сборку последовательности *de novo* и анализ результатов секвенирования, позволяющий определять тип генетических вариантов, включая их наследственный характер, оценить уровень экспрессии генов, идентифицировать новые гены и регуляторные элементы.

С помощью этого анализа мы хотели проверить, подтвердить или опровергнуть гибридогенный характер *V. × czemalensis*, а также некоторых других видов (*V. × schmakovii*, *V. × grisea*).

Для анализа от каждой пробы было взято по 20 мкл, которые были добавлены на плату в каждую лунку.

Секвенирование „100 & 150 bp paired-end read Illumina HiSeq 2000 & NextSeq 500 V2“ было проведено в лаборатории *LGC Genomics GmbH* в Берлине.

Процесс предварительной обработки данных секвенирования для статистического анализа подробно описан на соответствующей странице в Интернете (<https://github.com/halelab/GBS-SNP-CROP/wiki>).

Обработанные данные были проанализированы с помощью пакета программ для статистической обработки данных R (<http://adegenet.r-forge.r-project.org/>).

Ниже представлена схема рабочего процесса (рис. 1), при этом даны входы и выходы (окна), указанные для каждого шага (стрелки). Шаги (1, 3, 4, и 7) выполнены с помощью пользовательских скриптов Perl, в то время как шаги 2 и 5 выполняются с обычными инструментами биоинформатики.

После обработки данных в GBS-SNP-CROP были получены данные SNP. Методом главных компонент был получен следующий результат (рис. 2).

Все пробы *V. × czemalensis* из Республики Алтай оказались в одной группе с *V. incana* (группа *V. incana*) (рис. 3). И только пробы из Республики Тыва являются промежуточными, что подтверждает их гибридогенный характер (группа *V. × czemalensis*).

После дополнительного просмотра морфологических признаков было выяснено, что растения из популяций Республики Тыва и Алтай отличаются между собой формой соцветия и листовой пластинки средних стеблевых листьев (тувинская популяция – *V. × czemalensis*: соцветия широкие, немного

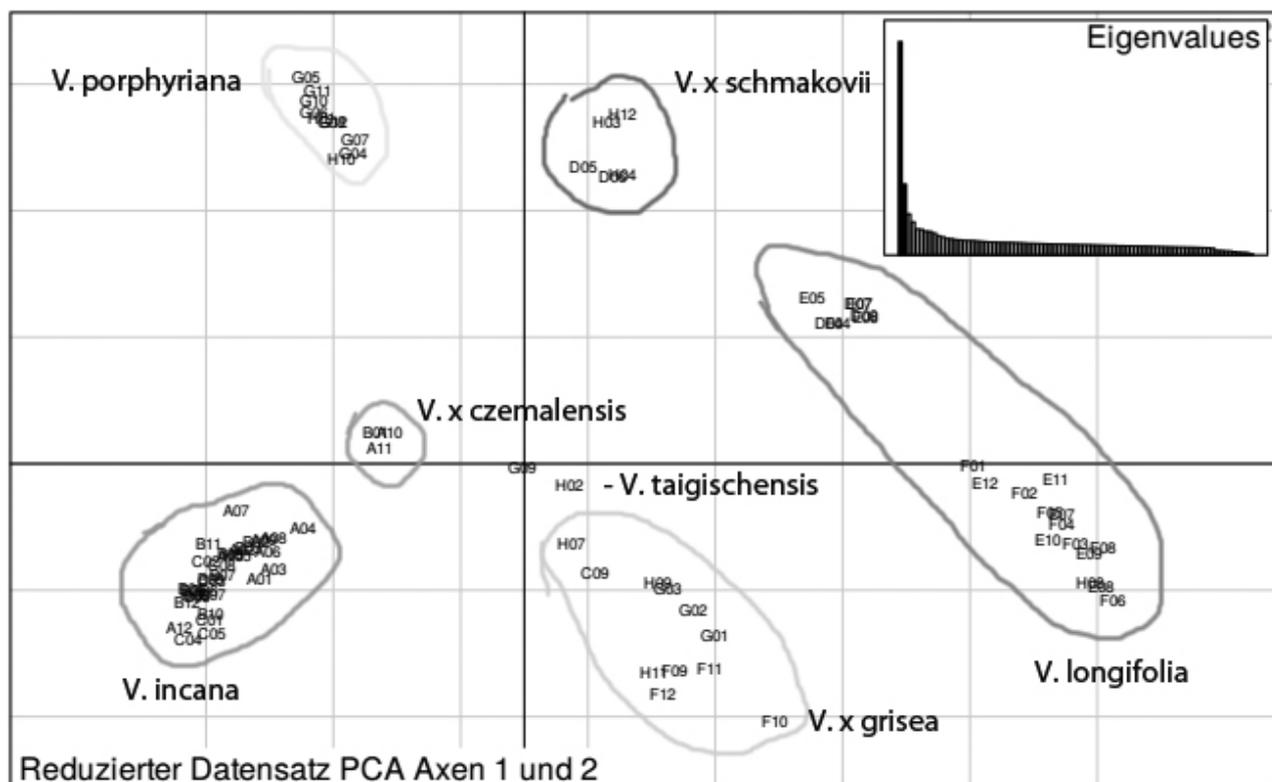


Рис. 2. Результат анализа методом главных компонент (PCA, оси 1 и 2).

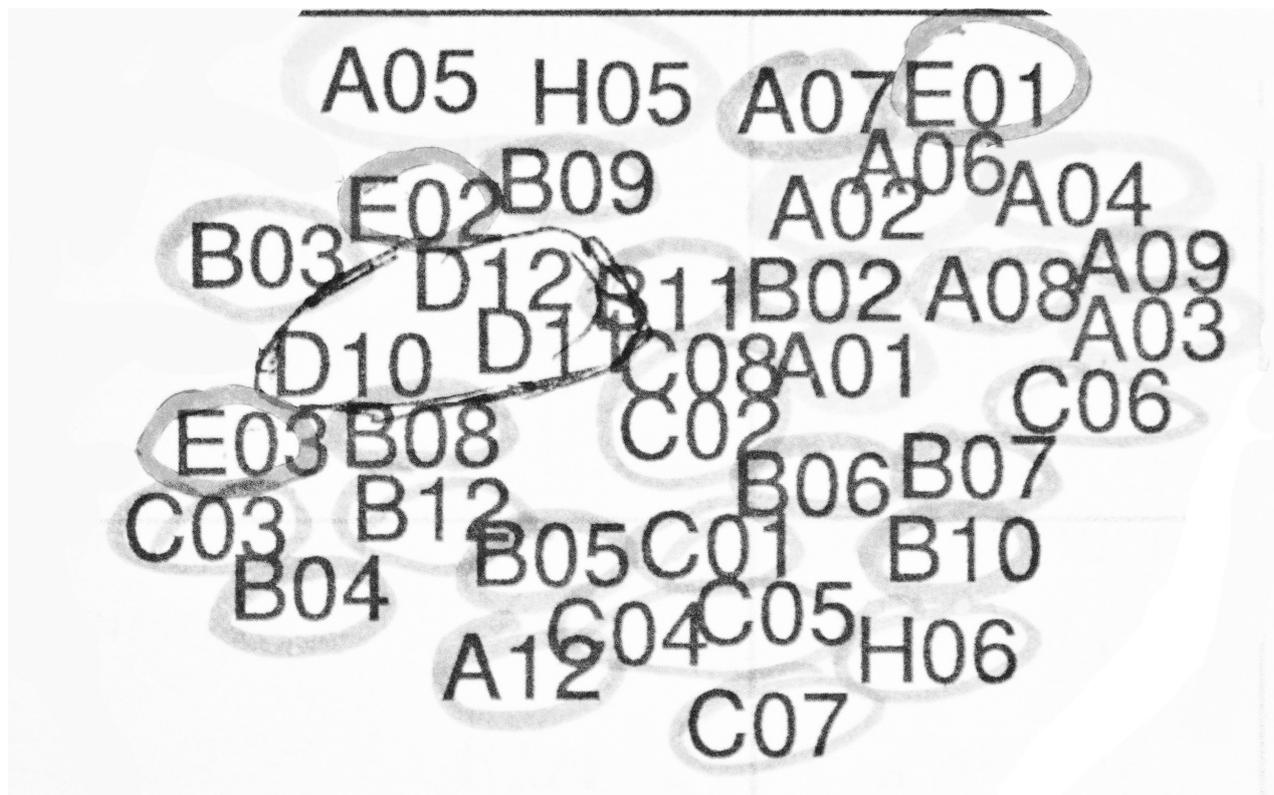


Рис. 3. *Veronica incana* и *V. × czemalensis* объединены в одну группу (PCA, оси 2 и 2). Расшифровка проб будет приведена в последующих работах, посвященных молекулярно-генетическому исследованию представителей подрода *Pseudolysimachium*.

сужающиеся к верхушке и здесь тупые; листья средних стеблевых листьев широко продолговато-ланцетные, притупленные, на явных черешках, тычинки равны по длине долям венчика). Растения популяции из Республики Алтай имеют сильно суживающиеся к верхушке соцветия, средние стеблевые листья на очень коротких черешках, продолговато-линейные, заостренные, тычинки превышают венчик.

Таким образом, выяснено, что все популяции *V. × czemalensis* из Республики Алтай относятся к *V. incana*, и только растения из классического местонахождения из Республики Тыва являются *V. × czemalensis*. К дополнительным систематическим признакам необходимо отнести форму соцветия и средних стеблевых листьев, соотношение длины тычинок и венчика.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта ДААД и Министерства образования и науки РФ № 6.754.2016/ДААД.

ЛИТЕРАТУРА

- Косачев П. А. Конспект сем. Scrophulariaceae Juss. и Pediculariaceae Juss. Алтайской горной страны // Turczaninowia, 2010. – Т. 13, вып. 1. – С. 19–102.
- Косачев П. А. Обзор секции *Pseudolysimachium* W.D.J. Koch рода *Veronica* L. (Scrophulariaceae) во флоре Алтайской горной страны // Turczaninowia, 2003. – Т. 6, вып. 1. – С. 11–33.
- Косачев П. А., Альбах Д., Шауло Д. Н., Шмаков А. И. Новые виды из подрода *Pseudolysimachium* рода *Veronica* (Plantaginaceae Juss.) // Turczaninowia, 2013. – Т. 16, вып. 3. – С. 8–14.
- Косачев П. А., Герман Д. А. Новый вид рода *Veronica* L. (Scrophulariaceae) из Западной Монголии // Новости систематики высших растений, 2004. – Вып. 36. – С. 209–212.
- Флора Алтая. Том 1 / Коллектив авторов. Отв. ред. и ред. тома Р. В. Камелин. – Барнаул: АзБука, 2005. – 340 с.
- Baird N. A., Etter P. D., Atwood T. S., Currey M. C., Shiver A. L., Lewis Z. A., Johnson E. A. Rapid SNP Discovery and Genetic Mapping Using Sequenced RAD Markers // Plos One, 3(10). DOI: ARTN e337610.1371/journal.pone.0003376

Berglund E. C., Kiialainen A., Syvänen A. C. Next-generation sequencing technologies and applications for human genetic history and forensics // *Investig. Genet.*, 2011. – Vol. 2. – P. 23.

Quail M. A., Smith M., Coupland P. et al. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers // *BMC Genomics*. 2012. – V. 13. – P. 341.

Ree R. H., & Hipp A. L. Inferring phylogenetic history from restriction site associated DNA (RADseq) // Chapter 6 *Next-Generation Sequencing in Plant Systematics*, 2015. – P. 1–24: International Association for Plant Taxonomy (IAPT).

Sanger F., Nicklen S., Coulson A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1977. – Vol. 74. – № 12. – P. 5463–5467.