

Аннотация

В настоящей работе проведена сборка геномов клеточных органелл, пластид и митохондрий, у 38 образцов гороха (род *Pisum*) и эндемичного бобового растения *Vavilovia formosa*, исходя из данных высокопроизводительного секвенирования ДНК. Проведен филогенетический анализ реконструированных нуклеотидных последовательностей, построены филогенетические деревья полных пластидных геномов, полных митохондриальных геномов и одного ядерного гена. Сравнительный анализ показал, что филогенетическое дерево, построенное на основе пластидных геномов в целом соответствует дереву, построенному на основе последовательностей ядерного гена, но значительно отличается от дерева, построенного на основе последовательностей митохондриальных геномов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в ходе эволюции гороха клеточные органеллы наследовались дискордантно, по-видимому, за счет неканонического двуродительского наследования пластид, происходящего вследствие ядерно-цитоплазматического конфликта.

1. Тема работы:

Филогенетический анализ геномов клеточных органелл 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;

Мглинец Анатолий Васильевич, к.б.н., с.н.с., Институт Цитологии и генетики СО РАН;

Соловьев Владимир Игоревич, ст. преподаватель НГУ, м.н.с., Институт Цитологии и генетики СО РАН;

3. Информация о гранте:

Грант РФФИ № 19-04-00162\19 А

"Роль гибридизации и сопряженного с ней конфликта ядра и цитоплазмы в формировании паттернов эволюции геномов клеточных органелл в роде горох (*Pisum* L.)", руководитель - Костерин Олег Энгельсович (2019-2020).

4. Научное содержание работы.

4.1. Постановка задачи.

Целью настоящего исследования является реконструкция и сравнительный анализ филогении геномов пластид и митохондрий в роде Горох (*Pisum* L.), выявление случаев дискордантной эволюции геномов клеточных органелл между собой и с последовательностями ядерной ДНК и оценка роли отдаленной гибридизации и репродуктивных барьеров вследствие конфликта ядра и цитоплазмы в эволюции геномов этих органелл.

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 (Akseyonova 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 (Akseyonova 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). У гороха сочетание генетического анализа, и секвенирования пластидных геномов (Bogdanova et al., 2015, PLoS ONE 10(3): e0119835), позволило связать ядерно-цитоплазматическую несовместимость с несовместимостью субъединиц пластидной гетеромерной формы ацетил-коА-карбоксилазы, кодируемых в ядерном и пластидном геномах. Наличие внутриклеточного конфликта может приводить к изменению обычного способа наследования органелл, например, к двуродительскому или преимущественно отцовскому наследованию пластид (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, 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 38 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. 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 эндемичного бобового растения *Vavilovia formosa*, а также 38 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). Были получены филогенетические деревья, реконструированные на основе пластидных геномов (Рис. 1) и митохондриальных геномов (Рис. 2) исследованных образцов гороха.

Сравнение филогенетических деревьев, представленных на рисунках 1 и 2 выявило следующие различия:

(1) На дереве пластидных геномов (Рис. 1) первая дивергенция проходит между ветвью, включающей *P. fulvum* и ветвью, включающей *P. sativum*, а также *P. abyssinicum*. Самая первая дивергенция митохондриальных геномов (Рис. 2) не отделяет вид *P. fulvum* (представлен образцами PI344955, 706 и WL2140), а включает *P. fulvum* и некоторых представителей *P. sativum* из выделенной нами ранее (Kosterin et al., 2010, Genet Resour Crop Evol 57, 733-739) эволюционной линии АС (причем образцы *P. fulvum* находятся в глубине этой ветки), тогда как вторая ветвь включает остальных представителей *P. sativum*, диких и культивируемых, а также два образца *P. abyssinicum*.

(2) Митохондриальный геном необычного образца Pe 013, совмещающего в себе признаки *P. fulvum* (амфикарпия) и *P. sativum*, (крупный пурпурный цветок), пластидный геном которого кластеризуется с *P. fulvum*, (Рис. 1) находится внутри ветви, включающей *P. sativum* и *P. abyssinicum*, а не ветви, включающей *P. sativum* и *P. fulvum*.

(3) Вторая главная ветвь (*P. sativum*+*P. abyssinicum*) на митохондриальном дереве (Рис. 2) разделяется на два отчетливых кластера, различающихся присутствием либо отсутствием в гене *cox1* сайта узнавания для эндонуклеазы рестрикции *PsiI*, что разделяет носителей ранее выделенных нами комбинаций аллелей трех молекулярных маркеров В и С от носителей комбинации А.

(4) В то же время ранее выделенная нами на основании анализа ядерного гена *His5* и полных пластидных геномов «эволюционная линия В» потеряла монофилию, так что носители комбинаций В и С оказались перемешаны в кластере В+С без видимой закономерности..

(5) Два представителя культурного подвида *P. sativum* subsp. *sativum* (WL1238 и WL1072) попали в разные ветви в пределах вышеупомянутого кластера. Также в разные ветви попали два образца дикого гороха с полуострова Афон (JI1091 и JI1096).

Наиболее важные различия можно резюмировать так в реконструкции на основе митохондриальных геномов *P. fulvum* не является первой ветвью дивергенции рода, а также потеря монофилии культурного подвида *P. sativum* subsp. *sativum*.

Полученные результаты можно интерпретировать следующим образом. Фенотип растения есть в основном проявление ядерных генов. Хотя мы секвенировали только один из нескольких десятков их тысяч, кодирующий минорный субтип гистона H1 и с очевидностью не вовлеченный в генетическую программу морфогенеза, основанное на его последовательности филогенетическое дерево (Рис. 3) хорошо согласуется с нашими ожиданиями на основании морфологии и, следовательно, таксономии растений (Bogdanova et al., 2018, Mol Phyl Evol 129, 280-290). В то же время митохондриальное дерево отличается от него несколькими с виду случайными перестановками. Это означает, что в ходе эволюции рода имело место несколько событий гибридизации, которые породили некоторые новые сочетания геномов ядра и органелл. В этой связи важно отметить два обстоятельства:

- (i) пластидные и митохондриальные геномы были унаследованы гибридами дискордантно, что было бы невозможно при строгом материнском наследовании органелл, и,
- (ii) пластиды выглядят унаследованными скорее конкордантно с просеквенированным ядерным геном, равно как и с неизвестными нам генами, определяющими внешность растений, на которой основана их таксономия.

Эти особенности объяснимы ввиду феномена, ранее открытого в нашем коллективе и оказавшегося широко распространенным в отдаленных скрещиваниях – различной силы конфликта нескольких ядерных и одного пластидного генов, кодирующих субъединицы мультиферментного комплекса – гетеромерной пластидной ацетил-коА-карбоксилазы. (Bogdanova et al., 2009. Theor. Appl. Genet 118: 801-809; 2012. Theor. Appl. Genet. 124: 1503-1512; 2014, Theor. Appl. Genet. 127: 1163-1172; 2015. Plos ONE 10(3): e0119835). Этот конфликт проявляется в определенной степени мужской и женской стерильности, а в тяжелых случаях – в мозаичном хлорозе и недоразвитии листочков, прилистников и корней. Немаловажно, что конфликт может быть преодолен за счет случайного отцовского наследования пластид, также впервые обнаруженного в нашем коллективе (Богданова, Костерин, 2006), так что мозаичное присутствие отцовских пластид в некоторых секторах растения восстанавливает их нормальный фенотип. С эволюционной точки зрения это означает, что потомками случайных спонтанных гибридов может быть унаследована не всякая комбинация пластид с некоторыми ядерными генами, то есть наследование пластид в какой-то мере контролируется ядром. С другой стороны, у гороха до сих пор не найдено ни конфликта между ядром и митохондриями, ни отцовского наследования митохондрий. Таким образом, какие именно митохондрии имеет спонтанный гибрид и его потомки, зависит только от направления скрещивания. В некотором смысле именно митохондриальное филогенетическое дерево визуализует для нас историю отдаленных спонтанных скрещиваний в ходе эволюции рода *Pisum*.

Наши результаты подчеркивают, как важен может быть ядерно-цитоплазматический конфликт для микроэволюции растений и показывают как они могут влиять на паттерн эволюции различных клеточных геномов.

4.5. Иллюстрации, визуализация результатов.

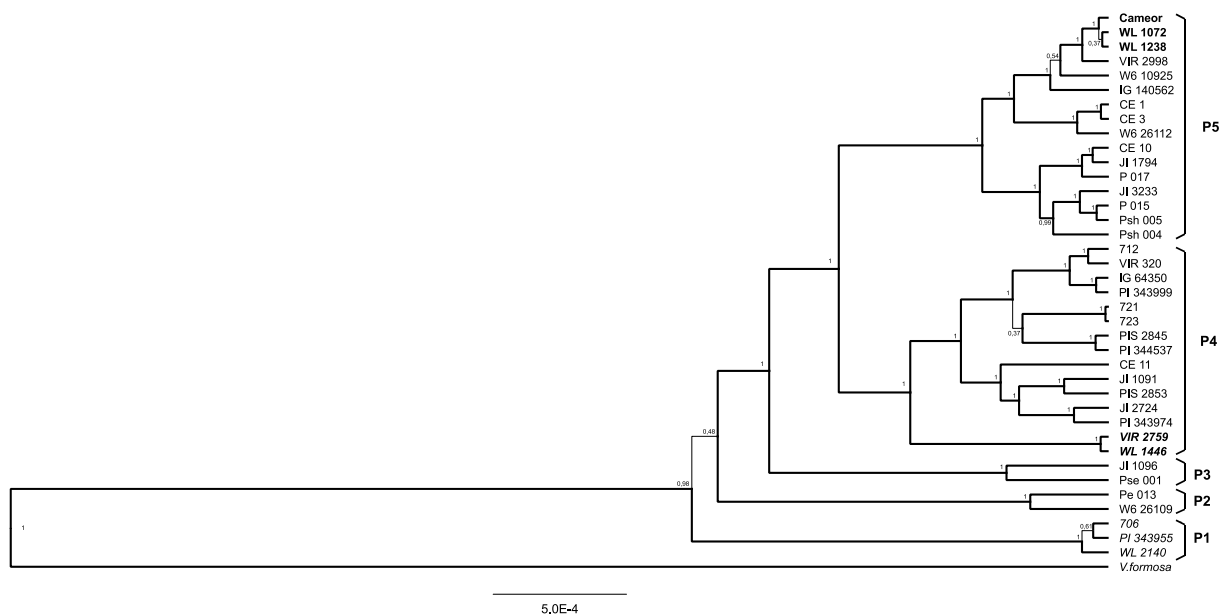


Рис. 1. Байесовская реконструкция филогении изученных образцов гороха на основе пластидных геномов. *Vavilovia formosa* представляет внешнюю группу. Основные ветви дерева обозначены P1-P5. Ветви, соответствующие узлам, поддержанным постериорной вероятностью больше, чем 0,5, показаны жирными линиями. Шкала соответствует ожидаемому числу нуклеотидных замен на один сайт. Условное обозначение видов и подвидов гороха: *Pisum fulvum* курсив, *P. abyssinicum* жирный курсив, дикий подвид *P. sativum* subsp. *elatius* обычный шрифт, культурный подвид *P. sativum* subsp. *sativum* жирный шрифт.

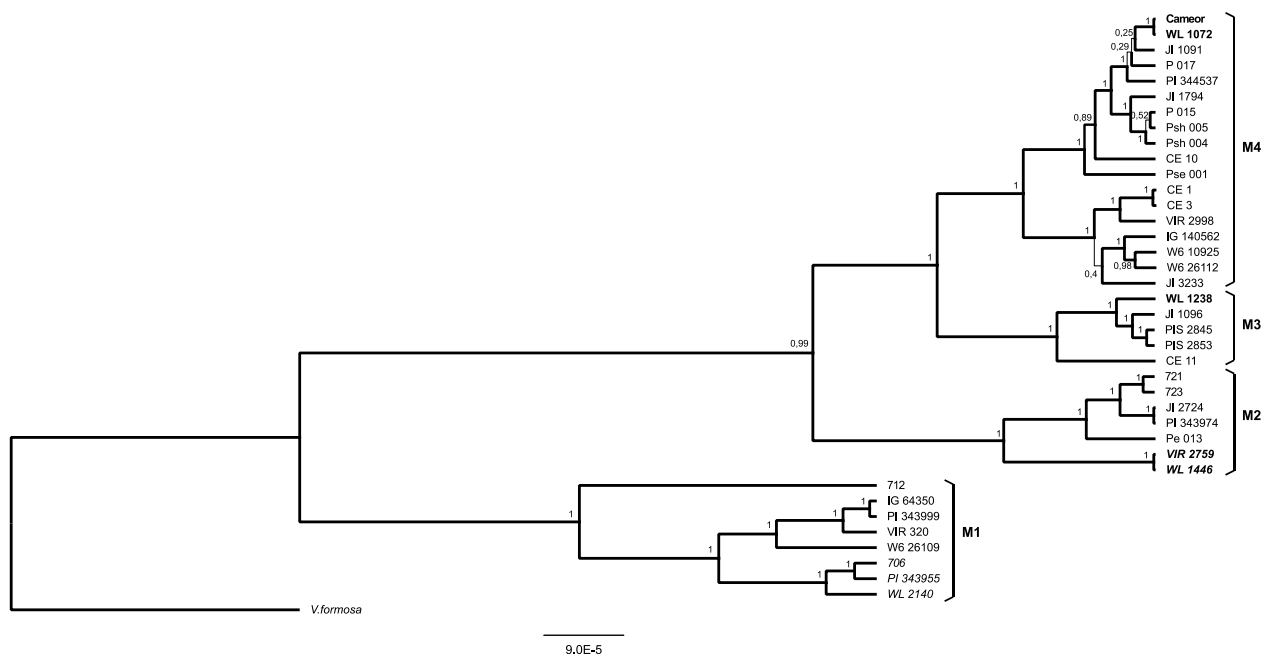


Рис. 2. Байесовская реконструкция филогении изученных образцов гороха на основе митохондриальных геномов. *Vavilovia formosa* представляет внешнюю группу. Основные ветви дерева обозначены M1-M4. Условные обозначения как на Рис. 1.

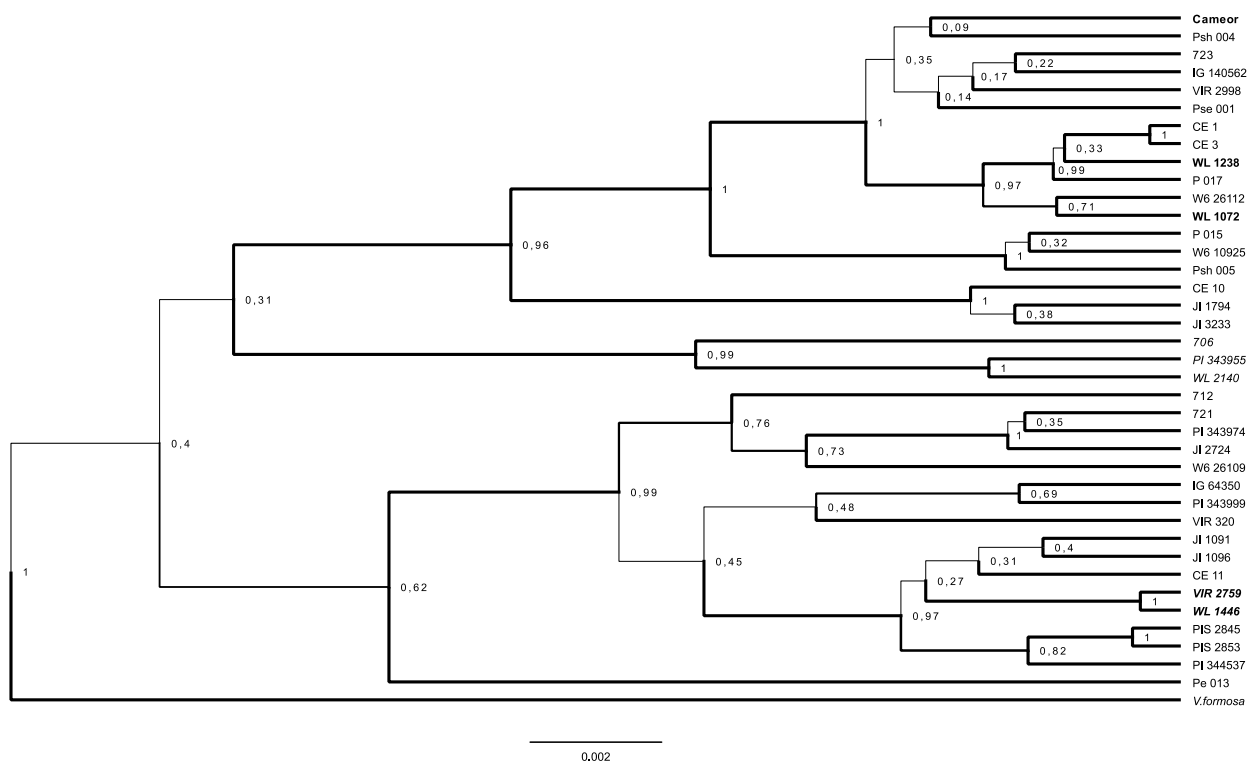


Рис. 3. Байесовская реконструкция филогении изученных образцов гороха на основе нуклеотидной последовательности ядерного гена *His5*. *Vavilovia formosa* представляет внешнюю группу. Условные обозначения как на Рис. 1.

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

Bogdanova, V.S., Mglinets, A.V., Shatskaya, N.V., Kosterin, O.E., **Solovyev, V.I.**, Vasiliev, G.V. 2018. Cryptic divergences in the genus *Pisum* L. (peas), as revealed by phylogenetic analysis of plastid genomes. *Mol. Phyl. Evol.* 129, 280-290. (Импакт-фактор 3,29) <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.09.002>

Shatskaya, N.V., **Bogdanova, V.S.**, Kosterin, O.E., Vasiliev, G.V., Kimeklis, A.K., Andronov, E.E., Provorov, N.A. 2019. The plastid and mitochondrial genomes of *Vavilovia formosa* (Stev.) Fed. and the phylogeny of related legume genera. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding* 23 (8), 972-980. (РИНЦ 0,858; Scopus 0,5) <https://doi.org/10.18699/VJ19.574>.