



УДК 582.542.1+575.133

Секвенирование и аннотирование хлоропластного генома *Amblyopyrum muticum* (Poaceae)

А. Р. Кулуев^{1,2*}, Р. Т. Матниязов^{1,3}, Б. Р. Кулуев^{1,4}, А. В. Чемерис^{1,5}

¹ Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, пр. Октября, д. 71, лит. 1Е, г. Уфа, 450054, Россия

² E-mail: kuluev.azat91@yandex.ru; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-8563-1244>

³ E-mail: rmat@mail.ru; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-7879-2795>

⁴ E-mail: kuluev@bk.ru; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-1564-164X>

⁵ E-mail: chemeris@anrb.ru; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-8917-0449>

* Автор для переписки

Ключевые слова: геном T, род *Aegilops*, секция *Sitopsis*, *Aegilops mutica*, *Aegilops umbellulata*.

Аннотация. Секвенирован полный хлоропластный геном двух образцов *Amblyopyrum muticum* (= *Aegilops mutica*) к-3979 и к-3981, размер которых составил 136911 и 136907 п. н. соответственно. Выравнивание и анализ нуклеотидных последовательностей хлоропластных геномов различных представителей трибы *Triticeae* (пшеницевых) показали сходство пластомов *A. muticum* и *Aegilops umbellulata* из секции *Aegilops*, достигающее 99,74 %. Построенное на основе выравнивания полных хлоропластных геномов филогенетическое древо показало, что *A. muticum* филогенетически стоит особняком от видов секции *Sitopsis*, но не от всех представителей рода *Aegilops*.

Sequencing and annotation of the chloroplast genome of *Amblyopyrum muticum* (Poaceae)

A. R. Kuluev, R. T. Matniyazov, B. R. Kuluev, A. V. Chemeris

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Centre, RAS, Oktyabrya Pr., 71, lit. 1E, Ufa, 450054, Russian Federation

Keywords: *Aegilops mutica*, *Aegilops umbellulata*, genus *Aegilops*, section *Sitopsis*, T genome.

Summary. The complete chloroplast genomes of two *Amblyopyrum muticum* (syn. *Aegilops mutica*) accessions, k-3979 and k-3981, were sequenced, measuring 136911 and 136907 bp, respectively. Alignment and analysis of the nucleotide sequences of chloroplast genomes from different representatives of the *Triticeae* tribe showed similarities between the plastomes of *A. muticum* and *Aegilops umbellulata* from the section *Aegilops*, reaching 99.74 %. A phylogenetic tree constructed based on the alignment of complete chloroplast genomes showed that *A. muticum* is phylogenetically distinct from species of the section *Sitopsis* but not from all representatives of the genus *Aegilops*.

Введение

Диплоидный вид *Amblyopyrum muticum* (Boiss.) Eig (Poaceae), единственный представитель рода *Amblyopyrum* (Jaub. et Spach) Eig с геномом, обозначенным как T (Kimber, Tsunewaki, 1988). Изначально этот вид Р. Е. Boissier в 1844 г. описал как *Aegilops mutica* из-за схожести по морфологии с *Ae. aucheri* Boiss. (подвид *Ae. speltoides* subsp. *aucheri* (Boiss.) Chennav) (Feldman, Levy, 2023). Палестинский ботаник А. Eig отметил, что *Ae. mutica* должен находиться среди представителей рода *Aegilops* L., но с выделением в подрод *Amblyopyrum* (Eig, 1929a). Позже на основе морфологических признаков он отделил от остальных эгилопсов род *Amblyopyrum*, который включал в себя вид *A. muticum* (Eig, 1929b). П. М. Жуковский в своем критико-систематическом обзоре видов рода *Aegilops* поместил *A. muticum* в секцию *Amblyopyrum*, но без отделения от других эгилопсов и назвал этот вид *Aegilops mutica* Boiss. (Zhukovsky, 1928). При этом он отметил, что это сомнительный вид, так как *Ae. mutica* обладает такими признаками другого рода *Agropyrum* L., как гладкие колосковые чешуи (у представителей рода *Aegilops* они зазубренные). П. М. Жуковский в своем труде выделил два подвида *Ae. mutica*: subsp. *tripsacoides* и *Ae. mutica* subsp. *loliacea*. Другие систематики (Hummer, 1980; Clayton, Renvoize, 1986) также поместили *A. muticum* в род *Aegilops* и обозначили его как *Aegilops mutica*. В настоящее время эти два названия синонимичные и встречаются оба варианта. То есть таксономический ранг этого вида до сих пор не определен до конца.

Amblyopyrum muticum – однолетнее растение, малостебельное, стебли прямостоячие, редко коленчатые, высотой до 90 см. Листья на стеблях редко расположенные, только прикорневые листья более многочисленные сравнительно с другими видами рода *Aegilops* L. Колосья достигают до 23 см и безостые на всем протяжении (Zhukovsky, 1928). Следует отметить, что существует также несоответствие в определении филогенетического положения *A. muticum* с точки зрения цитогенетики, морфологии и молекулярно-генетических исследований. Так, было обнаружено, что кариотип *A. muticum* похож на кариотипы *Ae. tauschii* Coss. и *Ae. comosa* Sm., но в то же время отличается от кариотипов *Ae. caudata* L. (син. *Ae. markgrafii* (Greuter) K. Hammer) и *Ae. umbellulata* Zhuk. (Senyaninova-Korchagina, 1932). По

сведениям М. Chennaveeraiah (1960), *A. muticum* имеет большие хромосомы с медианными или субмедианными центромерами, из которых две пары имеют довольно большие спутники на своих коротких плечах. И по его же данным, кариотип *A. muticum* отличается от кариотипа *Ae. comosa* и *Ae. tauschii* и больше похож на кариотип *Ae. speltoides* (Chennaveeraiah, 1960), что подтвердилось в другом исследовании (Giorgi, Bozzini, 1969). У *A. muticum* обнаружены признаки примитивного вида, а именно крупные хромосомы со срединными или субсрединными центромерами, и предполагается, что этот тип кариотипа характерен для видов, близких к предковым (Jones, Majisu, 1968). Методы гибридизации *in situ* с маркерами повторяющейся ДНК и С-дифференциального окрашивания хромосом красителем Гимза показали, что *A. muticum* филогенетически занимает изолированное положение, но относительно близкое к видам секции *Sitopsis*, нежели к другим видам рода *Aegilops* (Badaeva et al., 1996). Таким образом, с точки зрения цитогенетики была обнаружена филогенетическая связь между *A. muticum* и *Ae. speltoides*. Похожие данные приводятся в исследованиях по скрещиванию различных видов пшеницевых с *A. muticum*. Так, по данным R. Riley, *A. muticum* цитогенетически близок к *Ae. speltoides* не только из-за высокой степени спаривания, но и из-за того, что не было обнаружено хромосомных перестроек между двумя видами в процессе скрещивания (Riley, 1966). S. Maan пришел к выводу, что *A. muticum* является наиболее вероятным донором цитоплазмы для *Ae. ovata* L. (син. *Ae. geniculata* Roth), а его тип цитоплазмы и ядерного генома обозначил как M₁ (Maan, 1977). В дальнейшем выдвигались предположения, что пластом *A. muticum* филогенетически ближе к пласту *Ae. umbellulata* (Terachi et al., 1984; Murai et al., 1989; Dvorak, Zhang, 1992; Yamane, Kawahara, 2005; Damascus, 2012), к *Ae. speltoides* (Bernhardt et al., 2017), либо отделяется от других эгилопсов (Haider, 2012). Также есть сведения о филогении *A. muticum* на основе изучения ядерных генов. Так, Dvorak и Zhang, анализируя повторяющиеся последовательности ДНК, пришли к выводу, что *A. muticum* филогенетически близок к *Ae. caudata*, *Ae. comosa*, *Ae. uniaristata* Vis. и *Ae. umbellulata* (Dvorak, Zhang, 1992). Секвенирование внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS) рибосомной ДНК показало разделение *A. muticum* и *Ae. speltoides* (Wang et al.,

2000), в то время как анализ внешних транскрибированных спейсеров генов 18S рибосомной РНК показал близкое родство *Ae. speltoides* и *A. muticum* (Sallares, Brown, 2004). Недавно был частично секвенирован ядерный геном *A. muticum* (Li et al., 2022), который годом позже был дополнен уже полным геномом одного образца и экзомом пяти образцов *A. muticum* (Yang et al., 2023). В этом исследовании на филогенетическом древе *A. muticum* оказался близок к *Ae. speltoides*, но сходство их геномов было не очень высоким. Также были частично секвенированы (длиной 114778 п. н. без одного инвертированного повтора, при этом полный хлоропластный геном пшеницевых имеет длину в среднем более 136 тыс. п. н.) хлоропластные геномы 6 различных образцов *A. muticum* (Bernhardt et al., 2017), но сведения о его полном хлоропластном геноме и аннотации генов в публикациях отсутствуют. Поэтому целью данной работы было уточнение филогенетического положения *A. muticum* по материнской линии на основе секвенирования и аннотирования полных хлоропластных геномов двух его различных образцов.

Материалы и методы

Растительный материал и выделение хлоропластной ДНК

Для исследования были использованы семена *A. muticum* образцов к-3979 (страна происхождения Турция) и к-3981 (страна происхождения Армения), которые были предоставлены Федеральным исследовательским центром Всероссийский институт генетических ресурсов растений (ВИР, г. Санкт-Петербург). Растения проращивались в теплице при 21 °С в течение 3 недель, затем было собрано около 20 г зеленых листьев. Далее эти листья были помещены на 48 часов в холод (4 °С) и темноту для уменьшения содержания крахмала. Для выделения хлоропластной ДНК из листьев использовали метод сахарозного градиента (Shi et al., 2012) с некоторыми модификациями, где на этапе выделения хлоропластной ДНК из интактных хлоропластов к образцам добавляли Тритон X-100 до конечной концентрации 0,15 %, а затем использовали метод фенол-хлороформной экстракции (Graham, 1978). Гомогенизацию листьев проводили при помощи ступки и пестика в жидком азоте.

Секвенирование хлоропластной ДНК

Качество и концентрацию выделенной хлоропластной ДНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop OneC (Thermo Fisher Scientific, США). Количество ДНК определяли флуориметрическим методом с использованием набора SpectraQ BR (Raissol, Россия) и флуориметра Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, США). Подготовку ДНК-библиотек проводили методом shotgun при помощи набора VAHTS Universal Plus DNA Library Prep Kit for Illumina V2 (Vazyme, Китай). Для секвенирования брали 50 нг хлоропластной ДНК. На первом этапе подготовки проводили ферментативную фрагментацию хлоропластной ДНК с помощью тагментазы до размера фрагментов 350 п. н. с одновременным восстановлением концов. На втором этапе проводили лигирование адаптеров и очистку продукта реакции на магнитных частицах Smart beads (Raissol, Россия). На третьем этапе проводили индексную ПЦР и очистку продукта реакции на магнитных частицах Smart beads (Raissol, Россия). Контроль качества полученной ДНК-библиотеки проводили при помощи прибора для капиллярного электрофореза Qsep400 (Bioptic, Тайвань). Флуориметрическое измерение концентрации ДНК-библиотеки проводили с использованием набора SpectraQ BR (Raissol, Россия) и флуориметра Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, США). ДНК-библиотеки пулировали и проводили секвенирование при помощи набора SURFSeq 5000 Sequencing Kit V1.0 2000M reads/flow cell на секвенаторе SurfSeq5000 (GeneMind, Китай). Режим секвенирования – 2x150 п. н. Файлы формата base были демультиплексированы на приборе SurfSeq5000 с получением файлов с расширением fastq. В общей сложности было получено 15 млн чтений (ридов). Чистку чтений проводили при помощи программы Trimmomatic v0.22 (Bolger et al., 2014). Чтения, содержащие неопределенные нуклеотиды 'N', были удалены. Глубину покрытия оценивали при помощи bedtools genome coverage (Quinlan, Hall, 2010) и samtools depth (Li et al., 2009). Сборку пластома проводили при помощи программы NOVOWrap (Wu et al., 2021) с использованием последовательности хлоропластного генома *Ae. speltoides* var. *speltoides* KJ614406 в качестве референсного. Данный референсный геном был выбран на основании часто встречающейся информации в литературе о наиболее близком к *A. muticum* виде. Ошиб-

ки и неоднозначные нуклеотиды были вручную проверены и исправлены после автоматического секвенирования по Сэнгеру на секвенаторе Нанофор 05 (ИАП РАН/ООО «НПФ Синтол», Россия). Полные хлоропластные геномы двух образцов *A. muticum* были аннотированы при помощи ресурса «Chloroplast Genome Annotation, Visualization, Analysis, and GenBank Submission 2» (CP-GAVAS2. URL: <http://47.96.249.172:16019/analyzer/home>) (Shi et al., 2019). Аннотированные гены были проверены на ошибки и правильность расположения и исправлены вручную. Кольцевую карту хлоропластного генома визуализировали при помощи ресурса «Chloroplast» (URL: <https://irscope.shinyapps.io/Chloroplast>) (Zhang et al., 2019). SSR-локусы были идентифицированы с помощью алгоритма Web-ресурса MISA (Beier et al., 2017). Нуклеотидные последовательности секвенированных хлоропластных геномов были депонированы в GenBank (номера доступа указаны в скобках): *A. muticum* к-3979 (PQ632085) и *A. muticum* к-3981 (PQ632086).

Филогенетический анализ

Выравнивание нуклеотидных последовательностей хлоропластных геномов проводили при помощи MAFFT v.7.427 при следующих значениях: scoring matrix 1 PAM/k = 2, gap open penalty = 1,53, offset value = 0,0, strategy: FFT-NS-1 method (Kato, Standley, 2013). Множественное выравнивание визуализировали с помощью Jalview v.2.11.2.7 (Waterhouse et al., 2009). Нумерация нуклеотидов дана в соответствии с консенсусной последовательностью, сгенерированной программой MAFFT v7.427. Филогенетическое древо максимального правдоподобия строили при помощи MEGA11 при следующих значениях: bootstrap = 1000, GTR(G+I) (Tamura et al., 2021). В качестве внешней группы для филогенетического анализа была взята рожь *Secale cereale* L. (GenBank MZ507427).

Результаты

Секвенированы хлоропластные геномы двух образцов *A. muticum* к-3979 и к-3981, размер которых составил 136911 и 136907 п. н. соответственно. Размеры области LSC (большая единичная копия) – 81003 п. н. у образца к-3979 и 80999 п. н. у образца к-3981, области LSC (короткая единичная копия) – 12804 п. н., и области инвертированных повторов (IR) – 21552 п. н. каждая

у обоих образцов. Все основные характеристики хлоропластных геномов исследуемых образцов представлены в таблице 1, где для сравнения показаны характеристики хлоропластных геномов *Ae. umbellulata* MG958547, *Ae. speltoides* var. *speltoides* KJ614406 и *Ae. comosa* NC_046697 из GenBank. При этом хлоропластные геномы двух образцов *A. muticum* практически совпадают с *Ae. speltoides* по длине инвертированных повторов, в то время как длина IR области *Ae. umbellulata* незначительно отличается от IR области *Ae. comosa* (табл. 1). Содержание GC во всем хлоропластном геноме обоих образцов *A. muticum* достигает 38,28 %, в области LSC – 36,23 %, в области IR – 43,91 % IR, и области SSC – 32,25 %. В составе хлоропластного генома *A. muticum* было аннотировано 135 структурных генов, из которых 85 белок-кодирующих генов, 31 ген тРНК и 4 гена рРНК. 7 генов, кодирующих белки (*rps19*, *rpl2*, *rpl23*, *ndhB*, *rps7*, *rps12*, *rps15*), 8 генов тРНК (*trnH-GUG*, *trnM-CAU*, *trnL-CAA*, *trnV-GAC*, *trnT-CGU*, *trnA-UGC*, *trnR-ACG*, *trnN-GUU*), 4 гена рРНК (*rRNA4.5*, *rRNA23*, *rRNA16* и *rRNA5*) были дублированы из-за того, что находятся в области повтора IR. При этом в SSC-области обнаружено 10 белок-кодирующих генов и ген *trnL*, в LSC-области – 65 белок-кодирующих гена и 22 гена тРНК. Кроме того, из 135 генов 15 имеют по одному интрону и один ген (*ycf3*) – 2 интрона. Самый крупный интрон (2490 п. н.) находится в гене *trnK-UUU*, внутри которого располагается другой ген – *matK*. Кроме того, с помощью онлайн программы MISA было обнаружено 32 SSR-локуса у образца к-3979 и 29 SSR-локусов у образца к-3981. Также было проведено множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей секвенированных хлоропластных геномов некоторых представителей рода *Triticum* и *Aegilops* и двух образцов *A. muticum*. Выравнивание показало, что нуклеотидные последовательности хлоропластного генома *A. muticum* (обоих образцов) имеют высокое сходство с нуклеотидной последовательностью *Ae. umbellulata* MG958547, достигающее 99,74 %. Всего обнаружено 81 SNPs между хлоропластными геномами *A. muticum* и *Ae. umbellulata* MG958547, среди которых 45 транзиций и 36 трансверсий. Также найдены 42 индела, 15 из которых больше 4 п. н. (табл. 2). Инсерция в гене *rps2* (табл. 2) является причиной вставки аминокислот аспарагин-лейцин (NL) у *A. muticum*, причем эта вставка при выравнивании была обнаружена только у *A. muticum* (обоих образ-

цов) среди анализированных нами видов. Кроме того, между хлоропластными геномами двух образцов *A. muticum* найдены 4 SNPs и 7 инделов, длиной не превышающих 4 п. н. Стоит отметить, что несмотря на то, что между пластомами *A. muticum* и *Ae. umbellulata* есть множество нуклеотидных различий, в их нуклеотидных последовательностях были найдены одинаковые протяженные инделы, часть из которых показана на рисунке 1. Делеция, выявленная у *Ae. umbellulata* MG958547 в межгенном участке *rrn5* – *trnR^{ACG}* и внутри гена *rrn23* (табл. 2), обнаружена также у *Ae. comosa* NC_046697. Филогенетический анализ полных хлоропластных геномов двух образцов *A. muticum* и различных представителей рода *Triticum* и *Aegilops* показал близкое родство по материнской линии *A. muticum* и *Ae. umbellulata* MG958547 (рис. 2). При этом хлоропластный геном *Ae. speltooides* оказался близок к пластома

T. aestivum, что может быть связано с общей материнской линией мягкой пшеницы и предполагаемого донора субгенома В *Ae. speltooides*. По материнской линии в сестринской кладе оказались *A. muticum* (геном Т), виды секции *Sitopsis*, кроме *Ae. speltooides* (геном S), тетраплоидный вид из секции *Aegilops* *Ae. kotschyi* Boiss. (геном S'U) и диплоидный эгилопс из секции *Comopyrum* *Ae. comosa* (геном М). Внешним видом сестринских клад на древе расположился представитель секции *Vertebrata* *Ae. tauschii* (геном D). К вышеперечисленным видам по хлоропластному геному филогенетически оказались близки и диплоидные виды пшениц с геномом А. Таким образом, было выяснено, что филогенетически по материнской линии *A. muticum* находится внутри рода *Aegilops*, при этом его пластом отличается от пластома *Ae. speltooides*.

Таблица 1. Основные характеристики хлоропластных геномов *Amblyopyrum muticum* (к-3979, к-3981), *Aegilops umbellulata* MG958547, *Ae. comosa* NC_046697 и *Ae. speltooides* var. *speltooides* KJ614406

Характеристика генома	<i>Aegilops umbellulata</i> MG958547	<i>Amblyopyrum muticum</i> к-3979	<i>Amblyopyrum muticum</i> к-3981	<i>Aegilops speltooides</i> var. <i>speltooides</i> KJ614406	<i>Aegilops comosa</i> NC_046697
Размер генома, п. н.	136163	136911	136907	135652	136247
Длина области LSC, п. н.	80988	81003	80999	79766	80997
Длина области SSC, п. н.	12779	12804	12804	12780	12770
Длина области инвертированных повторов (IR), п. н.	21488	21552	21552	21553	21490
Количество различных генов	135	135	135	135	135
Количество белок-кодирующих генов	85	85	85	85	85

Обсуждение

Филогенетические взаимоотношения в так называемом пшенично-эгилопсном комплексе до конца еще не выяснены. Продолжается спор о том, нужно ли объединить *Aegilops* и *Triticum* в один род, и следует ли включить *Amblyopyrum muticum* в род *Aegilops* (Yen et al., 2020; Feldman, Levy, 2023). По одной из гипотез, большинство видов пшеницевых было сформировано в результате первичного гомоплоидного гибридного видообразования, то есть слияния линии *Triticum* с предковой формой *A. muticum* для образования всех других видов, кроме *Ae. speltooides*

(Bernhardt et al., 2020). Что касается изучения филогенетического положения *A. muticum*, на этот счет имеются различные, порой даже противоречивые данные. Так, в исследовании Li et al. *A. muticum* оказался в отдельной от *Ae. speltooides* кладе (Li et al., 2022). По сообщениям Bernhardt et al., *Ae. speltooides* и *A. muticum* образуют вместе кладу, отдельную от других пшеницевых (Bernhardt et al., 2017). Существуют и другие сведения о филогении *A. muticum*. Так, например, анализ цитоплазмы *A. muticum* указал на его тесную генетическую связь с цитоплазмой аллотетраплоидного вида *Ae. ovata* (син. *Ae. geniculata*) (Maan, 1977). Филогения, основанная на данных

частичного секвенирования ядерного генома, показала, что *A. muticum* группируется с видами с геномом U, в том числе с *Ae. geniculata* (геном M^oU) (Bernhardt et al., 2017). При этом мы тоже обнаружили сходство хлоропластного генома *Ae. geniculata* и *A. muticum*, но на сегодняшний день опубликован лишь неполный пластом *Ae. geniculata* NC_023097 и не удастся полноценно оценить различия между двумя видами. По результатам нашего филогенетического анализа

пластом *A. muticum* филогенетически оказался близок к пласту *Ae. umbellulata*. Это подтверждается некоторыми исследованиями (Terachi et al., 1984; Murai et al., 1989; Dvorak, Zhang, 1992; Yamane, Kawahara, 2005). Такое сходство пластов, возможно, объясняется тем, что участки хлоропластного генома *Ae. umbellulata* интрогрессировали в хлоропластный геном *A. muticum* (Huynh et al., 2019; Bernhardt et al., 2020).

Таблица 2. Протяженные инделы, обнаруженные в хлоропластных геномах *Amblyopyrum muticum*, в сравнении с *Aegilops umbellulata*

Нуклеотидная позиция согласно консенсусной последовательности	Локус	<i>Aegilops umbellulata</i> MG958547	<i>Amblyopyrum muticum</i> (обе линии)	Тип индела
16835-16871	Межгенный участок <i>psbM-petN</i>	TTAGATTCT TTCTATTA	–	Делеция
28500-28505	Ген <i>rps2</i>	–	AATTТА	Инсерция Вставка аминокислот NL
31824-31838	Межгенный участок <i>atpI- atpF</i>	AAAGTATA TATGCATT	–	Делеция
43773-43777	Инtron II <i>ycf3</i>	CCATA	–	Делеция
44900-44904	Межгенный участок <i>ycf3-rps4</i>	–	TTATC	Инсерция
47471-47476	Межгенный участок <i>trnL^{UAA}- trnF^{GAA}</i>	9T	15T	Дупликация
53997-54001	Межгенный участок <i>atpB- rbcL</i>	AATTT	–	Дупликация
66124-66131	Межгенный участок <i>rpl33-rps18</i>	–	AATTTTCA	Инсерция
66615-66635	Ген <i>rps18</i>	–	TTAGAAACA ACAACCA AAT	Делеция Делеция аминокислот LRNNNQN
71122-71126	Межгенный участок <i>psbT- psbN</i>	TATCT	AGATA	Инверсия
97905-97969	Межгенный участок <i>rrn5-trnR^{ACG}</i>	–	CGCTGAAGTATGAGCC CCGTGGACTAGCGATT GCTTCTCCACGAGGCT CATACCAGGCGCTACGG	Делеция
105104-105108	Межгенный участок <i>ndhF-rpl32</i>	9A	14A	Дупликация
109497-109501	Межгенный участок <i>ndhD-psaC</i>	–	GATTA	Дупликация
110277-110292	Межгенный участок <i>psaC-ndhE</i>	–	GTCTAATTAATCAAAA	Дупликация
119926-119990	Ген <i>rrn23</i>	–	CATACTTCAGCGCCGT AGCGCCTGGTATGAGC CTCGTGGAGAAGCAAT CGCTAGTCCACGGGGCT	Делеция Делеция аминокислот HTSAPRLVA SWRSNRSTG

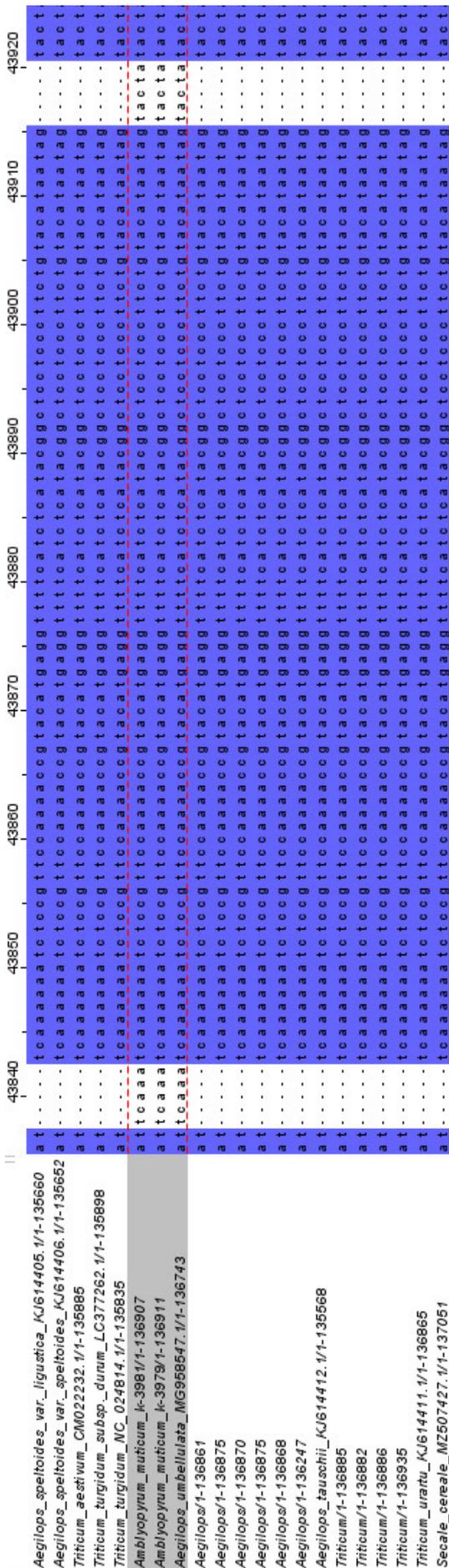


Рис. 1. Инсерции ТССАА и ТАСТА, обнаруженные в хлоропластных геномах *Aegilops umbellulata* MG958547 и *Amblyopyrum muticum*.

В исследованиях, где *A. muticum* группировался на филогенетическом древе с *Ae. speltoides* (Bernhardt et al., 2017, 2020; Huynh et al., 2019; Yang et al., 2023) были использованы данные по ядерному геному, транскриптому, по неполному хлоропластному геному, либо объектом служили диплоидные виды. В нашем же исследовании в анализ были взяты полные хлоропластные геномы не только *A. muticum*, но и гексаплоидных и тетраплоидных пшениц, чем можно объяснить попадание в кладу с мягкой пшеницей *Ae. speltoides* (рис. 2). По сведениям Li et al. (2022), полногеномный анализ также показывает близкое родство *Ae. speltoides* и полиплоидных пшениц с геномом В. И поэтому наша филогенетическая картина не противоречит другим данным (Middleton et al., 2014; Baidouri et al., 2017; Huynh et al., 2019; Bernhardt et al., 2020). Также было высказано предположение, что современный вид *A. muticum* интрогрессировал часть ДНК и из ядерного генома *Ae. umbellulata* (Huynh et al., 2019; Bernhardt et al., 2020). Что касается классификации *A. muticum* с выделением в отдельный род, то, по нашим данным, он все же находится в близком родстве с другими эгилопсами, по крайней мере по хлоропластному геному. Об этом же сообщают Bernhardt с соавторами, указывая что *A. muticum* не может быть отделен от других видов рода *Aegilops*, поскольку он является сестринским таксоном для *Ae. speltoides* по данным исследования ядерного генома и является как прародителем, так и интрогрессированным с другими представителями эгилопсов (Bernhardt et al., 2020). В то же время в своем предыдущем исследовании Bernhardt с соавторами предположили, что хлоропластный геном *A. muticum* имеет сходство с пластомом эгилопсов из-за существования их общего предка, либо же мог произойти захват хлоропласта от каких-то предковых форм эгилопсов при видообразовании *A. muticum* (Bernhardt et al., 2017). Это действительно географически возможно, поскольку области распространения эгилопсов и *A. muticum* перекрываются в Турции и Армении (Zhukovsky, 1928; Feldman, Levy, 2023). Анализ полного ядерного генома *A. muticum* показал, что *Ae. speltoides* и *A. muticum* отделяются филогенетически от остальных видов секции *Sitopsis*. При этом *Ae. speltoides* имел самую низкую геномную дифференциацию относительно субгенома В мягкой гексаплоидной пшеницы, затем следовал *A. muticum* (Yang et al., 2023). Это позволило предположить, что из ныне существующих видов наибо-

лее близки к предполагаемому донору субгенома В *Ae. speltoides* и *A. muticum*. Таким образом, исходя из литературных и полученных нами данных, предлагаем *A. muticum* оставить в роде *Aegilops*, выделив его в секцию *Amblyopyrum* и называть его *Aegilops mutica*. Glemin с соавторами также призывают к пересмотру и обширному изучению *A. muticum* (тем самым отдав дань уважения и П. М. Жуковскому и А. Eig), потому что этот вид обладает большим генетическим разнообразием, и его участие в формировании различных эгилопсов делает его хорошим кандидатом на роль нового источника хозяйственно-ценных признаков для селекции мягкой пшеницы (Glemin et al., 2019). И действительно, есть сведения о высоком уровне внутривидового полиморфизма *A. muticum* (Sasanuma et al., 2004), что также видно по результатам нашего исследования, где были обнаружены различные SNPs между хлоропластными геномами двух образцов *A. muticum*. Кроме того, *A. muticum* используется для

создания интрогрессивных образцов *T. aestivum* с устойчивостью к различным болезням (King et al., 2017; Fellers et al., 2020). Была даже создана геном-замещенная форма Avrotica (геном ВВААТТ), родителями которой были пшеница мягкая сорта 'Aurora' и *Ae. mutica* (син. *A. muticum*) (Badaeva et al., 2024) и которая обладает иммунитетом к ржавчине (Davoyan et al., 2019). *A. muticum*, ко всему прочему, интересен как объект исследования из-за его филогенетической близости к *Ae. speltoides*, который считается ближайшим к донору субгенома В мягкой пшеницы сохранившимся видом (Yen et al., 2020). Поэтому необходимо исследовать другие образцы этого вида из-за его внутривидового полиморфизма, а также, вероятно, если судить по нашим результатам, нужно тщательно сравнить полный ядерный геном *A. muticum* (Yang et al., 2023; Grewal et al., 2025) с недавно секвенированным полным ядерным геномом *Ae. umbellulata* (Abrouk et al., 2023; Singh et al., 2024).

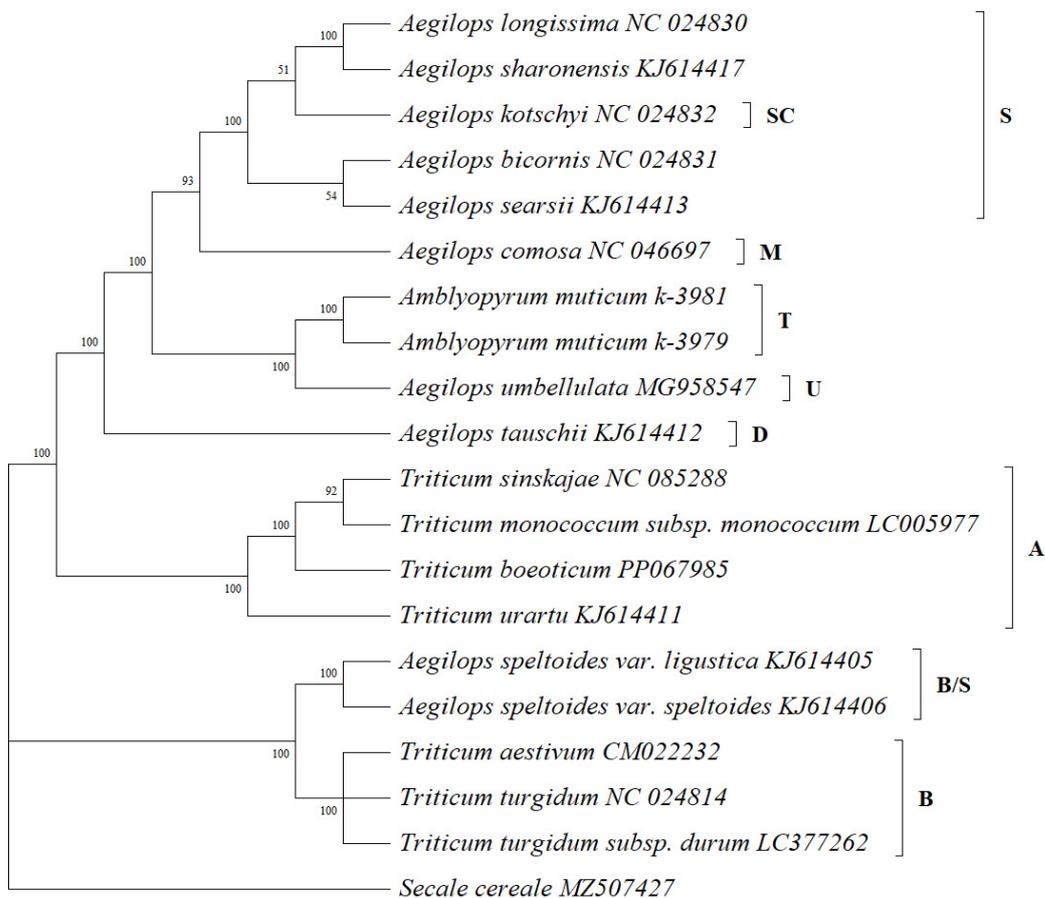


Рис. 2. Филогенетическое древо, построенное методом максимального правдоподобия на основе выравнивания нуклеотидных последовательностей хлоропластных геномов *Amblyopyrum muticum* (к-3979, к-3981) и различных представителей рода *Triticum* и *Aegilops* из GenBank. Количество бутстреп повторов 1000, модель замен GTR, гамма-распределение с инвариантными сайтами (G+I). В качестве внешней группы представлен *Secale cereale* (MZ507427).

Благодарности

Авторы выражают искреннюю признательность коллективу Отдела генетических ресурсов пшениц Всероссийского института генетических ресурсов растений (ВИР, г. Санкт-Петербург) и в особенности Евгению Валерьевичу Зуеву за предоставление семенного материала для исследований.

Экспериментальная работа выполнена с использованием приборов ЦКП «Агидель». Исследование А. Р. Кулуева, Р. Т. Матниязова поддержано грантом РНФ № 23-24-00275. Исследование Б. Р. Кулуева выполнено в рамках государственного задания №1022040500031-4 при поддержке гранта Минобрнауки РФ (соглашение № 075-15-2025-180 от 17 апреля 2025 г.).

REFERENCES / ЛИТЕРАТУРА

- Abrouk M., Wang Y., Cavalet-Giorsa E., Troukhan M., Kravchuk M., Krattinger S. G.** 2023. Chromosome-scale assembly of the wild wheat relative *Aegilops umbellulata*. *Sci. Data* 10: 739. <https://doi.org/10.1038/s41597-023-02658-2>
- Badaeva E. D., Davoyan R. O., Tereshchenko N. A., Lyalina E. V., Zoshchuk S. A., Goncharov N. P.** 2024. Cytogenetic features of intergeneric amphydiploids and genome-substituted forms of wheat. *Vavilov J. Genet. Breed* 28(7): 716–730. [In Russian] (**Бадаева Е. Д., Давоян Р. О., Терещенко Н. А., Лялина Е. В., Зошчук С. А., Гончаров Н. П.** Цитогенетические особенности межродовых амфидиплоидов и геномно-замещенных форм пшеницы // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2024. Т. 28, № 7. С. 716–730). <https://doi.org/10.18699/vjgb-24-80>
- Badaeva E. D., Friebe B., Gill B. S.** 1996. Genome differentiation in *Aegilops*. 2. Physical mapping of 5S and 18S–26S ribosomal RNA gene families in diploid species. *Genome* 39: 1150–1158.
- Baidouri M., Murat F., Veyssiere M., Molinier M., Flores R., Burlot L., l Alaux M., Quesneville H., Pont C., Salse J.** 2017. Reconciling the evolutionary origin of bread wheat (*Triticum aestivum*). *New Phytol*, 213: 1477–1486. <https://doi.org/10.1111/nph.14113>
- Beier S., Thiel T., Munch T., Scholz U., Mascher M.** 2017. MISA-web: a web server for microsatellite prediction. *Bioinformatics* 33(16): 2583–2585. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx198>
- Bernhardt N., Brassac J., Dong X., Willing E.-M., Poskar C. H., Kilian B., Blattner F. R.** 2020. Genome-wide sequence information reveals recurrent hybridization among diploid wheat wild relatives. *Plant J.* 102: 493–506. <https://doi.org/10.1111/tbj.14641>
- Bernhardt N., Brassac J., Kilian B., Blattner F. R.** 2017. Dated tribe-wide whole chloroplast genome phylogeny indicates recurrent hybridizations within *Triticeae*. *B. M. C. Evol. Biol.* 17(1): 141. <https://doi.org/10.1186/s12862-017-0989-9>
- Bolger A. M., Lohse M., Usadel B.** 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30: 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Chennaveeraiah M. S.** 1960. Karyomorphologic and cytotaxonomic studies in *Aegilops*. *Acta Horti Gotoburgensis* 23: 85–178.
- Clayton S. D., Renvoize S. A.** 1986. Genera graminum, grasses of the world. *Kew Bull. Addit. Ser.* 13: 1–389.
- Damascus S.** 2012. Resolving genetic relationships among *Aegilops* L. and *Triticum* L. species using analysis of chloroplast DNA by Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS). *Asian J. Agric. Sci.* 4(4): 270–279.
- Davoyan R. O., Bebyakina I. V., Davoyan E. R., Mikov D. S., Zubanova Yu. S., Boldakov D. M., Badaeva E. D., Adonina I. G., Salina E. A., Zinchenko A. N.** 2019. The development and study of common wheat introgression lines derived from the synthetic form RS7. *Vavilov J. Genet. Breed* 23(7): 827–835. [In Russian] (**Давоян Р. О., Бебякина И. В., Давоян Э. Р., Миков Д. С., Зубанова Ю. С., Болдаков Д. М., Бадаева Е. Д., Адонина И. Г., Салина Е. А., Зинченко А. Н.** Создание и изучение интрогрессивных образцов мягкой пшеницы, полученных на основе синтетической формы RS7 // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2019. Т. 23, №7. С. 827–835). <https://doi.org/10.18699/VJ19.556>
- Dvorak J., Zhang H.-B.** 1992. Reconstruction of the phylogeny of the genus *Triticum* from variation in repeated nucleotide sequences. *Theor. Appl. Genet.* 84: 419–429.
- Eig A.** 1929a. *Amblyopyrum* Eig. A new genus separated from the genus *Aegilops*. *PZE Inst. Agric. Nat. Hist. Agric. Res.* 2: 199–204.
- Eig A.** 1929b. Monographisch-kritische ubersicht der gattung *Aegilops*. *Reprrium Nov. Spec. Regni. Veg.* 55: 12–88.
- Feldman M., Levy A. A.** 2023. *Wheat Evolution and Domestication*. Cham: Springer. 673 pp. <https://doi.org/10.1007/978-3-031-30175-9>
- Fellers J. P., Matthews A., Fritz A. K., Rouse M. N., Grewal S., Hubbart-Edwards S., King I. P., King J.** 2020. Resistance to wheat rusts identified in wheat/*Amblyopyrum muticum* chromosome introgressions. *Crop. Science* 60: 1957–1964. <https://doi.org/10.1002/csc2.20120>
- Giorgi B., Bozzini A.** 1969. Karyotype analysis in *Triticum*. III. Analysis of the presumed diploid progenitors of polyploid wheats. *Caryologia* 22: 279–287.

- Glemin S., Scornavacca C., Dainat J., Burgarella C., Viader V., Ardisson M., Sarah G., Santoni S., David J., Ranwez V.** 2019. Pervasive hybridizations in the history of wheat relatives. *Sci. Adv.* 5(5): eaav9188. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav9188>
- Graham D. E.** 1978. The isolation of high molecular weight DNA from whole organisms of large tissue masses. *Anal. Biochem.* 78: 673–678.
- Greiner S., Lehwark P., Bock R.** 2019. Organellar Genome DRAW (OGDRAW) version 1.3.1: expanded toolkit for the graphical visualization of organellar genomes. *Nucleic Acids Res.* 47: W59–W64. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz238>
- Grewal S., Yang Cy., Krasheninnikova K., Collins J., Wood J. M. D., Ashling S., Scholefield D., Kaithakottil G. G., Swarbreck D., Yao E., Sen T. Z., King I. P., King J.** 2025. Chromosome-level haplotype-resolved genome assembly of bread wheat's wild relative *Aegilops mutica*. *Sci Data* 12, 438. <https://doi.org/10.1038/s41597-025-04737-y>
- Haider N.** 2012. Evidence for the origin of the B genome of bread wheat based on chloroplast DNA. *Turk. J. Agric. For.* 36(1): 13–25. <https://doi.org/10.3906/tar-1011-1394>
- Hammer K.** 1980. Vorarbeiten zur monographischen Darstellung von Wildpflanzensortimenten: *Aegilops* L. *Kulturpflanze* 28: 33–180. <https://doi.org/10.1038/s41597-025-04737-y>
- Huynh S., Marcussen T., Felber F., Parisod C.** 2019. Hybridization preceded radiation in diploid wheats. *Mol. Phylogenet. Evol.* 139: 106554. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.106554>
- Jones J. K., Majisu B. N.** 1968. The homoeology of *Aegilops mutica* chromosomes. *Can. J. Genet. Cytol.* 10: 620–626.
- Katoh K., Standley, D. M.** 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30(4): 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Kimber G., Tsunewaki K.** 1988. Genome symbols and plasma types in the wheat group. In: T. E. Miller, R. M. D. Koebner (eds.). *Proceedings of the seventh international wheat genetics symposium*. Cambridge: Institute of Plant Science Research. Pp. 1209–1210.
- King J., Grewal S., Yang C., Hubbart S., Scholefield D., Ashling S., Keith J., Edwards K. J., Allen A. M., BurrIDGE A., Bloor C., Davassi A., da Silva G. J., Chalmers K., King I. P.** 2017. A step change in the transfer of interspecific variation into wheat from *Amblyopyrum muticum*. *Plant. Biotech. J.* 15(2): 217–226. <https://doi.org/10.1111/pbi.12606>
- Kuluev A. R., Kuluev B. R., Mikhaylova E. V., Chemeris A. V.** 2024. Sequencing and analysis of complete chloroplast genomes of einkorn wheats *Triticum sinskajae* and *Triticum monococcum* accession k-20970. *Genet. Resour. Crop Evol.* 71: 3347–3360. <https://doi.org/10.1007/s10722-023-01843-x>
- Li H., Handsaker B., Wysoker A., Fennell T., Ruan J., Homer N., Marth G., Abecasis G., Durbin R.** 2009. The sequence alignment/map format and samtools. *Bioinformatics* 25: 2078–2079.
- Li L.-F., Liu B., Olsen K. M., Wendel J. F.** 2015. Multiple rounds of ancient and recent hybridizations have occurred within the *Aegilops–Triticum* complex. *New Phytol.* 208(1): 11–12.
- Li L.-F., Zhang Z.-B., Wang Z.-H., Li N., Sha Y., Wang X.-F., Ding N., Li Y., Zhao J., Wu Y., Gong L., Mafessoni F., Levy A.A., Liu B.** 2022. Genome sequences of five *Sitopsis* species of *Aegilops* and the origin of polyploid wheat B subgenome. *Mol. Plant.* 15(3): 488–503. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2021.12.019>
- Maan S. S.** 1977. Cytoplasmic homology between *Aegilops mutica* Boiss. and *Ae. ovata* L. *Euphytica* 26: 601–613.
- Middleton C. P., Senerchia N., Stein N., Akhunov E. D.** 2014. Sequencing of chloroplast genomes from wheat, barley, rye and their relatives provides a detailed insight into the evolution of the *Triticeae* tribe. *PLOS ONE* 9(3): e85761. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085761>
- Murai K., Xu N. Y., Tsunewaki K.** 1989. Studies on the origin of crop species by restriction endonuclease analysis of organellar DNA. III. Chloroplast DNA variation and interspecific relationships in the genus *Secale*. *Jpn. J. Genet.* 64: 35–47.
- Quinlan A. R., Hall I. M.** 2010. Bedtools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* 26: 841–842. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033>
- Riley R.** 1966. The genetic regulation of meiotic behavior in wheat and its relatives. In: J. Mac Key (ed.) *Proceedings of the second international wheat genetics symposium*. Sweden, Lund: Genetic Institute, University of Lund, Hereditas (suppl) 2. Pp. 395–406.
- Sallares R., Brown T. A.** 2004. Phylogenetic analysis of complete 5' external transcribed spacers of the 18S ribosomal RNA genes of diploid *Aegilops* and related species (*Triticeae*, Poaceae). *Genet. Resour. Crop Evol.* 51: 701–712.
- Sandve S. R., Marcussen T., Mayer K., Jakobsen K. S., Heier L., Steuernagel B., Wulf B. H., Olsen O. A.** 2015. Chloroplast phylogeny of *Triticum/Aegilops* species is not incongruent with an ancient homoploid hybrid origin of the ancestor of the bread wheat D genome. *New Phytol.* 208: 9–10. <https://doi.org/10.1111/nph.13487>
- Sasanuma T., Chabane K., Endo T. R., Valkoun J.** 2004. Characterization of genetic variation in and phylogenetic relationships among diploid *Aegilops* species by AFLP: incongruity of chloroplast and nuclear data. *Theor. Appl. Genet.* 108: 612–618.

- Schoen A., Saripalli G., Hosseinirad S., Sharma P. K., Kajla A., Yadav S. S., Tiwari V.** 2024. Genome sequences from diploids and wild relatives of wheat for comparative genomics and alien introgressions. In: R. Appels et al. (eds.). *The Wheat Genome*. Cham: Springer. Pp. 241–263. https://doi.org/10.1007/978-3-031-38294-9_12
- Senyaninova-Korchagina M.** 1932. Karyosystematic study of the genus *Aegilops*. *Proc. Appl. Bot. Genet. Pl. Breed Ser.* 2(1): 1–90. [In Russian] (**Сенянинова-Корчагина М.** Кариосистематическое исследование рода *Aegilops* // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции, 1932. Серия 2, № 1. С. 1–90).
- Shi L., Chen H., Jiang M., Wang L., Wu X., Huang L., Liu C.** 2019. CPGAVAS2, an integrated plastome sequence annotator and analyzer. *Nucleic Acids Res.* 47: W65–W73. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz345>
- Shi C., Hu N., Huang H., Gao J., Zhao Y.-J., Gao L.-Z.** 2012. An improved chloroplast DNA extraction procedure for whole plastid genome sequencing. *PLoS ONE* 7(2): e31468. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031468>
- Singh J., Gudi S., Maughan P. J., Liu Z., Kolmer J., Wang M., Chen X., Rouse M. N., Lasserre-Zuber P., Rimbart H., Sehgal S., Fiedler J. D., Choulet F., Acevedo M., Gupta R., Gill U.** 2024. Genomes of *Aegilops umbellulata* provide new insights into unique structural variations and genetic diversity in the U-genome for wheat improvement. *Plant Biotechnol. J.* 22(12): 3505–3519. <https://doi.org/10.1111/pbi.14470>
- Tamura K., Stecher G., Kumar S.** 2021. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis. Version 11. *Mol. Biol. Evol.* 38(7): 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Terachi T., Ogihara Y., Tsunewaki K.** 1984. The molecular basis of genetic diversity among cytoplasm of *Triticum* and *Aegilops*. III. Chloroplast genomes of the M and modified M genome-carrying species. *Genetics*. 108: 681–695.
- Wang J.-B., Wang C., Shi S.-H., Zhong Y.** 2000. ITS regions in diploids of *Aegilops* (Poaceae) and their phylogenetic implications. *Hereditas* 132: 209–213.
- Waterhouse A. M., Procter J. B., Martin D. M. A., Clamp M., Barton G. J.** 2009. Jalview Version 2 – a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25(9): 1189–1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>
- Wu P., Xu C., Chen H., Yang J., Zhang X., Zhou S.** 2021. NOVOWrap: An automated solution for plastid genome assembly and structure standardization. *Mol. Ecol. Resour.* 21(6): 2177–2186. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13410>
- Yamane K., Kawahara T.** 2005. Intra- and interspecific phylogenetic relationships among diploid *Triticum-Aegilops* species (Poaceae) based on base-pair substitutions, indels, and microsatellites in chloroplast noncoding sequences. *A. J. Bot.* 92: 1887–1898.
- Yang Y., Cui L., Lu Z., Li G., Yang Z., Zhao G., Kong C., Li D., Chen Y., Xie Z., Chen Z., Zhang L., Xia C., Liu X., Jia J., Kong X.** 2023. Genome sequencing of *Sitopsis* species provides insights into their contribution to the B subgenome of bread wheat. *Plant Commun.* 4(4): 100567. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2023.100567>
- Yen C., Yang J., Yuan Z., Ning S., Zhang L., Hao M., Liu D.** 2020. *Biosystematics of Triticeae: Volume I. Triticum – Aegilops complex*. Singapore: China Agriculture Press and Springer Nature. 265 pp. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-9931-2>
- Zheng S., Poczai P., Hyvonen J., Tang J., Amiryousefi A.** 2020. Chloroplast: an online program for the versatile plotting of organelle genomes. *Front. Genet.* 11: 576124. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.576124>
- Zhukovsky P. M.** 1928. A critical-systematic review of species of the genus *Aegilops* L. *Trudy Prikl. Bot.* 18(1): 417–609. [In Russian] (**Жуковский П. М.** Критико-систематический обзор видов рода *Aegilops* L. // Тр. по прикл. ботанике, генетике и селекции, 1928. Т. 18, № 1. С. 417–609).