

**ПОЛИМОРФИЗМ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ StY-ГЕНОМНЫХ ВИДОВ
ELYMUS GMELINII И ELYMUS PENDULINUS (TRITICEAE, POACEAE)
НА ТЕРРИТОРИИ АЗИАТСКОЙ ЧАСТИ РОССИИ**

Е.В. Кобозева¹, М.В. Олонова², С.В. Асбаганов¹, А.В. Агафонов¹

¹Центральный сибирский ботанический сад СО РАН,
630090, Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101, e-mail: ekobozeva87@mail.ru

²Национальный исследовательский Томский государственный университет,
634050, Томск, просп. Ленина, 36, e-mail: olonova@list.ru

На основе комплексного подхода изучены полиморфизм и специфичность StY-геномных видов *Elymus gmelinii* (Ledeb.) Tzvelev и *E. pendulinus* (Nevski) Tzvelev, распространенных в азиатской части России. При использовании морфологических и эколого-географических критериев, а также биохимических (SDS-электрофорез белков эндосперма) и молекулярно-генетических (ISSR-PCR) маркеров рассмотрена возможность интрогрессии между этими видами. Сделан вывод, что виды *E. pendulinus* и *E. gmelinii* являются достаточно обособленными, и признаков интрогрессии при совместном произрастании видов не обнаружено.

Ключевые слова: *Elymus*, *E. gmelinii*, *E. pendulinus*, StY-геномные виды, таксон, диагностические признаки, интрогрессия.

**POLYMORPHISM AND SPECIFICITY OF StY-GENOME SPECIES
ELYMUS GMELINII (TRITICEAE, POACEAE) AND ELYMUS PENDULINUS
IN THE TERRITORY OF ASIAN PART OF RUSSIA**

E.V. Kobozeva¹, M.V. Olonova², S.V. Asbaganov¹, A.V. Agafonov¹

¹Central Siberian Botanical Garden, SB RAS,
630090, Novosibirsk, Zolotodolinskaya str., 101, e-mail: ekobozeva87@mail.ru

²National Research Tomsk State University,
634050, Tomsk, Lenina Av., 36, e-mail: olonova@list.ru

Polymorphism and specificity in StY-genome species *Elymus gmelinii* (Ledeb.) Tzvelev and *E. pendulinus* (Nevski) Tzvelev widespread in the Asian part of Russia have been studied on the basis of the combined approach. Possibility of introgression between these species was considered with use morphological and ecological-geographical criteria, and also biochemical (SDS-electrophoresis of endosperm proteins) and molecular (ISSR-PCR) markers. The conclusion has been drawn that species *E. pendulinus* and *E. gmelinii* are rather isolated, and introgression signs at joint growth of species was not revealed.

Key words: *Elymus*, *E. gmelinii*, *E. pendulinus*, StY-genome species, taxon, diagnostic characters, introgression.

ВВЕДЕНИЕ

Род *Elymus* L. относится к дикорастущим многолетним травам трибы *Triticeae* Dum. из семейства *Poaceae* Varnh. По современным обобщенным обработкам, этот род насчитывает от 150 (Dewey, 1984; Barkworth et al., 2007) до 200 (Цвелев, 1991) таксонов видового ранга, таким образом, *Elymus* – самый крупный род в трибе *Triticeae*. Большинство видов аллополиплоидного рода *Elymus* – факультативные самоопылители, и большая часть причин разногласия систематиков о составе таксонов и построении системы рода заключается в интрогрессивных процессах, происходящих между многими видами рода. Кроме того, невыясненными

остаются некоторые вопросы сетчатой эволюции злаков.

Согласно последней обработке российских авторов (Цвелев, 2008; Цвелев, Пробатова, 2010), виды рода *Elymus* на территории Азиатской России объединены по морфологическим признакам и эколого-географической приуроченности в общие секции и подсекции. Но данная классификация в ряде случаев не учитывает геномную конституцию (гапломную формулу) видов, хотя именно филогенетическое происхождение аллоплоидных таксонов рода должно быть положено в основу их систематики.

Более 75 % всех известных тетраплоидных видов *Elymus*, произрастающих на территории Азии, входит в состав группы с геномом StY (Sun, Salomon, 2009). Виды этой группы распространены в Западной, Центральной и Восточной Азии, на территории России расположена северная граница их ареала (Lu, Salomon, 1992; Lu, 1994). В пределах Азиатской России произрастает восемь видов и две разновидности с геномом StY, которые принадлежат к секции *Goulardia* (Husnot) Tzvelev и относятся к трем подсекциям: *Curvati* (Nevski) Tzvelev (*E. fedtschenkoi* Tzvelev и *E. nevskii* Tzvelev, *E. gmelinii* (Ledeb.) Tzvelev), *Pendulini* (Nevski) Tzvelev (*E. pendulinus* (Nevski) Tzvelev, var. *pendulinus*, var. *yessoensis* (Honda) Tzvelev, *E. brachypodioides* (Nevski) Peschkova и *E. vernicosus* (Nevski ex Grub.) Tzvelev) и *Ciliaris* (Nevski) Tzvelev (*E. ciliaris* (Trin.) Tzvelev и *E. amurensis* (Drobow) Czer.).

В настоящее время большое внимание уделяется филогенетическим взаимоотношениям между таксонами, выяснению их происхождения и родственности на макро- и микроэволюционном уровнях. Но в процессе познания филогении рода или определенной группы видов зачастую исследователи сталкиваются с новыми фактами, позволяющими пересматривать состав таксонов и заду-

мываться о возможных факторах современного видообразования. Так, при выяснении взаимоотношений StY-геномных видов с применением комплексного подхода – методами сравнительной морфологии, экологической географии, биохимии (электрофорез запасных белков эндосперма и гистона H1), а также по предварительным данным анализа ISSR-маркеров нами было показано, что *E. gmelinii* более близок к *E. pendulinus*, чем к остальным видам данной группы (Агафонов и др., 2010; Асбаганов, Кобозева, 2012), хотя эти виды относятся к разным подсекциям. Тем не менее многие вопросы специфичности, дифференциации и взаимоотношений видов остаются невыясненными. Для более глубокого понимания взаимоотношений *E. gmelinii* и *E. pendulinus* необходимо также комплексно провести их сравнительное изучение – от морфологических и эколого-географических критериев до генетических основ их филогении.

Цель работы – изучить полиморфизм и специфичность *E. pendulinus* и *E. gmelinii* на основе морфологических, эколого-географических, биохимических и молекулярно-генетических критериев, а также определить возможность интрогрессии между этими видами.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Основой для изучения полиморфизма и специфичности StY-геномных видов *E. gmelinii* и *E. pendulinus* на территории азиатской части России нам послужили коллекции ведущих гербариев России: Санкт-Петербурга (LE), Владивостока (VLA), Новосибирска (NSK, NS), Барнаула (ALTB), Улан-Удэ (UUN, UUDE), Томска (TK), а также собственные сборы (табл. 1). Географическое сравнение распространения *E. gmelinii* и *E. pendulinus* на территории Азиатской России приведено согласно флористическому районированию Сибири (Мальшев, 1987) и российского (=советского) Дальнего Востока (Харкевич, 1985). При составлении морфологической характеристики растений использованы теоретические подходы (классификации) Т.А. Работнова (1950), Т.И. Серебряковой (1971), В.Н. Доброхотова и др. (2008).

Морфологические признаки нижних цветковых чешуй (НЦЧ) и узлов стебля (УС) изучали с помощью стереомикроскопа Carl Zeiss Stereo Discovery V12 (с программой Axio Vision 4.8 для получения, обработки и анализа изображений). Опушение листа оценивали как визуальное, так и при помощи снимков, выполненных на сканирующем электронном микроскопе Hitachi TM-1000 при увеличении от $\times 80$ до $\times 250$. В настоящей публикации использованы снимки, полученные при $\times 150$.

При постановке электрофоретических опытов нами подобраны типичные образцы видов *E. gmelinii*

и *E. pendulinus* из разных точек ареала при их совместном произрастании, а также морфологически отклоняющиеся формы. *Elymus pendulinus* в настоящей статье рассматривается в широком смысле, включая три близкородственных таксона *E. pendulinus*, *E. brachypodioides* и *E. vernicosus*, не показавших в предыдущих опытах видовой обособленности (Асбаганов, Кобозева, 2012; Кобозева и др., 2012). В поставленных опытах учтены морфологические особенности, географическая дистанция и территориальная изоляция образцов.

При выполнении электрофоретического анализа запасных белков в системе SDS-PAAG (Lammli, 1970) нами использована методика выделения изолированного эндосперма и экстракции белков из отдельных зерновок многолетних злаков трибы *Triticeae* с массой эндосперма 0.1–1.0 мг (Агафонов, Агафонова, 1992).

Анализ полиморфизма межмикросателлитных последовательностей ДНК (ISSR) проведен по стандартной методике с применением праймеров, успешно использовавшихся ранее для маркирования видов рода *Elymus* L. (Асбаганов, Кобозева, 2012).

ПЦР проводили на амплификаторе С-1000 (Bio-Rad, USA) в объеме 25 мкл. Смесь содержала: 1.5 ед Taq ДНК-полимеразы (Медиген, Россия, 5 ед/мкл); 1X Taq-буфер без Mg^{2+} (Медиген, Россия); 2.3 mM $MgCl_2$; 0.8 mM dNTPs (Медиген, Рос-

Местонахождение исследованных образцов из природных популяций *E. pendulinus* и *E. gmelinii*

Код образца	Местонахождение и автор сбора
<i>E. pendulinus</i>	
СНЕ-1044 СНЕ-1066	Респ. Алтай, окр. пос. Чемал, район слияния рек Катунь и Чемал; alt. 438 м N 51°23.919' E 86°00.112' и alt. 434 м N 51°23.533' E 86°00.197' (Е. Кобозева, Д. Герус)
AUS-1015	Респ. Алтай, Шебалинский р-н, окр. пос. Усть-Сема, тропа вдоль прав. бер. Катунь, перед мостом; alt. 345 м N 51°38.371' E 85°45.384' (Е. Кобозева, А. Агафонов)
TAV-1313 TAV-1314	Алтайский кр., Алтайский р-н, Семинский хр., Тавдинские пещеры; alt. 362 м N 51°46.623' E 85°43.886' (С. Асбаганов)
КНА-1321 КНА-1322	Респ. Хакасия, Ширинский р-н, окр. с. Ефремкино, прав. бер. р. Белый Июс, ниж. часть склона горы; alt. 504 м N 54°27.050' E 89°27.467' (А. Эбель)
SIM-1134	КНР, пров. Внутренняя Монголия, сев. склон горы, редкотравный лес; alt. 1523 м N 42°24.314' E 115°41.838' (О. Аненхонов)
VBI-1114	Респ. Бурятия, Бичурский р-н, окр. пос. Бичура, березово-сосновый лес на зап. склоне горы в дол. р. Бичурки; alt. 710 м N 50°32.458' E 107°37.216' (А. Агафонов, Е. Кобозева)
СНІ-0803 СНІ-0804	Забайкальский кр., окр. г. Нерчинск, 2 км на юго-запад, березово-злаковый лес; alt. 668 м N 51°56.609' E 116°33.688' (О. Аненхонов)
ВКА-0921	Приморский кр., окр. г. Большой Камень, граница смешанного леса; alt. 41 м N 43°7.301' E 132°25.083' (А. Агафонов)
GTS-1101	Приморский кр., окр. г. Уссурийск, Горно-таежная станция ДВО РАН, обочина дороги на дендрарий; alt. 121 м N 43°41.650' E 132°09.324' (А. Агафонов, Е. Кобозева)
ВОК-0728 ВОК-0738	Приморский кр., окр. г. Владивосток, кустарник в зоне отчуждения между ж/д ст. Океанская и Санаторная; alt. 7 м N 43°14.10' E 132°0.19' (А. Агафонов)
<i>E. gmelinii</i>	
AUS-1013	Респ. Алтай, Шебалинский р-н, окр. пос. Усть-Сема, тропа вдоль прав. бер. Катунь, перед мостом; alt. 345 м N 51°38.371' E 85°45.384' (А. Агафонов, Е. Кобозева)
TAV-1313	Алтайский кр., Алтайский р-н, Семинский хр., Тавдинские пещеры; alt. 362 м N 51°46.623' E 85°43.886' (С. Асбаганов)
MAJ-0564	Красноярский кр., Шушенский р-н, лесная поляна у Майнского водохранилища; alt. 355 м N 52°55.873' E 91°28.547' (А. Агафонов, Д. Герус)
КНА-1340	Респ. Хакасия, Ширинский р-н, окр. с. Ефремкино, прав. бер. р. Белый Июс, ниж. часть склона горы; alt. 504 м N 54°27.050' E 89°27.467' (А. Эбель)
КНА-1232	Респ. Хакасия, окр. пос. Сорокино; alt. 374 м N 55°30.801' E 88°52.393' (С. Асбаганов)
VBI-1146	Респ. Бурятия, Бичурский р-н, окр. пос. Бичура, дол. р. Бичурки; alt. 742 м N 50°29.674' E 107°40.750' (А. Агафонов)
VBI-1155	Респ. Бурятия, Бичурский р-н, окр. пос. Бичура, дол. р. Бичурки; alt. 739 м N 50°32.212' E 107°36.923' (А. Агафонов)
VUK-1108	Респ. Бурятия, Бичурский р-н, окр. пос. Малый Куналей, опушка смешанного леса; alt. 750 м N 50°32.762' E 107°47.435' (А. Агафонов)
BUD-0774 BUD-0775	Респ. Бурятия, Джиргинский р-н, дол. р. Торейка, опушка лиственничного леса; alt. 1063 м N 50°35.016' E 104°53.171' (Н. Бадмаева)
СНІ-0920	Забайкальский кр., Ононский р-н, 5 км юго-восточнее пос. Лаха, окр. Цаган-Обо, Адун-Чолонский горный массив, пологий склон, разнотравно-тонконоговое сообщество; alt. 800 м N 50°26.698' E 115°59.597' (А. Королук)
ВКА-0961 ВКА-0962	Приморский кр., окр. г. Большой Камень, южный склон сопки, подножие каменистых осыпей; alt. 38 м N 43°7.653' E 132°24.961'; alt. 41 м N 43°7.513' E 132°25.133' (А. Агафонов)

сия); 1.2 мкМ ISSR-праймер (Медиген, Россия); раствор ДНК – 2 мкл, воду mQH_2O – до 25 мкл. Амплификацию проводили по следующей программе: первичная денатурация при 94 °С – 3 мин, 95 °С – 20 с; 41 цикл – денатурация 94 °С – 25 с, отжиг праймеров (T_a – температура отжига и нуклеотидные последовательности указаны в табл. 2) – 45 с, элонгация – 1.5 мин; конечная элонгация – 9 мин. Электрофоретическое разде-

ление продуктов амплификации проводили в 1.5%-м агарозном геле в 1x TAE-буфере при напряжении 4 В/см.

Для количественной оценки полиморфизма использованных маркеров и определения уровня дивергенции между изученными генотипами полученные данные были представлены в виде матрицы состояний бинарных признаков, в которых наличие или отсутствие ПЦР-фрагментов одина-

Характеристика праймеров, использованных для изучения ДНК-полиморфизма

Нуклеотидная последовательность 5'-3'	Праймер	T _a , °C	Общее число бэндов	Число полиморфных бэндов	Доля полиморфных бэндов, %	Размер фрагментов ДНК, п.н.
(CA) ₈ GG	17899B	47	24	24	100	200–1500
(AC) ₈ CG	M1	47	53	53	100	200–1500
(AC) ₈ YG*	M2	56	49	49	100	200–1500
(CA) ₆ R**	M11	39	34	34	100	250–1000
(CTC) ₃ GC	HB14	41	14	13	92.86	300–1500
(CAC) ₃ GC	HB12	42	26	26	100	250–1000

Примечание. T_a – температура отжига праймеров при амплификации.

* Y = C или T.

** R = G или A.

кового размера рассматривалось как состояние 1 и 0. Для статистической обработки данных использовали пакет программ TREECON (version 1.3b) (van de Peer, de Wachter, 1994). Генетические дис-

танции рассчитывали по М. Нею (Nei, Li, 1979). Для построения дендрограмм применяли метод Neighbor-Joining (NJ) с бутстреп-поддержкой – 100 псевдореплик.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ареал *E. gmelinii* охватывает территорию Средней, Центральной и Восточной Азии. Этот вид распространен в горно-степном и лесостепном поясах на степных и суходольных лугах, лесных опушках, в сухих разреженных лесах, белоберезовых редколесьях, в лесном поясе – на открытых каменистых южных степных склонах, иногда разрастается на залежах. *Elymus pendulinus* имеет исключительно восточно-азиатское распространение – по северной части Японии и Китая, произрастает в долинных березово-еловых лесах, пойменных зарослях кустарников, сосновых борах, на каменистых склонах под кустами ильма, под утесами и скалами, в дубняках, на лесных опушках, иногда на галечниках, до среднего горного пояса (Пешкова, 1990; Пробатова, 1985; Цвелев, Пробатова, 2010). Согласно приведенным данным, места произрастания видов *E. gmelinii* и *E. pendulinus* экологически очень похожи, но чаще всего *E. gmelinii* встречается в открытых и сухих аридных зонах, тогда как *E. pendulinus* тяготеет к более влажным местам, притененным лесным опушкам.

В Западной Сибири *E. gmelinii* распространен на территории Томской, Новосибирской, Кемеровской обл., в Алтайском крае (=Барнаульский флористический район); Восточной Сибири – в Ангаро-Саянском и Приленско-Катаганском (южная часть) флористических районах (фл. р.), Иркутской обл., Северо-Бурятском фл. р. Республики Бурятия (Бурятская АССР) и Вилюйско-Верхнеленском фл. р. Республики Саха (Якутия) (=Якутская АССР) (Мальшев, 1987). На территории Дальнего Востока *E. gmelinii* встречается в Камчатском, Северо-Сахалинском, Верхне-Зейском, Амгунском, Южно-Сахалинском фл. р. (Харкевич, 1985). Об-

щее произрастание *E. gmelinii* и *E. pendulinus* отмечено в большей части распространения *E. pendulinus* на территории Азиатской России, а именно в Республике Алтай (=Горно-Алтайская автономная область); на территории Средней Сибири – в южной части Республики Хакасия (=Хакасская АО) и Верхне-Енисейского фл. р. Красноярского края и Республики Тыва (=Тувинская АССР); на территории Забайкальского края (=Читинская обл.) в Шилко-Аргуньском фл. р. (Даурия) (Мальшев, 1987). На территории Дальнего Востока (Харкевич, 1985) виды *E. gmelinii* и *E. pendulinus* произрастают в Даурском, Нижне-Зейском, Буреинском, Уссурийском, Южно-Сахалинском фл. р., а также в Южно-Бурятском фл. р. Республики Бурятия (=Бурятская АССР).

При этом необходимо отметить, что по результатам экспедиционных наблюдений и изучения гербарных коллекций в некоторых местах особи двух видов обнаруживаются в непосредственной близости. Это, гипотетически, может быть основой для интрогрессивных процессов.

Морфологически *E. pendulinus* и *E. gmelinii*, как многие виды рода, характеризуются внутривидовой изменчивостью по ряду признаков, но при этом в большинстве случаев отчетливо различимы (Кобозева и др., 2012, 2014). Видоспецифичные отличия наблюдаются на НЦЧ, листовых пластинках (ЛП) и УС по типу, длине и плотности трихом. Специфичность *E. pendulinus* заключается в изменчивости от голых и гладких до длиннoustоволосистых НЦЧ, тогда как у *E. gmelinii* НЦЧ могут быть либо голыми и гладкими, либо варьировать по опушенности от мелкошиповатых до щетиновых (рис. 1). Голые, но шероховатые листовые

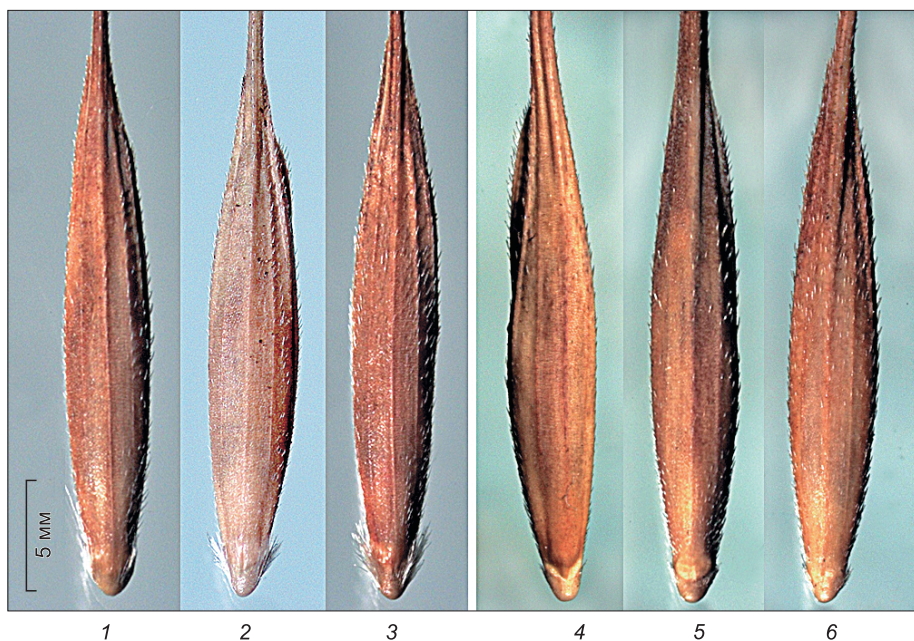


Рис. 1. Нижние цветковые чешуи у особей разных образцов двух видов:

Elymus pendulinus: 1 – VOK-0728, 2 – CHE-1044, 3 – CHE-1066. *E. gmelinii*: 4 – CHI-0920, 5 – BBI-1146, 6 – AUS-1013.

пластинки у *E. pendulinus* однорядно покрыты мелкими шипиками по жилкам, тогда как у *E. gmelinii* у ЛП по жилкам хаотично усеяны мельчайшими шипиками (рис. 2). Опушенные волосками ЛП у *E. pendulinus* имеют четкое расположение волосков по жилкам и коротких шипиков между жилками, тогда как у *E. gmelinii* ЛП покрыты трихомами раз-

ного типа по всей поверхности. Узлы стебля у этих видов могут быть либо голыми, либо опушенными (рис. 3), но также с определенными отличиями. У *E. pendulinus* опушение УС варьирует от щетинистых до длинноволосистых, тогда как у *E. gmelinii* УС могут быть покрыты шипиками или щетинками. При этом *E. pendulinus* и *E. gmelinii* имеют

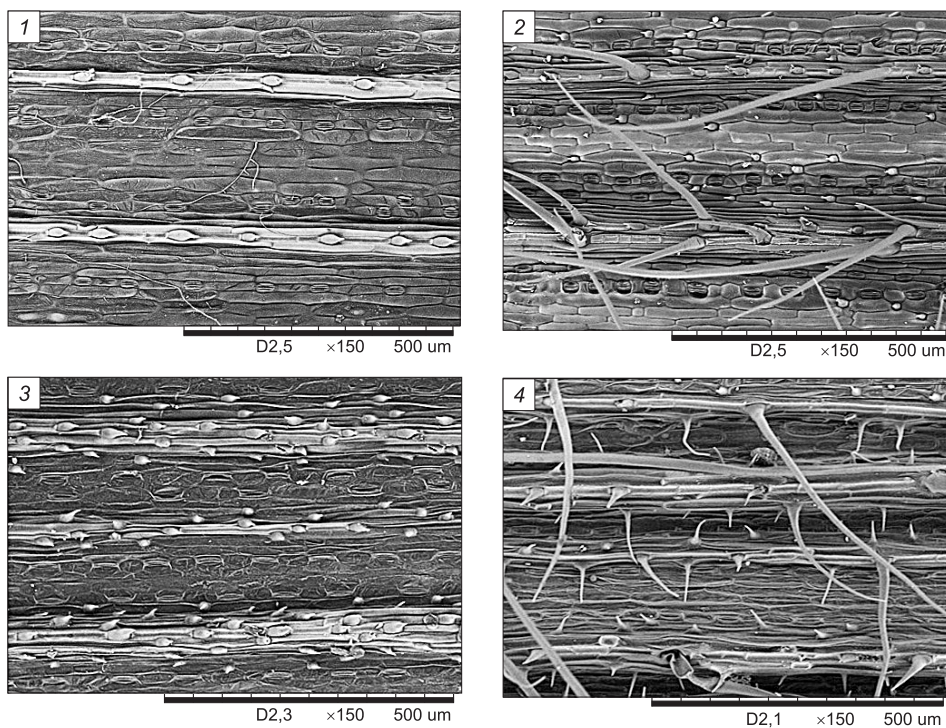


Рис. 2. Верхняя сторона листовых пластинок у особей:

E. pendulinus: 1 – CHE-1044, 2 – VOK-0728 и *E. gmelinii*: 3 – CHI-0920, 4 – MAJ-0564.

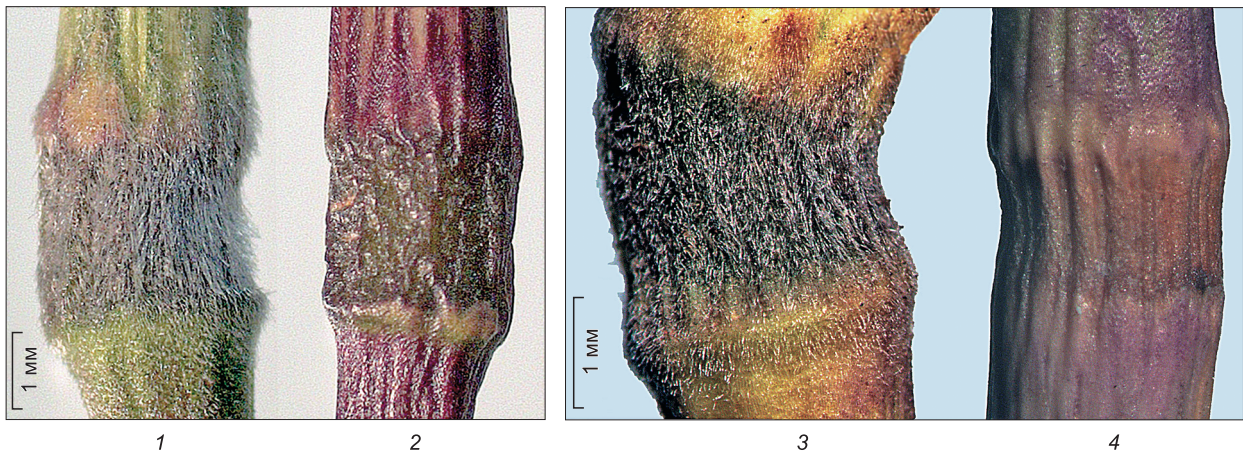


Рис. 3. Узлы стебля у особей:

E. pendulinus: 1 – VOK-0728, 2 – CHE-1044 и *E. gmelinii*: 3 – CHI-0920, 4 – MAJ-0564.

схожее проявление некоторых морфологических признаков, в частности среди этих видов встречаются растения с голыми (но не гладкими, а шероховатыми, часто шиповатыми) и опушенными (щетинистыми) НЦЧ, ЛП и УС (см. рис. 1–3).

Хотя *E. gmelinii* достаточно легко определяется в природе, некоторые экземпляры в той или иной степени отклоняются от типичных форм. При изучении морфологической дифференциации *E. gmelinii* нами выявлено, что некоторые особи этого вида могут иметь внешнее сходство с *E. pendulinus*. Во влажных условиях лесов южной части Бурятии нами найдены образцы *E. gmelinii*, при созревании колосьев которых ости НЦЧ не отклоняются в стороны (рис. 4, а), что является редким

случаем для этого вида, но типичным для *E. pendulinus*. При этом отмечены образцы *E. pendulinus* из Приморского края, имеющие отогнутые ости, т. е. сходные с *E. gmelinii* (рис. 4, б).

Поскольку сходство некоторых форм *E. gmelinii* и *E. pendulinus* на одинаковых стадиях онтогенеза может объясняться последствиями межвидовой интрогрессии, то для подтверждения этой гипотезы необходимы исследования с привлечением методов молекулярной биологии.

Ранее указывалось, что специфичность полипептидных спектров белков эндосперма у индивидуальных растений позволяет обнаружить последствия межвидовой интрогрессии у видов рода *Elymus* в пределах локальных популяций (Герус,



Рис. 4. Ости НЦЧ у спелого колоса:

а – *E. gmelinii* (ВУК-1108) не отклоняются в стороны (Южная Бурятия, окр. пос. Малый Куналей, березовый лес); б – *E. pendulinus* отклоняются в стороны (Приморский край, Хасанский р-н, территория Морской экспериментальной станции ТИБОУ ДВО РАН, обочина грунтовой дороги).

Агафонов, 2007; Агафонов, Герус, 2008). У самоопыляющихся видов этого рода зерновки с одной особи чаще всего идентичны по спектрам белков, поэтому для общей характеристики конкретного растения достаточно одной зерновки (Агафонов и др., 2008). Опыт по изучению электрофоретических свойств белков эндосперма был проведен с добавлением в белковые экстракты 2-меркаптоэтанола (+Me) для разрушения четвертичной структуры белка. Полученные при этом результаты наиболее информативны, так как, помимо мономерных белков, на спектрах проявляются компоненты, соответствующие субъединицам полимерных белков – глютелинов и агрегированных проламинов (Агафонов, Баум, 2000; Kostina et al., 1998). В сравнительном анализе спектров запасных белков эндосперма были проанализированы выборки семян разных образцов двух видов из общих мест произрастания (рис. 5).

При анализе полипептидных спектров *E. pendulinus* и *E. gmelinii* были выявлены следующие закономерности (см. рис. 5): 1) отмечен высокий полиморфизм видов по компонентному составу спектров, при этом общие, встречающиеся у всех образцов видоспецифичные белки отсутствуют; 2) отчетливых доказательств перекрывания (сов-

падения) по компонентам у образцов двух видов из общих местообитаний не обнаружено, что косвенно подтверждает отсутствие гибридизации и межвидовой интрогрессии; 3) формально следует отметить наличие близких или совпадающих по ОЭП компонентов у *E. pendulinus* и *E. gmelinii* в некоторых зонах.

Так, в зоне 30 ед. ОЭП у образцов *E. pendulinus* алтайского происхождения (треки 1, 2) отмечены сходные по ОЭП компоненты с *E. gmelinii* из Алтай (3), Красноярского края (10), Бурятии (треки 13, 15, 16). На уровне 43 ед. ОЭП образец *E. pendulinus* из Приморского края (20) показал наличие сходного компонента с *E. gmelinii* из республик Алтай (3) и Бурятия (13). Близкие по ОЭП компоненты (52 ед.) у *E. pendulinus* из республик Хакасия (7), Бурятия (11) и Приморского края (20, 21) были отмечены у *E. gmelinii* из Приморского края (треки 22, 23). Также в зоне 56 ед. ОЭП у образца *E. gmelinii* из Приморского края (22) был найден схожий компонент с таковым у *E. pendulinus* из Республики Бурятия (11) и Забайкальского края (18). Высокой консервативностью характеризуется компонент (или близкая по ОЭП группа) 75 ед., который отмечен практически у всех образцов обоих видов. Но наиболее заметной является схожесть по под-

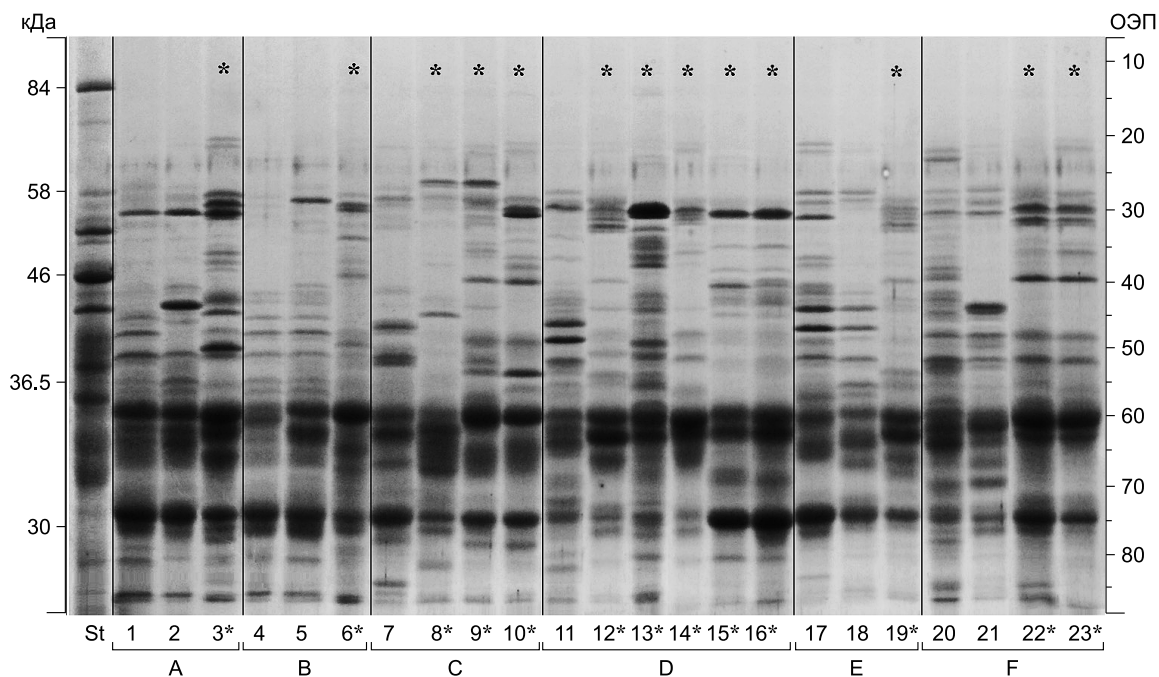


Рис. 5. SDS-электрофореграмма белков эндосперма выборочных образцов *E. pendulinus* и *E. gmelinii* из популяций с совместным или близким произрастанием двух видов в азиатской части России:

А – правобережье р. Катунь, Республика Алтай; **В** – левобережье р. Катунь; **С** – Республика Хакасия; **Д** – Республика Бурятия; **Е** – Забайкальский край; **Ф** – Приморский край. Полипептидные спектры отдельных зерновок в варианте +Me; **кДа** – ориентировочная шкала молекулярных масс; **ОЭП** – шкала относительной электрофоретической подвижности; **St** – эталонный спектр линии *E. sibiricus* ALT-8401. Звездочками отмечены образцы *E. gmelinii*.

1 – СНЕ-1044; 2 – АУС-1015; 3 – АУС-1013; 4 – ТАВ-1313; 5 – ТАВ-1314; 6 – ТАВ-1313; 7 – КНА-1321; 8 – КНА-1340; 9 – КНА-1232; 10 – МАЈ-0564; 11 – ВВИ-1114; 12 – ВВИ-1146; 13 – ВВИ-1155; 14 – ВУК-1108; 15 – ВУД-0774; 16 – ВУД-0775; 17 – СНІ-0804; 18 – СНІ-0803; 19 – СНІ-0920; 20 – ГТС-1101; 21 – ВКА-0921; 22 – ВКА-0961; 23 – ВКА-0962.

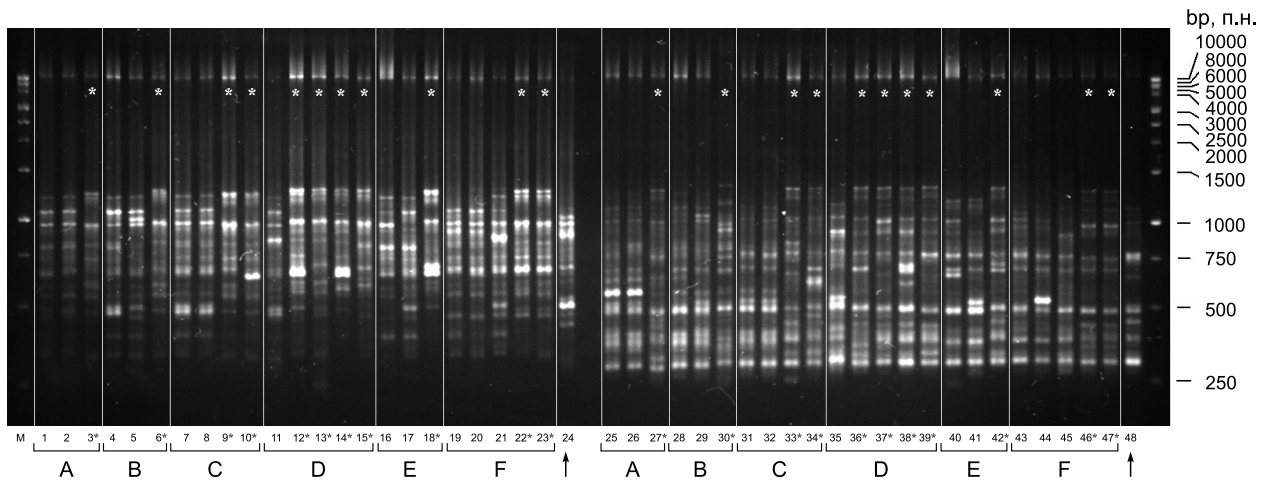


Рис. 6. ISSR-вариабельность при использовании праймеров M1 (1–24) и M2 (25–48) у *E. pendulinus* и *E. gmelinii* из популяций с совместным или близким произрастанием в азиатской части России:

A–F – см. рис. 5. bp – шкала молекулярных масс (п.н.). Стрелками отмечен образец *Pseudoroegneria strigosa* (M. Bieb.) A. Löve. Звездочками отмечены образцы *E. gmelinii*, оставшиеся – *E. pendulinus*.

1, 25 – CHE-1044; 2, 26 – AUS-1015; 3, 27 – AUS-1013; 4, 28 – TAV-1313; 5, 29 – TAV-1314; 6, 30 – TAV-1313; 7, 31 – KHA-1321; 8, 32 – KHA-1322; 9, 33 – KHA-1232; 10, 34 – MAJ-0564; 11, 35 – BBI-1114; 12, 36 – BBI-1146; 13, 37 – BBI-1155; 14, 38 – BUK-1108; 15, 39 – BUD-0774; 16, 40 – CHI-0803; 17, 41 – SIM-1134; 18, 42 – CHI-0920; 19, 43 – GTS-1101; 20, 44 – VOK-0738; 21, 45 – BKA-0921; 22, 46 – BKA-0961; 23, 47 – BKA-0962; 24, 48 – *Ps. strigosa*.

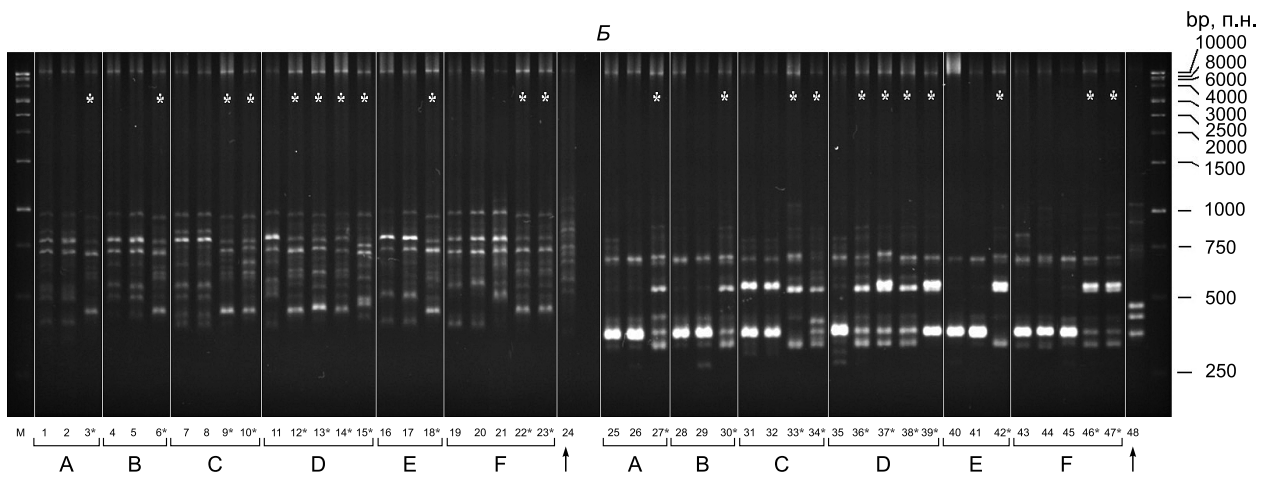
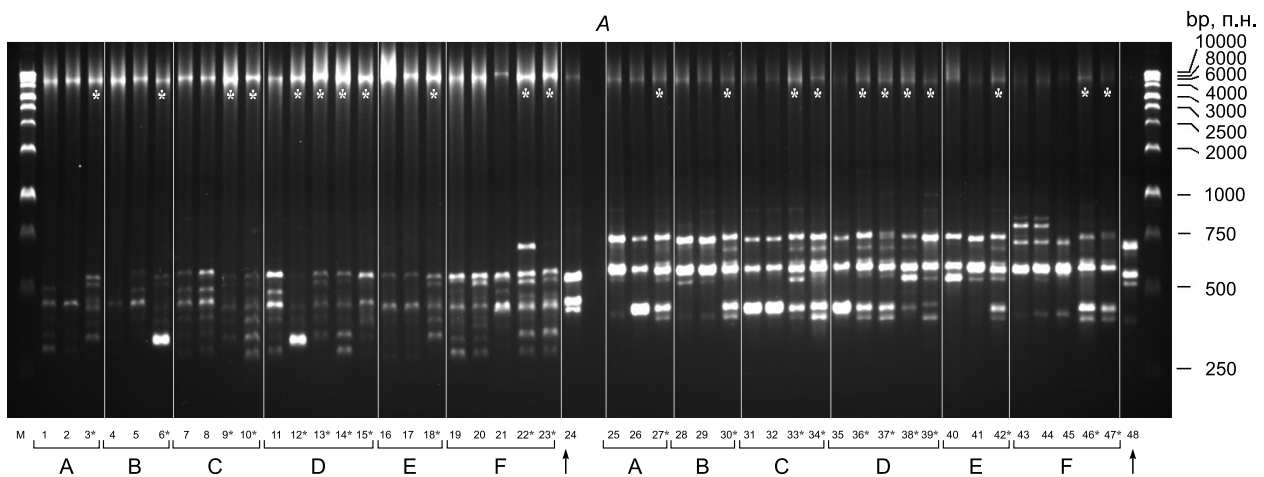


Рис. 7. ISSR-вариабельность при использовании праймеров:

A – HB12 (1–24) и HB14 (25–48); Б – M11 (1–24) и 17899B (25–48) у *E. pendulinus* и *E. gmelinii* из популяций с совместным или близким произрастанием в азиатской части России. Все обозначения к рисунку аналогичны рис. 6.

вижности у пары компонентов 48–52 ед. у образцов *E. pendulinus* и *E. gmelinii* из Приморского края.

Кроме того, особого изучения заслуживает относительно консервативная пара высокомолекулярных субъединиц (ВМС) в зоне ОЭП 20–23 ед. При этом необходимо отметить, что наличие близких по ОЭП компонентов у *E. pendulinus* и *E. gmelinii* в общих местах произрастания может наблюдаться в первую очередь вследствие широкого полиморфизма и случайным совпадением, а не результатом интрогрессии. Именно поэтому создание матриц наличия–отсутствия компонентов для статистической обработки в данном случае нам представилось нецелесообразным. Следовательно, для получения более точных результатов и прояснения взаимоотношения таксонов необходимо провести анализ видов с помощью ДНК-маркеров.

Для выявления полиморфизма и видовой специфичности у *E. pendulinus* и *E. gmelinii* нами был применен метод маркирования межмикросателлитных последовательностей ДНК (ISSR). В качестве образца из внешней группы в исследование был взят образец *Pseudoroegneria strigosa* (M. Bieb.) A. Löve. При сравнении ISSR-профилей, полученных с помощью шести праймеров (17899B, M1, M2, M11, HB14, HB12), был выявлен высокий полиморфизм (93–100 %) межмикросателлитных последовательностей ДНК у 23 образцов исследованных видов (см. табл. 2). Двести амплифицируемых фрагментов (бэндов) варьировали в диапазоне от 200 до 1500 п. н. (рис. 6, 7).

Наибольшее число ISSR-фрагментов (53) получено при использовании праймера M1. Результа-

ты амплификации с праймером M1 представлены на рис. 6 (1–24). Наименее изменчивые профили были получены при использовании праймера HB14 – 14 ампликонов (см. рис. 7, А, 25–48).

По результатам, основанным на данных полиморфизма ISSR-PCR-спектров, была построена консенсусная дендрограмма методом Neighbor-Joining (NJ) (рис. 8). Как показано на дендрограмме, образцы одного вида из разных мест сгруппировались согласно их видовой принадлежности. Кроме того, образцы объединились в клады по географическому критерию. Таким образом, внутри кластера вида *E. pendulinus* в отдельную кладу вошли образцы алтайского происхождения с близким расположением образцов из Хакасии. Немного более отдаленно от этого кластера располагаются образцы из Забайкальского края и Бурятии. Отдельную кладу образовали образцы *E. pendulinus* приморского происхождения. Из общего кластера *E. pendulinus* отделился образец из Бурятии (BBI-1114), по морфологическим признакам формально относящийся к *E. vernicosus*. При этом видовая обособленность *E. pendulinus*, *E. brachypodioides* и *E. vernicosus* не подтвердилась, также как по результатам предыдущего ISSR-анализа (Асбаганов, Кобозева, 2012). Внутри обособленного кластера *E. gmelinii* образцы объединились также по географическому критерию. Небольшими кластерами сгруппировались образцы из Республики Бурятия и Забайкальского края – в один, и образцы из Хакасии, Красноярского края и Алтая – в другой. Четко отделились от них образцы из Приморского края, составив отдельный кластер. Выделился из общего кластера образец *E. gmelinii* из

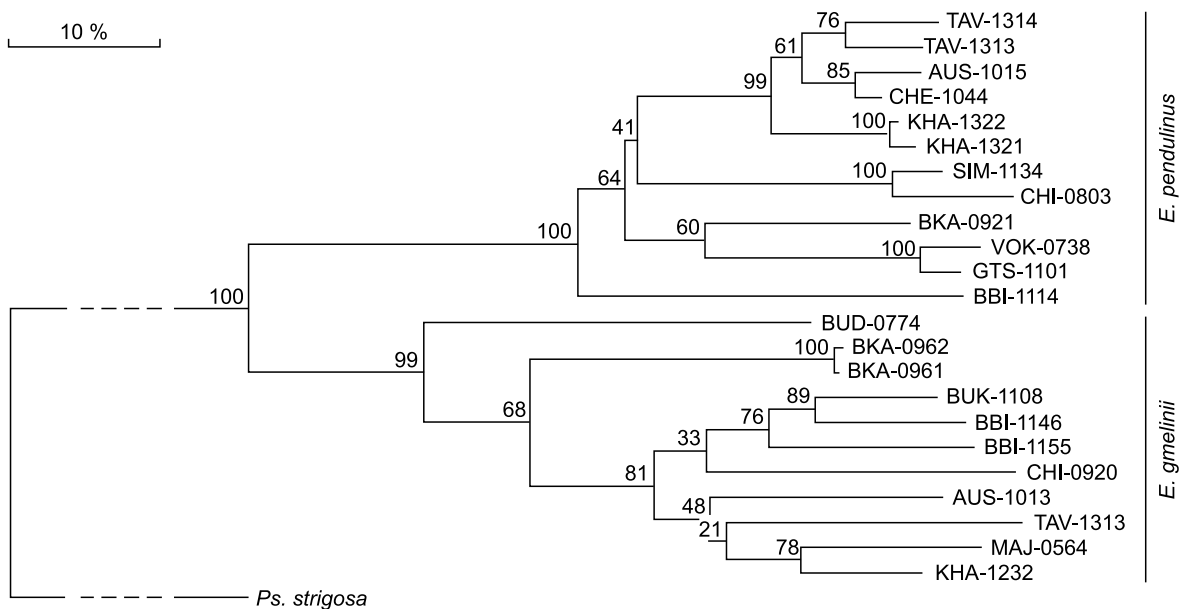


Рис. 8. Консенсусная (по 6 праймерам) NJ дендрограмма, построенная на основе данных по ISSR-PCR-спектрам *Elymus pendulinus* и *E. gmelinii*, через программу TREECON v. 1.3b. В узлах указаны значения бутстреп-поддержки. Шкала вверху – генетические расстояния по Nei, Li (1979).

Джиргинского р-на Бурятии (BUD-0774). Тем не менее рассмотренный нами выше образец из Бичурского р-на Бурятии (BUC-1108), ости которого в природных условиях не отклонялись в стороны, что не характерно для *E. gmelinii*, показал полную принадлежность к данному виду и объединился с остальными образцами из этого же района.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, поэтапно рассматривая различные критерии, указывающие на возможность протекания интрогрессивных процессов между видами – от морфологических и эколого-географических до молекулярно-генетических, мы сделали вывод, что виды *E. pendulinus* и *E. gmelinii* являются отчетливо обособленными. Признаков интрогрессии у изученных образцов при совместном произрастании видов нами не обнаружено. Тем не менее для подкрепления данного вывода в пер-

спективе необходимо проведение гибридизации между выборочными биотипами двух видов, поскольку данные о репродуктивной совместимости в эксперименте существенно углубляют сведения о филогенетических отношениях между близкородственными таксонами рода *Elymus*.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках проектов № 11-04-00861, 13-04-01715а, 14-04-31-962-мол_а и 14-34-50524мол_рф_нр.

ЛИТЕРАТУРА

- Агафонов А.В., Агафонова О.В.** SDS-электрофорез белков эндосперма у представителей рода пырейник (*Elymus* L.) с различной геномной структурой // Сиб. биол. журн. 1992. Вып. 3. С. 7–12.
- Агафонов А.В., Баум Б.Р.** Индивидуальная изменчивость и репродуктивные свойства половых гибридов внутри комплекса *Elymus trachycaulus* (Poaceae: Triticeae) и близких таксонов. 1. Полиморфизм запасных белков эндосперма у биотипов Северной Америки и Евразии // *Turczaninowia*. 2000. Т. 3, вып. 1. С. 63–75.
- Агафонов А.В., Герус Д.Е.** Исследование полиморфного комплекса *Elymus charkeviczii* Probat. s. l. (Triticeae: Poaceae) полуострова Камчатка с позиций биосистематики и таксономической генетики // Раст. мир Азиатской России. 2008. № 1. С. 58–70.
- Агафонов А.В., Герус Д.Е., Дорогина О.В.** Самоопыление видов рода *Elymus* (Triticeae: Poaceae) и его отражение на полипептидных спектрах белков эндосперма // Сиб. ботан. вестн.: электрон. журн. 2008. Т. 3, вып. 1–2. С. 21–26. <http://journal.csbg.ru>
- Агафонов А.В., Герус Д.Е., Кобозева Е.В.** Дифференциация StY-геномных видов рода *Elymus* (Poaceae) в Азиатской России по данным морфологии, изменчивости запасных белков эндосперма, гистона H1 и ДНК маркеров // Материалы IV Междунар. конф. “Проблемы изучения растительного покрова Сибири”. Томск, 2010. С. 7–9.
- Асбаганов С.В., Кобозева Е.В.** Полиморфизм ISSR-маркеров у *Elymus pendulinus*, *E. brachypodioides*, *E. vernicosus* (Triticeae: Poaceae) как один из критериев генетической дифференциации видов // Материалы II (X) Междунар. бот. конф. молодых ученых (11–16 нояб. 2012 г., г. Санкт-Петербург). СПб., 2012. С. 15.
- Герус Д.Е., Агафонов А.В.** Свидетельства межвидовой интрогрессии в смешанных популяциях *Elymus komarovii*, *E. transbaicalensis* (Triticeae: Poaceae) и некоторых морфологически близких видов Горного Алтая // Сиб. ботан. вестн.: электрон. журн. 2007. Т. 2, вып. 1. С. 17–25. <http://journal.csbg.ru>
- Доброхотов В.Н., Малько А.М., Кистанова В.Ю.** Семена сорных растений. М., 2008. 496 с.
- Кобозева Е.В., Овчинникова С.В., Агафонов А.В.** Изменчивость и таксономические взаимоотношения между StY-геномными видами *Elymus pendulinus*, *E. brachypodioides* и *E. vernicosus* (Triticeae: Poaceae) // Раст. мир Азиатской России. 2012. Вып. 2 (10). С. 87–93.
- Кобозева Е.В., Агафонов А.В., Овчинникова С.В.** Морфологическая и географическая дифференциация *Elymus gmelinii* (Triticeae, Poaceae) в Северной Азии // Там же. 2014. № 4 (16). С. 15–25.
- Мальшев Л.И.** Таксономические и хорологические исследования по программе “Флора Сибири” (1981–1995) // Бот. журн. 1987. Т. 72, № 6. С. 854–858.
- Пешкова Г.А.** *Elymus* L. – Пырейник // Флора Сибири. Новосибирск, 1990. Т. 2. С. 17–32.
- Пробатова Н.С.** Мятликовые, или Злаки – Poaceae Varnh. (Gramineae Juss.) // Сосудистые растения советского Дальнего Востока. Л., 1985. Т. 1. С. 89–382.
- Работнов Т.А.** Жизненный цикл многолетних травянистых растений в луговых ценозах // Тр. БИН АН СССР. Сер. 3. Геоботаника. М., 1950. Вып. 6. С. 7–204.
- Серебрякова Т.И.** Морфогенез растений и жизненных форм злаков. М., 1971. 360 с.
- Харкевич С.С.** Флористические районы советского Дальнего Востока // Сосудистые растения советского Дальнего Востока. Л., 1985. Т. 1. С. 20–22.

- Цвелев Н.Н.** О геномном критерии родов у высших растений // Бот. журн. 1991. Т. 76, № 5. С. 669–676.
- Цвелев Н.Н.** О роде *Elymus* L. (Poaceae) в России // Там же. 2008. Т. 93, № 10. С. 1587–1596.
- Цвелев Н.Н., Пробатова Н.С.** Роды *Elymus* L., *Elytrigia* Desv., *Agropyron* Gaertn., *Psathyrostachys* Nevski и *Leymus* Hochst. (Poaceae: Triticeae) во флоре России // Комаровские чтения. Владивосток, 2010. Вып. 57. С. 5–102.
- Barkworth M.E., Cambell J.J.N., Salomon B.** *Elymus* L. // Flora of North America / Eds. M.E. Barkworth et al. N.Y.; Oxford, 2007. V. 24. P. 288–343.
- Dewey D.R.** The genomic system of classification as a guide to intergeneric hybridization with the perennial Triticeae // Gene manipulation in plant improvement / Ed. J.P. Gustafson. N.Y., 1984. P. 209–279.
- Kostina E.V., Agafonov A.V., Salomon B.** Electrophoretic properties and variability of endosperm proteins of *Elymus caninus* (L.) L. // Triticeae III / Ed. A.A. Jaradat, Enfield; New Hampshire, 1998. P. 265–272.
- Laemmli U.K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. V. 227, No. 5259. P. 680–685.
- Lu B.-R.** The genus *Elymus* in Asia. Taxonomy and biosystematics with special reference to genomic relationships // Proc. 2nd Int. Triticeae Symp. / Eds. R.R.-C. Wang, K.B. Jensen, C. Jaussi. Logan, 1994. P. 219–233.
- Lu B.-R., Salomon B.** Differentiation of the SY-genomes in Asiatic *Elymus* // Hereditas. 1992. V. 116. P. 121–126.
- Nei M., Li W.-H.** Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76, No. 10. P. 5269–5273.
- Peer Van de Y., Wachter R.D.** TREECON for Windows: A software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment // Comput. Appl. Biosci. 1994. V. 10. P. 569–570.
- Sun G., Salomon B.** Molecular evolution and origin of tetraploid *Elymus* species // Breeding Science. 2009. V. 59. P. 487–491.