

Выявление геномного состава аллополиплоидных видов рода *Elymus* (Poaceae: Triticeae) Азиатской России с помощью CAPS-анализа

А.В. Агафонов¹✉, Е.В. Шабанова (Кобозева)¹, С.В. Асбаганов¹, А.В. Мглинец², В.С. Богданова²

¹ Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

✉ e-mail: agalex@mail.ru

Аннотация. Род *Elymus* L. наряду с пшеницей, рожью и ячменем принадлежит к трибе Triticeae. Помимо своего хозяйственного значения, эта триба характеризуется широким распространением аллополиплоидных таксонов, которые формируются в ходе межвидовой и межродовой гибридизации и последующих преобразований вовлеченных в гибридизацию диплоидных геномов. Для идентификации исходных геномов в составе полиплоидов удобны малокопийные ядерные гены, менее подверженные процессам реорганизации, чем повторенные некодирующие элементы. В настоящей работе разработан удобный CAPS-маркер для различения базисных геномов St, H, Y, входящих в состав азиатских видов рода *Elymus*, с помощью электрофоретического анализа фрагментов рестрикции ПЦР-амплифицированного участка гена, кодирующего β-амилазу. В России распространено около 50 видов *Elymus* предположительно трех гапломных комбинаций: StH, StY и StHY. Наименее изученными остаются бореальные StH-геномные виды – эндемики Российской Федерации. По результатам анализа ранее изученных разными авторами нуклеотидных последовательностей гена β-амилазы была отобрана эндонуклеаза рестрикции *TaqI*, которая имела различающиеся по положению сайты узнавания в составе вышеуказанного фрагмента из геномов St, H и Y. В результате расщепления ПЦР-продукта эндонуклеазой *TaqI* у каждого из исходных гапломов формировался специфичный паттерн фрагментов рестрикции, легко визуализируемый в агарозном геле. Проанализирована выборка из 68 образцов, принадлежащих 32 видам. У 15 видов была подтверждена ранее известная геномная конституция, у *E. kamoji* этот метод не позволил выявить присутствие генома H. Предполагается возможное происхождение данного варианта генома H от другого вида *Hordeum*. У 16 видов геномная конституция определена впервые. Показано, что большинство изученных видов бореальной группы видов из Сибири и Российского Дальнего Востока имеют геномную конституцию StStHH. Исключение составил *E. amurensis*, филогенетически близкий к StY-геномному виду *E. ciliaris* и также имеющий геномный состав StStYY. Сделан вывод, что основное видовое разнообразие StH-геномной группы находится севернее центра происхождения большинства StY-геномных видов рода.

Ключевые слова: *Elymus*; таксономия; аллополиплоиды; геномная конституция; CAPS-маркеры.

Для цитирования: Агафонов А.В., Шабанова (Кобозева) Е.В., Асбаганов С.В., Мглинец А.В., Богданова В.С. Выявление геномного состава аллополиплоидных видов рода *Elymus* (Poaceae: Triticeae) Азиатской России с помощью CAPS-анализа. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(2):115-122. DOI 10.18699/VJ20.606

Identification of genome compositions in allopolyploid species of the genus *Elymus* (Poaceae: Triticeae) in the Asian part of Russia by CAPS analysis

A.V. Agafonov¹✉, E.V. Shabanova (Kobozeva)¹, S.V. Asbaganov¹, A.V. Mglinets², V.S. Bogdanova²

¹ Central Siberian Botanical Garden of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Russia, Novosibirsk, Russia

² Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: agalex@mail.ru

Abstract. The genus *Elymus* L., together with wheat, rye, and barley, belongs to the tribe Triticeae. Apart from its economic value, this tribe is characterized by abundance of polyploid taxa formed in the course of remote hybridization. Single-copy nuclear genes are convenient markers for identification of source genomes incorporated into polyploids. In the present work, a CAPS-marker is developed to distinguish basic St, H, and Y genomes comprising polyploid genomes of Asiatic species of the genus *Elymus*. The test is based on electrophoretic analysis of restriction patterns of a PCR-amplified fragment of the gene coding for beta-amylase. There are about 50 *Elymus* species in Russia, and most of them are supposed to possess one of three haplome combinations, StH, StY and StHY. Boreal StH-genomic species endemic for Russia are the least studied. On the basis of nucleotide sequences from public databases, *TaqI* restrictase was selected, as it produced patterns of restriction fragments specific for St, H, and Y haplomes easily recognizable in agarose gel. A sample of 68 accessions belonging to 32 species was analyzed. In 15 species, the earlier known genomic constitutions were confirmed, but in *E. kamoji* this assay failed to reveal the presence of H genome. This unusual H ge-

nome was suggested to originate from a different *Hordeum* species. In 16 species, genomic constitutions were identified for the first time. Fifteen accessions from Asian Russia possessed the genomic constitution StStHH, and *E. amurensis*, phylogenetically close to the StY-genomic species *E. ciliaris*, had the genomic constitution StStYY. It is inferred that the center of species diversity of the StH-genomic group is shifted to the north as compared to the center of origin of StY-genomic species, confined to China.

Key words: *Elymus*; taxonomy; allopolyploids; genome constitution; CAPS markers.

For citation: Agafonov A.V., Shabanova (Kobozeva) E.V., Asbaganov S.V., Mglinets A.V., Bogdanova V.S. Identification of genome compositions in allopolyploid species of the genus *Elymus* (Poaceae: Triticeae) in the Asian part of Russia by CAPS analysis. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii*=Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2020;24(2):115-122. DOI 10.18699/VJ20.606

Введение

Род *Elymus* L. – крупнейший род трибы Triticeae Dum. и, по оценкам, насчитывает от 150 до 200 видов (Dewey, 1984; Barkworth, 2000). Он представлен исключительно аллополиплоидными таксонами с геномным составом, включающим несколько основных геномов (гапломов) в разных сочетаниях. Генетическая основа рода *Elymus* образована пятью гапломами (St, H, Y, P, W), происходящими от различных родов трибы Triticeae (St – *Pseudoroegneria*, H – *Hordeum*, P – *Agropyron*, W – *Astralopyrum*, Y – донор неизвестен). С момента установления геномной конституции видов рода *Elymus* ее стали предлагать в качестве стабильного генетического критерия для классификации таксонов (Löve, 1984). За относительно короткий промежуток времени в систематике трибы Triticeae произошли существенные изменения в связи с геномной системой классификации, предложенной D.R. Dewey (1984). За 20 последующих лет было идентифицировано шесть самостоятельных родов в соответствии с геномной конституцией входящих в них таксонов: *Douglasdeweya* C. Yen, J.L. Yang & B.R. Baum (PPStSt), *Roegneria* C. Koch (StStYY), *Anthosachne* Steudel (StStWWYY), *Kengyia* C. Yen & J.L. Yang (PPStStYY), *Campeiostrachys* Drobow (HHStStYY) и *Elymus* L. (StStHH, StStStHH, StStHHHH).

Однако, отклоняясь от принципов A. Löve, многие ботаники до настоящего времени помещают несколько геномных комбинаций в единый род *Elymus* s. l. При этом примерно у 40 % видов геномная конституция еще не определена (Okito et al., 2009). Для территории России в настоящее время признается 53 вида рода *Elymus*, подразделенного на четыре секции (Цвелев, 2008; Цвелев, Пробатова, 2010). При этом в состав двух секций (*Elymus* и *Goulardia* (Husn.) Tzvelev) включены виды с разными геномными формулами, что с очевидностью нарушает филогенетический принцип их построения. По нашему предположению, в России распространены виды только трех гапломных комбинаций: StH, StY и StHY (Агафонов и др., 2015). Наименее изученными остаются бореальные StH-геномные виды – эндемики РФ. Если придерживаться зарубежной системы таксонов, то виды *Elymus* должны быть распределены по трем родам в соответствии с геномной конституцией: *Elymus*, *Roegneria* и *Campeiostrachys*. На наш взгляд, подразделение видов рода территории России на отдельные самостоятельные роды нецелесообразно из-за сложностей в морфологической идентификации таких родов. Но при этом классификация внутривидовых таксонов на основе геномной конституции видов абсолютно необходима для построения филогенетически ориентированной системы рода.

Ранее для идентификации геномов у представителей трибы Triticeae были применены CAPS-маркеры (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences – полиморфизм рестриционных фрагментов амплифицированной ДНК) (Gostimsky et al., 2005; Li et al., 2007; Hu et al., 2014; Шавруков, 2015). Из преимуществ использования CAPS-маркеров можно отметить кодоминантность наследования, нетребовательность к количеству геномной ДНК и невысокую стоимость.

CAPS-маркеры были впервые применены нами в целях идентификации геномной конституции видов рода *Elymus* (Кобозева и др., 2017). Для этого были разработаны праймеры на основе известных последовательностей гена β-амилазы (Mason-Gamer, 2013), которые включали 38 последовательностей из гапллома St, 23 – из гапллома H и 15 – из гапллома Y, принадлежащих 24 видам *Elymus*, в том числе 14 – с геномным составом StStHH, 9 – с геномным составом StStYY и 1 – StStHHUkUk (*Elytrigia repens*). Проведен поиск вариабельных позиций, которые одинаковы у всех представителей одного генома и отличаются этот геном от двух остальных. При этом особое внимание уделялось тем геном-специфичным заменам, которые приводят к возникновению/исчезновению сайтов узнавания эндонуклеазами рестрикции. Установлено, что обработка ПЦР-продукта рестриктазой *TaqI* приводила к возникновению геном-специфичных паттернов рестрикции. В настоящей работе мы применяем метод CAPS-анализа для изучения большой выборки видов *Elymus* с территории азиатской части России для выяснения их геномной конституции, которая до настоящего времени не была известна.

Материалы и методы

В анализ были взяты 68 образцов видов, распространенных на территории России, с ранее установленной (табл. 1) и неизвестной (табл. 2) геномной конституцией (ГК). Номенклатура видов приведена согласно Н.Н. Цвелеву и Н.С. Пробатовой (2010). Были использованы образцы из биоресурсной научной коллекции Центрального сибирского ботанического сада Сибирского отделения Российской академии наук (ЦСБС СО РАН) – «Коллекция живых растений в открытом и закрытом грунте», их идентификационные номера приведены в табл. 1 и 2. Префиксы соответствуют географическому происхождению образцов.

Тотальную ДНК выделяли из 20 мг сухой зеленой массы с использованием набора NucleoSpin Plant II Kit (Macherey-Nagel, Германия) по протоколу производителя. Реакцию амплификации фрагмента гена β-амилазы проводили в термоциклере C-1000 (Bio-Rad, США) с исполь-

Таблица 1. Образцы видов рода *Elymus* с известной геномной конституцией, установленной классическим цитогенетическим методом

№ образца	Вид <i>Elymus</i> ; образец	Геномная конституция	Местонахождение, авторы сбора
1	<i>E. kamoji</i> ; CCH-1395	StHY (Zhou et al., 1999)	КНР, провинция Сичуань, окрестности г. Ченду, фрагмент леса в Панда-парке, alt. 527 м, N 30°44.253' E 104°8.453' (А. Агафонов, Е. Кобозева)
2	<i>E. kamoji</i> ; SLA-1276	»	Приморский край, Хасанский р-н, г. Славянка, прибрежный луг, alt. 1 м, N 42°52.101' E 131°22.987' (А. Агафонов)
3	<i>E. dahuricus</i> ; BUD-0781	StHY (Dewey, 1984)	Республика Бурятия, Джиргинский р-н, окрестности пос. Нижний Торей, долина р. Торейка, луговой склон, alt. 863 м, N 50°34.567' E 104°52.571' (Н. Бадмаева)
4	<i>E. dahuricus</i> ; CHJ-1516	»	Китайская Народная Республика, провинция Цзилинь, лесопосадки в окрестностях оз. Цаган-Нур, alt. 138 м, N 45°12.106' E 124°25.074' (С. Асбаганов)
5	<i>E. schrenkianus</i> ; AKA-0702	StHY (Lu, Bothmer, 1992)	Республика Алтай, Кош-Агачский р-н, каменистый луг в долине р. Каланегир, alt. 2283 м, N 49°37.896' E 88°29.441' (С. Лукьянчиков)
48	<i>E. schrenkianus</i> ; AUK-0652	»	Республика Алтай, Кош-Агачский р-н, плато Укок, 80 м севернее автотрассы, каменистый луг в долине ручья, alt. 2445 м, N 49°30.418' E 88°5.012' (А. Агафонов, В. Salomon)
6	<i>E. pendulinus</i> ; VOK-0738	StY (Jensen, 1990)	Приморский край, окрестности г. Владивосток, кустарник в зоне отчуждения у железнодорожной станции Океанская; alt. 7 м, N 43°14.10' E 132°0.19' (А. Агафонов)
7	<i>E. pendulinus</i> ; CHE-1044	»	Республика Алтай, окрестности Чемальского р-на, окрестности пос. Чемал, район слияния рек Катунь и Чемал, alt. 434 м, N 51°23.533' E 86°00.197' (Е. Кобозева)
8	<i>E. gmelinii</i> ; AUS-1013	StY (Jensen, Hatch, 1989)	Республика Алтай, Шебалинский р-н, окрестности г. Усть-Сема, галечник в пойме р. Катунь, левый берег, alt. 341 м, N 51°37.620' E 85°45.923' (А. Агафонов, Е. Кобозева)
9	<i>E. sibiricus</i> ; ACH-1601	StH (Dewey, 1974)	Республика Алтай, перевал Чике-Таман, правая обочина автотрассы, 500 м севернее смотровой площадки, alt. 1250 м, N 50°38.911' E 86°18.789' (Е. Кобозева)
10	<i>E. caninus</i> ; OSE-1423	StH (Dewey, 1968)	Республика Северная Осетия–Алания, Алагирский р-н, экотропа в долине р. Цейдон, alt. 1951 м, N 42°47.139' E 43°53.605' (А. Агафонов, М. Агафопова)
11	<i>E. caninus</i> ; OSE-1427	»	Республика Северная Осетия–Алания, Ирафский р-н, окрестности пос. Стур-Дигора, западный склон хр. Большой Кавказ, долина правее притока р. Урух, alt. 1996 м, N 42°52.898' E 43°35.959' (С. Асбаганов)
12	<i>E. caninus</i> ; UKU-1617	»	Республика Башкортостан, Белорецкий р-н, окрестности пос. Новоабзаково, сухой луг в смешанном лесу, alt. 618 м, N 53°48.718' E 58°40.377' (А. Агафонов, С. Асбаганов)
13	<i>E. gmelinii</i> ; BKA-0962	StY (Jensen, Hatch, 1989)	Приморский край, окрестности г. Большой Камень, подножие каменистых осыпей, alt. 41 м, N 43°7.513' E 132°25.133' (А. Агафонов)
14	<i>E. fedtschenkoi</i> ; KSA-0935	StY (Liu, Dewey, 1983)	Казахстан, хр. Южный Алтай, западный макросклон, alt. 1791 м, N 49°05.077' E 86°04.483' (Д. Герус)
49	<i>E. fedtschenkoi</i> ; KME-1729	»	Казахстан, хр. Заилийский Алатау, окрестности пос. Медеу, высокогорный каменистый луг, alt. 3223 м, N 43°07.101' E 77°06.828' (С. Асбаганов)
50	<i>E. fedtschenkoi</i> ; AUR-1714	»	Республика Алтай, Улаганский р-н, долина р. Ярлы-Амры, высокогорный каменистый луг, alt. 2180 м, N 50°19.044' E 087°43.049' (Е. Кобозева)
51	<i>E. nevskii</i> ; KME-1728	StY (Dewey, 1980)	Казахстан, хр. Заилийский Алатау, окрестности пос. Медеу, высокогорный каменистый луг, alt. 3223 м, N 43°07.101' E 77°06.828' (С. Асбаганов)
15	<i>E. fibrosus</i> ; ABZ-1602	StH (Dewey, 1984)	Республика Башкортостан, Белорецкий р-н, окрестности пос. Новоабзаково, обочина грунтовой дороги в смешанном лесу, alt. 546 м, N 53°47.845' E 58°37.291' (А. Агафонов, С. Асбаганов)
16	<i>E. mutabilis</i> ; KHA-1210	»	Красноярский край, Шушенский р-н, Шушенский бор, alt. 495 м, N 52°49.622' E 91°26.609' (С. Асбаганов)
17	<i>E. mutabilis</i> ; ABZ-1607	»	Республика Башкортостан, Белорецкий р-н, окрестности пос. Новоабзаково, обочина грунтовой дороги в смешанном лесу, alt. 546 м, N 53°47.845' E 58°37.291' (А. Агафонов, С. Асбаганов)
26	<i>E. abolinii</i> ; BUD-0780	StY (Jensen, 1989)	Республика Бурятия, Джиргинский р-н, окрестности пос. Нижний Торей, долина р. Торейка, опушка лиственничного леса, alt. 863 м, N 50°34.634' E 104°52.781' (Н. Бадмаева)
27	<i>E. ciliaris</i> ; VOK-0711	StY (Dewey, 1984)	Окрестности г. Владивосток, кустарник в зоне отчуждения между железнодорожными станциями Санаторная и Океанская, alt. 4 м, N 43°13.94' E 131°59.95' (Д. Герус, А. Агафонов)
38	<i>E. panormitanus</i> ; H4152*	StY (Lu, Salomon, 1992)	СССР, Украина, Крым
39	<i>E. caucasicus</i> ; H3207*	StY (Jensen, Wang, 1991)	СССР, Армения, окрестности г. Дилижан
66	<i>E. confusus</i> ; BUM-0505	StH (Lu et al., 1995)	Республика Бурятия, Тункинский р-н, окрестности пос. Монды, южный макросклон Тункинско-го хребта, каменистый берег ручья, alt. 1738 м, N 51°42.610' E 100°59.967' (Д. Герус, А. Агафонов)
67	<i>E. confusus</i> ; TAR-0730	»	Республика Тува, Тес-Хемский р-н, перевал Шуурмак–Самагалтай, северо-западные отроги хр. Хорумнуг–Тайга, елово-лиственничный лес, alt. 1545 м, N 50°36.870' E 95°10.729' (И. Артемов)

Примечание. Нумерация образцов соответствует трекам на рис. 2.

* Образцы получены от д-ра В. Salomon (Шведский аграрный университет, отделение селекции растений, Алнарп, Швеция).

Таблица 2. Образцы видов рода *Elymus* с неизвестной геномной конституцией с территории России

№ об-разца	Вид <i>Elymus</i> ; образец	Местонахождение, авторы сбора
18	<i>E. uralensis</i> ; UKU-1617	Республика Башкортостан, Белорецкий р-н, окрестности пос. Новоабзаково, сухой луг в смешанном лесу, alt. 618 м, N 53°48.718' E 58°40.377' (А. Агафонов, С. Асбаганов)
19	<i>E. viridiglumis</i> ; UKU-1618	Республика Башкортостан, Белорецкий р-н, окрестности пос. Новоабзаково, гора Куркак, высокотравный луг в березовом редколесье, alt. 619 м, N 53°48.718' E 58°40.377' (А. Агафонов, С. Асбаганов)
20	<i>E. transbaicalensis</i> ; AKU-0422	Республика Алтай, Кош-Агачский р-н, 10 км на север от пос. Чаган-Узун по Чуйскому тракту, лог Куюктанар, alt. 1815 м, N 50°9.783' E 88°19.054' (А. Агафонов, Д. Герус)
21	<i>E. transbaicalensis</i> ; GAR-0530	Республика Бурятия, Окинский р-н, автотрасса на пос. Орлик, галечник у р. Гарган, alt. 1610 м, N 52°05.947' E 100°23.005' (А. Агафонов, Д. Герус)
22	<i>E. margaritae</i> ; GUK-1009	Республика Алтай, Усть-Коксинский р-н, гора Красная, комплекс курумов и высокогорных лугов, alt. 2028 м, N 50°4.495' E 85°13.073' (Д. Никонова, Е. Кобозева)
23	<i>E. margaritae</i> ; AUK-0650	Республика Алтай, Кош-Агачский р-н, плато Уюк, 80 м севернее автотрассы, каменистый луг в долине ручья, alt. 2438 м, N 49°30.418' E 88°05.012' (А. Агафонов, В. Salomon)
24	<i>E. komarovii</i> ; AKU-0458	Республика Алтай, Кош-Агачский р-н, 10 км на север от пос. Чаган-Узун по Чуйскому тракту, лог Куюктанар, alt. 1815 м, N 50°9.783' E 88°19.054' (А. Агафонов, Д. Герус)
25	<i>E. transbaicalensis</i> ; TUV-9697	Республика Тува, Тоджинский р-н, заповедник Азас, кордон Илги-Чул (Д. Шауло)
28	<i>E. komarovii</i> ; AKT-0417	Республика Алтай, Кош-Агачский р-н, Северо-Чуйский хребет, ущелье Актру, граница леса и грунтовой дороги, alt. 2061 м, N 50°6.518' E 87°48.193' (А. Агафонов, Д. Герус)
29	<i>E. komarovii</i> ; GAR-0501	Республика Бурятия, Окинский р-н, долина р. Ока, лесная поляна в 50 м от русла р. Гарган, alt. 1607 м, N 52°05.947' E 100°23.005' (А. Агафонов, Д. Герус)
30	<i>E. komarovii</i> ; JPO-1505	Республика Якутия (Саха), Хангаласский р-н, окрестности г. Покровск, луг у автостанции, alt. 131 м, N 61°29.367' E 129°08.225' (Е. Кобозева, С. Асбаганов)
31	<i>E. subfibrosus</i> ; ANA-1118	Чукотский автономный округ, окрестности г. Анадырь (Д. Лысенко)
32	<i>E. subfibrosus</i> ; LEN-1524	Республика Саха (Якутия), Хангаласский улус, западные Ленские столбы, alt. 156 м, N 61°6.370' E 127°21.593' (Е. Кобозева, С. Асбаганов)
33	<i>E. macrourus</i> ; 12-0135	Восточный Таймыр, район слияния рек Большая Лесная Рассоха и Новая. Галечная пойма в устье Большой Лесной Рассохи, alt. 2 м, N 72°37.363' E 101°17.793' (Е. Поспелова)
34	<i>E. jacutensis</i> ; 13-0443	Юго-Восточный Таймыр, окраина Анабарского плато, район слияния рек Эриечка и Нямакит-Далдын, лужайка под скалами, alt. 218 м, N 71°15.250' E 105°37.452' (И. Поспелов)
35	<i>E. sajanensis</i> ; ZUN-0502	Республика Бурятия, Окинский р-н, окрестности пос. Зун-Холбо, alt. 1682 м, N 52°10.092' E 100°57.581' (А. Агафонов, Д. Герус)
36	<i>E. sajanensis</i> ; ART-0202	Республика Алтай, Кош-Агачский р-н, хр. Чихачева, галечник по левому притоку р. Бугузун, alt. 2254 м, N 50°1.914' E 89°23.620' (И. Артемов)
37	<i>E. amurensis</i> ; MES-1111	Приморский край, Хасанский р-н, окрестности Морской экспериментальной станции ТИБОХ ДВО РАН, луговой фрагмент у обочины грунтовой дороги, alt. 93 м, N 42°37.045' E 131°8.650' (Е. Кобозева, А. Агафонов)
40	<i>E. transbaicalensis</i> ; AKT-0628	Республика Алтай, Кош-Агачский р-н, Северо-Чуйский хребет, ущелье Актру, ивняк у альплагеря, alt. 2118 м, N 50°5.038' E 87°46.820' (А. Агафонов, Д. Герус)
41	<i>E. kronokensis</i> ; BER-0804	Республика Бурятия, Еравнинский р-н, юго-восточнее вахтового пос. Озерный, лиственничник, alt. 1154 м, N 52°58.625' E 111°38.166' (О. Аненхонов)
42	<i>E. kronokensis</i> ; MMA-1103	Магаданская область, Тенькинский р-н, окрестности пос. Мадаун, горенник в пойме р. Арманы, alt. 627 м, N 60°35.861' E 150°40.862' (Д. Лысенко)
43	<i>E. kronokensis</i> ; KES-9603	Камчатский край, Быстринский р-н, южный склон горы на север от пос. Эссо, alt. 627 м, N 55°55.945' E 158°41.275' (А. Агафонов, В. Salomon)
44	<i>E. lenensis</i> ; 12-0125	Восточный Таймыр, район слияния рек Большая Лесная Рассоха и Новая, байджарах на берегу озера, alt. 39 м, N 72°39.613' E 101°17.079' (И. Поспелов)
45	<i>E. kamczadalarum</i> ; KSO-9623	Камчатский край, Елизовский р-н, окрестности пос. Сосновка, alt. 247 м, N 53°5.046' E 158°17.918' (А. Агафонов, В. Salomon)
46	<i>E. charkeviczii</i> ; KES-9670	Камчатский край, Быстринский р-н, окрестности пос. Эссо, обочина грунтовой дороги, alt. 484 м, N 55°55.014' E 158°42.116' (А. Агафонов, В. Salomon)
47	<i>E. charkeviczii</i> ; MSN-1202	Городской округ Магадан, пос. Снежный, тропа у границы леса, alt. 145 м, N 59°43.466' E 150°52.677' (Н. Бадмаева)
52	<i>E. lenensis</i> ; LEN-1520	Республика Саха (Якутия), Хангаласский р-н, луговой склон на правом берегу р. Лена, alt. 114 м, N 61°6.369' E 127°21.593' (Е. Кобозева, С. Асбаганов)
53	<i>E. lenensis</i> ; ALD-1539-3	Республика Саха (Якутия), Алданский р-н, левый берег р. Алдан, кустарник у песчаной отмели, alt. 228 м, N 58°40.878' E 128°33.081' (Е. Кобозева, С. Асбаганов)

Окончание табл. 2

№ образца	Вид <i>Elymus</i> ; образец	Местонахождение, авторы сбора
54	<i>E. kronokensis</i> ; KRT-1611	Красноярский край, Эвенкийский р-н, окрестности пос. Тура, р. Нижняя Тунгуска, лиственничник, обочина тропы, alt. 169 м, N 64°16.478' E 100°16.445' (Л. Кривобоков)
55	<i>E. kronokensis</i> ; 12-0137	Восточный Таймыр, береговой обрыв на р. Большая Лесная Рассоха, alt. 2 м, N 72°35.808' E 101°15.900' (Е. Поспелова)
56	<i>E. kronokensis</i> ; TAL-0602	Республика Алтай, Кош-Агачский р-н, долина р. Талдура, лиственничник по склону горы, alt. 2095 м, N 49°57.472' E 87°57.552' (Д. Герус, А. Агафонов)
57	<i>E. subfibrosus</i> ; KRT-1612	Красноярский край, Эвенкийский р-н, пос. Тура, обочина грунтовой дороги, alt. 309 м, N 64°16.920' E 100°14.880' (Л. Кривобоков)
58	<i>E. subfibrosus</i> ; JRO-1733	Республика Саха (Якутия), Томпонский р-н, автотрасса Колыма, южные отроги Верхоянского хребта, долина р. Росомаха, приток р. Ильгувеем, alt. 460 м, N 63°2.879' E 137°52.610' (Н. Бадмаева)
59	<i>E. jacutensis</i> ; ALU-1711	Республика Алтай, Улаганский р-н, разнотравный луг на левом берегу р. Чулышман под перевалом Кату-Ярык, alt. 733 м, N 50°55.497' E 088°12.226' (Е. Кобозева)
60	<i>E. jacutensis</i> ; GAN-1516	Республика Алтай, Чемальский р-н, окрестности пос. Анос, склон к левому берегу р. Анос у моста, alt. 380 м, N 51°30.014' E 85°57.160' (Е. Кобозева)
61	<i>E. jacutensis</i> ; ALD-1541	Республика Саха (Якутия), Алданский р-н, левый берег р. Алдан, кустарник у песчаной отмели, alt. 228 м, N 58°40.878' E 128°33.081' (Е. Кобозева, С. Асбаганов)
62	<i>E. macrourus</i> ; MTE-1210	Магаданская область, Тенькинский р-н, обочина автотрассы у границы смешанного леса, alt. 970 м, N 60°26.034' E 150°58.558' (Н. Бадмаева)
63	<i>E. macrourus</i> ; LEN-1524_1	Республика Саха (Якутия), Хангаласский р-н, луговой склон на правом берегу р. Лена, alt. 114 м, N 61°6.369' E 127°21.593' (Е. Кобозева, С. Асбаганов)
64	<i>E. turuchanensis</i> ; KRE-1440	Красноярский край, Туруханский р-н, пос. Бор, на песке по берегу р. Енисей, alt. 30 м, N 61°36.265' E 90°0.143' (М. Ломоносова)
65	<i>E. peschkovae</i> ; MJA-1106	Магаданская область, Хасынский р-н, Яблоновый перевал, пойменный луг у дороги, alt. 755 м, N 60°19.467' E 151°10.540' (Д. Лысенко)
68	<i>E. peschkovae</i> ; AMU-8804	Амурская область, 60 км вниз по р. Гилкой от г. Тында, песчаный берег, alt. 445 м, N 54°56.216' E 125°21.854' (О. Потемкин)

Примечание. Нумерация образцов соответствует трекам на рис. 2.

зованием праймеров El_balg_F4 (5'-GGTACCATCGTGGACATTGAA-3') и El_balg_R4 (5'-CTGTACCACCA GTGAATGCC-3') (Кобозева и др., 2017). Реакционная смесь для ПЦР в объеме 15 мкл содержала однократный Taq буфер, по 0.2 мМ каждого dNTP, 1.5 мМ MgCl₂, 1 мкл каждого праймера, 20 нг геномной ДНК, 1 ед. HS Taq ДНК полимеразы («Евроген», РФ). Использовали следующий режим: первичная денатурация при 94 °C – 4 мин; 40 циклов: денатурация при 94 °C – 20 с, отжиг праймеров при 60 °C – 25 с, элонгация при 72 °C – 90 с; финальная элонгация – 5 мин при 72 °C. CAPS-анализ (Konieczny, Ausubel, 1993) проводили следующим образом: к 8 мкл ПЦР-амплификата добавляли TaqI буфер (до 1×), 1 ед. TaqI рестриктазы (Thermo Scientific, США), MQ-H₂O до 15 мкл. Реакционную смесь инкубировали при 65 °C в течение 1 ч, затем анализировали электрофорезом в 1.7 % агарозном геле, содержащем однократный TAE-буфер.

Результаты и обсуждение

Сравнительный анализ последовательностей гена β-амилазы, опубликованных в работе R. Mason-Gamer (2013), показал, что изучаемый фрагмент генома Y длиной около 1100 п. н. не содержал ни одного сайта рестрикции TaqI, тогда как в геноме St у него был один сайт узнавания на расстоянии ~170 п. н. от праймера El_balg_R4. Этот же сайт мог присутствовать в некоторых H-содержащих образцах, кроме того, все геномы H имели сайт узнавания на расстоянии ~280 п. н. от праймера El_balg_F4. Таким

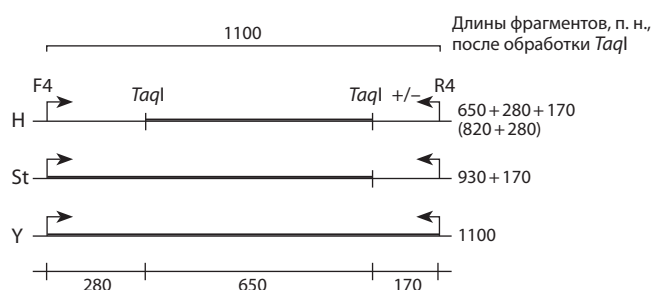


Рис. 1. Схема расположения сайтов узнавания эндонуклеазой TaqI во фрагменте гена β-амилазы в трех базисных гапломах, входящих в состав полиплоидного генома *Elymus*.

образом, при визуализации в геле геномы распознавались по самым крупным фрагментам: геном H – по наличию фрагмента длиной около 650 п. н., St – 930 п. н., Y – 1100 п. н. (рис. 1).

Нами был проведен анализ CAPS-маркера у 68 образцов (см. табл. 1 и 2). Электрофореграммы фрагментов рестрикции TaqI эндонуклеазой представлены на рис. 2. По результатам этого анализа была определена ГК исследованных образцов. Из 16 видов рода ранее известная ГК была подтверждена у 15 видов, за исключением *E. katoji*. У 16 видов ГК была определена впервые, 15 из них имели геномный состав StStHh и 1 вид, *E. amurensis*, – геномный состав StStYy (табл. 3). Вместе с тем были обнаружены некоторые ограничения при применении

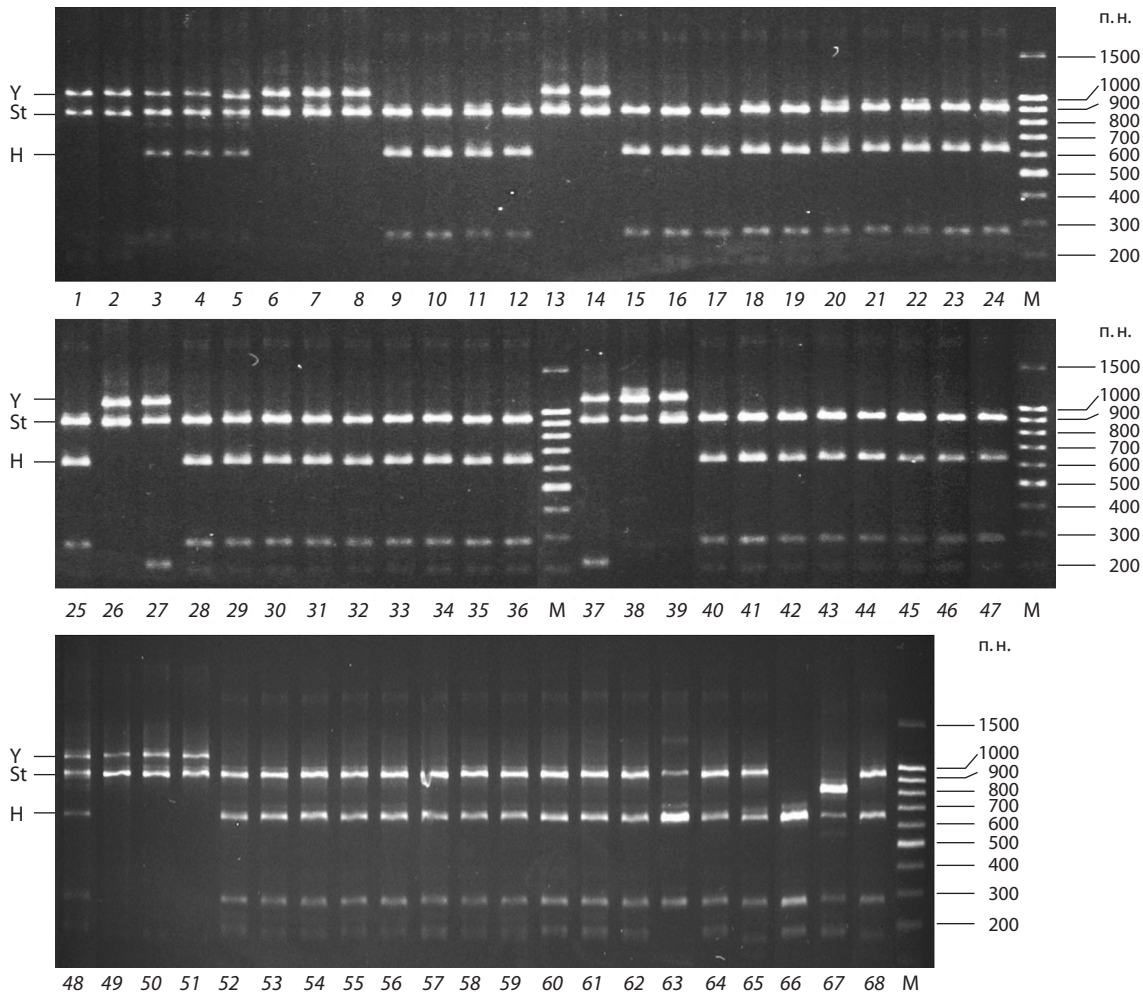


Рис. 2. Полиморфизм длин продуктов рестрикции эндонуклеазой *TaqI* амплифицированного фрагмента гена β -амилазы у видов рода *Elymus*.

Нумерация образцов соответствует табл. 1 и 2. В качестве маркера длины фрагментов использовали 100+ bp DNA Ladder («Евроген»).

Таблица 3. Список бореальных видов *Elymus* с территории азиатской части России, у которых геномная конституция (ГК) впервые определена CAPS-методом

№ п/п	Вид <i>Elymus</i>	Число изученных образцов	ГК	№ п/п	Вид <i>Elymus</i>	Число изученных образцов	ГК
1	<i>E. amurensis</i>	1	StY	9	<i>E. margaritae</i>	2	StH
2	<i>E. charkeviczii</i>	2	StH	10	<i>E. sajanensis</i>	2	StH
3	<i>E. jacutensis</i>	4	StH	11	<i>E. subfibrosus</i>	4	StH
4	<i>E. kamczadalarum</i>	1	StH	12	<i>E. transbaicalensis</i>	4	StH
5	<i>E. komarovii</i>	4	StH	13	<i>E. uralensis</i>	1	StH
6	<i>E. kronokensis</i>	6	StH	14	<i>E. viridiglumis</i>	1	StH
7	<i>E. lenensis</i>	3	StH	15	<i>E. turuchanensis</i>	1	StH
8	<i>E. macrourus</i>	3	StH	16	<i>E. peschkovae</i>	2	StH

этого метода. Так, у двух генотипов *E. kamoji* с помощью CAPS-анализа удалось обнаружить только два гаплота, St и Y, хотя, исходя из известного числа хромосом, вид является гексаплоидом, следовательно, должен содержать три базисных генома (гаплота) (см. рис. 2, 1, 2). Маловероятно, что отсутствие рестрикционных фрагментов,

соответствующих гаплоту H, обусловлено неполным гидролизом. Поскольку все представители рода содержат геном St, имеющий сайт узнавания эндонуклеазой *TaqI*, то наличие фрагментов, специфичных для этого генома, служит внутренним контролем прохождения гидролиза. Это соответствует зарубежной классификации, где вид

E. kamoji отнесен к роду *Campeiostrachys* (Baum et al., 2011), содержащему виды с геномной формулой StHY. Проведенная нами цитологическая проверка показала число хромосом $2n = 42$ у обоих образцов *E. kamoji*. Наличие у *E. kamoji* генома H, лишённого двух сайтов узнавания эндонуклеазой *TaqI*, ставит вопрос о его происхождении, которое остается невыясненным. Не исключено, что у разных представителей рода геном H получен от разных предковых таксонов, что соответствует предположению о полифилии доноров базисных гаплов (Mason-Gamer, 2013).

Интересный паттерн фрагментов рестрикции показали два образца *E. confusus* (см. рис. 2, 66 и 67), ГК которого была определена ранее как StStHH (Lu et al., 1995). У образца TAR-0730 (см. рис. 2, 67) более длинный фрагмент, соответствующий аллелю из генома St, видимо, укорочен, может быть, вследствие делеции. В спектре фрагментов образца BUM-0505 (рис. 2, 66) отсутствует фрагмент длиной около 930 п. н., происходящий из генома St, тогда как более мелкий фрагмент длиной около 170 п. н., характерный для этого гаплова, отчетливо виден. Вероятно, это объясняется мутацией в составе исследуемого гена генома St, например, приводящей к возникновению сайта узнавания для *TaqI*. Не исключена также возможность рекомбинации и/или интрогрессии между геномами St и H в ходе интенсивных микроэволюционных процессов, что косвенно подтверждается высокой морфологической изменчивостью внутри этого вида.

Таким образом, по данным CAPS-анализа, почти все вновь изученные образцы бореальной группы видов из Сибири и Дальнего Востока России имеют StH-геномный состав. Исключение составил *E. amurensis*, филогенетически близкий к StY-геномному виду *E. ciliaris* и имеющий геномный состав StY. Это означает, что центр разнообразия азиатской StH-геномной группы расположен севернее, по сравнению с таковым у StY-геномной группы, который, как считается, находится на территории Китая (Lu, Salomon, 1992). Примечательно, что в Северной Америке состав рода *Elymus* также представлен в основном StH-геномными видами, за исключением *Elymus californicus* с неясным происхождением (Mason-Gamer, 2001). Кроме того, там отмечено несколько заносных азиатских StHY- и StY-геномных видов (Barkworth et al., 2007).

Метод показал высокую точность: в данной работе ранее известная геномная конституция была подтверждена CAPS-анализом у 15 из 16 видов *Elymus*. Для 10 видов геномная формула, вновь определенная CAPS-анализом как StH, была независимо подтверждена секвенированием нуклеотидных последовательностей клонированного фрагмента гена *GBSSI* (*waxy*) (Kobozeva et al., 2018; Агафонов и др., 2019). При этом необходимо отметить относительно высокую трудоемкость секвенирования генов у полиплоидных видов ввиду необходимости использования микробиологических процедур при клонировании.

Заключение

Главное достоинство CAPS-анализа фрагмента гена β -амилазы – в его скорости и методической доступности, позволяющей анализировать большое число образцов у видов

с обширными ареалами и широкой морфологической и генетической вариабельностью. Однако следует иметь в виду, что никакой отдельно взятый молекулярный маркер не может однозначно идентифицировать вид или геном, он служит лишь маркером, но не диагнозом. Поэтому разработка дополнительных простых и доступных методов геномной идентификации новых или неизученных биотипов из локальных местообитаний остается актуальной.

Список литературы / References

- Агафонов А.В., Асбаганов С.В., Шабанова (Кобозева) Е.В., Морозов И.В., Бондарь А.А. Геномная конституция и дифференциация субгеномов эндемичных сибирских и дальневосточных видов рода *Elymus* (Poaceae) по данным секвенирования ядерного гена *waxy*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(7):817-826. DOI 10.18699/VJ19.555.
[Agafonov A.V., Asbaganov S.V., Shabanova (Kobozeva) E.V., Morozov I.V., Bondar A.A. Genome constitution and differentiation of subgenomes in Siberian and Far Eastern endemic species of the genus *Elymus* (Poaceae) according to the sequencing of the nuclear gene *waxy*. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(7):817-826. DOI 10.18699/VJ19.555. (in Russian)]
- Агафонов А.В., Кобозева Е.В., Асбаганов С.В., Шмаков Н.А. Современные достижения и перспективы в построении филогенетически ориентированной системы таксонов рода *Elymus* (Poaceae: Triticeae). Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии: Сб. статей XIV междунар. науч.-практ. конференции. Барнаул. 2015;314-322.
[Agafonov A.V., Kobozeva E.V., Asbaganov S.V., Shmakov N.A. Current achievements and prospects of construction of a phylogenetically oriented taxonomy of the genus *Elymus* (Poaceae: Triticeae). Proceedings of the 14th International Scientific and Practical Conference "Problems of Botany of Southern Siberia and Mongolia". Barnaul. 2015;314-322. (in Russian)]
- Кобозева Е.В., Мглинец А.В., Агафонов А.В. Выявление геномного состава аллополиплоидных видов рода *Elymus* (Poaceae: Triticeae) с помощью CAPS-анализа. В: Проблемы изучения растительного покрова Сибири: Матер. VI междунар. науч. конференции. Томск. 2017;155-157. DOI 10.17223/9785946216371/51.
[Kobozeva E.V., Mglinets A.V., Agafonov A.V. Identification of the genomic composition in allopolyploid species of the genus *Elymus* (Poaceae: Triticeae) with CAPS-analysis. In: Proceedings of the 6th International Conference "Issues in the Study of the Vegetation Cover in Siberia". Tomsk. 2017;155-157. DOI 10.17223/9785946216371/51. (in Russian)]
- Цвелев Н.Н. О роде *Elymus* L. (Poaceae) в России. Бот. журнал. 2008;93(10):1587-1596.
[Tsveliyov N.N. On the genus *Elymus* (Poaceae) in Russia. Botanicheskiy Zhurnal = Botanical Journal. 2008;93(10):1587-1596. (in Russian)]
- Цвелев Н.Н., Пробатова Н.С. Роды *Elymus* L., *Elytrigia* Desv., *Agropyron* Gaertn., *Psathyrostachys* Nevski и *Leymus* Hochst. (Poaceae: Triticeae) во флоре России. В: Комаровские чтения. Владивосток: Дальнаука, 2010;57:5-102.
[Tsveliyov N.N., Probatova N.S. The genera *Elymus* L., *Elytrigia* Desv., *Agropyron* Gaertn., *Psathyrostachys* Nevski, and *Leymus* Hochst. (Poaceae: Triticeae) in the flora of Russia. In: V.L. Komarov Memorial Lectures. Vladivostok: Dalnauka Publ., 2010;57:5-102. (in Russian)]
- Шавруков Ю.Н. CAPS-маркеры в биологии растений. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(2):205-213. DOI 10.18699/VJ15.026.

- [Shavrukov Y.N. CAPS markers in plant biology. Russ. J. Genet.: Appl. Res. 2016;6(3):279-287. DOI 10.1134/S2079059716030114.]
- Barkworth M.E. Changing perceptions of the Triticeae. In: Jacobs S.W.L., Everett J. (Eds.). Grasses: Systematics and Evolution. Melbourne: CSIRO, 2000;110-120.
- Barkworth M.E., Cambell J.J.N., Salomon B. *Elymus* L. In: Barkworth M.E., Capels K.M., Long S., Anderton L.K., Piep M.B. (Eds.). Flora of North America. New York; Oxford: Oxford University Press, 2007;24:288-343.
- Baum B.R., Yang J.-L., Yen C., Agafonov A.V. A taxonomic revision of the genus *Campepistachys* Drobov. J. Syst. Evol. 2011;49(2):146-159.
- Dewey D.R. Synthetic *Agropyron-Elymus* hybrids. III. *Elymus canadensis* × *Agropyron caninum*, *A. trachycaulum* and *A. striatum*. Amer. J. Bot. 1968;55:1133-1139.
- Dewey D.R. Cytogenetics of *Elymus sibiricus* and its hybrids with *Agropyron tauri*, *Elymus canadensis* and *Agropyron caninum*. Bot. Gaz. 1974;135:80-87.
- Dewey D.R. Cytogenetics of *Agropyron ugamicum* and six of its interspecific hybrids. Bot. Gaz. 1980;141:305-312.
- Dewey D.R. The genomic system of classification as a guide to intergeneric hybridization with the perennial Triticeae. In: Gustafson J.P. (Ed.). Gene Manipulation in Plant Improvement. New York: Plenum Publ. Corp., 1984;209-279.
- Gostimsky S.A., Kokaeva Z.G., Kononov F.A. Studying plant genome variation using molecular markers. Russ. J. Genet. 2005;41(4):378-388. DOI 10.1007/s11177-005-0101-1.
- Hu C.Y., Tsai Y.Z., Lin S.F. Development of STS and CAPS markers for variety identification and genetic diversity analysis of tea germplasm in Taiwan. Bot. Stud. 2014;55:12. DOI 10.1186/1999-3110-55-12.
- Jensen K.B. Cytology, fertility, and origin of *Elymus abolinii* (Drob.) Tzvelev and its F₁ hybrids with *Pseudoroegneria spicata*, *E. lanceolatus*, *E. dentatus* ssp. *ugamicus*, and *E. drobovii* (Poaceae: Triticeae). Genome. 1989;32:468-474. DOI 10.1139/g89-470.
- Jensen K.B. Cytology and morphology of *Elymus pendulinus*, *E. pendulinus* ssp. *multiculmis*, and *E. parviglume* (Poaceae: Triticeae). Bot. Gaz. 1990;151(2):245-251.
- Jensen K.B., Hatch S. Genome analysis, morphology, and taxonomy of *Elymus gmelinii* and *E. strictus* (Poaceae: Triticeae). Bot. Gaz. 1989;150(1):84-92.
- Jensen K.B., Wang R.R.C. Cytogenetics of *Elymus caucasicus* and *Elymus longearistatus* (Poaceae: Triticeae). Genome. 1991;34:860-867.
- Kobozeva E.V., Asbaganov S.V., Agafonov A.V. Genome composition and assessment of the divergence between Russian boreal species in the genus *Elymus* (Poaceae) detected on the basis of sequencing of the nuclear gene GBSSI. In: Prospects of Development and Challenges of Modern Botany. BIO Web Conf. 2018;11.00023. DOI 10.1051/bioconf/20181100023.
- Konieczny A., Ausubel F.M. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. Plant J. 1993;4(2):403-410.
- Li X.-M., Lee B.S., Mammadov A.C., Koo B.-C., Mott I.W., Wang R.R.C. CAPS markers specific to Eb, Ee, and R genomes in the tribe Triticeae. Genome. 2007;50:400-411.
- Liu C.W., Dewey D.R. The genome constitution of *Elymus fedtschenkoi*. Acta Genet. Sinica. 1983;10:20-27.
- Löve A. Conspectus of the Triticeae. Feddes Repert. 1984;95:425-521.
- Lu B.-R., Bothmer R. von. Interspecific hybridization with *Elymus himalayanus* and *E. schrenkianus*, and other *Elymus* species (Triticeae: Poaceae). Genome. 1992;35:230-237.
- Lu B.-R., Salomon B. Differentiation of the SY genomes in Asiatic *Elymus*. Hereditas. 1992;116:121-126.
- Lu B.-R., Salomon B., Bothmer R. von. Interspecific hybridization with *Elymus confusus* and *E. dolichaterus*, and their genomic relationships (Poaceae: Triticeae). Plant Syst. Evol. 1995;197:1-17.
- Mason-Gamer R.J. Origin of North American *Elymus* (Poaceae: Triticeae) allotetraploids based on granule-bound starch synthase gene sequences. Syst. Bot. 2001;26:757-768.
- Mason-Gamer R.J. Phylogeny of a genomically diverse group of *Elymus* (Poaceae) allopolyploids reveals multiple levels of reticulation. PLoS One. 2013;8(11):e78449. DOI 10.1371/journal.pone.0078449.
- Okito P., Mott I.W., Wu Y., Wang R.R. A Y genome specific STS marker in *Pseudoroegneria* and *Elymus* species (Triticeae: Gramineae). Genome. 2009;52(4):391-400.
- Zhou Y.-H., Wu B.-H., Fu T.-H., Zheng Y.-L. Morphology, fertility and cytogenetics of intergeneric hybrid between *Roegneria kamoji* Ohwi and *Dasyphyrum villosum* (L.) Candargy (Poaceae: Triticeae). J. Syst. Evol. 1999;37(2):125-130.

ORCID ID

A.V. Agafonov orcid.org/0000-0002-1403-5867
S.V. Asbaganov orcid.org/0000-0002-7482-7495

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ЦСБС СО РАН «Оценка морфогенетического потенциала популяций растений Северной Азии экспериментальными методами» (№ гос. регистрации AAAA-A17-117012610051-5), государственного задания ИЦиГ СО РАН № 0324-2019-0039-С-01, а также при частичной поддержке РФФИ (проект № 18-04-01030). При подготовке публикации использованы материалы биоресурсной научной коллекции ЦСБС СО РАН «Коллекции живых растений в открытом и закрытом грунте», УНУ № USU 440534.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 25.12.2018. После доработки 08.08.2019. Принята к публикации 30.10.2019.