

Пятая международная научная конференция PlantGen2019

Геномная конституция и дифференциация субгеномов эндемичных сибирских и дальневосточных видов рода *Elymus* (Poaceae) по данным секвенирования ядерного гена *waxy*

А.В. Агафонов¹✉, С.В. Асбаганов¹, Е.В. Шабанова (Кобозева)¹, И.В. Морозов^{2,3}, А.А. Бондарь²¹ Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия² Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия³ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

✉ e-mail: agalex@mail.ru

В России распространены 53 вида многолетних трав рода *Elymus* L. (Poaceae) предположительно трех гапломных комбинаций: StH, StY и StHY. Наименее изученными остаются бореальные StH-геномные виды – эндемики РФ. Ранее R. Mason-Gamer с соавторами в серии исследований было показано, что молекулярно-филогенетический анализ последовательностей низкокопийного гена *waxy* (*GBSS1*) существенно дополняет цитогенетические данные по геномной конституции и эволюционным взаимоотношениям как среди североамериканских, так и среди азиатских видов рода *Elymus*. Мы исследовали ген *GBSS1* у 18 видов *Elymus* из Сибири и Дальнего Востока России (включая 14 эндемичных), чтобы определить их геномную конституцию и оценить уровни филогенетической дифференциации: *E. charkeviczii*, *E. jacutensis*, *E. kamczadolorum*, *E. komarovii*, *E. kronokensis*, *E. lenensis*, *E. macrourus*, *E. margaritae*, *E. subfibrosus*, *E. sajanensis*, *E. transbaicalensis*, *E. peschkovae*, *E. uralensis*, *E. viridiglumis*. Продукты ПЦР-амплификации фрагментов гена *GBSS1* (область экзонов 9–14) были клонированы и секвенированы (по 6–8 клонов на образец). Все изученные виды включали субгеномные вариации St и H. Наиболее существенные различия между субгеномными фрагментами St и H обнаружены в интроне 13. Этот интрон в субгеноме H содержит делецию в 21 п. н. во всех генотипах *Elymus*, вероятно, унаследованную от общего предка геномов H и P. Вместо этой делеции все субгеномы St имеют относительно консервативную последовательность, близкую по нуклеотидному составу к таковой у рода *Pseudoroegneria*, предок которого является донором современного субгенома St всех видов *Elymus*. Кластерный филогенетический анализ выявил дифференциацию последовательностей каждого из субгеномов St и H на два эволюционных варианта – условно St₁ и St₂, H₁ и H₂. Установлено, что варианты субгеномов St и H гомогенны с различными современными видами предковых родов *Pseudoroegneria* и *Hordeum*: St₁ – *P. strigosa*, St₂ – *P. spicata*, H₁ – *H. jubatum*, H₂ – *H. californicum*. Выявлены особенности взаимоотношений между российскими и североамериканскими видами рода, а также ряд микроэволюционных связей в группе эндемичных бореальных видов Сибири и Дальнего Востока. Полученные новые данные необходимы для построения филогенетически ориентированной таксономической системы рода *Elymus*. Ключевые слова: *Elymus*; филогения; аллополиплоиды; геномная конституция; *GBSS1*.

Для цитирования: 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

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*

A.V. Agafonov¹✉, S.V. Asbaganov¹, E.V. Shabanova (Kobozeva)¹, I.V. Morozov^{2,3}, A.A. Bondar²¹ Central Siberian Botanical Garden, SB RAS, Novosibirsk, Russia² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: agalex@mail.ru

Fifty-three species of perennial grasses in the genus *Elymus* L. (Poaceae), which are widespread in Russia, are generally assumed to have three haplome combinations: StH, StY and StHY. The StH-genome species, endemic to Russia, remain the least studied. R. Mason-Gamer and co-authors have previously shown in a series of studies that a molecular phylogenetic analysis of the low-copy gene *waxy* (*GBSS1*) sequences significantly complements cytogenetic data on the genomic constitution and evolutionary relationships among both North American and Asian species of the genus *Elymus*. To determine the species' genomic constitution and to evaluate the level of phylogenetic differentiation, we examined the *GBSS1* gene in 18 species of *Elymus* from Siberia and the Russian Far East, including the following 14 endemics: *E. charkeviczii*, *E. jacutensis*,

E. kamczadalarum, *E. komarovii*, *E. kronokensis*, *E. lenensis*, *E. macrourus*, *E. margaritae*, *E. subfibrosus*, *E. sajanensis*, *E. transbaicalensis*, *E. peschkovae*, *E. uralensis*, and *E. viridiglumis*. PCR amplification products of *GBSS1* gene fragments (including exons 9–14) were cloned and 6–8 clones per accession were sequenced. It appears that all the species studied have St and H subgenomic gene variations. The most significant differences between the subgenomic variants St and H were found in intron 13. The H subgenome contains a 21-bp-long deletion in intron 13 in all *Elymus* genotypes, probably derived from a common ancestor of the H and P genomes. Instead of this deletion, all St subgenomes have a relatively conservative sequence similar to that of the genus *Pseudoroegneria*, whose ancestor is considered to be the donor of the modern St subgenome for all *Elymus* species. Cluster phylogenetic analysis revealed differentiation in St and H subgenome sequences into two evolutionary variants: St₁ vs. St₂ and H₁ vs. H₂, respectively. Variants of the St and H subgenomes were found homologous to various modern species of the ancestral genera *Pseudoroegneria* and *Hordeum*: St₁ to *P. strigosa*, St₂ to *P. spicata*, H₁ to *H. jubatum*, and H₂ to *H. californicum*. The details of the relationships between Russian and North American species of the genus, as well as a number of microevolutionary interconnections in the group of boreal endemic species of Siberia and the Russian Far East were revealed. The new results obtained here are essential for the development of a phylogenetically oriented taxonomic system for the genus *Elymus*.

Key words: *Elymus*; phylogeny; allopolyploids; genome constitution; *GBSS1*.

For citation: 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)

Введение

Род *Elymus* L. (Пырейник) – самый крупный род трибы *Triticeae* Dumort. семейства Poaceae Barn. Он содержит исключительно амфилоидные самоопыляющиеся виды многолетних трав (Dewey, 1984; Löve, 1984), которые широко распространены на всех континентах от Голарктики до субтропиков. При этом более половины видов произрастает в Центральной Азии (Lu, 1994). Геномная конституция всех видов образована гапломами от предков современных родов: *Pseudoroegneria* (Nevski) Á. Löve (гаплом St), *Hordeum* L. (гаплом H), *Agropyron* Gaertn. (гаплом P), *Australopyrum* (Tzvelev) Á. Löve (гаплом W) и гапломом Y от неизвестного предка. Общим для всех видов рода является гаплом St. После создания и признания геномной системы классификации трибы *Triticeae* (Dewey, 1984) стала получать распространение таксономическая система, в которой род *Elymus* в широком понимании подразделяют на самостоятельные роды на основе геномного состава видов (Baum et al., 2011): *Elymus* L. (StStHH-геном), *Roegneria* C. Koch (StStYY-геном), *Campeiostachys* Drobov (StStHHYY-геном), *Kengyia* C. Yen & J.L. Yang (StStYYPP-геном), *Douglasdeweya* C. Yen, J.L. Yang et B.R. Baum (StStPP). По последним обработкам род *Elymus* в пределах России подразделен на четыре секции: *Turczaninovia* (Nevski) Tzvelev (4 вида), *Goulardia* (Husn.) Tzvelev (42 вида), *Elymus* (6 видов), *Clinelymopsis* (Nevski) Tzvelev (1 вид) (Цвелев, Пробатова, 2010). Эта система построена по традиционным критериям (сравнительно-морфологический и эколого-географический), обеспечивает целостность и единство рода, но в состав секций входят виды с разной геномной конституцией.

В настоящее время становится очевидной необходимость сбалансированного комплексного подхода для построения филогенетически ориентированной системы таксонов рода *Elymus*. Сложность на этом направлении заключается в объединении двух совершенно разных методологий в ботанике – традиционной таксономии с приоритетом морфологических критериев и экспериментальной генетики на основе современных молекулярных технологий. В отношении использования молекулярных маркеров существенные результаты получены Dr. R. Mason-Gamer

с сотрудниками (Helfgott, Mason-Gamer, 2004; Mason-Gamer, 2001, 2004, 2008, 2013; Mason-Gamer et al., 1998; 2010a, b). Так, проведенные ими исследования показали, что сведения о нуклеотидных последовательностях низкокопийного гена *waxy* (гранул-связанная синтаза крахмала 1, *GBSS1*) согласуются с цитогенетическими данными в отношении геномной конституции и эволюционного происхождения североамериканских (Mason-Gamer, 2001) и азиатских (Mason-Gamer et al., 2010a) видов рода *Elymus*.

Нами сделан краткий анализ пригодности таких генетических маркеров, как низкокопийные гены ядерной локализации *bmy2*, *waxy* и ITS кластеров рПНК, для изучения филогенетических отношений между видами рода, встречающимися в Сибири и на Дальнем Востоке России (Shmakov et al., 2015). Было подтверждено, что в сочетании с другими молекулярными маркерами результаты секвенирования позволяют реконструировать филогенетические отношения между таксонами. Более того, эти исследования доказывают, что при построении филогенетически ориентированной системы рода для территории России необходимо опираться на данные о геномной конституции видов и их микроэволюционных взаимоотношениях. Наличие в базе данных NCBI Nucleotide (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) множества последовательностей гена *GBSS1* позволяет более подробно оценить родство между большим числом генотипов каждого вида в сравнительных исследованиях.

Нами проведено изучение нуклеотидных последовательностей гена *GBSS1* (~1 300 п. н., экзоны 9–14) у 18 видов *Elymus* (включая 14 эндемичных), произрастающих на территории Сибири и Дальнего Востока России, с целью установления или подтверждения их геномной конституции, а также для оценки уровней эволюционной дифференциации субгеномов, образующих генотипы у разных видов. Эти сведения являются необходимым условием для построения филогенетически ориентированной таксономической системы рода в пределах России.

Материалы и методы

Набор образцов включал распространенные в Азиатской части России виды рода *Elymus*, в основном с неустанов-

ленной геномной конституцией (Прил. 1)¹. Для сравнительного анализа были использованы последовательности гена *GBSSI* у видов, имеющих маркерные геномы St, H и Y, из базы данных NCBI (Прил. 2). Геномную ДНК экстрагировали из свежих или высушенных листьев по модифицированной методике (Khanuja et al., 1999) или с помощью наборов Nucleospin Plant II (Macherey-Nagel, Германия) в соответствии с инструкциями производителя.

Аmplификацию фрагментов гена *GBSSI* проводили с праймерами F-for (TGCGAGCTCGACAACATCATGCG) и M-bac (GGCGAGCGGCGGATCCCTCGC), предложенными ранее (Mason-Gamer et al., 1998), которые формируют продукт длиной приблизительно 1.3 тыс. п. н., включающий фрагмент гена *GBSSI*, содержащий экзоны 9–14. ПЦР проводили на термоджеле C-1000 (Bio-Rad, США). Объем реакционной смеси для ПЦР составлял 15 мкл и содержал Taq буфер, по 0.2 mM каждого dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 1 мкл каждого праймера, 20 нг геномной ДНК, 1 ед. HS Taq ДНК полимеразы («Евроген», Россия). Использовали следующий температурный профиль: первичная денатурация при 94 °C – 4 мин; затем 38 циклов: денатурация при 94 °C – 25 с, отжиг праймеров при 65 °C – 30 с, элонгация при 72 °C – 1 мин; финальная элонгация – 20 мин при 72 °C для усиления терминального нематричного присоединения дезоксиаденозина к 3'-концу ПЦР-продукта (Mason-Gamer et al., 1998). Амплификат, содержащий исследуемый фрагмент, анализировали электрофорезом в 1.7 % агарозном геле в буфере TAE при удельном напряжении 4 В/см.

Поскольку аллополиплоидные геномы *Elymus* содержат не менее двух субгеномных вариаций гена *GBSSI*, то для минимизации PCR drift эффекта, обусловленного стохастическими флуктуациями на начальных стадиях ПЦР, амплификацию выполняли в трехкратной повторности (Wagner et al., 1994). Объединенный из трех повторностей ПЦР-продукт лигировали в pAL2-T вектор («Евроген») в соответствии с инструкциями производителя. Полученной лигазной смесью трансформировали химически компетентные клетки *E. coli* XL1-Blue. Колонии клеток, содержащие рекомбинантную плазмиду со встройкой, отбирали методом бело-голубой селекции на твердой LB питательной среде с X-gal, IPTG и ампициллином. Для каждого образца отбирали 20 белых колоний, которые тестировали на наличие вставки ожидаемой длины с помощью электрофореза продуктов амплификации при использовании суспензии колонии в качестве матрицы и универсальной пары праймеров M13 («Евроген»). Для каждого образца отбирали не менее шести колоний, содержащих вставку расчетного размера ~1300 п. н. Отобранные колонии растили в 4 мл жидкой среды LB в течение 16 ч при 37 °C и 220 об/мин. Плазмидную ДНК выделяли набором Plasmid Miniprep («Евроген») по инструкции производителя.

Реакционная смесь реакции Сэнгера содержала 0.7 мкг плазмидной ДНК общей длиной около 4300 п. н., 20 пМ праймера M13F или M13R, 1.8 мкл реагента BigDye v.3.1, 7.2 мкл 5X буфера для секвенирования и воду до суммарного объема реакции в 40 мкл. Для реакции Сэнгера

был использован следующий температурный профиль: денатурация при 95 °C в течение 2 мин, а затем 50 циклов: плавления при 95 °C – 30 с; отжига при 55 °C – 10 с; элонгации при 60 °C – 4 мин. Продукты реакции Сэнгера очищали от избытка компонентов BigDye с помощью гель-фильтрации в микроколонках, содержащих 600–700 мкл подготовленного Sephadex G-50 (GE Healthcare) с удалением жидкости из мертвого объема центрифугированием при 900 g в течение 2 мин. Затем их анализировали на автоматическом геномном анализаторе ABI 3130XL (Applied Biosystems) в ЦКП СО РАН «Геномика». Полученные последовательности собирали в контиги, перекрывающие нуклеотидную последовательность *GBSSI* с 9-го по 14-й экзон, включая 5 интронов, с помощью Unipro UGENE v1.31.0 (Okonechnikov et al., 2012). В итоге получено не менее 6 контигов нуклеотидных последовательностей для каждого из 22 образцов *Elymus*. Дополнительно для сравнительного анализа были привлечены 42 нуклеотидные последовательности из GenBank NCBI.

Множественное выравнивание последовательностей производили с помощью программы T-Coffee (www.tcoffee.org) и проверяли вручную. Выровненные структуры исследуемого фрагмента *GBSSI* использовали для расчета филогенетических деревьев методом максимального правдоподобия (ML) на веб-сервере IQ-TREE (Trifinopoulos et al., 2016). Для каждого экзона и интрона были определены наилучшие модели нуклеотидных замен в программе PartitionFinder версии 2.1.1 (Lanfear et al., 2016) с помощью модели выбора AICc, алгоритма поиска “greedy” (Lanfear et al., 2012) и связанными (linked) длинами ветвей. Для укоренения дендрограмм применяли предложенную ранее последовательность *Bromus tectorum* AY362757.1 из генбанка NCBI (Mason-Gamer, 2004). Статистическую поддержку топологии в IQ-TREE анализе оценивали с помощью 1000 репликаций методами SH-aLRT (Guindon et al., 2010) и UFBoot (Minh et al., 2013).

Результаты и обсуждение

Полученные результаты с использованием реперных образцов – носителей предковых для рода *Elymus* геномов St (виды рода *Pseudoroegneria*) и H (виды рода *Hordeum*) отчетливо показали, что у всех изученных видов из Сибири и российского Дальнего Востока обнаружены варианты последовательностей, присущие только геномам St и H. Это означает, что рассмотренные виды относятся к тетраплоидной StH-геномной группе. Очевидно, что центр видового разнообразия StH-геномной группы смещен к северу по сравнению с центром происхождения большинства StY-геномных видов, находящимся на территории Китая (Lu, Salomon, 1992). Примечательно, что видовой состав аллотетраплоидной группы видов *Elymus* Северной Америки также представлен в основном StH-геномными видами (Mason-Gamer, 2001). Там отмечены только редкие особи нескольких заносных азиатских StHY- и StY-геномных видов (Barkworth et al., 2007).

Наиболее показательные отличия субгеномных фрагментов St и H прослеживаются в интроне 13 (рис. 1). Последовательности субгенома H этого интрона у всех включенных в анализ генотипов *Elymus* содержат протяженную делецию длиной 21 п. н., вероятнее всего, полученную от

¹ Приложения 1 и 2 см. по адресу:
<http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2019-23/appx19.pdf>

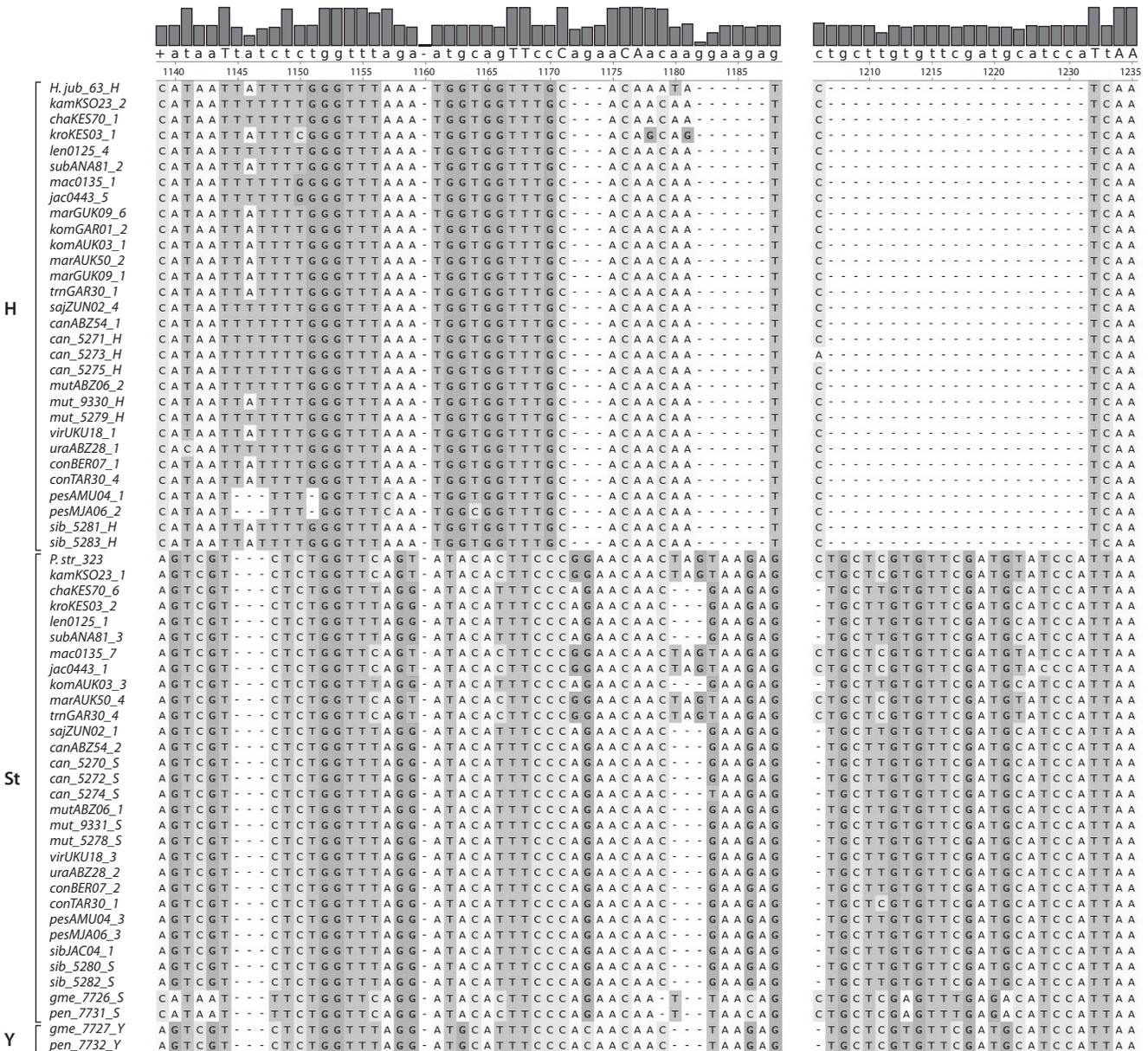


Рис. 1. Различия в нуклеотидных последовательностях в субгеномах H и St в интроне 13 гена *GBSS1* у видов *Elymus* с территории Азиатской части России в сравнении с последовательностями у реперных образцов евроазиатских видов.

общего предка субгеномов H и P, поскольку она присутствует также у современных представителей моногеномных родственных видов из родов *Hordeum* и *Agropyron*. На месте этой делеции у всех субгеномов St и Y отмечена относительно консервативная последовательность, во многом совпадающая с таковой у рода *Pseudoroegneria*, предок которого является донором современного генома St. Мелкие делеции характерны и для других участков этого интрона и в меньшей степени выражены в других участках анализируемого фрагмента *GBSS1*.

При этом на нашей выборке клонов не подтвердилось ранее опубликованные данные о существовании консервативных участков, абсолютные специфичных для гапломов H и St (Shmakov et al., 2015). Данный тезис подтвердился только для части последовательностей, принадлежащих разным гапломом.

Кластерный анализ последовательностей *GBSS1* с 9-го по 14-й экзон, а также отдельно интронов или экзонов демонстрировал схожие закономерности, высвечивая отдельные нюансы филогенетических связей как внутри, так и между родственными группами анализируемых таксонов *Elymus*. Анализ наиболее консервативных участков (экзоны 9–14) показал близкое родство внутри отдельных субгеномов и при этом их дифференциацию между собой (рис. 2).

Обнаружилось, что каждый из двух субгеномов у изученных видов отчетливо дифференцирован. Так, последовательности субгенома St делятся на две группы, условно обозначенные как St₁ и St₂. Последовательности субгенома St₁ для сибирских видов, вероятно, являются более древними, поскольку, наряду с северными биотипами *E. macrourus*, *E. jacutensis* и *E. kamczadalarum*, они



Рис. 2. Дендрограмма, построенная методом максимального правдоподобия по результатам анализа последовательностей экзонов 9–14 гена *GBSS1* субгеномов St и H у видов рода *Elymus* из Азиатской части России в сравнении с реперными образцами евроазиатских видов (субгеномы St, H и Y).

Указаны значения бутстреп-поддержки SH-aLRT (%) / UFboot (%).

обнаружены не только у более южных StY-геномных видов *E. gmelinii* и *E. pendulinus*, но и у образца *P. strigosa* PI 499637 из Северо-Восточного Китая.

Субгеномную группу St₂ образует более обширная часть видов, включающая как узколокальные (*E. komarovii*, *E. uralensis*, *E. sajanensis*, *E. margaritae*), так и широко

викарирующие виды (*E. caninus*, *E. sibiricus*). Этот факт отчетливо иллюстрируется специфичностью нуклеотидных последовательностей в разных участках гена, как показано на рис. 3. Примечательно, что образец алтайского вида *E. margaritae* AUK-0650 содержит оба варианта субгенома St. При этом в наборе из восьми последова-

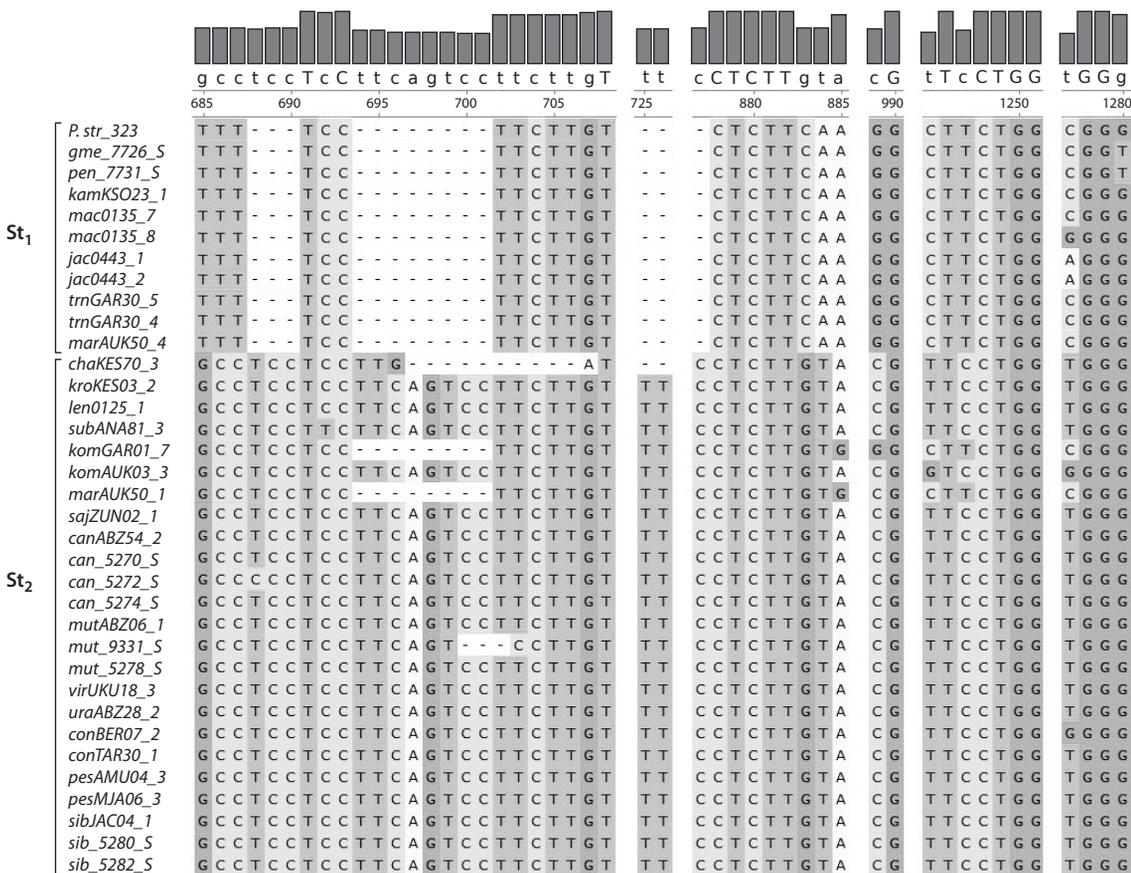


Рис. 3. Дифференциация субгеномов St на основе различий в нуклеотидных последовательностях в разных участках гена GBSS1 у видов *Elymus* с территории Азиатской части России в сравнении с последовательностями у реперных образцов евроазиатских видов.

тельностью у каждого из образцов *E. komarovii* GAR-0501 и *E. margaritae* GUK-1709 последовательности, принадлежащие субгеному St, выявлены не были.

По такому же принципу были подразделены последовательности североамериканских видов по первоначальным данным, где сравнивалось большее число природных образцов (Mason-Gamer, 2001). Поэтому нами была построена дендрограмма, в которую включены эндемичные виды Азиатской России в сравнении с некоторыми последовательностями североамериканских видов. Используются последовательности субгенома St, включающие экзоны 9–14 вместе с интронами (рис. 4).

В этом варианте построения дендрограммы азиатские виды снова распределились по двум кладам с тем же составом, как в варианте построения по экзонам. При этом часть североамериканских видов (отмечены на рис. 4 точками) вместе с азиатским видом *P. strigosa* образовали единую кладу с группой субгенома St₁, а другая часть расположилась в группе St₂ вместе со всеми образцами североамериканского вида *P. spicata*. Последовательности GBSS1 субгенома Y у *E. gmelinii* и *E. pendulinus* показали более близкое родство с группой St₂, что не противоречит данным об эволюционном происхождении этого субгенома (Mason-Gamer et al., 2010a).

Аналогичная картина дифференциации проявилась и для субгенома H (рис. 5). По полным последователь-

ностям интронов и экзонов генома H у российских и североамериканских (отмечены на рис. 5 точками) видов была построена дендрограмма. В качестве реперных взяты два многолетних вида *Hordeum* (помечены звездочками). Две главные клады, на которые разделились копии гена генома H, условно обозначены как H₁ и H₂. Клада H₁ включает исключительно российские виды, тогда как клада H₂ сформирована российскими северо-восточными и всеми североамериканскими видами. Каждому из вариантов соответствует свой предковый таксон современного рода *Hordeum*. Для российской группы H₁ это широко распространенный в Евразии *H. jubatum*, а для группы H₂ – североамериканский *H. californicum* Covas & Stebbins.

Российские виды, входящие в состав клады H₁, показали значительно большую дифференциацию, чем виды смешанной клады H₂. Клада H₁ разделилась на три субклады. В первую очередь отделились три клона северо-восточных видов *E. kronokensis* и *E. peschkovae*. Этот факт косвенно подтверждает значительную обособленность *E. peschkovae* от близкого по морфологии колоса сибирского *E. confusus*, который, в свою очередь, ближе всех прочих видов кластеризуется с реперным *H. jubatum*. Наиболее отдаленный кластер образован всеми образцами *E. caninus*, к которым присоединился клон эндемика Южного Урала *E. uralensis*. В самый крупный кластер вошли горные сибирские виды *E. komarovii*, *E. transbaicalensis*

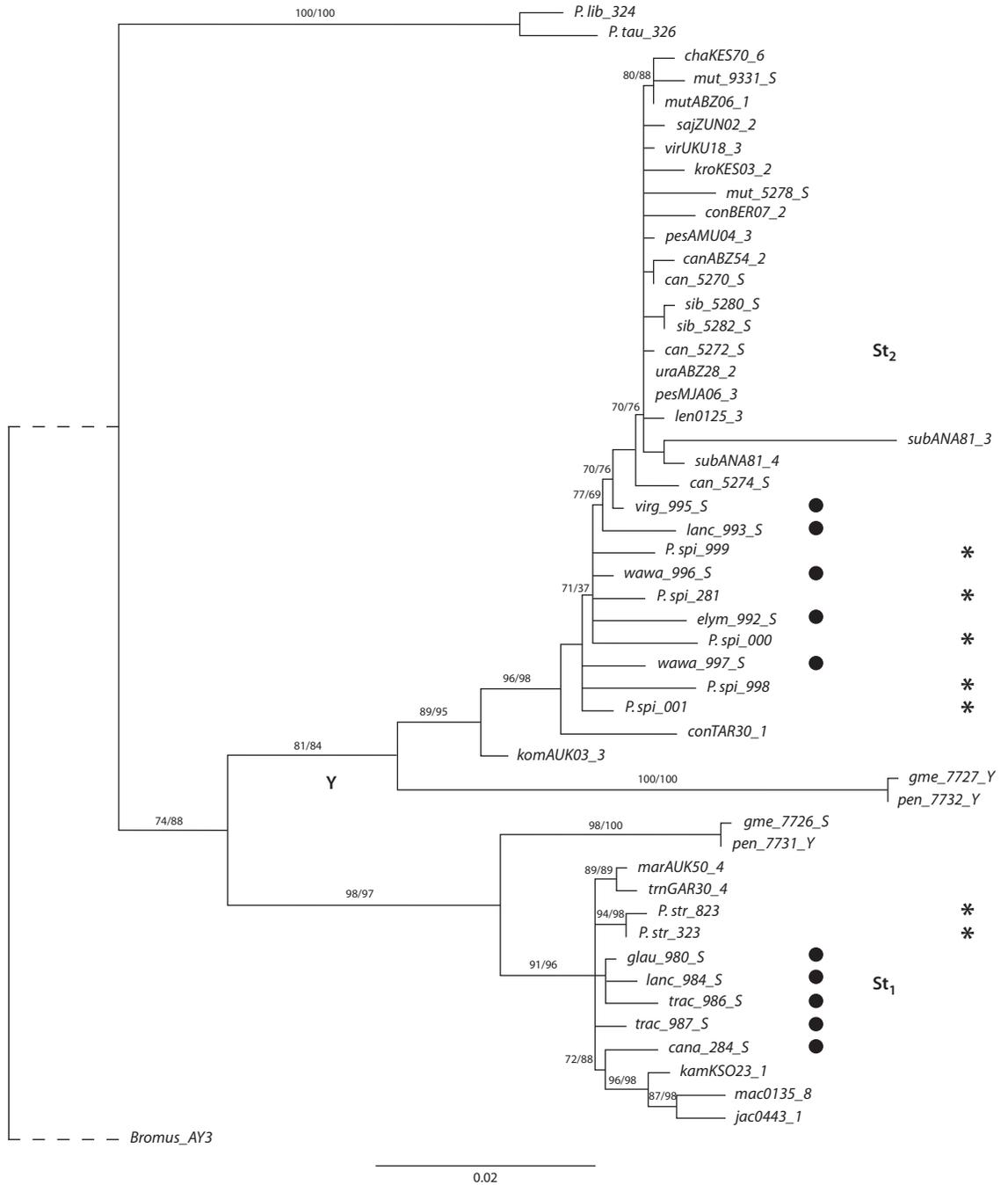


Рис. 4. Дендрограмма, построенная методом максимального правдоподобия по результатам анализа последовательностей интронов и экзонов (9–14) гена *GBSS1* субгенома St у видов рода *Elymus* из Азиатской части России в сравнении с образцами евроазиатских и североамериканских (отмечены точками) видов (субгеномы St и Y). Звездочками отмечены виды *Pseudoroegneria* – носители генома St.

Указаны значения бутструп-поддержки SH-aLRT (%)/UFboot (%).

и *E. margaritae*, к которым примыкают пара реперных клонов *E. sibiricus* и, что наиболее неожиданно, клон чукотского образца *E. subfibrosus*. Примечательно, что реперные образцы *E. mutabilis* попали в разные клады субгенома H.

Смешанная клада H₂ включила не только все североамериканские клоны видов *Elymus* вместе с *H. californicum*, но и клоны ряда российских видов из разных регионов: *E. kamczadalarum* и *E. charkeviczii* (камчатские виды),

E. macrourus, *E. jacutensis*, *E. lenensis* (северные образцы с п-ова Таймыр), горный сибирский вид *E. sajanensis* и два из трех *E. mutabilis* (реперный китайский mut_5279_H и южноуральский ABZ06_2). Третий реперный алтайский mut_9330_H попал в кладу H₁.

Таким образом, по субгеному H можно заметить только тенденцию к родству между североамериканскими и северными и восточными образцами российских видов. Более понятно близкое родство между американскими

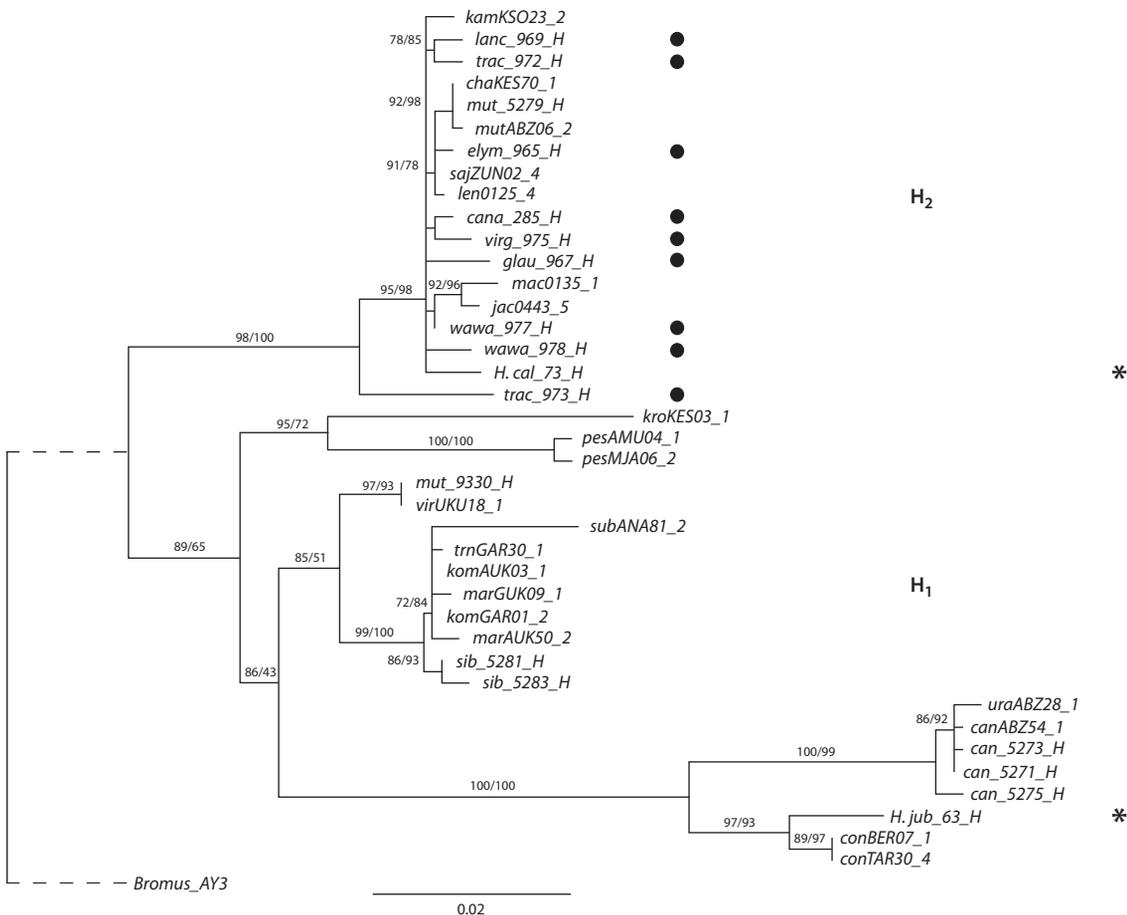


Рис. 5. Дендрограмма, построенная методом максимального правдоподобия по результатам анализа последовательностей интронов и экзонов (9–14) гена *GBSS1* субгенома H у видов рода *Elymus* из Азиатской части России в сравнении с образцами евроазиатских и североамериканских (отмечены точками) видов. Звездочками отмечены носители генома H: североамериканский вид *H. californicum* и широко распространенный вид азиатского происхождения *H. jubatum*.

Указаны значения поддержки SH-aLRT (%) / UFboot (%).

и камчатскими видами, учитывая исторические связи этих флор, а также видами широких северных ареалов *E. macrourus* и *E. jacutensis*. Труднее объяснить близость к этой группе китайского и южноуральского образцов *E. mutabilis*.

Тем не менее на примере вариабельности гена *GBSS1* можно проследить родственные отношения в эволюции видов и локальных географических рас с территории Сибири и Дальнего Востока. Если рассмотреть взаиморасположение образцов внутри клад субгеномов, то кластеры объединили их по предполагаемому родству. Так, виды *E. jacutensis* и *E. macrourus* объединились в общие кластеры в обеих кладах H и St (см. рис. 2), а также на отдельных дендрограммах этих субгеномов (см. рис. 4 и 5), тем самым подтвердив ранее сделанные предположения о том, что *E. jacutensis* представляет собой остистую разновидность *E. macrourus* (Цвелев, 1964). Этот факт согласуется с данными сравнительно-морфологического и электрофоретического анализа и гибридизации выборочных биотипов этих видов (Агафонов, 2008).

Результаты секвенирования подтвердили обособленность *E. kamczadalarum* от камчатского вида *E. charkevi-czii*, выявленную ранее с помощью методов сравнительной

морфологии, электрофореза запасных белков эндосперма семян, половой гибридизации (Агафонов, Герус, 2008) и молекулярного ISSR-анализа (Кобозева и др., 2017). Виды *E. komarovii* и *E. transbaicalensis* образовали неразличимые ветви в кладе H₁ вместе с алтайским видом *E. margaritae*, а в кладе St₁ объединились имеющиеся клоны *E. transbaicalensis* и *E. margaritae*. Филогенетическая близость первых двух видов неоднократно подтверждалась в эксперименте (Агафонов и др., 2019), тогда как исследование степени обособленности *E. margaritae* проводится в настоящее время методами биосистематики. Но наиболее неожиданные данные получены относительно взаимоотношений в группе южноуральских биотипов *E. uralensis*, *E. viridiglumis*, *E. caninus*, *E. mutabilis*. Сейчас эти данные проверяются в полевых и лабораторных экспериментах.

Заключение

Таким образом, несмотря на исторически сложную картину сетчатой эволюции в составе различных родственных аллополиплоидных родов и продолжающиеся активные микроэволюционные преобразования, базисные геномы сохраняют уникальные предковые черты. Это позволяет

относительно легко идентифицировать геномный состав и классифицировать современные виды в рамках филогенетически ориентированной таксономической модели рода. На наш взгляд, необходимо сохранить целостность рода, поскольку некоторые виды из самостоятельного рода *Roegneria* с геномной формулой StY (Baum et al., 1991) близки по морфологии видам из вновь предлагаемого рода *Campeiostrachys* с геномной формулой StHY (Baum et al., 2011). При этом виды рода *Campeiostrachys* в значительной мере различаются между собой морфологически. Генетически объединяет всех представителей рода геном St, ведущий происхождение от предков рода *Pseudoroegneria*.

В основу дифференциации рода должна быть положена модель микроэволюционных комплексов, которые представляют собой совокупность таксонов, эволюционирующих через гибридизацию и интрогрессию. Степень родства таксонов необходимо подтвердить при помощи методов биосистематики с обязательным определением скрещиваемости особей, т.е. с учетом положения в системе рекомбинационных и интрогрессивных генопулов (Агафонов, Саломон, 2002). По сути, микроэволюционный комплекс – это проекция совокупности рекомбинационных генопулов на таксономическую модель рода с учетом геномной конституции видов. Каждый микроэволюционный комплекс должен представлять собой разветвленную систему таксонов видового и внутривидового рангов, в этом случае система рода будет филогенетически подтвержденной структурой.

В перспективе предстоит определить таксономический ранг разных микроэволюционных комплексов. Это могут быть секции или агрегаты одного вида в широком понимании, как показано на примере ревизии подсекции *Pendulini* (Nevski) Tzvelev секции *Gouldardia* (Husn.) Tzvelev (Кобозева, Агафонов, 2015).

Список литературы / References

- Агафонов А.В. Биосистематическое исследование комплекса *Elymus macrourus* – *E. jacutensis* и критического таксона *E. ircutensis* (Triticeae: Poaceae). Растит. мир Азиатской России. 2008; 2:20-32.
[Агафонов А.В. Biosystematic research of the complex *Elymus macrourus* – *E. jacutensis* and the critical taxon *E. ircutensis* (Triticeae: Poaceae). Rastitel'nyj Mir Aziatskoj Rossii = Plant Life of Asian Russia. 2008;2:20-32. (in Russian)]
- Агафонов А.В., Герус Д.Е. Исследование полиморфного комплекса *Elymus charkeviczii* Probat. s. l. (Triticeae: Poaceae) полуострова Камчатка с позиций биосистематики и таксономической генетики. Растит. мир Азиатской России. 2008;1:58-70.
[Агафонов А.В., Герус Д.Е. Study of the polymorphic complex *Elymus charkeviczii* Probat. s. l. (Triticeae: Poaceae) in the Kamchatka Peninsula from the viewpoint of biosystematics and taxonomical genetics. Rastitel'nyj Mir Aziatskoj Rossii = Plant Life of Asian Russia. 2008;2:58-70. (in Russian)]
- Агафонов А.В., Никонова (Герус) Д.Е., Шабанова (Кобозева) Е.В. Изменчивость и специфичность сибирских видов *Elymus transbaicalensis*, *E. komarovii*, *E. sajanensis*, *E. kronokensis* (Poaceae) и некоторых морфологически отклоняющихся форм по гистону H1. Turczaninowia. 2019;22(1):5-18. DOI 10.14258/turczaninowia.22.1.1.
[Агафонов А.В., Никонова (Герус) Д.Е., Шабанова (Кобозева) Е.В. The variability and specificity of the histone H1 among the Siberian species *Elymus transbaicalensis*, *E. komarovii*, *E. sajanensis*, *E. kronokensis* (Poaceae) and some morphologically deviating forms. Turczaninowia. 2019;22(1):5-18. DOI 10.14258/turczaninowia.22.1.1. (in Russian)]
- Кобозева Е.В., Агафонов А.В. Ревизия подсекции *Pendulini* (Nevski) Tzvelev рода *Elymus* L. (Poaceae). Сист. заметки по материалам Гербария им. П.Н. Крылова ТГУ. 2015;112:22-31. DOI 10.17223/20764103.112.3.
[Kobozeva E.V., Agafonov A.V. Revision of the subsection *Pendulini* (Nevski) Tzvelev of the genus *Elymus* L. (Poaceae). Sistematische Zаметki po Materialam Gerbariya imeni P.N. Krylova TGU = Systematic Notes on the Materials of P.N. Krylov Herbarium of the Tomsk State University. 2015;112:22-31. DOI 10.17223/20764103.112.3. (in Russian)]
- Кобозева Е.В., Емцева М.В., Асбаганов С.В., Агафонов А.В. Таксономическая специфичность дальневосточных видов *Elymus kamczadorum*, *E. charkeviczii* s. l. и *E. kronokensis*, выявляемая с помощью ISSR-маркеров. Растит. мир Азиатской России. 2017; 3(27):43-50. DOI 10.21782/RMAR1995-2449-2017-3(43-50).
[Kobozeva E.V., Emceva M.V., Asbaganov S.V., Agafonov A.V. Taxonomical specificity among species from the Russian Far East *Elymus kamczadorum*, *E. charkeviczii* s. l. and *E. kronokensis* revealed by ISSR-markers. Rastitel'nyj Mir Aziatskoj Rossii = Plant Life of Asian Russia. 2017;3(27):43-50. DOI 10.21782/RMAR1995-2449-2017-3(43-50). (in Russian)]
- Цвелев Н.Н. *Roegneria* C. Koch – регнерия, пырей бескорневищный. В: Арктическая флора СССР. М.; JL., 1964;2:230-247.
[Tsvelyov N.N. Wheatgrass *Roegneria* C. Koch. In: Arctic Flora of the USSR. Moscow; Leningrad, 1964;2:230-247. (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.
[Tsvelyov 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)]
- Агафонов А.В., Саломон В. Генепулы among SH genome *Elymus* species in boreal Eurasia. In: Hernández P. et al. (Eds.) Triticeae IV. Consejería de Agricultura y Pesca. Spain, Sevilla, 2002;37-41.
- Barkworth M.E., Cambell J.J.N., Salomon B. *Elymus* L. In: Barkworth M.E. et al. (Eds.). Flora of North America. New York; Oxford: Oxford Univ. Press, 2007;24:288-343.
- Baum B.R., Yang J.-L., Yen C., Agafonov A.V. A taxonomic revision of the genus *Campeiostrachys* Drobov. J. Syst. Evol. 2011;49(2):146-159.
- Baum B.R., Yen C., Yang J.-L. *Roegneria*: its generic limits and justification for its recognition. Can. J. Bot. 1991;69:282-294.
- 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, USA: Plenum Publ. Corp., 1984;209-279.
- Guindon S.E.P., Dufayard J.C.C.O., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. Syst. Biol. 2010;59:307-321. DOI 10.1093/sysbio/syq010.
- Helfgott D.M., Mason-Gamer R.J. The evolution of North American *Elymus* (Triticeae, Poaceae) allotetraploids: evidence from phosphoenolpyruvate carboxylase gene sequences. Syst. Bot. 2004;29: 850-861.
- Khanuja S.P., Shasany A.K., Darokar M., Kumar S. Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. Plant Mol. Biol. Rep. 1999;17:74. DOI 10.1023/A:1007528101452.
- Lanfear R., Calcott B., Ho S.Y.W., Guindon S. PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. Mol. Biol. Evol. 2012;29:1695-1701.

- Lanfear R., Frandsen P.B., Wright A.M., Senfeld T., Calcott B. PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Mol. Biol. Evol.* 2016;34(3):772-773. DOI 10.1093/molbev/msw260.
- Löve A. *Conspectus of the Triticeae*. Feddes Repert. 1984;95:425-521.
- Lu B.-R. The genus *Elymus* in Asia. Taxonomy and biosystematics with special reference to genomic relationships. In: Wang R.R.-C., Jensen K. (Eds.). *Proc. 2nd Int. Triticeae Symp.* Logan, Utah, USA, 1994;219-233.
- Lu B.-R., Salomon B. Differentiation of the SY genomes in Asiatic *Elymus*. *Hereditas*. 1992;116:121-126.
- 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. Reticulate evolution, introgression, and intertribal gene capture in an allohexaploid grass. *Syst. Biol.* 2004;53:25-37.
- Mason-Gamer R.J. Allohexaploidy, introgression, and the complex phylogenetic history on *Elymus repens* (Poaceae). *Mol. Phyl. Evol.* 2008;47:598-611.
- Mason-Gamer R.J. Phylogeny of a genomically diverse group of *Elymus* (Poaceae) allopolyploids reveals multiple levels of reticulation. *PLoS One*. 2013;8:e78449. DOI 10.1371/journal.pone.0078449.
- Mason-Gamer R.J., Burns M.M., Naum M. Phylogenetic relationships and reticulation among Asian *Elymus* (Poaceae) allotetraploids: analysis of three nuclear genes. *Mol. Phyl. Evol.* 2010a;54:10-22. DOI 10.1016/j.ympev.2009.10.002.
- Mason-Gamer R.J., Burns M.M., Naum M. Reticulate evolutionary history of a complex group of grasses: phylogeny of *Elymus* StStHH allotetraploids based on three nuclear genes. *PLoS One*. 2010b;5(6):e10989. DOI 10.1371/journal.pone.0010989.
- Mason-Gamer R.J., Weil C.F., Kellogg E.A. Granule-bound starch synthase: structure, function, and phylogenetic utility. *Mol. Biol. Evol.* 1998;15:1658-1673.
- Minh B.Q., Nguyen M.A.T., von Haeseler A. Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. *Mol. Biol. Evol.* 2013;30:1188-1195.
- Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. Ugene team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 2012;28:1166-1167.
- Shmakov N.A., Afonnikov D.A., Belavin P.A., Agafonov A.V. The suitability of the *BMV2* and *WAXY* genes and internal transcribed spacers of rRNA as markers for studying genetic variability in *Elymus* species. *Russ. J. Genet.: Appl. Res.* 2015;5(3):300-307. DOI 10.1134/S207905971503017X.
- Trifinopoulos J., Nguyen L.-T., von Haeseler A., Minh B.Q. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Res.* 2016;W1:W232-W235. DOI 10.1093/nar/gkw256.
- Wagner A., Blackstone N., Cartwright P., Dick M., Misof B., Snow P., Wagner G.P., Bartels J., Murtha M., Pendleton J. Surveys of gene families using polymerase chain-reaction – PCR selection and PCR drift. *Syst. Biol.* 1994;43(2):250-261.

ORCID ID

A.V. Agafonov orcid.org/0000-0002-1403-5867
S.V. Asbaganov orcid.org/0000-0002-7482-7495
I.V. Morozov orcid.org/0000-0002-0307-4203
A.A. Bondar orcid.org/0000-0001-9181-0487

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ЦСБС СО РАН «Оценка морфогенетического потенциала популяций растений Северной Азии экспериментальными методами (№ гос. регистрации АААА-А17-117012610051-5) при частичной поддержке РФФИ (проект № 18-04-01030). При подготовке публикации использовались материалы биоресурсной научной коллекции ЦСБС СО РАН «Коллекции живых растений в открытом и закрытом грунте», УНУ № USU 440534. Секвенирование ДНК выполнено в ЦКП «Геномика» (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск). Авторы выражают глубокую благодарность инженеру ЦСБС СО РАН М.В. Емцевой за существенную помощь в оформлении результатов секвенирования гена *GBSS1*.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 06.06.2019. После доработки 30.07.2019. Принята к публикации 31.07.2019.