

*На правах рукописи*



Добрякова  
Ксения Сергеевна

**МОЛЕКУЛЯРНО-ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ  
ИССЛЕДОВАНИЕ ВИДОВ *ELYMUS* L. ФЛОРЫ РОССИИ**

03.02.07 – «Генетика»  
03.02.01 – «Ботаника»

Автореферат  
диссертации на соискание ученой  
степени кандидата биологических наук

Санкт-Петербург  
2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Ботаническом институте им. В.Л. Комарова Российской академии наук

**Научный руководитель:** доктор биологических наук, профессор  
**Родионов Александр Викентьевич**

**Официальные оппоненты:** **Шанцер Иван Алексеевич**  
доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина Российской академии наук, ведущий научный сотрудник

**Жуков Владимир Александрович**  
кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», ведущий научный сотрудник, и.о. заведующего лабораторией

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный педагогический университет имени А.И. Герцена»

Защита состоится 13 июня 2018 г. в 14–00 часов на заседании диссертационного совета Д 006.041.02. при Всероссийском институте генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова по адресу 190000, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, д. 44.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова и на сайте института: <http://www.vir.nw.ru/>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор биологических наук

Е.В. Рогозина

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Род *Elymus* (Пырейник) является крупным родом трибы *Triticeae* семейства Злаки (*Poaceae*) и, несомненно, это один из самых трудных в таксономическом отношении родов трибы. По современным представлениям род включает в себя около 150-170 видов, родственные отношения между которыми остаются предметом дискуссий (Цвелев, 1976, 2008; Melderids, 1980; Агафонов, 2004, 2008, 2009; Chen, Zhu, 2006; Dizkirici et al., 2010; Цвелев, Пробатова, 2010; Кобозева и соавт., 2011; Sun, Zhang, 2011; Fan et al., 2013; Агафонов и др., 2015; Wu et al., 2015). Все виды рода *Elymus* – аллополиплоиды, в состав генома которых вместе с базовым субгеномом St, полученным от одного или нескольких видов *Pseudoroegneria*, входят в различных комбинациях один или несколько субгеномов, называемых H, Y, W, P (Dewey, 1984; Yen et al., 2005). В России в основном распространены виды с геномными формулами: StH, StY и StHY (Агафонов, 2007).

Зарубежные исследования в области молекулярной филогении видов *Elymus* посвящены большей частью американским и китайским видам, в них было вовлечено лишь небольшое количество сибирских и дальневосточных видов, исследованных в нашей работе. Очевидно, что филогенетическая картина рода была бы неполной без включения в исследование образцов из природных популяций Сибири, Дальнего Востока, европейской части нашей страны.

С точки зрения общей биологии, генетики растений, ботаники и биологии развития, пырейники – интересная модель для изучения процессов морфологической изменчивости, фенотипической пластичности, видообразования и гибридизации (Assadi, 1995; Агафонов, 2004; Fan et al., 2013; Mason-Gamer, 2013). Изучение аллополиплоидных видов *Elymus* может пролить свет на механизмы изменений геномов, транскриптомов, протеомов у растений, возникших в результате межвидовой гибридизации (Родионов, 2013; Mason-Gamer, 2013).

В настоящее время при исследовании родов и видов гибридного происхождения широко используется сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей, в частности, секвенирование и анализ последовательностей ядерной и хлоропластной ДНК, особенно ITS-последовательностей генома ядра и последовательностей района *trnL-trnF* генома хлоропластов (Антонов, 2006; Liu et al., 2006; Шнеер, 2009; Матвеева и др., 2011; Носов и др., 2015). Этот относительно новый подход, называемый «геносистематика» (Антонов, 2006), открыл перед ботаникой принципиально новые возможности при исследовании филогенетических отношений между родами и видами и оказался особенно продуктивным в работе с данными таксонами гибридного происхождения (Носов и др., 2015). Необходимость целенаправленного исследования методами молекулярной филогении видов *Elymus*, актуальна еще и потому, что именно для представителей *Elymus sensu lato* (в понимании разных авторов (Цвелев, 1976, 2008; Melderids, 1980; Агафонов, 2004,

2008, 2009; Yen et al, 2005; Dizkirici et al., 2010; Цвелев, Пробатова, 2010; Sun, Zhang, 2011; Wu et al., 2015)) характерна неоднозначность подходов систематиков разных стран при определении видовой принадлежности гербарных образцов и образцов, поддерживаемых в генетических коллекциях и ресурсных центрах (Цвелев, 1976; Melderis, 1980; Melderis, McClintock, 1983; Carlson, Barkworth, 1997; Агафонов, 2007, 2009; Цвелев, Пробатова, 2010; Baum et al., 2011; Khuat et al., 2015). Отметим, что для данной работы *Elymus sensu stricto* означает объем рода согласно системе рода *Elymus* Н.Н. Цвелева (2008).

**Степень разработанности темы.** Объем и границы рода *Elymus* L. флоры России многократно, иногда радикально, пересматривались (Невский, 1934; Цвелев, 1968, 1976, 2008; Пешкова, 1979, 1990; Melderis, 1980; Пробатова, 2006; Агафонов, 2007, 2009; Цвелев, Пробатова, 2010). В связи с трудностями в разделении рода по морфологическим признакам (Цвелев, 2008), в последнее время для решения проблем происхождения и родственных отношений видов рода *Elymus* все шире используются методы молекулярной систематики. С помощью этого подхода относительно хорошо изучены виды рода *Elymus* Северной Америки (Mason-Gamer, 2001, 2004, 2013; Mason-Gamer et al., 2002). В последнее время эти методы стали широко использовать при изучении видов рода, произрастающих в Китае (Liu et al., 2006; Sun et al., 2011; Fan et al., 2013; Hu et al., 2013; Wu et al., 2015). Но исследование методами, включающими секвенирование филогенетически значимых ДНК-маркеров, природных популяций (видов, подвидов, вариаций) рода *Elymus* флоры России только начинается (Шмаков и др., 2014; Агафонов и др., 2015; Добрякова, Носов, 2015; Пунина и др., 2016 и др.). Филогенетические связи между видами рода Пырейник, а также между *Elymus* и другими близкими родами трибы *Triticeae* на настоящий момент остаются предметом изучения и обсуждения.

**Цель и задачи исследования.** Целью работы является выяснение родственных связей между видами *Elymus sensu lato* флоры России с помощью методов молекулярной филогении. Для осуществления цели были поставлены следующие задачи:

1. Секвенировать ДНК районов ITS1-5.8S-ITS2 ядерного генома, *trnL-trnF* генома хлоропластов у видов *Elymus* L. флоры России и некоторых других видов злаков трибы *Triticeae*, изучить изменчивость этих последовательностей ДНК.
2. Проанализировать накопление мутаций в районах ITS1-5.8S-ITS2 в ходе дивергенции видов рода *Elymus*, исследовать их распределение и влияние на вторичную структуру РНК ITS1 и ITS2.
3. Определить с помощью методов молекулярной систематики филогенетические связи между исследуемыми образцами видов *Elymus sensu lato*
4. Сопоставить существующие таксономические гипотезы о системе рода *Elymus* s.l. с полученными молекулярно-филогенетическими данными.

**Научная новизна работы.** В ходе работы были секвенированы 45 последовательностей ITS1-5.8S-ITS2 и 18 последовательностей ДНК районов *trnL-trnF* у видов *Elymus* s.l. и родственных видов родов трибы *Triticeae*. Впервые были секвенированы последовательности ITS 9 видов трибы *Triticeae* (*Agropyron krylovianum* Schischk., x *Elyhordeum schmidii* (Melderis) Melderis, *Elytrigia geniculata* (Trin.) Nevski, *Elymus jacutensis* (Drob.) Tzvel., *Elymus probatovae* Tzvel., *Elymus scandicus* (Nevski) Tzvel., *Elymus subfibrosus* (Tzvel.) Tzvel., *Elymus uralensis* (Nevski) Tzvel., *Elymus vernicosus* (Nevski ex Grub.) Tzvel.) и 2 последовательности предполагаемых межвидовых гибридов *Elymus*. Всего было секвенировано 40 ITS-последовательностей у 27 видов *Elymus* и 5 последовательностей 5 видов трибы *Triticeae*. Также впервые были секвенированы и изучены последовательности района *trnL-trnF* 10 видов злаков трибы Пшеницевые (*Elymus charkeviczii* Prob., *Elymus franchetii* Kitag., *Elymus ircuitensis* Peschkova, *Elymus kamoji* (Ohwi) S.L. Chen, *Elymus peschkovae* Tzvel., *Elymus probatovae* Tzvel., *Elymus scandicus* (Nevski) Khokhr., *Elymus subfibrosus* Tzvel., *Elymus vassiljevii* Czerep. и *Agropyron krylovianum* Schischk.). Всего было секвенировано 16 последовательностей *trnL-trnF* у 14 видов *Elymus* и 2 последовательности видов *Agropyron*.

Впервые при анализе ITS-последовательностей выявлены два семейства риботипов (типов ITS/типов рДНК) у видов *Elymus* Евразии, названных Northern St-rDNA (Северный St-риботип) и Southern St-rDNA (Южный St-риботип). В составе этих двух семейств риботипов выделены особые дериваты – геномы, характерные для видов комплекса видов *E. dahuricus* aggr.: Northern dahuricus St-rDNA (Северный dahuricus St-риботип) и Southern dahuricus St-rDNA (Южный dahuricus St-риботип). Исследование хлоропластной ДНК также выявило два семейства хлоротипов, всего 6 вариантов.

Были построены и проанализированы вторичные структуры молекул 5.8S рРНК и районов ITS исследуемых видов рода *Elymus*. Показано, что у большинства видов рода *Elymus* дивергенция последовательностей ДНК ITS1 и ITS2 идет, преимущественно, за счет однонуклеотидных замен в одонитевых участках РНК-транскрипта и таких мутаций в шпильках, которые не изменяют вторичную структуру транскрипта. Дивергенция же последовательностей *trnL-trnF* видов *Elymus* сопровождается появлением крупных делеций и однонуклеотидных замен.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Род *Elymus* L. (Пырейник) - один из крупнейших родов значимой с точки зрения современного ресурсоведения трибы *Triticeae* (Пшеницевые) семейства *Poaceae* (Мятликовые или Злаки). Некоторые виды исследуемого рода используются в сельском хозяйстве: *E. caninus*, *E. dahuricus*, *E. hoffmannii*, *E. nutans*, *E. sibiricus*, *E. trachycaulus*, *E. virginicus*, эти виды входят в состав фуражных трав в России, Северном Китае и Северной Америке. В борьбе с эрозией почв используют: *E. dahuricus*, *E. hystrix*, *E. macrourus*, *E. villosus* (Цвелев, 1976; Okito, 2008; Knüpfper, 2009). Объем и границы *Elymus* s.l. неоднократно пересматривались, в том числе и в последнее время (Цвелев, 1968, 1976, 2008, Пешкова, 1979, 1990; Yen et al., 2005;

Цвелев, Пробатова, 2010; Vaum et al., 2011). Полученные нами данные имеют существенное значение для выяснения филогенетических отношений видов рода, произрастающих в России, для уточнения филогении рода *Elymus* в мировом объеме, а также для понимания эволюции генома как этого рода, так и других аллополиплоидных групп семейства Злаковых (*Poaceae*). Все секвенированные последовательности ITS1-5.8S-ITS2 и *trnL-trnF* видов трибы *Triticeae* были депонированы в международную базу данных NCBI GenBank. Характеристики коллекции гербарных образцов видов *Elymus*, сохраняемой в России, были расширены сведениями об изученных нуклеотидных последовательностях. Мы подтвердили ранее известное число хромосом ( $2n=28$ ) для образцов *E. sibiricus* L., *E. transbaicalensis* (Nevski) Tzvelev и *Psathyrostachys juncea* (Fisch.) Nevski, также кариологически были исследованы межвидовой гибрид *Elymus* (*Elymus caninus* x *Elymus mutabilis*) ( $2n=28$ ) и вид *E. ircutensis* Peschkova ( $2n=28$ ).

Результаты работы целесообразно использовать в различных учреждениях ФАНО России, изучающих злаки: Федеральном исследовательском центре Всероссийском институте генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, Федеральном исследовательском центре Институте цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск), ФГБУН Институте общей генетики имени Н.И. Вавилова (Москва), Ботанических садах России. Результаты диссертационной работы также могут быть использованы в учебных курсах лекций для студентов, специализирующихся на кафедрах ботаники, цитологии и гистологии, генетики и биотехнологии СПбГУ и других биологических факультетах университетов России (МГУ, НГУ).

**Методология и методы исследования.** Для изучения филогении видов *Elymus* s.l. были секвенированы и проанализированы с помощью методов молекулярной систематики последовательности ядерной и хлоропластной ДНК (хпДНК). В ходе диссертационного исследования для выяснения родственных связей между видами *Elymus* sensu lato флоры России были реконструированы молекулярно-филогенетические деревья методами Байеса и NJ, была построена филогенетическая сеть NeighbourNet с помощью программы SplitsTree4 (Huson, Bryant, 2006). Кариологически были исследованы некоторые виды *Triticeae*.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Сравнительное исследование последовательностей района ITS1-5.8S рДНК-ITS2 видов рода *Elymus* флоры России и сопредельных стран позволило выделить два основных варианта (два семейства) рДНК: характерный для видов Сибири и северо-восточной Евразии, встречающийся также у видов в Северном Китае риботип Northern St-rDNA (Северный St-риботип) и распространенный у видов в Приморье РФ, Китае, Корее, Иране риботип, названный Southern St-rDNA (Южный St-риботип).
2. ITS-последовательности двух типов - Northern dahuricus (Северный dahuricus St-риботип) и Southern dahuricus (Южный dahuricus St-риботип) - встречаются у всех 3-х видов группы родства *E. dahuricus* aggr. флоры России и у гималайского вида *E. tangutorum*.

3. Сравнительный анализ последовательностей *trnL-trnF* 19 видов *Elymus* s.l. выявил два семейства хлоротипов (не менее 6 разных вариантов гаплотипов хлоропластной ДНК), все они встречаются у представителей природных рас *Elymus*, определяемых сейчас как 4 разных вида *E. dahuricus* agg. или 4 разновидности вида *Campeiostrachys dahurica*.

**Степень достоверности и апробация работы.** Полученные данные базируются на современных молекулярно-филогенетических методах, обработка результатов была проведена актуальными методами анализа (методы Байеса и NJ, NeighbourNet). Было проанализировано не менее 60 гербарных образцов 40 видов трибы Пшеницевые, также в анализ вошли 112 нуклеотидных последовательностей 42 видов трибы *Triticeae*, взятых из международной базы данных GenBank (NCBI). Таким образом были проанализированы не только секвенированные в данном исследовании образцы представителей рода *Elymus* (40 ITS-последовательностей 27 видов и 16 *trnL-trnF* последовательностей 14 видов), но и все депонированные в настоящее время в базе данных последовательности видов *Elymus* флоры Евразии (45 ITS-последовательностей 14 видов и 29 последовательностей *trnL-trnF* 12 видов). Верификация таксономического определения образцов проводилась выдающимся агрологом, автором последней таксономической обработки рода *Elymus* Н.Н. Цвелевым (+), которому мы были искренне признательны за неоценимые консультации. Результаты работы представлены на 2-ой Всероссийской научно-практической конференции по геномному секвенированию NGS 2014 (Москва, 2014), на отчетной конференции «Живая природа: современное состояние и проблемы развития. Динамика и сохранение генофондов» (Москва, 2014), на международной конференции «50 лет без К.И. Мейера: XIII Московское совещание по филогении растений» (Москва, 2015), на 14-ой международной научно-практической конференции «Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии» (Барнаул, 2015), на 3-й Всероссийской научно-практической конференции по геномному секвенированию NGS 2015 (Москва, 2015), на III (XI) Международной ботанической конференции молодых ученых (Санкт-Петербург, 2015), на 15-ой международной научно-практической конференции «Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии» (Барнаул, 2016), на IV всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Биоразнообразие: глобальные и региональные процессы» (Улан-Удэ, 2016), на конференции, посвященной 85-летию со дня рождения В.Н. Тихомирова «Систематика и эволюционная морфология растений» (Москва, 2017), на 2-ой всероссийской научной конференции с международным участием «Сорные растения в изменяющемся мире: актуальные вопросы изучения разнообразия, происхождения, эволюции» (Санкт-Петербург, 2017).

**Публикации.** По материалам диссертации автором опубликовано 13 работ, из них 3 статьи в рецензируемых журналах, входящих в список ВАК.

**Структура диссертации.** Работа состоит из введения, трех глав, выводов и списка литературы. Диссертация изложена на 145 страницах, включает 24 таблицы и 22 рисунка. Список цитируемой литературы содержит 208 источников, из них 146 на иностранных языках.

# ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

## Глава 1. Обзор литературы

В обзоре литературы кратко охарактеризован род *Elymus*, приведены геносистематические методы и маркеры, применяющиеся для молекулярно-филогенетического исследования этого рода. Рассмотрена история изучения рода *Elymus* s.l. морфологическими, кариосистематическими и молекулярно-филогенетическими методами. Кратко рассмотрен вопрос межвидовой гибридизации и полиплоидии видов трибы *Triticeae*.

## Глава 2. Материал и методы

Для секвенирования 40 последовательностей ITS 27 видов *Elymus* и 5 последовательностей ITS представителей других родов трибы *Triticeae* (*Elyhordeum*, *Elytrigia*, *Psathyrostachys* и *Agropyron*), а также 16 последовательностей *trnL-trnF* 14 видов *Elymus* и 2 последовательностей *trnL-trnF* 2 видов *Agropyron* мы использовали гербарные образцы. Образцы растений были собраны в Алтайском крае и республике Алтай, в Хакасии, Кемеровской области, Якутии, на Кавказе в 2004-2013 гг. Гербарные образцы хранятся в гербарии лаборатории Биосистематики и цитологии БИН РАН. Растительный материал для исследования был также взят из гербарных коллекций БИН РАН (LE). Выделение геномной ДНК из растительных тканей проводили согласно методике Doyle, Doyle (1987) с небольшими модификациями, описанными ранее (Родионов и др., 2005, 2008). Амплификация района ITS была проведена с использованием праймеров ITS 1P (Ridgway et al., 2003) и ITS 4 (White et al., 1990). Для амплификации последовательности района *trnL-trnF*, использовали праймеры с, d, e, f (Taberlet et al., 1991). Секвенировали по Сэнгеру в ЦКП БИН РАН. В работе использовали флуоресцентно меченные 2', 3'-дидезоксинуклеозидтрифосфаты набора BigDye 3.1 (Applied Biosystems, США). Филогенетические деревья строили используя метод NJ в программе MEGA 6 (Tamura et al., 2013), а также по методу Байеса с помощью программы Mr. Bayes 3.2.2. (Ronquist et al., 2012) с использованием модели GTR+I+G при 1000000 репликаций до достижения значения показателя standard deviation ниже 0.01. В связи с широким распространением межвидовой гибридизации в роде *Elymus*, для определения связей между видами рода мы также использовали алгоритм NeighbourNet, предложенный для исследования сетчатой эволюции (Bryant, Moulton, 2004; Huson, Bryant, 2006). Кариологически были исследованы некоторые виды *Triticeae* (напр. рис. 1).

## Глава 3. Результаты и обсуждение

### 3.1. Общая характеристика ITS1 и ITS2 *Elymus* s. l. трибы *Triticeae*

Общая длина последовательностей ITS1-5.8S-ITS2 видов *Elymus* s.l. варьировала от 599 до 602 позиций, границы последовательностей ITS и 5.8S рДНК были определены с помощью сопоставления секвенированных нами последовательностей с последовательностями базы данных GenBank (Dizkirici et al., 2010; Liu et al., 2006; Mason-Gamer, 2013). Длина ITS1 от мотива TCGT до

ТГААТС у изученных нами видов *Elymus* изменялась от 219 до 221 пар нуклеотидов. С помощью пакета программ Mega 6 были рассчитаны р-расстояния для всех секвенированных последовательностей участка ITS1-5.8S рДНК-ITS2, а также для некоторых последовательностей, взятых из базы данных GenBank. Р-расстояние – это величина, отражающая процент нуклеотидов, по которым различаются последовательности при их попарном сравнении, формула для расчета р-расстояния:  $p=nd/n$ , где  $nd$  – число варьируемых нуклеотидов, а  $n$  – общее число нуклеотидов в последовательности. При сравнении последовательностей видов рода *Elymus* генетические расстояния варьировали в пределах от 0,1% (*E. macrourus*, *E. scandicus* и другие виды) до 3,5% между видами *E. dahuricus* var. *tangutorum*, *E. fibrosus*, *E. dahuricus* var. *tangutorum* и *E. hyperarcticus*. При попарном сравнении последовательностей видов рода *Elymus* с видами *Elytrigia* и видами *Agropyron* средняя величина р-расстояния оказалась равна 1,8%, тогда как с ITS-последовательностью *Psathyrostachys desertorum* средняя величина р-расстояний составила 3,5%.

### 3.2. Молекулярно-филогенетические деревья, рассчитанные на основании сравнения последовательностей ITS1-5.8S рДНК-ITS2 и *trnL-trnF* видов *Elymus* s.l.

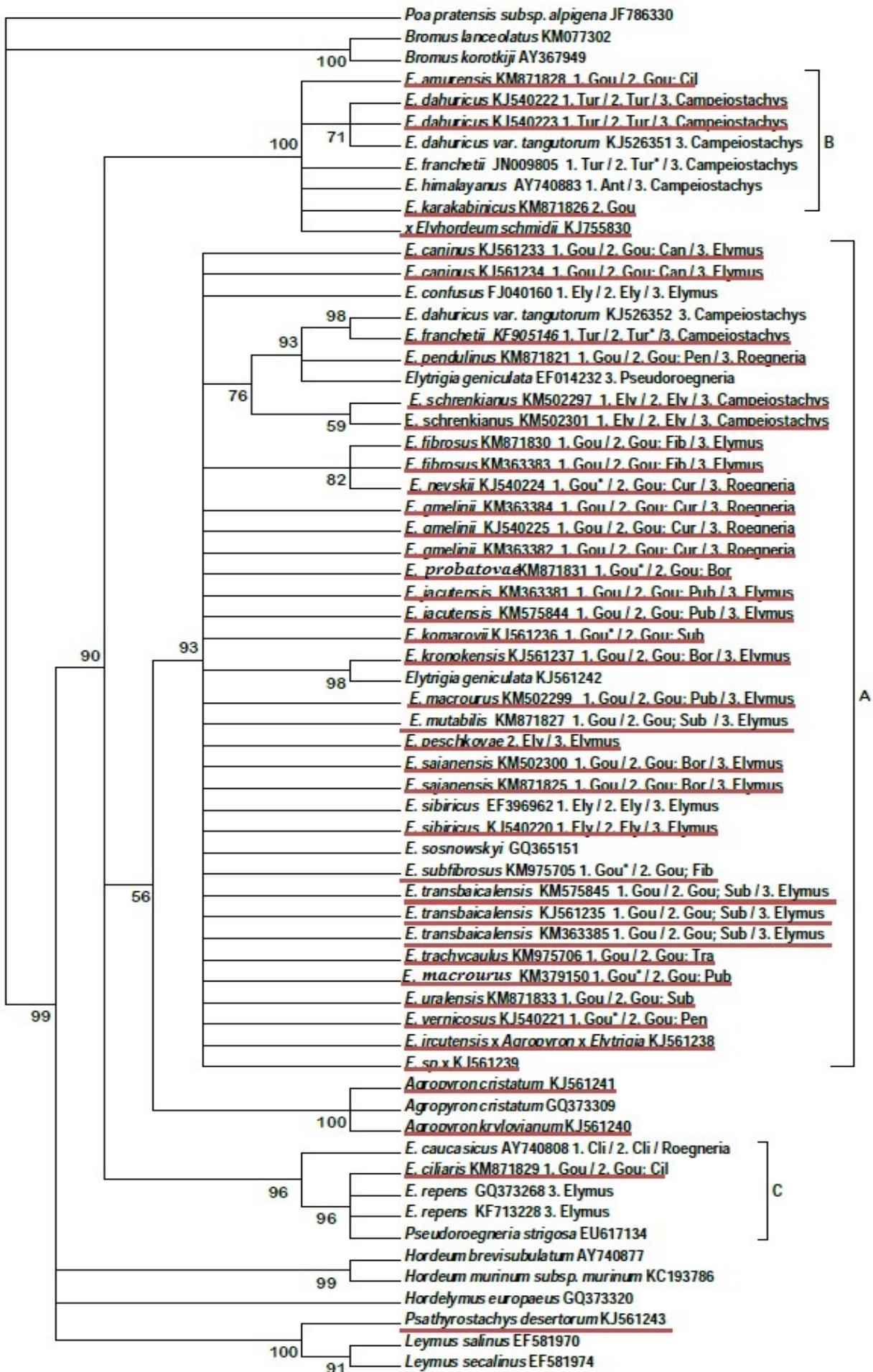
На основании сравнения секвенированных нами ITS-последовательностей *Elymus* и последовательностей, депонированных в GenBank, мы реконструировали молекулярно-филогенетические деревья методами NJ (Neighbor-joining (Saitou, Nei, 1987)) и Байеса (Ronquist, Huelsenbeck, 2003) (по топологии дерева были сходны). Метод Neighbor-joining (NJ) – восходящий кластерный метод для создания филогенетических деревьев. NJ пригоден для использования, в случае, если р-расстояния между ITS-последовательностями невелики. По топологии дерева, построенные методами NJ и Байеса для последовательностей ITS1-5.8S рДНК-ITS2 ядерного генома *Elymus* сходны. На деревьях, построенных методом Байеса виды родов *Elymus*, *Elytrigia*, *Agropyron* и *Elyhordeum* образуют общую кладу с апостериорной вероятностью 90, при анализе методом NJ бутстрэп-поддержка равна 81.



**Рисунок 1.** Метафазные хромосомы *Elymus* sp., Алт. 11-818,  $2n=28$ . Масштабная линейка 10 мкм. (Зеленый светофильтр).

ITS-последовательности пырейников на молекулярно-филогенетических деревьях представлены тремя кладами (состав клад см. на рис. 2). Эти группы родства получили названия клад А, В и С. Для сравнения изменчивости внутри и между кладами *Elymus* в программе Мегаб были рассчитаны р-расстояния между последовательностями видов *Elymus*. Как показали наши данные, р-расстояния между ITS-последовательностями видов *Elymus* и *Elytrigia* оказались сходны. Объяснением данного факта является то, что рода Пырейник (*Elymus*) и Пырей (*Elytrigia*) имеют общий субгеном St, а также возможно были случаи межвидовой (в пределах рода) и межродовой гибридизации между филогенетически близкими родами трибы Пшеницевые. Вне зависимости от метода расчета филогенетических связей, все взятые в анализ виды разделяются на внешнюю группу (*Poa*, *Bromus*, *Leymus*, *Hordeum*) и четыре статистически поддерживаемые клады, названные нами А, В, С, в составе которых мы видим все виды *Elymus*, *Pseudoroegneria*, *Elyhordeum* и отдельную кладу *Agropyron*. Клады А, В, С, *Agropyron* выделяются с бутстрэп индексами (апостериорной вероятностью) 71 (93), 88 (100), 52 (96), 99 (100), соответственно.

Разница в уровнях поддержки, наблюдаемая в данном случае, типична для сравнения результатов Байесовского анализа и расчетами бутстрэп-индексов - как показывают модельные эксперименты, индексы апостериорной вероятности всегда относительно высоки (Erixson et al., 2003; Garsia-Sandoval, 2014). То, что на филогенетическом древе виды *Pseudoroegneria* (*Elytrigia*) располагаются среди видов рода *Elymus* согласуется с неоднократно показанным для американских и азиатских видов *Elymus* фактом, что доминирующими (самыми массовыми в геноме) последовательностями в ЯОР и в локусе 5S рРНК-генов *Elymus* являются последовательности рДНК St-генома *Pseudoroegneria* (Mason-Gamer et al., 2002, 2010; Vaum et al., 2003; Liu et al., 2006, 2008). Клада А (bootstrap=71%, апостериорная вероятность 93%) на филогенетических деревьях ITS-последовательностей, образована видами *Elymus*, принадлежащих к 3 секциям: *Elymus*, *Turczaninovia*, *Goulardia* (подсекции *Curvati*, *Subsecundi*, *Canini*, *Trachyscauli*, *Boreales* – Цвелёв, 2008) и *Elytrigia geniculata*. Образцы *Elymus nevskii* (подсекция *Curvati*) и *Elymus fibrosus* (подсекция *Fibrosi*) образуют умеренно поддерживаемую субкладу (bootstrap=63%, апостериорная вероятность 82%). Интересно отметить, что *Elymus kronokensis* образует субкладу (bootstrap=64%, апостериорная вероятность 98%) с тетраплоидом *Elytrigia geniculata* (секция *Pseudoroegneria*). Три вида рода *Agropyron* образуют кладу с индексом бутстрэп-поддержки 99%. Последовательность вида *xElyhordeum* sp. вместе с последовательностями *E. karakabinicus*, *E. amurensis* (секция *Goulardia*), *E. dahuricus* (секция *Turczaninovia*) и *E. himalayanus* (Китай, Liu et al., 2006) образуют хорошо поддерживаемую кладу В (bootstrap=88%, апостериорная вероятность 100%). Кладу С (bootstrap=52%; апостериорная вероятность = 96%) образуют последовательности следующих видов: *E. caucasicus* (секция *Clinelymopsis*), *E. ciliaris* (секция *Goulardia*) и *E. repens*.



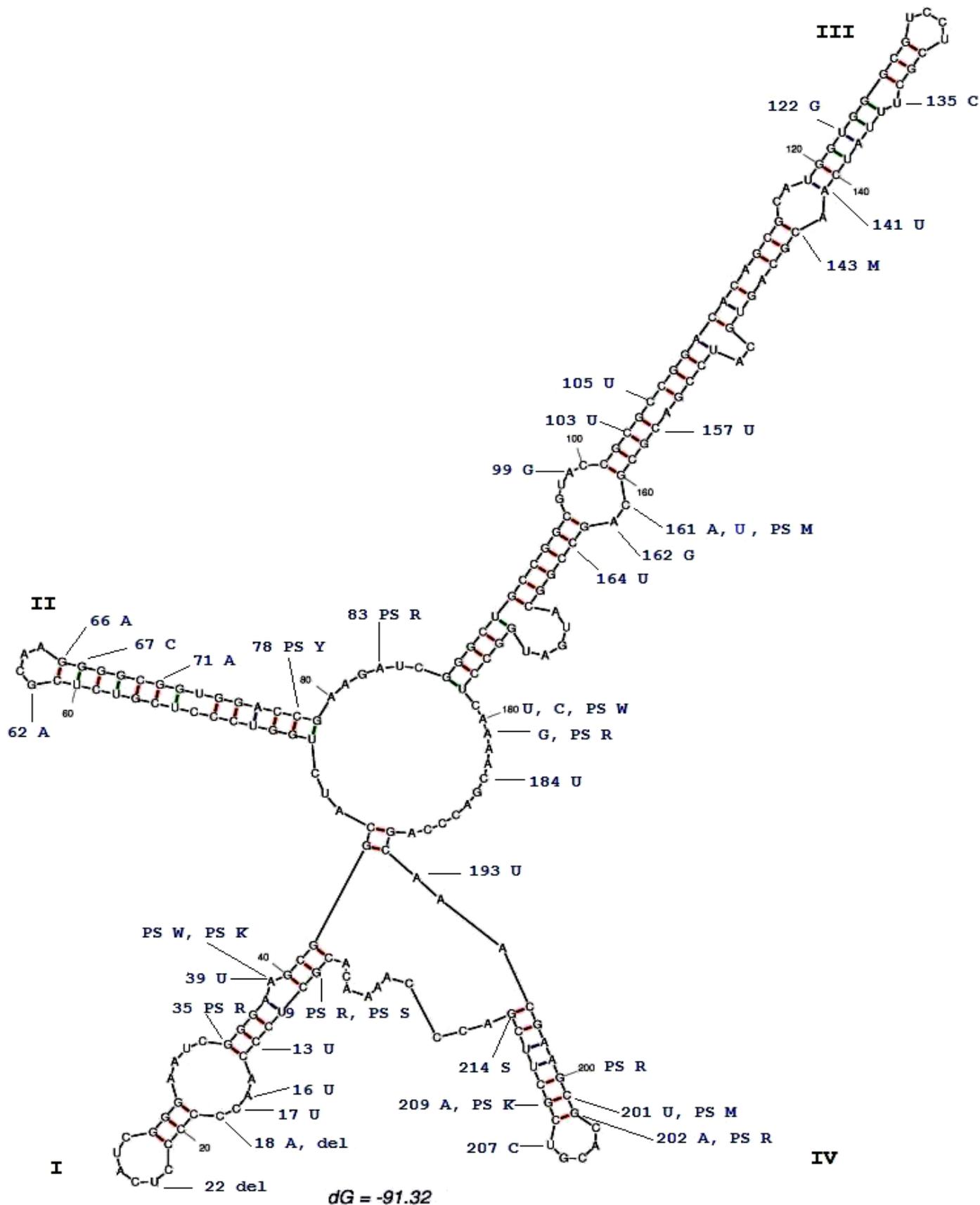
**Рисунок 2.** Филогенетическое дерево, построенное по результатам анализа участка ITS1-5.8S рРНК-ITS2 методом Байеса. Для последовательностей *Elymus* под цифрой 1. указана секция, согласно системе Н.Н. Цвелева 1976 г. (Цвелев, 1976): Tur – Turczaninovia, Gou – Goulardia, Cli – Clinelymopsis, Ant – Anthosachne, Ely – Elymus. Под цифрой 2. указана секция, согласно системе Н.Н. Цвелева 2008 г. (Цвелев, 2008): Tur – Turczaninovia, Gou – Goulardia, Cli – Clinelymopsis, Ely – Elymus. Для секции Goulardia указаны следующие подсекции (Цвелев, 2008): Cur – Curvati, Sub – Subsecundi, Pen – Pendulini, Cil – Ciliares, Can – Canini, Tra – Trachycauli, Bor – Boreales, Pub – Pubescentes, Fib – Fibrosi. Под номером 3 указана система родов трибы *Triticeae* в соответствии с геномной конституцией: *Elymus* (StStHH), *Roegneria* (StStYY), *Campeiostrachys* (StStHHYY). Красным цветом подчеркнуты последовательности, секвенированные нами.

Сравнение клад, выявляемых при молекулярно-филогенетическом анализе методами Байеса и NJ с предлагаемым в последних обработках рода *Elymus* делением рода на секции и подсекции, (Цвелев, 1976, 2008; Цвелев, Пробатова, 2010) (см. рис. 2) показывает отсутствие какого-либо соответствия: статистически поддержанные клады во всех случаях включают в себя виды разных секций и подсекций, ни одна из секций или подсекций по итогам сравнительного исследования ITS-последовательностей не выглядит монофилетичной, что может быть связано с многочисленными случаями межвидовой, а также межродовой гибридизации пырейников. Данные политопные аллополиплоидные гибриды объединяют в своем составе геномы от разных рас родительских видов, что является дополнительной трудностью для построения молекулярно-филогенетической реконструкций *Elymus*. Также согласно Антонову (2006), следует различать понятия таксон и генотаксон, которые не во всех случаях полностью совпадают. Кроме ITS-последовательностей в работу были включены также *trnL-trnF* последовательности генома хлоропластов. Длина проанализированных последовательностей *trnL-trnF* включает 1091 выровненную позицию, из них переменных – 109, парсимонично значимых 58 (табл. 1). Деревья, построенные методами NJ и Байеса, для последовательностей *trnL-trnF* генома хлоропластов по топологии схожи, но не полностью совпадают. На филогенетическом дереве, метод Байеса, *trnL-trnF* последовательности 3 родов трибы *Triticeae*: *Elymus*, *Elytrigia*, *Agropyron* образуют общую группу с апостериорной вероятностью 100%, бутстрэп-поддержка этой клады хорошая – 90%; во внешней группе находятся представители родов *Psathyrostachys*, *Hordeum* трибы *Triticeae*. Частота нуклеотидных замен в исследуемом районе у видов рода *Elymus* очень низкая: генетические расстояния между *trnL-trnF* последовательностями *Elymus* варьировали от 0,1% (между *E. gmelinii* и *E. mutabilis*) до 0,9% (между видами *E. dahuricus* и *E. charkeviczii*, а также, между видами *E. dahuricus* и *E. pendulinus*). При попарном сравнении видов рода *Elymus* с *Agropyron cristatum* средняя величина р-расстояния равна 1,2%, с *Pseudoroegneria spicata* — 0,2%. При таком низком общем уровне полиморфизма последовательностей особую значимость могут иметь парсимонично значимые мутации (замены нуклеотидов и делеции / вставки) (табл. 2). Во время проведения данного исследования мы столкнулись с низкой изменчивостью последовательностей ITS и *trnL-trnF*, что привело к получению недостаточно

разрешенных топологий, а с другой стороны, с большим числом случайных нуклеотидных замен участков ITS1 и ITS2, не меняющих вторичную структуру пре-рНК, но маскирующих филогенетический сигнал и затрудняющий построение хорошо разрешенных кладограмм. В связи вышеизложенными фактами был проведен анализ парсимонических замен видов *Elymus*, также была построена молекулярно-филогенетическая сеть NeighbourNet (SplitsTree4), используемая для выявления родственных связей между нуклеотидными последовательностями гибридогенных видов (см. ниже).

### **3.3. Мутации, накопившиеся в ITS1 и ITS2 в ходе дивергенции видов *Elymus*, и их влияние на вторичную структуру рНК-транскрипта**

Теоретически ожидается, что при равной вероятности мутаций в дивергирующих последовательностях частота трансверсий ДНК ( $T \leftrightarrow A$ ,  $T \leftrightarrow G$ ,  $C \leftrightarrow A$ ,  $C \leftrightarrow G$ ) должна быть в два раза выше, чем частота транзиций ( $T \leftrightarrow C$ ,  $A \leftrightarrow G$ ), т.е.  $R$  (отношение частоты транзиций к частоте трансверсий) = 0.5 (Yang, Yoder, 1999). Но, как показано для многих ядерных генов,  $R$  может находиться в интервале 0.5–2 (Ней, Кумар, 2004). Оценка отношения частоты транзиций к частоте трансверсий важна не только для понимания паттерна эволюции ДНК последовательностей, но также для оценки генетических расстояний и филогенетических реконструкций (Yang, Yoder, 1999; Ней, Кумар, 2004). Для всех последовательностей ITS видов *Elymus* разных клад были обнаружены отклонения отношения частоты транзиций к частоте трансверсий от теоретически ожидаемого ( $R=1.5$  для ITS1 и  $R=1.4$  для ITS2), что свидетельствует о стабилизирующей роли отбора в пользу транзиций, в меньшей степени данное несоответствие связано с изменяющимися характеристиками двойной спирали ДНК. Наличие множества замен С на U указывает на то, что наиболее часто в транскрибируемых спейсерах генов рНК замены нуклеотидов происходят в результате дезаминирования 5-метилцитозина, в результате которого образуется тимин (Vanyushin, 2006). Одним из факторов, способствующих высокой частоте замен  $C \leftrightarrow U$ , является также то, что такая замена не меняет вторичной структуры молекулы, так как G образует в рНК пару не только с C, но и с U – так называемую воббл-пару G:U, которая сравнима по силе связи с таковой в паре G:C (Varani, McClain, 2000). При дивергенции видов *Elymus* преимущественно накапливаются мутации, не влияющие на вторичную структуру транскрипта ITS1 и ITS2 (в ITS1 в 17 случаях не нарушалась; в 9 случаях вторичная структура нарушалась, а в 2 даже «улучшалась» – воббл-пара замещалась на пару U:A и был делецирован нуклеотид, нарушающий монотонность двойной спирали. В ITS2 в 31 случае мутация не нарушала вторичную структуру, в 16 «ухудшала», в 1 случае «улучшала» - замена C на U привела к появлению пары U:A). Обращает на себя внимание и тот факт, что две пары из немногочисленных мутаций в ITS1 были компенсационными (рис. 2): C53-G64 заместилось на U53:A64 и G171:U199 заменилось с одной стороны, на G171:C199 и на A171:U199 (в этих позициях внутригеномный полиморфизм) (рис. 3).



**Рисунок 3.** Наиболее энергетически выгодная вторичная структура ITS2 пырейников ( $dG = -91.32$ ), построенная с помощью алгоритма Zuker'a, и распределение мутаций, найденных у видов рода *Elymus*, по молекуле РНК-копии ITS2. Полиморфные позиции: К (G и U), М (A и C), R (A и G), S (C и G), W (A и U), Y (C и U).

### 3.4. Молекулярно-филогенетический анализ рода *Elymus* s. l. на основании сравнения последовательностей анализа участка *trnL-trnF* хлоропластного генома

Обобщив данные по всем секвенированным последовательностям района *trnL-trnF* видов рода *Elymus*, как секвенированных нами, так и депонированных в Генбанке, можно выделить несколько (6) контрастных гаплотипов (хлоротипов). Четыре из них найдены среди секвенированных нами последовательностей *Elymus* флоры России, а также характерны для образцов из Польши, Китая, Японии, Казахстана, а два известны пока только из Китая. Хлоропластная ДНК у большинства растений и, по-видимому, у злаков из трибы Пшеницевые, наследуется по материнской линии (Birky, 1995; но см. Mogensen, Rusche, 2000).

**Таблица 1.** Полиморфизм района *trnL-trnF* видов рода *Elymus* (только парсимонично-значимые позиции).

Consensus		GCAACAAGGTATACAAAGGAAAATTTCTAAAAGTTTTATACTATTTTATAATATDDAG	
1 *E. nevskii KF600695 KAZ	GOU/ROE	-----	A1
2 E. dahuricus AB732930 Japan	TUR/CAM	-----	
3 E. dahuricus KF905194 China	TUR/CAM	-----	
4 *E. dahuricus KJ744040 KHA	TUR/CAM	-----	
5 E. excelsus KF905204 China	TUR/CAM	-----C-----	
6 E. tangutorum KF905191 China	TUR/CAM	-----	
7 E. cylindricus KF905222 China	TUR/CAM	-----	
8 E. cylindricus KF905188 China	TUR/CAM	-----	
9 E. tangutorum KF905195 China	TUR/CAM	-----	
10 E. tangutorum KF905196 China	TUR/CAM	-----	
11 E. tangutorum KF905202 China	TUR/CAM	-----	
12 E. tangutorum KF905219 China	TUR/CAM	-----	
13 E. caucasicus DQ159289 UN	CLI/ROE	-----T-----	
14 *E. excelsus KP325395 SAY	TUR/CAM	-----G-----	A2
15 *E. excelsus KP325398 CHITA	TUR/CAM	-----G-----	
16 *E. cylindricus KP325396 PRIM	TUR/CAM	-----G-----	
17 *E. pendulinus KP325397 PRIM	GOU/ROE	-----G-----	B4
18 E. cylindricus KF905194 China	TUR/CAM	-----DDDD-----	
19 E. dahuricus KF905220 China	TUR/CAM	AADD-DDD-A-----DDDDDDDD-----	B3
20 E. excelsus KF905187 China	TUR/CAM	AADD-DDD-A-----DDDDDDDD-----	
21 E. cylindricus KF905217 China	TUR/CAM	-----T--DDDDDDDDDDDDGGACDDDDDDCGCCDDDDDDDDT-G-	B2
22 E. excelsus KF905189 China	TUR/CAM	-----T--DDDDDDDDDDDDGGACDDDDDDCGCCDDDDDDDDT-G-	
23 *E. peschkovae KP325391 AMUR	ELY/ELY	-----DDDD-T--	B1
24 *E. peschkovae KP325400 YAK	ELY/ELY	-----DDDD-T--	
25 *E. fedtschenkoi KJ755833 ALT	GOU/ROE	-----DDDD-T--	
26 *E. nevskii KJ744043 ALT	GOU/ROE	-----DDDD-T--	
27 E. ciliaris KF600690 UN	GOU/ROE	-----DDDD-T--	
28 E. ciliaris KF600689 Japan	GOU/ROE	-----DDDD-T--	
29 * E. charkeviczii KP325390 CHUK	GOU/ELY	-----DDDD-T--	
30 *E. probatovae KP325394 CHUK	GOU/ELY	-----DDDD-T--	
31 *E. ircutensis KP325393 ALT	GOU/ELY	-----DDDD-T--	
32 *E. subfibrosus KP257587 YAK	GOU/ELY	-----DDDD-T--	
33 *E. vassiljevii KP325392 CHUK	GOU/ELY	-----DDDD-T--	
34 E. excelsus KF905200 China	TUR/CAM	-----DDDD-T--	
35 E. tangutorum KF905193 China	TUR/CAM	-----DDDD-T--	
36 E. tangutorum KF905212 China	TUR/CAM	-----DDDD-T--	
37 E. tangutorum KF905199 CHI	TUR/CAM	-----DDDD-A--	
38 E. caninus KF600688 Poland	GOU/ELY	-----DDDD-A--	
39 *E. caninus KJ744041 ALT	GOU/ELY	-----C-----DDDD-A--	
40 *E. scandicus KP325399 CHU	GOU/ELY	-----DDDD-A--	
41 E. mutabilis KF600695 China	GOU/ELY	-----DDDD-A--	

Примечание: \* - секвенированные нами последовательности; после видового названия стоит номер последовательности в Генбанке, затем географическое происхождение образца, затем секционная принадлежность по Цвелеву (2008: TUR=Turczaninovia, GOU=Goulardia, CLI=Clinelymopsis, ELY=Elymus.) и род, согласно геномному критерию родов (Yen et al., 2005: ELY= *Elymus* (StStHH), ROE=*Roegneria* (StStYY), CAM=*Campeiostrachys* (StStHHYY)). Буквой D отмечены делеции. A1, A2, B1, B2, B3, B4 - варианты гаплотипов.

Поэтому, пока представления о материнском наследовании хлоропластов у *Elymus* не опровергнуты, можно считать, что разнообразие хлоропластной ДНК (хлоротипов), выявленное у разных видов рода *Elymus*, говорит о том, что виды рода имеют несколько разных предков по материнской линии (возможно разные виды *Elytrigia*) (табл. 1). При этом мы не видим определенной связи между гаплотипами хлоропластной ДНК и делением рода *Elymus sensu lato* на секции или на рода по геномному критерию рода, что может быть связано с событиями межвидовой и межродовой гибридизации.

### 3.5. Изменчивость ITS последовательностей группы видов *E. dahuricus* aggr. и происхождение St-субгеномов у этих видов

Согласно современным представлениям отечественных систематиков (Савчкова, 2004; Цвелев, 2008; Цвелев, Пробатова, 2010), в родственную группу видов *E. dahuricus* aggr. входят 4 вида флоры России: *E. dahuricus*, *E. franchetii* (syn.: *E. dahuricus* subsp. *cylindricus*), *E. woroschilowii* и *E. excelsus*. Кроме того, известны ITS-последовательности вида *E. tangutorum* Nevski из Гималаев, близкого к *E. dahuricus* и в некоторых обработках рассматриваемого как форму *E. dahuricus*: *E. dahuricus* var. *tangutorum* Roshev., или *Campeiostrachys dahurica* var. *tangutorum* (Nevski) B.R. Baum, J.L. Yang & C. Yen (Wang, Zhou, 2015; Yang et al., 2015). Исследователи, придерживающиеся геномной концепции вида, на основании геномной композиции этих растений (StStYУНН) относят все эти виды к роду *Campeiostrachys*, рассматривая при этом все четыре вида *E. dahuricus*, *E. cylindricus*, *E. excelsus* и *E. woroschilowii* как разновидности (var.) одного вида *C. dahurica* (Turcz. ex Griseb.) B.R. Baum, J.L. Yang et C.C. Yen (Baum et al., 2011). Среди 11 видов *Elymus sensu lato*, отнесенных авторами цитируемой работы к роду *Campeiostrachys*, есть еще один вид флоры России – *C. schrenkiana* (Fisch. et C.A. Mey.) Drobov (syn. *E. schrenkianus* (Fisch. et Mey.) Tzvel.).

Отметим, что автор рода *Campeiostrachys* Drobov (Извилистоколосник) В.П. Дробов, отнюдь не считал, что *E. dahuricus* следует объединять с *C. schrenkiana* (= *E. schrenkianus*) и относить к роду *Campeiostrachys*. Напротив, он полагал, что виды секции *Turczaninovia* Nevski, к которой, собственно, и относятся виды *E. dahuricus* aggr., следует выделять в иной особый род. К роду же *Campeiostrachys*, по мнению В.П. Дробова, кроме уже названного Извилистоколосника Шренка (*C. schrenkiana*), следует относить вид *C. confusa* (syn.: *E. confusus*), современными агростологами рассматриваемый как вид секции *Elymus* в роде *Elymus*, группа родства *E. sibiricus* aggr. (Агафонов, Герус, 2009; Цвелев, Пробатова, 2010). В таблице 2 (а-б) представлены известные на сегодняшний день последовательности видов *Elymus* из международной базы данных GenBank, указаны только позиции, имеющие парсимоническое значение для видов данной группы родства. Из таблицы 2 следует, что все типы последовательностей ITS видов *Elymus sensu lato*, взятые в анализ, можно разделить на 4 группы, на четыре разных риботипа, и в каждой из этих групп мы видим образцы, определенные как виды из комплекса *E. dahuricus* aggr.: Northern dahuricus St-rDNA (dahuricus A, Северный dahuricus St-

Таблица 2а. Типы ITS-последовательностей у видов рода *Elymus* и рода *Pseudoroegneria*.

	CONSENSUS	GCCTGCCGTGCCTTAGTCGCACCTGCCCAACACGG	
	Consensus Aa	.....	} a
1	<i>P.kosanini</i> EF014236 TUR	.....	
2	<i>P. cognata</i> EF014226 CHI	.....	
3	<i>E. fedtschenkoi</i> AY740838 CHI	.....	
4	<i>P.sosnowskyi</i> GQ365150 TUR	.....A.....	
5	<i>P.stipifolia</i> EF014240 STAV	.....	
6	<i>P.stipifolia</i> EU617039 UN	.....A.....	} b
	Consensus Ab	.....T.....A	
7	<i>P.geniculata</i> EU617141 USDA	.....G.....T.....A	
8	<i>P.geniculata</i> EF014228 RUS	.....T.....A	
9	<i>P.tauri</i> EU617155 UN	.....T.....A	} c
10	<i>E. kronokensis</i> KJ561237	.....T.....A	
	Consensus Ac	.....T.....	
11	<i>P.strigosa</i> JQ360134 UN	.....T.....	} c
12	<i>E. gmelinii</i> KM363382 ALT	.....T.....	
13	<i>E. jakutensis</i> KM575844 ALT	.....W.....	
	Consensus Ad	.....W.....A.....WR.....	} d
14	<i>E. subfibrosus</i> KM975705 YAK	.....TG.....	
15	<i>E. jakutensis</i> KM363381 YAK	.....K.....WR.....	
16	<i>E. macrourus</i> KM379150 ALT	.....A.....WR.....	
17	<i>E. vernicosus</i> KJ540221 ALT	.....A.....WR...M.	
18	<i>Elymus</i> sp. KJ561239 ALT	.....W.....W.....WR.....	
19	<i>E. transbaicalensis</i> KM363385 ALT	.....R.....W.....C.....	
20	<i>E. transbaicalensis</i> KM575845 ALT	.....A.....A.....A.....	
21	<i>E. transbaicalensis</i> KJ561235 ALT	.....W.....A.....WR.....	
22	<i>E. trachycaulus</i> KM975706 PRI	.....W.....A.....WR.....	
23	<i>E. gmelinii</i> KJ755831 KEM	.....W.....A.....WR.....	
24	<i>E. caninus</i> KJ561233 ALTK	.....A.....W.....WR.....	
25	<i>E. caninus</i> KJ561234 KAV	.....W.....W.....TG.....	
26	<i>E. komarovii</i> KJ561236 ALT	.....W.....A.....WR.....	
27	<i>E. ircutensis</i> KJ561238 ALT	.....W.....N.....WR.....	
28	<i>E. confusus</i> FJ040160 CHI	.....A.....A.....TG.....	
29	<i>E. macrourus</i> KM502299 YAK	.....A.....A.....N.....	
30	<i>E. sajanensis</i> KM871825 TUVA	.....A.....A.....NN.....	
31	<i>E. probatovae</i> KM871831 CHU	.....A.....A.....TT.....	
	Consensus Ae	.....A.....A.....	} e
32	<i>E. peschkovae</i> KM871824 YAK	.....A.....A.....	
33	<i>E. dahuricus</i> JN009816 CHI	.....A.....A.....	
34	<i>E. fibrosus</i> KM871830 FIN	.....A.....A.T.....	
35	<i>E. fibrosus</i> KM363383 ALT	.....A.....A.....	
36	<i>E. nevskii</i> KJ540224 ALT	.....A.....A.....	
37	<i>E. mutabilis</i> KM871827 ALT	.....A.....A.....	
38	<i>E. sajanensis</i> KM502300 ALT	.....A.....A.....	
39	<i>E. uralensis</i> KM871833 ALT	.....A.....A.....	
40	<i>E. sibiricus</i> KJ540220 ALT	.....R.....A.....M.....	
41	<i>E. sibiricus</i> EF396962 CHI	.....A.....A.....	

Northern St-rDNA

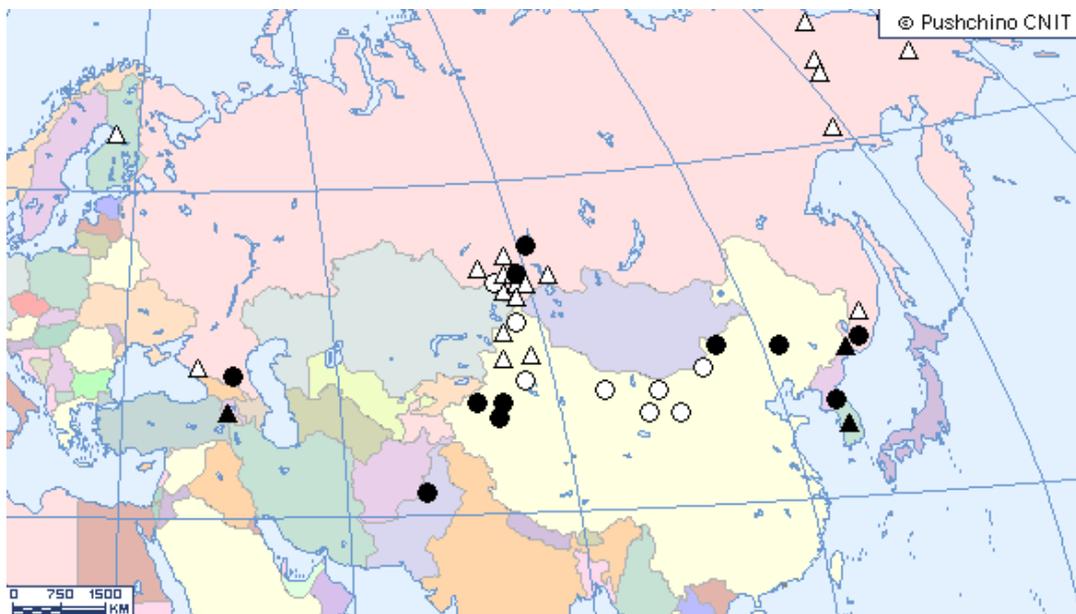
риботип), Southern dahuricus St-rDNA (dahuricus B, Южный dahuricus St-риботип), ITS Northern St-rDNA (northern St, Северный St-риботип), ITS Southern St-rDNA (southern St, Южный St-риботип) (наши обозначения).

Таблица 26. Типы ITS-последовательностей у видов рода *Elymus* и рода *Pseudoroegneria*.

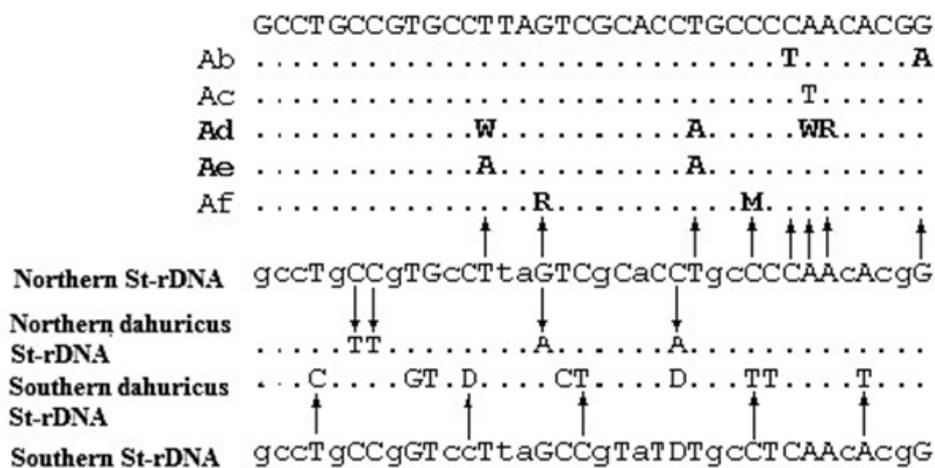
	consensus Af			.....R.....M.....	
42	<i>E. dolichatherus</i>	EU617245	USDA	T.....TA.....T.....	Northern St-rDNA
43	<i>P. elytrigioides</i>	AY740798	C-TIB	.....A.....	
44	<i>E. schrenkianus</i>	KM502297	ALT	.....A.....A.....	
45	<i>E. schrenkianus</i>	KM502301	ALT	.....A.....M.....	
46	<i>E. schrenkianus</i>	KJ776788	ALT	.....G.....T.....	
47	<i>E. schrenkianus</i>	KM502298	TUVA	.....R.....M..WR.....	
	Dahuricus A			.....TT.....A.....A.....	Northern dahuricus St-rDNA
48	<i>E. cylindricus</i>	KF905180	CHI	.....TT.....A.....A.....	
49	<i>E. excelsus</i>	KJ526343	CHI	.....TT.....A.....A.....	
50	<i>E. tangutorum</i>	KJ526352	CHI	.....TT.....A.....A.....	
51	<i>E. dahuricus</i>	KF905152	CHI	.....TT.....A.....A.....	
52	<i>E. dahuricus</i>	KF905178	CHI	.....TT.....A.....A.A.....	
53	<i>E. pednulinus</i>	KM871821	ALT	.....T.....A.....A.....T...K	
54	<i>E. gmelinii</i>	AY740842	C-ALT	.....T.....A.....A.....T.....	
55	<i>E. excelsus</i>	KJ526342	CHI	...C..T.....A.....A.....	
56	<i>E. gmelinii</i>	AY740843	C-ALT	.....T.....A.....D...TT...T.....	
	Dahuricus B			...C...GT.D...CT...D...TT...T.....	Southern dahuricus St-rDNA
57	<i>E. dahuricus</i>	KJ526339	CHI	...C...GT.D...C...A.....	
58	<i>E. cylindricus</i>	KJ526337	CHI	...C...GT.D...CT...D...TT...T.....	
59	<i>E. cylindricus</i>	JN009805	CHI	...C...GTTD...CT...D...TT...T.....	
60	<i>E. dahuricus</i>	KF713222	KOR	...C...GTTD...CT...D...TT...T.....	
61	<i>E. excelsus</i>	KJ526341	CHI	...C...GTTD...T...D...TT...T.....	
62	<i>E. excelsus</i>	JN009803	CHI	...C...GT.D...CT...D...TT...T.....	
63	<i>E. excelsus</i>	JN009809	UN	...C...GT.D...C.R...D...TT...T.....	
64	<i>L. angustus</i>	JQ360093	CHI	...C...GT.D...CT...D...TT...T.....	
65	<i>E. dahuricus</i>	KJ526338	CHI	...C...GT.D...CTA...D...TT...T.A.....	
66	<i>E. cylindricus</i>	KJ526336	CHI	...C...GT.D...C.....D...TT...T.A.....	
67	<i>E. dahuricus</i>	KJ540223	ALT	...C...GT.D...C.....D...TT...T.A.....	
68	<i>E. dahuricus</i>	KJ540222	KHAK	...C...GT.D...C.S...D...TT...T.A.....	
69	<i>E. karakabinikus</i>	KM871826	ALT	...C...GT.D...CYR...D...TT...T.R.....	
70	<i>E. tangutorum</i>	KJ526351	CHI	...C...GT.D...C.....D...TT...T.A.....	
71	<i>E. himalayanus</i>	AY740883	PAK	...C...GT.D...C.....D...TT...TT.....	
72	<i>E. amurensis</i>	KM871828	PRI	...C...AT.D...C...T.D...TT...T.....	
73	<i>E. dolichatherus</i>	EU617242	USDA	.TDCA...GT.D...C.....D...TT...TG.....	
74	<i>E. dolichatherus</i>	EU617246	USDA	.TDCA...GT.D...C.....D.....	
75	<i>P. stripifolia</i>	EU617047	STAV	.....AGT.D...C...C.D...T...T.....	
	Consensus B			.....GT.....C..T.TD...T.....	Southern St-rDNA
76	<i>E. dahuricus</i>	HQ600520	KOR	.....T.....CT..C.D...TT...T.....	
77	<i>P. spicata</i>	AY740793	USA	.....GT.....C..T.TT...T...T.....	
78	<i>P. stipifolia</i>	EU617052	USDA	.....GT.....C..T.TD...T.....	
79	<i>P. strigosa</i>	EF014241	UN	.....AGT.....C..T.TD...T.....	
80	<i>P. kosanini</i>	EF014235	TURK	.....GT.....C..T.TD...T.....	
81	<i>E. ciliaris</i>	KM871829	PRI	.....GT.....C..T.TD...T.....	
82	<i>P. repens</i>	KF713228	KOR	.....T.....C..T.TD...T.....	
83	<i>P. stipifolia</i>	EU617041	STAV	.....GT...C..C..T.TD...T.T.....A	
84	<i>P. tauri</i>	EU617173	USDA	.....GT...C..C...TD...T.....	
85	<i>E. caucasicus</i>	AY740808	ARM	.....AGT...C..C...TD...T.....	
86	<i>P. libanotica</i>	EF014238	IRAN	.....GT...C..C...TT...T...T.....	
87	<i>P. libanotica</i>	EU617123	USDA	.....GT...C..C...TD...T.....	

По 4 вида: *E. dahuricus*, *E. excelsus*, *E. franchetii* (*E. cylindricus*), включая гималайский *E. tangutorum* (полный набор видов этого видового комплекса, взятых в анализ), представлены в общностях, названных нами, учитывая географическое происхождение большинства образцов этих двух риботипов: Northern dahuricus St-rDNA (Северный dahuricus St-риботип) и Southern dahuricus St-rDNA (Южный dahuricus St-риботип). Мы предполагаем (см. рис. 5), что вариант ITS, названный

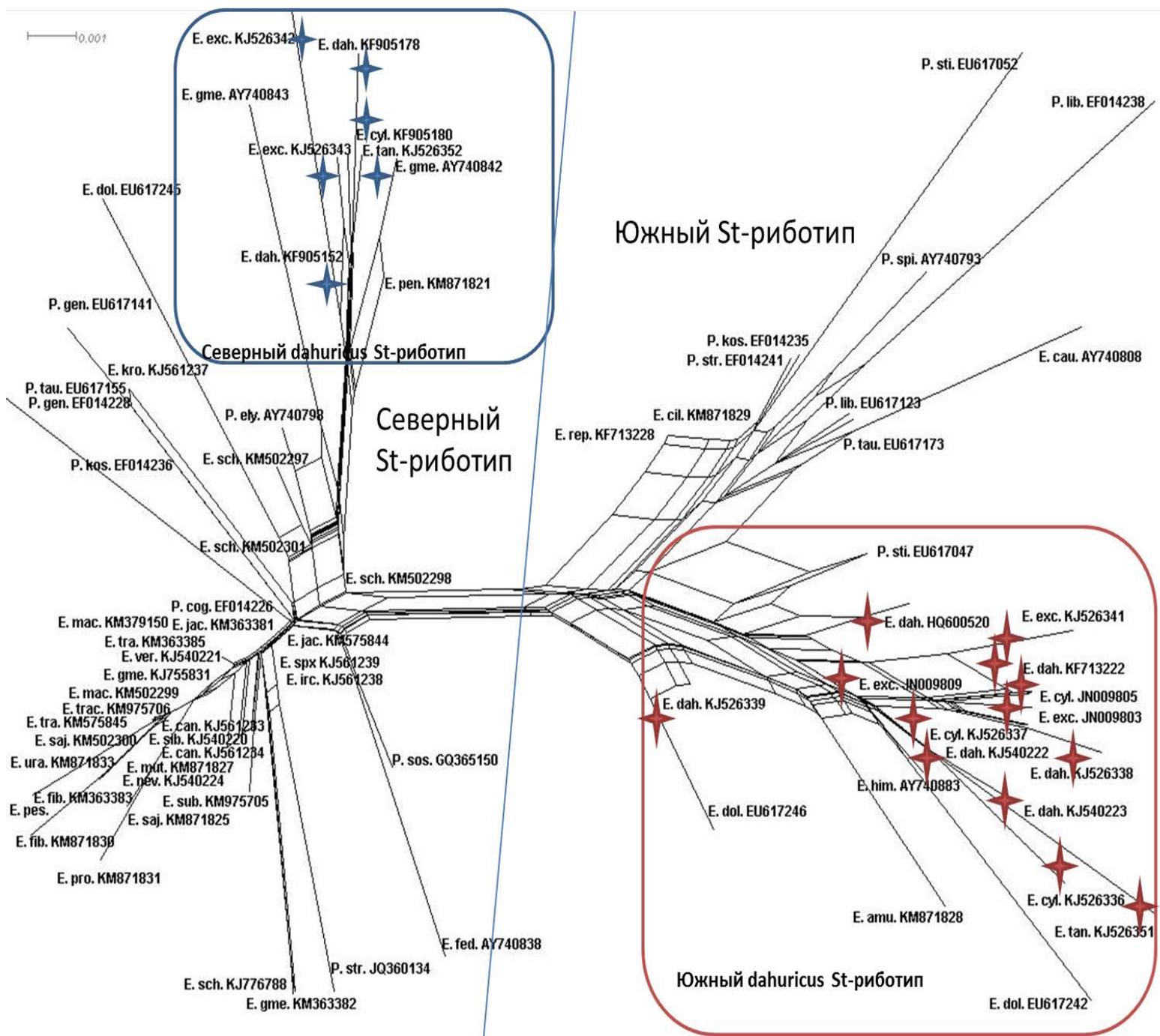
нами Southern dahuricus St-rDNA, есть измененный (4 однонуклеотидных замены, 1 делеция) вариант ITS Southern St-rDNA, а Northern dahuricus St-rDNA, для которого характерны не менее 4 замен нуклеотидов, произошел от варианта ITS, названного нами Northern St-rDNA (рис. 5). Вариант ITS Northern St-rDNA широко распространен среди видов *Elymus* флоры Сибири, Дальнего Востока РФ, Северного Китая и представлен несколькими вариантами (варианты Ab-Af) (табл. 2, рис. 4, 5). Ближе всего к ITS Northern dahuricus St-rDNA оказались ITS-последовательности всех 4-х образцов *E. schrenkianus* из разных частей ареала этого вида. Данные, в какой-то степени, согласуются с отнесением именно *E. schrenkianus* к одному роду с видами *E. dahuricus* aggr. – роду *Campeiostachys* (Baum et al., 2011). Хотя по ряду таксономически значимых признаков *E. schrenkianus* отличается от *E. dahuricus* aggr. (sect. *Turczaninovia*). Поэтому этот вид относится систематиками-морфологами к другой секции – к типовой секции *Elymus* (Цвелев, Пробатова, 2010).



**Рисунок 4.** Распространение видов *Elymus* с разными вариантами риботипов: Northern St-rDNA (Δ), Northern dahuricus St-rDNA (○), Southern St-rDNA (▲), Southern dahuricus St-rDNA (●).



**Рисунок 5.** Парсимонически информативные позиции ITS-последовательностей видов *Elymus* sensu lato. Происхождение риботипов Northern dahuricus St-rDNA и Southern dahuricus St-rDNA. Ab-Af – варианты риботипа Northern St-rDNA.



**Рисунок 6.** Сеть NeighbourNet (SplitsTree4) последовательностей ITS видов *Elymus* и других видов трибы *Triticeae*. Для ITS-последовательности видов *Triticeae* указаны сокращенные видовые названия и номера в GenBank (NCBI) (расшифровку см. текст диссертации, стр. 110) Используемые для построения сети NeighbourNet ITS-последовательности приведены в таблице 2. Последовательности видов группы родства *E. dahuricus* aggr. (*E. dahuricus*, *E. excelsus*, *E. franchetii* (*E. cylindricus*), *E. tangutorum*) отмечены звездочками.

Для того чтобы определить происхождение риботипов, к которым относятся выделенные нами типы ITS Northern St-rDNA и Southern St-rDNA, мы сравнили их с имеющимися в базах данных последовательностями диплоидных и полиплоидных видов рода *Pseudoroegneria* (табл. 2). При этом оказалось, что у диплоидных видов *Pseudoroegneria cognata*, *P. stipifolia*, *P. strigosa* обнаружен тип Northern St-rDNA, а у *P. libanotica* (Иран), *P. spicata* (США), а также у двух образцов, определенных как *P. stipifolia* (Северный Кавказ) и *P. strigosa* – тип ITS Southern St-rDNA. Тип Southern St-rDNA был обнаружен также у *E. caucasicus*

(Армения) и *E. ciliaris* из Приморья, *E. dahuricus* из Южной Кореи. Вариант Northern St-rDNA широко распространен среди видов рода *Elymus* в Сибири, включая Якутию и Чукотку. Обратим внимание, на то, что диплоидные *P. stipifolia*, *P. strigosa* с кариотипами StSt, тетраплоид *P. tauri* ( $2n=28$ , StStPP - Wang et al., 1986), октоплоид *P. kosanini* ( $2n=56$  – Schulz-Schaeffer, Jurasits; 1962; формула кариотипа неизвестна) имеют 2 разных риботипа - и Northern St-rDNA, и Southern St-rDNA. То, что виды *Pseudoroegneria* имеют более чем один тип St-гаплота, первоначально было показано в системе скрещиваний по нарушениям в конъюгации хромосом (Stebbins, Pun, 1953) и затем подтверждено при исследовании ITS и низкокопийных ядерных генов. Разные типы ITS-последовательностей у диплоидных видов *Pseudoroegneria* выявил Yu с соавт. (Yu et al., 2008a).

Существование ITS-последовательностей двух контрастных типов Northern dahuricus St-rDNA и Southern dahuricus St-rDNA, может являться свидетельством того, что в Сибири, на Дальнем Востоке и в северном Китае существуют несколько надежно различающихся по ITS-последовательностям группы популяций (рас) *E. dahuricus* aggr. В каждой из рас представлены все морфологические формы, относимые сейчас к 4 разным видам *Elymus* (или к роду *Campeiostrachys*).

Для описания дивергенции видов у гибридных таксонов традиционные модели эволюции, предполагающие постепенное накопление мутаций, сопровождаемое дихотомическим ветвлением филогенетических ветвей, подходят плохо, поэтому мы обработали результаты секвенирования ITS-последовательностей с помощью алгоритма SplitsTree4 (сеть NeighbourNet), предложенного для исследования сетчатой эволюции (Huson, Bryant, 2006). Полученная при этом схема родства подтвердила описанное выше разделение евразийских видов рода *Elymus* на две группы родства – группу с риботипом Northern St-rDNA и риботипом Southern St-rDNA, при этом риботипы Northern dahuricus St-rDNA и Southern dahuricus St-rDNA являются дериватами этих двух базисных типов рДНК (геномов).

При этом видна особая близость *E. schrenkianus* к группе видов с риботипом Northern dahuricus St-rDNA (рис. 6). Наиболее веским аргументом в пользу раздельного существования видов с типами ITS Northern dahuricus St и Southern dahuricus St могло бы служить доказательство относительно высокой репродуктивной изоляции между этими расами при высокой фертильности гибридов, полученных при перекрестном опылении форм, относящихся к одной расе. Такие эксперименты пока не проведены, но А.В. Агафоновым и соавт. (Agafonov et al, 2001) показано, что семенная фертильность при разных комбинациях родителей из *E. dahuricus* aggr. зависит не столько от комбинации определенных по морфологии таксонов (скрещиваемых форм), а связана, прежде всего, с близостью местообитаний (географическим происхождением). Взятые в комплексе, наши результаты и результаты группы А.В. Агафонова показывают, что система видов в группе видов, называемой *E. dahuricus* aggr. может быть пересмотрена. Прежде всего, по нашему мнению, необходимо определить

местообитания и ареалы растений *Elymus* с геномом (риботипом) Northern dahuricus St-rDNA и растений с геномом (риботипом) Southern dahuricus St-rDNA. Далее надо пересмотреть систему таксономически значимых признаков и попробовать найти особые, присущие только растениям с риботипом Northern dahuricus St-rDNA и растений с риботипом Southern dahuricus St-rDNA морфологические характеристики.

### ВЫВОДЫ:

1. Изменчивость последовательностей ITS1 и ITS2 видов рода *Elymus* обусловлена, преимущественно, наличием однонуклеотидных замен, в отличие от изменчивости последовательностей района *trnL-trnF* генома хлоропластов, которая связана с появлением крупных делеций. Мутации, накапливающиеся в ITS-последовательностях, распределены по длине спейсера неслучайно и большая их часть – транзиции. Среди мутаций в двунитевых районах преобладают такие, которые не влияют на вторичную структуру транскрипта ITS.

2. Анализ парсимонично значимых сайтов в ITS-последовательностях видов рода *Elymus* флоры России и сопредельных стран впервые позволил выявить четыре основных варианта (два семейства) рДНК: характерные для Южной Сибири, Якутии, Северного Кавказа и северо-восточной Евразии, встречающиеся также в Северном Китае риботипы, названные Северный St-риботип и Северный dahuricus St-риботип, а также распространенные в Приморье, в восточном и западном Китае, Корее, Иране, относительно редкие в Южной Сибири риботипы Южный St-риботип и Южный dahuricus St-риботип.

3. Секвенирование и анализ последовательностей *trnL-trnF* видов *E. dahuricus* agg. и группы их родства впервые позволили выявить 6 вариантов хлоропластной ДНК (хлоротипов), четыре из которых найдены у видов рода *Elymus* флоры России, а два известны пока только из Китая. Разнообразие хлоротипов, выявленное у разных видов рода *Elymus* говорит о том, что виды этого рода имеют несколько разных предков по материнской линии.

4. Совместная кластеризация последовательностей ITS1-5.8S-ITS2 видов *Elymus* и *Pseudoroegneria* на молекулярных деревьях, реконструированные методами NJ и Байеса, позволяет предположить, что доминирующими (самыми массовыми в геноме) последовательностями в ЯОР *Elymus* являются последовательности рДНК St-генома, базового для *Elymus* и *Pseudoroegneria*. Наличие трех клад на молекулярно-филогенетических деревьях, включающих ITS-последовательности видов *Elymus*, может являться свидетельством того, что донорами St-генома были разные виды *Pseudoroegneria*.

5. Использование последовательностей ITS1-5.8S-ITS2 для построения молекулярно-филогенетических деревьев методами NJ или Байеса не позволяет выявить на древе кладу, однозначно соответствующую секции *Turczaninovia*, принятой в последних таксономических обработках рода *Elymus*.

6. При анализе последовательностей и предполагаемых вторичных структур транскрипта гена 5.8S рРНК видов *Elymus* была обнаружена молекулярная синапоморфия одного из подтипов St-генома. У видов группы родства *E. dahuricus* aggr. из Южной Кореи и Китая в 136 позиции находится нуклеотид U, а у остальных видов *Elymus* в данном положении в хроматограмме прочитывается С.

7. Наличие полиморфных сайтов в исследованных нуклеотидных последовательностях ITS1-5.8S-ITS2 позволило подтвердить предположения, ранее сделанные агроэкологами, о гибридогенном происхождении отдельных представителей видов *Elymus*.

8. Характеристики коллекции гербарных образцов видов *Elymus*, сохраняемой в России (LE), были расширены сведениями об изученных последовательностях ITS1-5.8S-ITS2 и *trnL-trnF*; все секвенированные нуклеотидные последовательности были депонированы в международную базу данных NCBI GenBank.

## СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

### Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. Пунина Е.О., Мякошина Ю.А., **Добрякова К.С.**, Носов Н.Н., Родионов А.В. Кариологическое исследование злаков (Poaceae) Алтая и Алтайского края. Сообщение 1. // *Turczaninowia*. 2013. Т. 16. №2. С. 127-133.
2. **Добрякова К.С.**, Носов Н.Н. Изменчивость последовательностей ITS1-генов 5.8S рРНК-ITS2 и *trnL-trnF* в ходе дивергенции видов рода *Elymus* L. флоры Сибири и Дальнего Востока // *Вестник СПбГУ*. 2015. Сер. 3. Вып. 4. С. 4-17.
3. **Добрякова К.С.** Аллополиплоидия и происхождение геномов видов *Elymus* L. (Обзор) // *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2017. Т. 178. Вып. 4. С. 127-134.

### Публикации в прочих изданиях:

4. Дмитриева В.А., **Добрякова К.С.**, Носов Н.Н., Родионов А.В. Молекулярно-филогенетическое исследование рода *Elymus* L. трибы *Triticeae* флоры России // Геномное секвенирование. Сборник тезисов 2-ой Всероссийской научно-практической конференции по геномному секвенированию (NGS-2014). М., 2014. С. 10.
5. **Добрякова К.С.** Секвенирование и молекулярно-филогенетический анализ последовательностей ITS видов *Elymus* L. трибы *Triticeae* // 50 лет без К.И. Мейера: XIII Московское совещание по филогении растений: Материалы международной конференции и (2–6 февраля 2015 г., Москва) / Ред. Тимонин А.К. — М.: МАКС Пресс, 2015. С. 128-131.
6. Родионов А.В., Гнутиков А.А., **Добрякова К.С.**, Коцинян А.Р., Носов Н.Н., Пунина Е.О., Мачс Э.М. Динамика изменений генов и спейсеров в районе 35S рРНК в ходе дивергенции таксонов разного уровня у дикорастущих злаков // Живая природа: современное состояние и проблемы развития. Динамика и сохранение генофондов. Материалы отчетной конференции / М.: ИОГен, 2014. С. 48-49.
7. **Добрякова К.С.** Изменчивость последовательностей ITS1-ген 5.8S рРНК-ITS2 и *trnL-trnF* видов рода *Elymus* L. секции *Turczaninovia* (Nevski) Tzvel. // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии: сборник научных статей по материалам XIV международной научно-практической конференции (25–29 мая 2015 г., Барнаул). — Барнаул: Изд-во АлтГУ, 2015. С. 333-336.
8. **Добрякова К.С.** Молекулярно-филогенетическое исследование рода *Elymus* s.l. (*Triticeae*, *Poaceae*) // Сборник тезисов III (XI) Международной Ботанической Конференции молодых ученых. Санкт-Петербург, 4-9 октября 2015. С. 5-6.
9. **Добрякова К.С.** Изменчивость последовательностей ITS1-5.8S-ITS2 видов *Elymus* связанная с гибридизацией и рекомбинацией: филогенетическая сеть NeighbourNet // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии: сборник научных статей по материалам XV международной научно-практической конференции (23–26 мая 2016 г., Барнаул). — Барнаул: Изд-во АлтГУ, 2016. С. 143-147.
10. Пунина Е.О., Гнутиков А.А., Носов Н.Н., Мякошина Ю.А., Коцинян А.Р., **Добрякова К.С.**, Райко М.П., Мачс Э.М., Крапивская Е.Е., Шмаков А.И., Родионов А.В. Исследование злаков Алтая: итоги, проблемы, перспективы // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии: сборник научных статей по материалам XV международной научно-практической конференции (23–26 мая 2016 г., Барнаул). — Барнаул: Изд-во АлтГУ, 2016. С. 87-94.

11. **Добрякова К.С.** Гибридизация и полиплоидия видов рода *Elymus* в связи с проблемами их изучения // Сборник тезисов Всероссийской конференции молодых ученых "Биоразнообразие: глобальные и региональные процессы" (23-27 июня 2016 г., Улан-Удэ). – Улан-Удэ: Изд-во БНЦ СО РАН, 2016. С. 25.
12. Родионов А.В., **Добрякова К.С.**, Носов Н.Н., Пунина Е.О. Система риботипов видов рода *Elymus* (*Poaceae*) не согласуется ни с одной из систем секций и подсекций, предложенными систематиками на основании сравнительно-морфологического анализа // Материалы конференции, посвященной 85-летию со дня рождения В.Н. Тихомирова «Систематика и эволюционная морфология растений». – Москва: Изд-во ООО "МАКС Пресс", 2017. С. 331-337.
13. **Добрякова К.С.** GenBank (база данных последовательностей ДНК) как инструмент анализа видов *Elymus* L. // Вторая всероссийская научная конференция с международным участием «Сорные растения в изменяющемся мире: актуальные вопросы изучения разнообразия, происхождения, эволюции» (Санкт-Петербург, 27-28 ноября 2017 г.) / ООО «Копи-Р Групп», 2017. С. 35-36.

### Благодарности

Искренне благодарю научного руководителя д.б.н., проф. А.В. Родионова за предоставленную возможность проведения данного исследования. Считаю своим долгом выразить благодарность коллективу лаборатории Биосистематики и цитологии БИН РАН, а также К.Г. Петровой (+) за помощь в работе. Выражаю глубокую признательность члену-корреспонденту РАН, д.б.н. Н.Н. Цвелёву (+) за неоценимые консультации и помощь в определении образцов. Искренне благодарю сотрудников ВИР им. Н.И. Вавилова за бесценные советы и помощь в оформлении диссертации на завершающем этапе работы. Данное исследование выполнено при поддержке грантов РФФИ 12-04-31524 мол\_а, 14-04-01416, 15-04-06438 и программы «Динамика генофондов», работа частично проводилась в ЦКП ОБН БИН РАН.