«Растительный мир Азиатской России», 2008, № 1, 58–70

УДК [581.15+543.545+631.523] : 582.542
© 2008

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМОРФНОГО КОМПЛЕКСА *ELYMUS CHARKEVICZII* PROBAT. S.L. (TRITICEAE: POACEAE) ПОЛУОСТРОВА КАМЧАТКА С ПОЗИЦИЙ БИОСИСТЕМАТИКИ И ТАКСОНОМИЧЕСКОЙ ГЕНЕТИКИ

А.В. АГАФОНОВ, Д.Е. ГЕРУС

STUDY OF THE POLYMORPHIC COMPLEX *ELYMUS CHARKEVICZII* PROBAT. S.L. (TRITICEAE: POACEAE) ON THE KAMCHATKA PENINSULA FROM THE VIEWPOINT OF BIOSYSTEMATICS AND TAXONOMIC GENETICS

A.V. AGAFONOV, D.E. GERUS

Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, 630090 Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101
Central Siberian Botanical Garden, SB RAS, 630090 Novosibirsk, Zolotodolinskaya st., 101
Fax: +7(383) 330-19-86, e-mail: agalex@csbg.nsc.ru

Проведено биосистематическое изучение камчатских таксонов *Elymus charkeviczii* Probat., *E. mutabilis* (Drob.) Tzvel. и *E. subfibrosus* (Tzvel.) Tzvel. в сравнении с выборочными биотипами *E. kamczadalorum* (Nevski) Tzvel. По результатам электрофоретического анализа запасных белков эндосперма и гибридологического анализа различительных морфологических признаков сделан вывод, что камчатские растения, определяемые как *Elymus charkeviczii*, *E. mutabilis* и *E. subfibrosus* относятся к формам единого эндемичного камчатского комплекса, за которым предлагается сохранить название *E. charkeviczii* Probat. s.l. С другой стороны, *E. kamczadalorum* представляет собой морфологически и репродуктивно обособленный вид. Тем не менее, явления интрогрессии между *E. kamczadalorum* и *E. charkeviczii* могут иметь место при их совместном произрастании.

Ключевые слова: *Elymus*, биосистематика, таксон, SDS-электрофорез, гибридизация, рекомбинация, генетический анализ.

A biosystematic study of Kamchatka taxa *Elymus charkeviczii*, *E. subfibrosus* and *E. mutabilis* in comparison with selected biotypes of *E. kamczadalorum* was carried out. The results of the electrophoretic analysis of endosperm storage proteins and hybridological analysis of distinctive morphological characters support the previous conclusion that *E. charkeviczii*, *E. subfibrosus* and *E. mutabilis* on Kamchatka are just morphological variants of the same taxon, which probably is endemic to Kamchatka and should be named *E. charkeviczii* s.l. *E. kamczadalorum* is a distinct species although introgression may occur between this species and *E. charkeviczii* at places where the two species grow together.

Key words: *Elymus*, biosystematics, taxon, SDS-electrophoresis, hybridization, recombination, genetic analysis.

ВВЕДЕНИЕ

По данным разных авторов, на п-ове Камчатка произрастает от 10 до 14 видов рода *Elymus* L. (Пробатова, 1985; Якубов, Чернягина, 2004). *E. kamczadalorum* произрастает на юге Аляски и на п-ове Камчатка (Пробатова, 1985), где является одним из самых распространенных видов рода. Ранее было показано, что все образцы *E. kamczadalorum*, собранные в разных районах полуострова, проявили высокий уровень сходства по электрофоретическим спектрам запасных белков эндосперма, что свидетельствует о незначительном полиморфизме данного вида (Агафонов, Баум, 2000).

E. charkeviczii, в отличие от предыдущего вида, указывается лишь для немногих точек на Камчатке, в Северной Корякии, на юге и юго-востоке Магаданской области и повсюду является очень редким (тип — VLA: Корякский округ, Пенжинский р-н, прав. бер. р. Пенжины в 2 км от пос. Аянка,

© Российская академия наук, Сибирское отделение; Центральный сибирский ботанический сад, 2008

кустарниковые заросли, 17 VII 1971, Н. Пробатова, В. Селедец). Согласно описаниям (Пробатова, 1984; 1985), *E. charkeviczii* отличается от *E. kamczadalorum* очень короткошиповатыми члениками оси колоска (в противоположность волосистым), а также более крупными (1.8–2.5, а не 1.3–1.5 мм) пыльниками. Кроме того, из диагноза *E. charkeviczii* следует еще одно существенное отличие — относительно более короткие колосковые чешуи ($k = L_{кч}/L_{нцч} = 0.8$).

E. subfibrosus — один из малоизученных таксонов северных районов Сибири и Дальнего Востока. В отличие от *E. kamczadalorum* и *E. charkeviczii*, вид достаточно широко распространен в Сибири, но на Дальнем Востоке России довольно редок. При его описании автором была дана следующая характеристика (Цвелев, 1964): «Восточносибирский бореальный вид, занимающий как бы промежуточное положение между *R. fibrosa* и *R. macroura* и несомненно близкородственный этим видам. От первого из них *R. subfibrosa* отличается главным образом голыми с внутренней стороны колосковыми чешуями, более мелкими пыльниками и б. м. волосистыми у основания нижними цветковыми чешуями, а от второго — волосистыми лишь у самого основания нижними цветковыми чешуями». Особенностью типового экземпляра *E. subfibrosus* (LE: Sibiria, obl. Jakutsk, Balanach, in arenosis ad fluminen, 15 VII 1898, N. Nilsson) являются укороченные, но широкие колосковые чешуи. Среди дальневосточных гербарных образцов, имеющихся в гербарии VLA (г. Владивосток) таких морфотипов нам обнаружить не удалось. Авторы региональных флор (Пробатова, 1985; Пешкова, 1990) дают подробные описания *E. subfibrosus*, но в целом различия в представлениях о морфологии вида для Сибири и Дальнего Востока достаточно существенные. Можно предположить, что в двух описаниях идет речь либо о разных таксонах, либо о таксоне с очень широкой амплитудой изменчивости по морфологическим признакам.

Среди видов, сомнительных для Камчатки, может быть назван *E. mutabilis*. Как вид в современном понимании, он описан в составе полиморфного таксона *Agropyrum mutabile* Drobov. С.А. Невский (1932) на основании подробного изучения доступного гербарного материала разделил таксон на две самостоятельные видовые единицы, одна из которых (*A. angustiglume*), подразделенная на три подвида (ssp. *sibiricum*, ssp. *irendykense*, ssp. *genuinum*), составляет ядро современного *E. mutabilis*. Другая единица получила название *Agropyrum transbaicalense* Nevski (=*Elymus transbaicalensis* (Nevski) Tzvel. Характер родства между *E. mutabilis* и *E. transbaicalensis* был оценен с позиций биосистематики ранее (Агафонов, 2004). Описание образцов *E. mutabilis*, собранных на Дальнем Востоке (Пробатова, 1985), также несколько отличается от описания сибирских (Пешкова, 1990), что затрудняет сравнение признаков и выявление морфологических различий между сибирскими и дальневосточными популяциями. Поскольку в диагнозах видов *Elymus* многие признаки традиционно приводятся в абсолютных величинах (мм и см), это осложняет анализ признаков, подверженных модификационной изменчивости.

В контексте данной работы существенно то, что на востоке Сибири (Оленекско-Нижнеленский и Алданский флористические районы Якутии) отмечено только несколько краевых популяций *E. mutabilis* (Hultén, Fries, 1986; Пешкова, 1990). Далее к востоку следует разрыв ареала до Камчатки, и лишь отдельные экземпляры были собраны в Магаданской области (Пробатова, 1985). Поэтому, несмотря на морфологическое сходство, произрастание на Камчатке популяций, которые филогенетически близки сибирским популяциям *E. mutabilis*, весьма спорно.

Ранее на основании анализа электрофоретических спектров запасных белков эндосперма было предположено, что камчатские образцы, соответствующие, согласно диагнозам Н.С. Пробатовой (1985), видам *E. charkeviczii*, *E. mutabilis* и *E. subfibrosus*, входят в состав единой популяции (Agafonov, Baum, 1998; Агафонов, Баум, 2000). Для подтверждения данного предположения нами были проведены сравнительные биосистематические исследования с использованием живого материала вышеназванных видов, а также *E. kamczadalorum*, из родства с которым был описан *E. charkeviczii* (Пробатова, 1984). Были поставлены следующие задачи:

1. На гербарном и живом материале в культуре камчатских образцов *Elymus charkeviczii*, *E. subfibrosus* и *E. mutabilis* изучить характер их изменчивости по основным морфологическим признакам на качественном уровне;
2. Исследовать изменчивость и специфичность электрофоретических спектров запасных белков эндосперма, как наиболее доступных генетических маркеров, у данных видов в сравнении с *E. kamczadalorum*;
3. Изучить способность выборочных биотипов вышеназванных таксонов к образованию фертильных гибридов;
4. Провести генетический анализ различительных морфологических признаков, используемых для диагностики камчатских образцов *E. charkeviczii*, *E. subfibrosus* и *E. mutabilis* в современных сводках (Пробатова, 1985; Пешкова, 1990).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Растительный материал. Морфологический анализ проводился на гербарном материале, собранном в разных районах п-ова Камчатка, и на особях, выращенных на открытых делянках и в условиях климокамеры. Для электрофоретического анализа запасных белков эндосперма использовались семена с образцов, собранных авторами, а также семена, любезно предоставленные сотрудниками Института северного луговодства ЯНЦ СО РАН (г. Якутск) академиком ЯАН Г.В. Денисовым и к.б.н. Э.В. Филипповым (табл. 1). Определение растений проводилось с использованием систематических обработок рода *Elymus* для Дальнего Востока (Пробатова, 1985) и Сибири (Пешкова, 1990).

Таблица 1

Происхождение образцов *E. kamczadalorum, E. charkeviczii, E. subfibrosus* и *E. mutabilis*

Код образца	Вид по Цвелеву (1976) и Пробатовой (1985)	Местонахождение, авторы сбора
	Камчатские образцы	
KTO-9609	*E. kamczadalorum*	Камчатка, Елизовский р-н, песчаный берег Тихого океана; h 3 м; N 52° 59.990′; E 158° 51.725′ (A. Агафонов, B. Salomon)
KSO-9610 KSO-9611 KSO-9612	*E. kamczadalorum*	Камчатка, Елизовский р-н, окр. пос. Сосновка, лесная тропа к сопке Острая; h 50 м; N 53° 05.014′; E 158° 17.961′ (A. Агафонов, B. Salomon) **[1]**
KSO-9613	ОИП*	**[1]**
KSO-9603	*E. subfibrosus* (?)	**[1]**
KAD-9614	*E. charkeviczii*	Камчатка, Мильковский р-н, кустарник у бер. р. Поперечная; h 200 м; N 53° 25.874′; E 157° 32.419′ (A. Агафонов, B. Salomon)
KES-9625 KES-9633	*E. mutabilis* (?)	Камчатка, Быстринский р-н, окр. пос. Эссо, пойма р. Уксичан; h 550 м; N 55° 55.524′; E 158° 40.888′ (A. Агафонов, B. Salomon) **[2]**
KES-9612	*E. subfibrosus* (?)	**[2]**
KES-9629	*E. charkeviczii*	**[2]**
KES-9631 **KES-9632**	*E. charkeviczii*	Камчатка, Быстринский р-н, окр. пос. Эссо, дол. р. Быстрая; h 530 м; N 55° 56.099′; E 158° 43.696′ (A. Агафонов, B. Salomon) **[3]**
KES-9634	*E. subfibrosus* (?)	**[3]**
KES-9639 **KES-9640**	*E. mutabilis* (?)	**[3]**
	Популяция	
KES-96	все морфотипы**	Камчатка, окр. Быстринский р-н, пос. Эссо, пойма р. Уксичан и дол. р. Быстрая; кустарник по склону горы по прав. бер. р. Быстрая (A. Агафонов, B. Salomon)
	Якутские образцы	
JAN-8916	*E. subfibrosus*	окр. г. Нерюнгри (О. Потемкин)
JAK-8737	*E. subfibrosus*	Томпонский р-н, окр. пос. Хандыга (В. Доронькин)
JAE-8951	*E. subfibrosus*	Сунтарский р-н, дол. р. Вилюй, окр. пос. Эльгяй (Э. Филиппов)
JAV-8953	*E. subfibrosus*	Верхневилюйский р-н, дол. р. Вилюй, окр. пос. Верхневилюйск (Э. Филиппов)
JAC-8331	*E. subfibrosus*	Ленинский р-н, Нюрбенский стационар Института северного луговодства ЯНЦ СО РАН, селекционный образец (Г. Денисов)
JAC-0101 JAC-0102	МОФ***	30 км на северо-восток от г. Якутск (Н. Ермаков)

Жирным шрифтом выделены образцы, включенные в гибридизацию.
* — особь интрогрессивного происхождения;
** — морфотипы, соответствующие *E. charkeviczii, E. subfibrosus* и *E. mutabilis*;
*** — морфологически отклоняющиеся формы, близкие к *E. subfibrosus*.

Анализ изменчивости по диагностическим морфологическим признакам на качественном уровне. Выборки колосьев с разных растений из смешанных локальных популяций анализировались в лабораторных условиях. Учитывались следующие признаки: плотность и симметричность колосьев; коэффициент относительной длины колосковых чешуй КЧ (соотношение между длиной КЧ и прилежащей нижней цветковой чешуи НЦЧ, $k = L_{КЧ}/L_{НЦЧ}$); степень опушенности НЦЧ и члеников колосковой оси (ЧКО, волосистые — длинношиповатые — короткошиповатые — гладкие).

Электрофорез. Процедуры по выделению белков и электрофорез проводили по методике Laemmli (1970) с модификациями (Агафонов, Агафонова, 1992).

Нумерический анализ электрофоретических спектров. Построение матрицы сделано на основе электрофоретических спектров в варианте +Me, где выявляются как проламины, так и субъединицы глютелина. Компоненты спектра регистрировались как описано ранее (Костина, Агафонов, 2002; Агафонов, 2004). Каждую матрицу обрабатывали по методам Уорда и «полной связи» с использованием коэффициента «Манхэттен расстояний» (Manhattan distances). Все расчеты проводили с помощью компьютерной программы Statistica 5.0.

Половая гибридизация. Все процедуры по созданию половых гибридов и оценки их семенной фертильности (СФ) в поколениях F_1–F_2 были выполнены как описано ранее (Agafonov, 1994; Агафонов, 1997). Уровни половой совместимости биотипов Cs различались согласно последним данным (Agafonov, Salomon, 2002). Для самоопыляющихся видов рода *Elymus* рекомбинационный геннул (РГП) определен как совокупность особей, которые могут формировать половые гибриды со следующими характеристиками:

1. Семенная фертильность (СФ) самоопыленных гибридов F_1 выше нуля;
2. Значения СФ у растений в поколении F_2 после самоопыления могут варьировать от нуля до приблизительно нормальных значений, установленных для родительских биотипов.

Условные границы между уровнями половой совместимости α1 (свободная генетическая рекомбинация) и α2 (ограниченная рекомбинация) могут быть определены эмпирически. У гибридных особей F_1, образованных родительскими биотипами с уровнем совместимости α2, значения СФ падают ниже 40 % от нормальных величин. В поколении F_2 наряду с фертильными обнаруживаются абсолютно стерильные растения с частотой выше 0.05.

Интрогрессивный геннул (ИГП) определен как совокупность особей, которые могут формировать фертильные гибриды с характеристиками:

1. Значения СФ самоопыленных гибридов F_1 выше нуля, но все растения в поколении F_2 полностью стерильны после самоопыления (β1-уровень); или абсолютно стерильны самоопыленные гибриды уже в поколении F_1 (β2-уровень);
2. Восстановление полового размножения возможно только после однократного или многократных возвратных скрещиваний. При этом интрогрессивные явления наблюдаются в следующих поколениях.

Генетический анализ наследования признаков проводили на выборках растений F_2, выращенных на открытом коллекционном участке ЦСБС, наблюдаемое расщепление по фенотипам проверяли по критерию χ^2 (Лобашов, 1969) на соответствие менделевскому типу расщепления (моногибридному и дигибридному).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Анализ морфологической изменчивости

Во всех смешанных популяциях *E. kamczadalorum* в большинстве случаев легко отличим от морфологически близких таксонов, определяемых как *E. charkeviczii, E. subfibrosus* и *E. mutabilis* (далее «комлекс *ChSM*»), по более узким листовым пластинкам (ЛП) и по абсолютно гладким и длинным колосковым чешуям (соотношение длин колосковых и прилежащих нижних цветковых чешуй ($L_{КЧ}/L_{НЦЧ}$ = k = 0.9–1.0). Тем не менее, нами было обнаружено несколько самофертильных особей, отнесенных нами к *E. kamczadalorum*, но имеющих несколько укороченные КЧ (k = 0.8–0.9). Дальнейшее изучение живых особей образца KSO-9613 подтвердило константность этого признака, а электрофоретический анализ обнаружил наличие белковых компонентов комплекса *ChSM*. Растения образцов, в целом отнесенных нами к этому комплексу, характеризовались укороченными колосковыми чешуями (величина $k = L_{КЧ}/L_{НЦЧ}$ варьировала от 0.5 до 0.8) и более широкими листовыми пластинками. В собранной нами выборке растений (популяция KES-96, 158 особей) из окрестностей пос. Эссо также наблюдалась изменчивость по опушенности члеников колосковой оси — от волосистых до мелкошиповатых. Именно высокая изменчивость обширной и плотной популяции в окрестностях Эссо стала основой для идентификации нескольких самостоятельных видов,

отнесенных нами к комплексу *ChSM*. Часть собранных растений в той или иной степени отклонялись в сторону *E. subfibrosus*. Всеми признаками *E. subfibrosus* обладали образцы, колосья которых имели более укороченные колосковые чешуи (k = 0.5–0.7) и редко шиповатые по бокам НЦЧ. Некоторые растения, схожие по общему габитусу со строго диагностированными особями *E. charkeviczii*, имели густоопушенные нижние цветковые чешуи и могут быть формально отнесены к *E. mutabilis*.

Из собранных нами растений были отобраны, выращены и проанализированы контрастные особи, соответствующие диагнозам вышеназванных таксонов. Фрагменты колосьев некоторых из них показаны на рис. 1. Дистанция между точками сбора образцов *E. charkeviczii* составляла 400 км, для *E. subfibrosus* — более 600 км.

Кроме приведенных характеристик, в популяции была отмечена изменчивость по признакам «зеленая — сизая окраска листовых пластинок и стеблей» (дискретный признак), «относительная длина колосковых чешуй» и «выраженность мембран колосковых чешуй» (признаки с непрерывной изменчивостью). При более внимательном сравнении зерновок у растений, отнесенных к *E. charkeviczii*, было обнаружено, что признак «короткошиповатые колосковые членики» также варьирует. По степени увеличения шипиков образцы этого таксона можно поставить в ряд KES-9632 — KAD-9614 — KES-9629 — KES-9631. Растения последнего образца имели заметно выраженный сизый налет на листьях и стеблях. Таким образом, вариабельность по признакам $L_{кч}/L_{нцч}$ и степени опушенности НЦЧ дала основание Н. Пробатовой (1984) описать новый вид *E. charkeviczii* (гладкие НЦЧ и мелкошиповатые членики оси колоска), а также идентифицировать как *E. subfibrosus* и *E. mutabilis* гербарные образцы с частично и полностью шиповатыми НЦЧ соответственно.

Среди якутских образцов изучались две морфологически отклоняющиеся формы (МОФ), отличающиеся от типичных форм *E. subfibrosus* по ярким признакам. Растения образца JAC-0101 имели абсолютно гладкие НЦЧ и короткошиповатые ЧКО аналогично признакам, характерным для *E. charkeviczii*, а растения JAC-0102 — густо опушенные НЦЧ и ЧКО. По остальным признакам, кроме одного, особи двух образцов были близки другим образцам *E. subfibrosus*. Исключение составил признак $L_{кч}/L_{нцч}$. У растений названных образцов этот показатель составлял 0.7–0.8, что приближает их к другому сибирскому виду *E. transbaicalensis*.

Сравнительное изучение доступного материала континентальных форм *E. subfibrosus* и *E. mutabilis* показало, что абсолютных диагностических признаков, вероятно, не существует. Можно вести дискуссию о тенденции. Так, наиболее заметным признаком, отличающим континентальные образцы *E. subfibrosus* и *E. mutabilis* от комплекса *ChSM* является выраженность колосковых мембран, которая может быть поставлена в ряд убывания *E. subfibrosus* — *ChSM* — *E. mutabilis*. Однако, среди последних двух таксонов обнаруживаются формы с достаточно

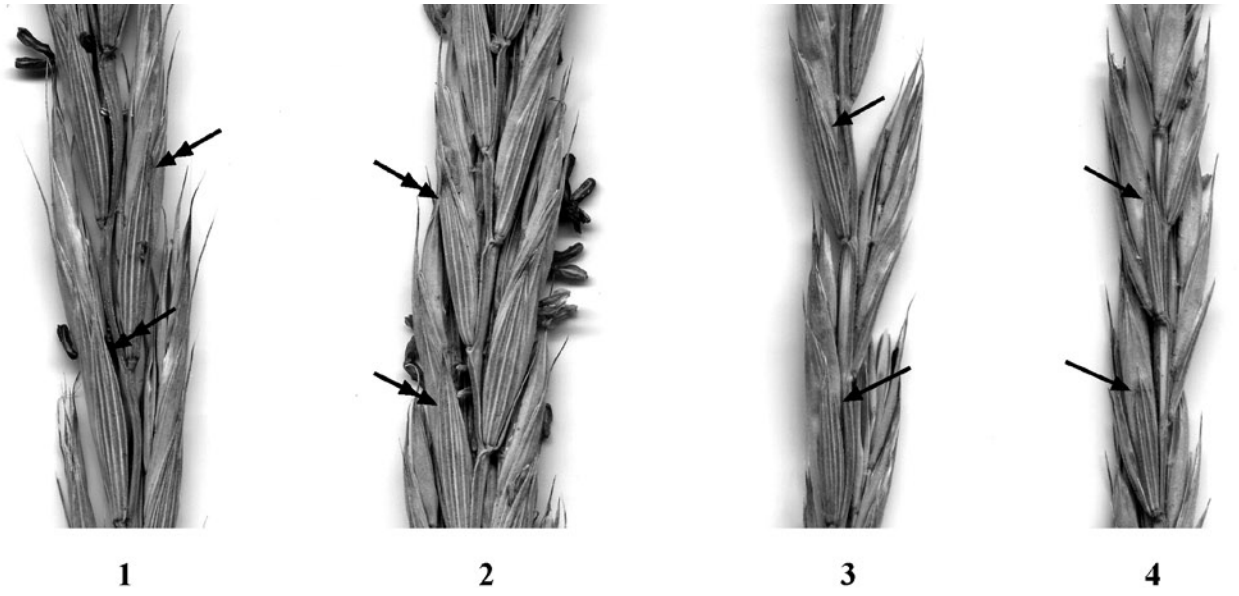

Рис. 1. Фрагменты колосьев выращенных растений камчатских таксонов: 1. *E. charkeviczii* KES-9632; 2. *E. «mutabilis»* KES-9633; 3. *E. «subfibrosus»* KES-9612, нижняя часть колоса; 4. *E. «subfibrosus»* KES-9612, верхняя часть колоса. Стрелки показывают колосковые чешуи k = 0.5–0.7, двойные стрелки показывают колосковые чешуи, имеющие k = 0.7–0.8.

выраженными мембранами. Еще сложнее диагностировать признак «волосистая — голая внутренняя поверхность колосковых чешуй». Этот признак варьирует в значительных пределах у всех названных таксонов. Чаще растения *E. subfibrosus* имеют короткошиповатую внутреннюю поверхность чешуй, а *E. mutabilis* — волосистую. Однако растения с редковолосистыми чешуями отмечены у *E. subfibrosus* (образец JAN-8916), в то время как большинство континентальных особей *E. subfibrosus*, так же как и всех камчатских растений комплекса *ChSM*, имеют короткошиповатые изнутри колосковые чешуи.

Таким образом, на основе исключительно морфологического анализа гербарных и живых образцов невозможно сделать однозначный вывод как о наличии выраженной видовой специфичности внутри комплекса *ChSM*, так и о реальных филогенетических связях между разными камчатскими и континентальными таксонами.

2. Изменчивость по запасным белкам эндосперма

Запасные белки эндосперма (проламин-глютелиновый комплекс) у видов *Elymus* представляют собой полиморфные генетические системы, позволяющие с высокой точностью идентифицировать и регистрировать индивидуальные биотипы, а также получать объективную информацию о видовой специфичности, гетерогенности популяций, преимущественных формах размножения и о явлениях межвидовой интрогрессии (Агафонов, Агафонова, 1992; Kostina et al., 1998; Агафонов, 2004; Герус, Агафонов, 2006).

Ранее нами было показано на примере выборочных образцов *E. kamczadalorum* и комплекса *ChSM* с Камчатки, что эти две группы характеризуются различающимися специфичными полипептидными спектрами и относительно низкой вариабельностью спектров внутри групп (Агафонов, Баум, 2000; Agafonov, Salomon, 2002). Более подробный анализ полипептидных спектров подтвердил эти данные. Все изученные образцы *E. kamczadalorum* из разных районов Камчатки проявили визуальное сходство между собой на фоне незначительной изменчивости, что вполне соответствует представлениям о невысоком уровне полиморфизма эндемичного вида. Полипептидные спектры комплекса *ChSM* в целом отличались по компонентному составу от *E. kamczadalorum* во всех электрофоретических зонах. Вместе с тем, на возможность генетической интрогрессии указывало присутствие у некоторых особей *E. kamczadalorum* компонентов, идентичных по ОЭП с таковыми у особей *ChSM* (рис. 2).

В сравнительный анализ были также включены континентальные образцы *E. subfibrosus*. Они показали гораздо более высокий уровень изменчивости, чем материал с Камчатки. Географически близкие образцы имели большее перекрывание по компонентам спектров, несмотря на различия в морфологии колоса. При этом не было обнаружено полипептидов, тождественных по величине ОЭП с камчатским комплексом *ChSM*. Это также свидетельствует о том, что последний филогенетически отдален от континентальных форм *E. subfibrosus*.

Был проведен сравнительный электрофоретический опыт, в который были включены отдельные континентальные образцы *E. mutabilis* из разных географических точек от Скандинавии до Восточной Сибири в сравнении с камчатским образцом KES-9639, имеющим опушенные (волосистые) нижние цветковые чешуи (рис. 3). Как и следовало ожидать, наибольшее сходство в компонентном составе обнаружилось у образцов из территориально близких точек и районов. Построение числовых матриц и проведение кластерного анализа на основе полных полипептидных спектров с использованием различных методов и коэффициентов позволило получить статистические результаты. В частности, из дендрограммы, построенной по методу «полной связи», следует, что 12 скандинавских образцов образуют общий кластер, но при этом от группы шведских образцов несколько отличается финский H 10340 (рис. 3, **8**). Группа азиатских образцов разделилась на два кластера, один из которых включил восточно-казахстанские, алтайские и один из тувинских биотипов, а другой на разных уровнях различий сочетал биотипы с разным географическим происхождением. Особенно заметно проявились отличия в спектре камчатского KES-9639, зерновки которого не имели ни одного общего полипептидного компонента с другими континентальными образцами *E. mutabilis*. Это косвенно подтверждает предположение, что комплекс *ChSM* отдален от *E. mutabilis* и может рассматриваться как самостоятельный таксон.

Необходимо отметить, что скандинавские популяции вида считаются генетически однородными. Результаты исследования 6 ферментных систем показали полное отсутствие внутривидовой аллозимной изменчивости у *E. mutabilis* в пределах Швеции и Финляндии (Diaz et al., 1999). Эти данные еще раз подчеркивают более высокую разрешающую способность метода анализа запасных белков для изучения внутривидовой изменчивости и популяционных процессов.

Более подробно группу таксонов *E. charkeviczii*, *E. subfibrosus* и *E. mutabilis* изучали на примере

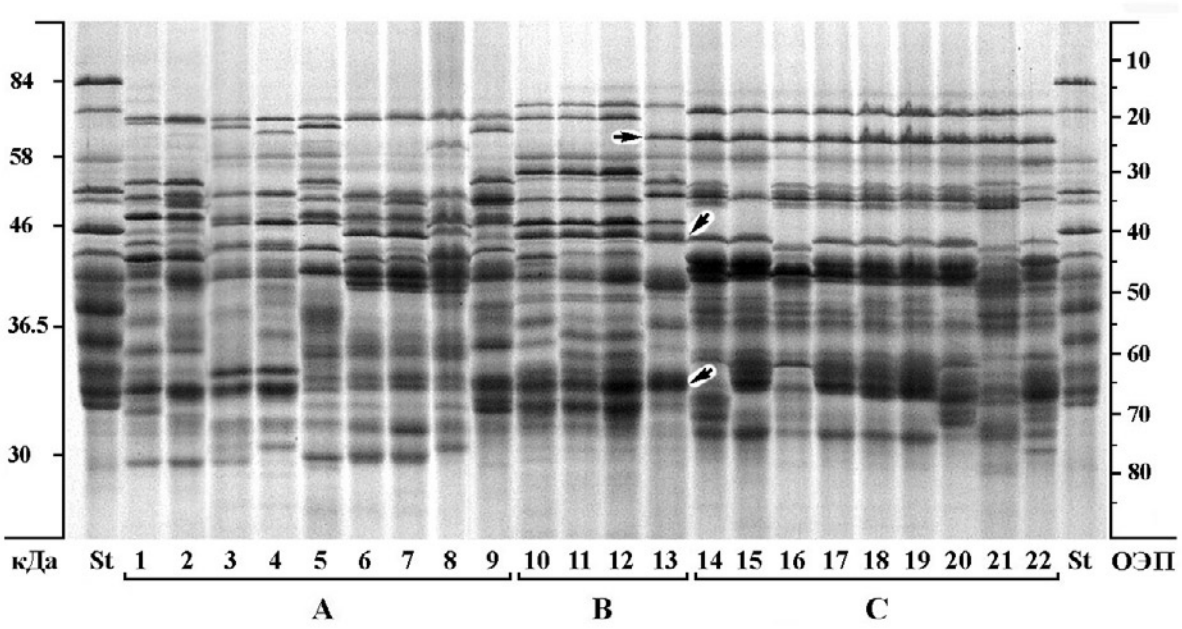

Рис. 2. SDS-электрофореграммы белков эндосперма континентальных образцов *E. subfibrosus* и двух МОФ (A), *E. kamczadalorum* (B) и морфологически близких камчатских таксонов комплекса *ChSM* (C). Полипептидные спектры отдельных зерновок в варианте +Me.
E. subfibrosus: 1. JAC-0102; 2. JAC-0101; 3. JAK-8737; 4. JAE-8951; 5. JAV-8953; 6–8. JAC-8331; 9. JAN-8916.
E. kamczadalorum: 10. KSO-9610; 11. KSO-9611; 12. KSO-9612; 13. KSO-9613; 14. *E. «subfibrosus»* KSO-9603.
E. charkeviczii: 15. KAD-9614; 16. KES-9629; 17. KES-9632.
E. «subfibrosus»: 18. KES-9612; 19. KES-9634.
E. «mutabilis»: 20. KES-9625; 21. KES-9633 (сизая форма); 22. KES-9639.
Стрелками отмечены полипептиды, указывающие на возможность интрогрессии между *E. kamczadalorum* и комплексом *ChSM*.
кДа — ориентировочная шкала молекулярных масс; ОЭП — шкала относительной электрофоретической подвижности.

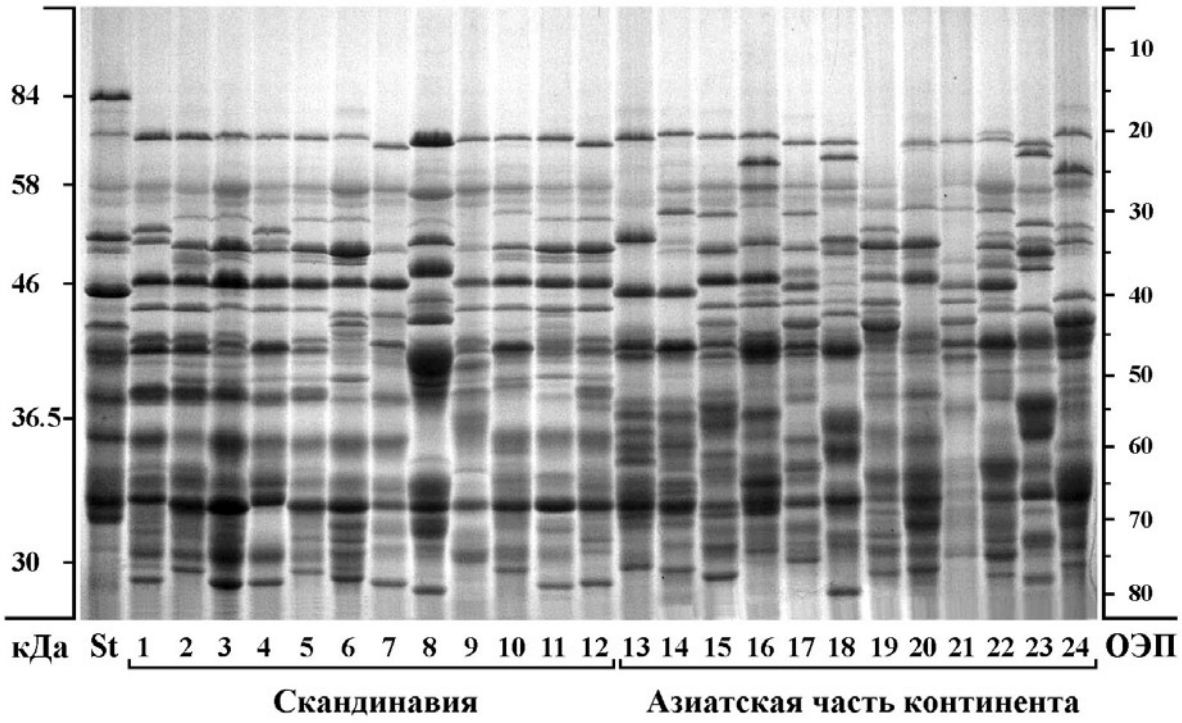

Рис. 3. SDS-электрофореграммы белков эндосперма *E. mutabilis*. Полипептидные спектры отдельных зерновок образцов из Скандинавии (1–12), Киргизии (13), Казахстана (14–16), Тувы (17–18), Горного Алтая (19–20), Западного Саяна (21–23) и Камчатки (24) в варианте +Me.

смешанной популяции KES-96, собранной в окрестностях пос. Эссо. Среди 158 колосьев, собранных с индивидуальных растений, было отобрано 4 фенотипа:

1. Опушенные нижние цветковые чешуи (НЦЧ) и волосистые членики колосковой оси (ЧКО); соответствует таксону *E. mutabilis*.
2. Шиповатые НЦЧ, длинношиповатые ЧКО;
3. Шиповатые НЦЧ по бокам и в верхней части, шиповатые ЧКО; растения с укороченными КЧ соответствуют *E. subfibrosus*.
4. Гладкие НЦЧ, очень короткошиповатые ЧКО; соответствует *E. charkeviczii*.

Чтобы выявить взаимосвязь между четырьмя морфотипами и полипептидным составом белков эндосперма был проведен отдельный опыт (рис. 4).

Анализ полученных спектров показал, что почти все зерновки в той или иной степени (по одному или нескольким компонентам) отличались друг от друга, но вместе с тем сохраняли общее сходство по распределению компонентов. У зерновок популяции р. Уксичан были полностью идентичными полипептиды из зоны BMC (около 70 кДа), совпадающие с зерновками образцов, взятых нами за типовые (KES-9633, KAD-9614 и KES-9634), а также несколько полипептидов в других зонах электрофоретической подвижности. Присутствие в индивидуальных спектрах компонентов, идентичных по ОЭП, то есть частичное перекрывание состава полипептидов, позволило провести статистический анализ сходства по этой характеристике. На дендрограмме, построенной по матрице полипептидных спектров (рис. 5), зерновки разных морфотипов перемешаны и не образуют отдельных кластеров. Таким образом, никаких доказательств видовой специфичности не обнаружено. Другими словами, отобранные фенотипы, соответствующие трем разным таксонам, по генетической структуре могут быть охарактеризованы как единая популяция.

3. Репродуктивные свойства половых гибридов комплекса *ChSM*

Поскольку было предположено, что таксоны комплекса *ChSM* представляют единую популяцию, искусственно разбитую на несколько самостоятельных видов, была проведена серия скрещиваний. Анализ такого рода популяций с позиций традиционной таксономии связан с существенными затруднениями, которые чаще всего преодолеваются путем выделения и описания новых таксонов. Тем не менее, для таксонов с половым размножением одним из важнейших показателей генетического единства популяции

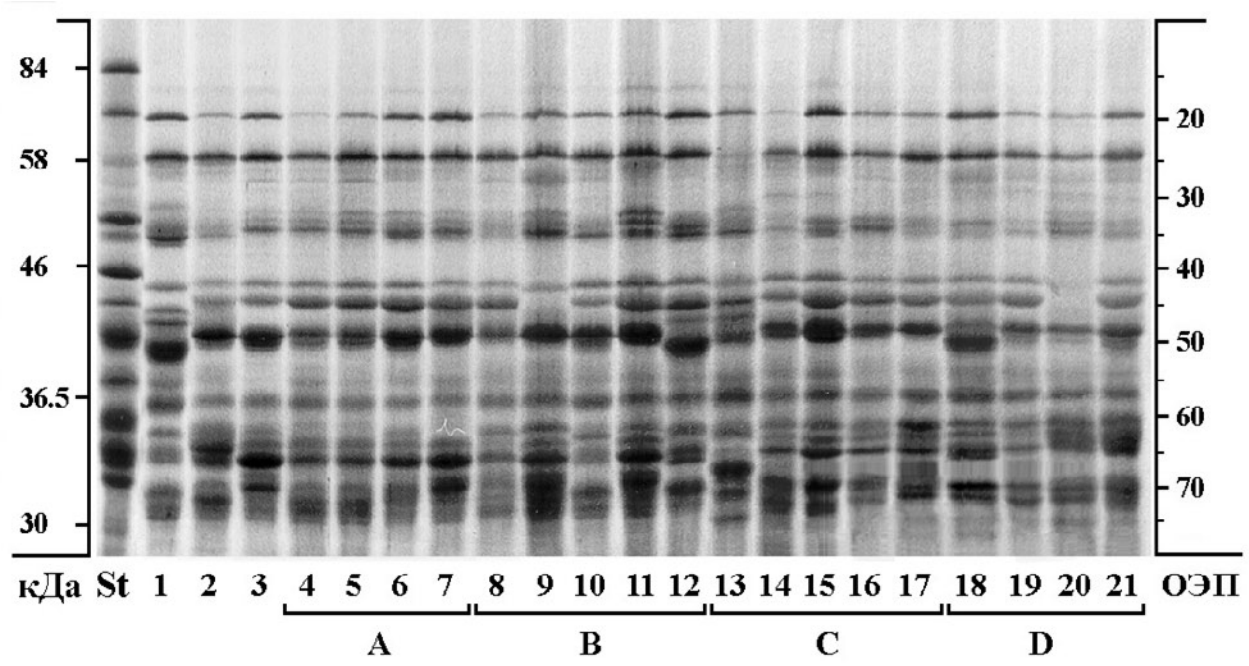

Рис. 4. Изменчивость по полипептидным спектрам белков эндосперма в смешанной популяции KES-96 камчатского комплекса *ChSM*. SDS-электрофорез, вариант +Me.
Спектры зерновок с отдельных растений популяции в сравнении с известными биотипами. 1. KES-9633 (*E. mutab.?*); 2. KAD-9614 (*E. chark.*); 3. KES-9634 (*E. subfibr.?*); 4–7. Опушенные НЦЧ, волосистые ЧКО (*E. mutab.?*); 8–12. Шиповатые НЦЧ, длинношиповатые ЧКО (*E. subfibr.?*); 13–17. Шиповатые НЦЧ по бокам и в верхней части, шиповатые ЧКО (*E. subfibr.?*); 18–21. Гладкие НЦЧ, очень короткошиповатые ЧКО (*E. chark.*).

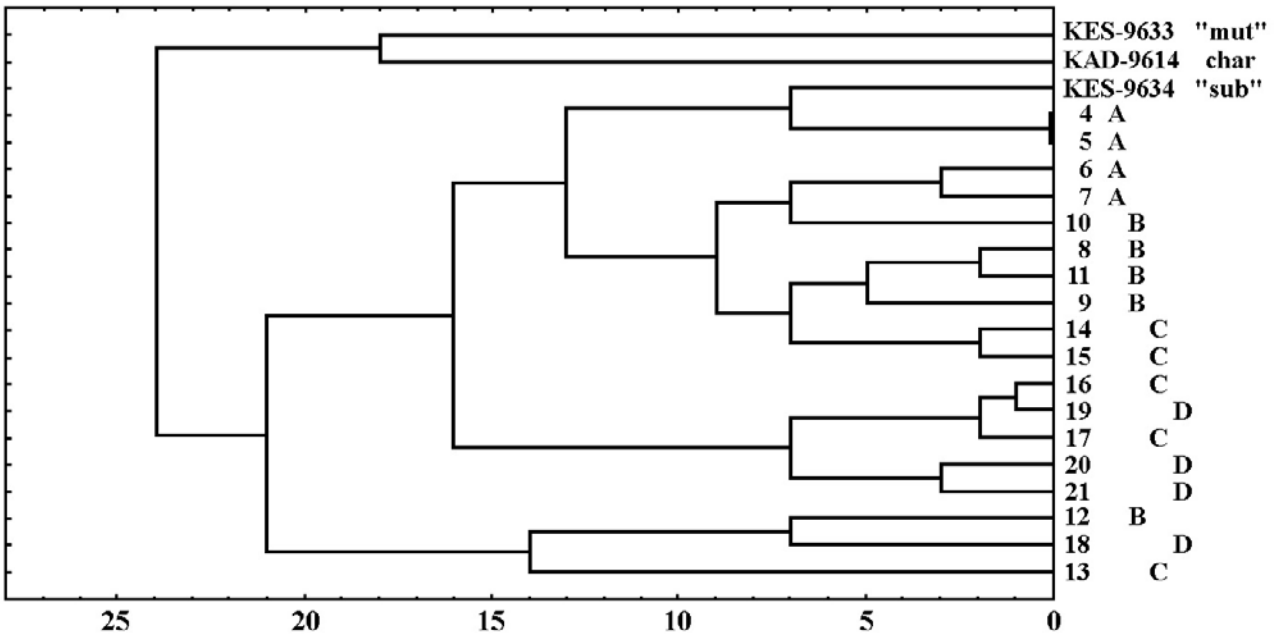

Рис. 5. Дендрограмма по коэффициенту Manhattan distance, построенная на основе данных по проламинам и субъединицам глютелина (рис. 4) по методу «полной связи». A, B, C, D — разные морфотипы НЦЧ и ЧКО. Шкала показывает уровни различий.

является высокая репродуктивная совместимость особей. Именно поэтому нами был создан ряд гибридных растений от родительских форм с различающейся морфологией. Характеристики выборочных биотипов, включенных в половую гибридизацию, приведены в табл. 2.

Перед гибридизацией растения выборочных образцов выращивались в условиях климокамеры и открытого грунта течение 2 поколений. Конкретные признаки, приведенные в табл. 2, проявили полную константность. Это вполне согласуется с многочисленнымм данными о том, что основной формой размножения всех StH-геномных видов *Elymus* является самоопыление, и уровень гетерозиготности растений в норме чрезвычайно низок (Dewey, 1983; Агафонов, Агафонова, 1990; Lu, 1993; Kostina et al., 1998; Агафонов, Баум, 2000).

Половые гибриды между растениями разных образцов были получены в числе 1–3 особей. Гибридное растение *E. kamczadalorum* KSO-9605 × *E. «mutabilis»* KES-9625 имело закрытые пыльники и показало абсолютную стерильность в течение двух

Таблица 2

Морфологические характеристики растений камчатского комплекса *ChSM*, включенных в гибридизацию

Код образца	Листовые пластинки	Колосья	Поверхность НЦЧ	Членики колосковой оси	Дополнительные характеристики
KES-9612 sub?	ГДВ	СПЛ-Р	РШ	ДВ	Колосья до 24 см дл.
KES-9625 mut?	НВ	СПЛ	ДШ	ДВ	Колосья до 18 см дл.
KES-9631 char	Г-Ш	СПЛ	ГЛ	КШ	Нижн. поверх. лист. пласт. длинношиповатая
KES-9632 char	Г-Ш*	СПЛ	ГЛ	КШ	* Верхние листья редко волосистые к концам
KES-9634 sub?	НВ	СПЛ-Р	РШ	ДВ	Колосья до 30 см, пыльн. крупные до 2.5 мм
KES-9639 mut?	ГДВ**	СПЛ	ДВ	ДВ	** Нижние 4 листа только шероховатые
KES-9640 mut?	Г-Ш*	СПЛ	ДВ	ДВ	* Верхние листья редко волосистые к концам

Листовые пластинки (ЛП) сверху: ГДВ — густо длинно-волосистые; НВ — равномерно волосистые; Г-Ш — голые, но шероховатые.
Морфология колоса: СПЛ-Р — средней плотности, ближе к рыхлым; СПЛ — средней плотности.
Поверхность нижних цветковых чешуй (НЦЧ): РШ — редкошиповатые; ДШ — длинно-волосистые; ДВ — длинно-волосистые; ГЛ — гладкие; членики колосковой оси: ДВ — длинно-волосистые; КШ — коротко-шиповатые.

полевых вегетаций (рис. 6). Основные показатели семенной фертильности гибридов внутри комплекса *ChSM*, приведенные в табл. 3, также подтверждают тезис о его генетическом единстве. Тем не менее, исходя из результатов электрофоретического анализа (см. рис. 2), можно предположить возможность интрогрессии между *E. kamczadalorum* и комплексом *ChSM*. Полностью стерильным также был гибрид *E. mutabilis* BAI-9202 (Бурятия) × *E. «mutabilis»* KES-9640.

4. Генетический анализ диагностически различительных признаков в комплексе *ChSM*

Высокие значения СФ гибридов между биотипами комплекса *ChSM*, соответствующие уровню половой совместимости $\alpha 1$, позволили провести оценку наследования различительных признаков. Сестринские гибридные растения внутри всех комбинаций скрещивания были визуально единообразны, что вполне ожидаемо по закону Менделя, и имели промежуточный фенотип по изучаемым признакам. Последний факт свидетельствовал о неполном доминировании альтернативных генов или аддитивном наследовании соответствующих признаков.

В выращенной выборке 11 растений F_2 гибрида KES-9634 × KES-9631 наблюдалось расщепление по двум дискретно различимым парам признаков «зеленые лист. пласт. — сизый налет» и «коротко-шиповатые — волосистые членики колоска» в соотношении 4:7 и 3:8 соответственно. Менее дискретно выраженные фенотипические классы по признаку опушенности НЦЧ наблюдали в малой выборке F_2 гибрида KES-9634 × KES-9625 (9 растений). В ней можно было различить особи с волосистыми НЦЧ, длинношиповатыми, редкошиповатыми и почти гладкими (редкие шипики по бокам и в нижней части НЦЧ).

Чтобы прояснить характер наследования и расщепления в поколении F_2 некоторых диагностических признаков был проведен генетический анализ гибрида *E. «mutabilis»* KES-9639 × *E. charkeviczii* KES-9632, образованного наиболее морфологически контрастными родительскими формами. На делянке было высажено индивидуально 170 растений F_2, из которых 154 достигли стадии колошения. У особей выборки в течение 2 вегетаций регистрировали следующие морфологические признаки:

1. Состояние пыльников (открытые — частично открытые — закрытые).
2. Опушенность листовых пластин (волосистые в той или иной степени — абсолютно голые);
3. Опушенность нижних цветковых чешуй (гладкие — шиповатые — волосистые);
4. Опушенность колосковых члеников семян (длинноволосистые — шиповатые).

В популяции не было обнаружено ни одного растения с закрытыми или частично открытыми пыльниками, что соответствует половой совместимости родительских биотипов на уровне $\alpha 1$. Абсолютно голые листовые пластинки отмечены у 9 особей, остальные распределились в фенотипических классах от редко волосистых к концу листьев до густо-длинноволосистых. Поскольку отчетливые

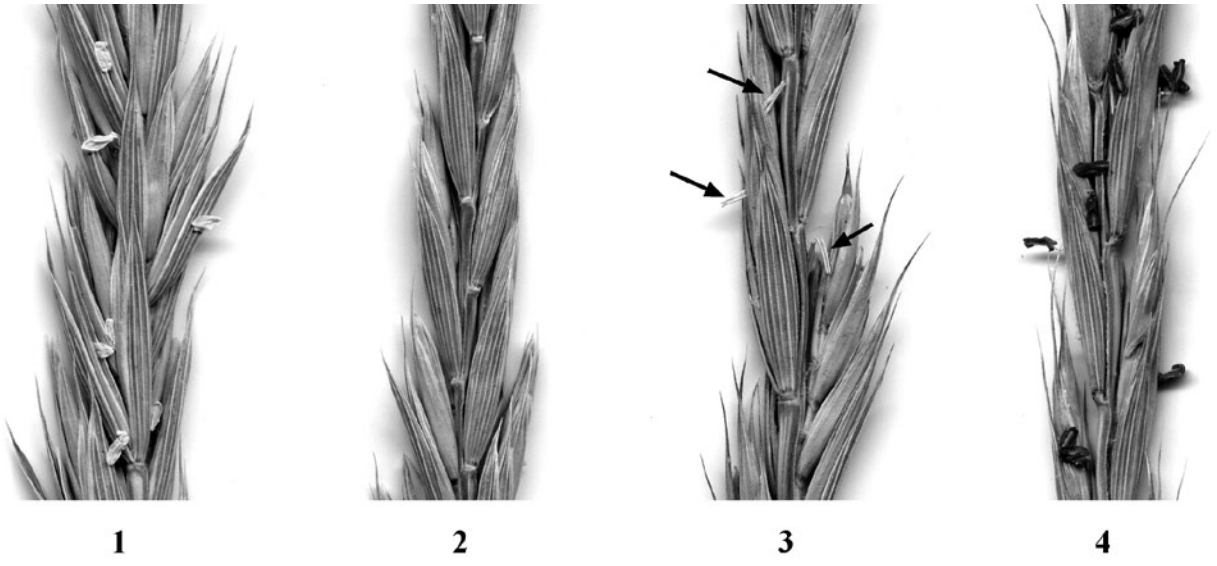

Рис. 6. Фрагменты колосьев выращенных растений камчатских таксонов (1, 2, 4) и гибридного растения *E. kamzchadalorum* × *E. «mutabilis»* (3); 1. *E. kamzchadalorum* KTO-9609; 2. *E. kamzchadalorum* KSO-9605; 3. KSO-9605 × KES-9625; 4. *E. «mutabilis»* KES-9625. Стрелками указаны закрытые пыльники гибрида.

Таблица 3

Наивысшие значения семенной фертильности (СФ) гибридов и уровни половой совместимости Cs камчатских биотипов *E. kamczadalorum* и *ChSM* в поколениях F_1 и F_2

№ п/п	Комбинация скрещивания	Наивысшие значения семенной фертильности в поколениях, %				Уровень Cs
		F_1	N_{F1}	F_2	N_{F2}	
1	KES-9612 sub? × KES-9625 mut?	85.9	3	80.0	2	α1
2	KES-9634 sub? × KES-9625 mut?	82.8	3	87.3	2	α1
3	KES-9634 sub? × KES-9631 char	92.4	3	84.5	2	α1
4	KES-9639 mut? × KES-9632 char	88.6	1	94.5	6	α1
5	KSO-9605 kam × KES-9625 mut?	0.0	1	–	–	β?
6	BAI-9202 mut × KES-9640 mut?	0.0	1	–	–	β?

N_{F1} и N_{F2} — число растений, проанализированных в F_1 и в F_2 соответственно.

границы между классами волосистых пластин зарегистрировать практически невозможно, была проверена гипотеза дигенного наследования признака, по которому различались родительские формы. Тогда рецессивный фенотип $a_1a_1a_2a_2$, соответствующий по предположению абсолютно голым листовым пластинкам, ожидался в соотношении 1:15 с волосистыми в разной степени. В действительности наблюдалось соотношение 9:145, что с вероятностью $P > 0.95$ подтверждает гипотезу о дигенном контроле признака с независимым наследованием генов.

Еще сложнее было разграничить фенотипические классы по степени опушенности НЦЧ. С разной степенью достоверности нами было отмечено не менее 6 фенотипов:

1. Гладкие абсолютно.
2. Коротко редкошиповатые в верхней части.
3. Очень короткошиповатые равномерно.
4. Длинношиповатые (коротковолосистые).
5. Редко- длинноволосистые.
6. Относительно густо- длинноволосистые.

Такое высокое число фенотипических классов и относительно высокая возможность субъективной ошибки при отнесении конкретной особи к определенному классу, на наш взгляд, ставят под сомнение возможность проведения полноценного генетического анализа. Большинство названных фенотипов показали варьирование даже в пределах выборки зерновок с одной особи. Наиболее достоверно различались и могли быть идентифицированы крайние фенотипы с абсолютно гладкими и густо- длинноволосистыми НЦЧ. Нами была предпринята попытка оценить вероятность дигенного наследования признака с неодинаковым влиянием на фенотип или с наличием у гибридных особей плейотропного эффекта. Была проверена гипотеза расщепления в F_2 в соотношении 1:14:1, где частоте 14 соответствуют все промежуточные особи в классическом соотношении дигенного аддитивного наследования 1:4:6:4:1. Тогда наблюдаемое соотношение фенотипов составляло 15:127:12.

При анализе выборки F_2 по признаку опушенности члеников колосковой оси (ЧКО) удалось установить следующее. Изменчивость по признаку также, как в предыдущем случае, не позволила отчетливо выявить фенотипические классы. Степень длины шипиков и волосков на члениках варьировала не только в популяции в целом, но и в известных пределах внутри выборки семян с одного растения. Этот феномен особенно заметен при отборе зерновок с разных уровней колосков — у зерновок более высокого порядка ЧКО длиннее, но шипики или волоски короче. Нам представилось возможным подсчитать только общее соотношение между особями с короткими шипиками, особями со всеми промежуточными состояниями признака и особями с очень длинными волосками. Это соотношение составило 10:128:16.

Результаты анализа расщепления F_2 приведены в табл. 4. Применение критерия χ^2 на пределе достоверности ($0.2 > P > 0.05$) позволило сделать вывод о дигенном характере наследования каждого из двух признаков «опушенность нижних цветковых чешуй» и «опушенность члеников колосковой оси». Обращает на себя внимание тот факт, что особей с абсолютно гладкими цветковыми чешуями (ГЛ) было отмечено больше (15 растений), чем особей с очень короткими шипиками (КШ) на колосковой оси (10 растений). Признак КШ ни разу не встретился у особей с опушенными или даже шиповатыми чешуями. Было отмечено 5 особей, имеющих абсолютно гладкие чешуи, но относительно длинношиповатые (или коротковолосистые) членики

Таблица 4

Расщепление в поколении F_2 гибрида *E. «mutabilis»* KES-9639 × *E. charkeviczii* KES-9632 по признакам опушенности НЦЧ и ЧКО

Фенотип	Наблюдаемое число особей	Ожидаемое число особей	χ^2, P
Опушенность нижних цветковых чешуй			
Гладкие абсолютно (ГЛ)	15	9.625	$\chi^2 = 4.04$
Все промежуточные (ПРОМ)	127	134.75	
Длинноволосистые (ДВ)	12	9.625	(0.2 > P > 0.05)
Опушенность члеников колосковой оси			
Короткошиповатые (КШ)	10	9.625	$\chi^2 = 4.22$
Все промежуточные (ПРОМ)	128	134.75	
Длинноволосистые (ДВ)	16	9.625	(0.2 > P > 0.05)

оси колоска. Однако в целом отчетливо прослеживалась тенденция, что более опушенные нижние цветковые чешуи встречались вместе с более выраженными шипиками или волосками на оси колосков. Это можно объяснить действием одних и тех же двух генов, но при наличии дополнительных генов-модификаторов или общего плейотропного эффекта конкретных генотипов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, по результатам анализа запасных белков эндосперма, гибридизации и генетического анализа диагностических морфологических признаков нами сделан вывод, что гетерогенные камчатские популяции, подразделенные разными авторами на *E. subfibrosus*, *E. mutabilis* и *E. charkeviczii* образуют единую систему популяций, или комплекс. Особи и локальные популяции этого комплекса представлены на Камчатке целой гаммой морфотипов. Часть из них ошибочно относят к *E. mutabilis* или *E. subfibrosus*, другая часть — носители редкого аллеля «короткошиповатая ось колоска» — описаны как самостоятельный вид *Elymus charkeviczii*. Предлагаем оставить за этим комплексом название *E. charkeviczii* Probat s.l. На данном этапе наиболее целесообразным представляется применение географического критерия, подтвержденного результатами биосистематического анализа. Для получения более детальных сведений о филогенетических взаимоотношениях таксона с континентальными популяциями *E. mutabilis* и *E. subfibrosus*, а также с северо-американскими популяциями *E. trachycaulus*, необходимо использовать молекулярные методы с привлечением ДНК-маркеров (Agafonov et al., 2001).

Авторы выражают признательность шведскому ботанику Бьерну Саломону (Dr. B. Salomon) за помощь в сборе природного материала и критическое обсуждение материалов рукописи. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 04–04–48720.

ЛИТЕРАТУРА

Агафонов А.В. Принцип рекомбинационных (РГП) и интрогрессивных (ИГП) генпулов в биосистематике рода пырейник (*Elymus* L.) Северной Евразии // Сиб. экол. журн. 1997. Т. IV. № 1. С. 81–89.

Агафонов А.В. Внутривидовая структура и репродуктивные отношения между *Elymus mutabilis* и *E. transbaicalensis* (*Poaceae*) в Южной Сибири с позиций таксономической генетики // Генетика. 2004. Т. 40. № 11. С. 1490–1501.

Агафонов А.В., Агафонова О.В. Электрофоретические спектры проламина у образцов пырея бескорневищного различного происхождения // Генетика. 1990. Т. 26. № 11. С. 1992–2001.

Агафонов А.В., Агафонова О.В. SDS-электрофорез белков эндосперма у представителей рода пырейник (*Elymus* L.) с различной геномной структурой // Сиб. биол. журн. 1992. Вып. 3. С. 7–12.

Агафонов А.В., Баум Б.Р. Индивидуальная изменчивость и репродуктивные свойства половых гибридов внутри комплекса *Elymus trachycaulus* (*Poaceae: Triticeae*) и близких таксонов. 1. Полиморфизм запасных белков эндосперма у биотипов Северной Америки и Евразии // Turczaninowia. 2000. Т. 3. Вып. 1. С. 63–75.

Герус Д.Е., Агафонов А.В. Моделирование интрогрессивных процессов между *Elymus fibrosus* и *E. caninus* и их регистрация с помощью одномерного SDS-электрофореза // Генетика. 2006. Т. 42. № 12. С. 1405–1413.

Костина Е.В., Агафонов А.В. Изменчивость запасных белков и гистона H1 у *Elytrigia repens* по данным электрофореза // Бот. журн. 2002. Т. 87. № 3. С. 106–115.

Лобашов М. Е. Генетика. *Л*., 1969. С. 132–135.

Невский С.А. К систематике рода *Agropyrum* Gaertn. // Изв. Бот. сада АН СССР (под ред. В.*Л*. Комарова). 1932. Т. XXX. Вып. 5–6. С. 607–635.

Пешкова Г.А. *Elymus* L. — Пырейник // Флора Сибири. Новосибирск. 1990. Т. 2. С. 17–32.

Пробатова Н.С. Новые таксоны сем. *Poaceae* с Дальнего Востока СССР // Бот. журн. 1984. Т. 69. № 2. С. 251–259.

Пробатова Н.С. Мятликовые, или злаки — *Poaceae* Barnh. (*Gramineae* Juss.) // Сосудистые растения Советского Дальнего Востока.. *Л*. 1985. Т. 1. С. 89–382.

Цвелев Н.Н. *Roegneria* C. Koch — Регнерия, пырей бескорневищный // Арктическая флора СССР. М.-*Л*. 1964. Вып. 2. С. 230–247.

Цвелев Н.Н. Злаки СССР. *Л*. 1976. 788 с.

Якубов В.В., Чернягина О.А. Каталог флоры Камчатки (сосудистые растения). Петропавловск-Камчатский. 2004. 165 с.

Agafonov A.V. The Principle of Recombination Gene Pools (RGP) and Introgression Gene Pools (IGP) in the biosystematic treatment of *Elymus* species. // Proc. 2nd Int. *Triticeae* Symp. (Eds. Wang R.R.-C., Jensen K.B. and Jaussi C.), Logan, Utah, USA. 1994. P. 254–260.

Agafonov A.V., Baum B. R. Variation of endosperm protein complex of *Elymus trachycaulus* (Link) Gould ex Shinners // Triticeae III. Proc. 3rd Int. *Triticeae* Symp. (Ed. Jaradat A. A.), Enfield, New Hampshire, Science Publishers. 1998. P. 273–284.

Agafonov A.V., Salomon B. Genepools among SH genome *Elymus* species in boreal Eurasia // Triticeae IV (Ed. Hernбndez P. et al.). Sevilla, Spain. Consejeria de Agricultura y Pesca. 2002. P. 37–41.

Agafonov A.V., Baum B.R., Bailey L.G., Agafonova O.V. Differentiation in the *Elymus dahuricus* complex (*Poaceae*): evidence from grain proteins, DNA, and crossability // Hereditas. 2001. Vol. 135. P. 277–289.

Dewey D.R. Historical and carrent taxonomic perspectives of *Agropyron*, *Elymus* and related genera // Crop Science. 1983. Vol. 23. № 4. P. 637–642.

Diaz O., Salomon B., Bothmer R. von. Absence of genetic variation in Scandinavian populations of *Elymus mutabilis* (Drob.) Tzvel. (*Poaceae*) // Hereditas. 1999. Vol. 131. P. 83–86.

Kostina E.V., Agafonov A.V., Salomon B. Electrophoretic properties and variability of endosperm proteins of *Elymus caninus* (L.) L. // Triticeae III (Ed. Jaradat A.A.). Enfield, New Hampshire, USA. Science Publishers. 1998. P. 265–272.

Hultén E., Fries M. Atlas of North European vascular plants North of the tropic of Cancer. Koelts Sci. Books, Kцnigstein. 1986. P. 997.

Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. Vol. 227. № 5259. P. 680–685.

Lu B.-R. Biosystematic investigations of asiatic wheatgrasses — *Elymus* L. (*Triticeae: Poaceae*). Alnarp, Sweden. 1993. P. 1–57.