

ИЗМЕНЧИВОСТЬ И ВИДОВАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ БЕЛКОВЫХ И ДНК-МАРКЕРОВ У *LEYMUS RAMOSUS* И *L. CHINENSIS* (POACEAE)

Н.К. Бадмаева¹, Д.Я. Тубанова¹, А.В. Агафонов²

¹Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН,
670047, Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6, e-mail: badmayevan@mail.ru, tdolgor@yandex.ru

²Центральный сибирский ботанический сад СО РАН,
630090, Новосибирск, Золотодолинская, 101, e-mail: agalex@mail.ru

Исследована изменчивость состава запасных белков эндосперма, гистона H1 и последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров *ITS1-5.8S-ITS2* ядерной рДНК и *matK* хлоропластной ДНК двух видов рода *Leymus*, проведен анализ их филогенетических отношений. Полученные результаты подтверждают видовую самостоятельность *L. ramosus* (Trin.) Tzvel. и *L. chinensis* (Trin.) Tzvel.

Ключевые слова: Poaceae, *Leymus ramosus*, *L. chinensis*, запасные белки эндосперма, гистон H1, *ITS1-5.8S-ITS2*, *matK*.

VARIABILITY AND SPECIFICITY OF PROTEIN- AND DNA-MARKERS AMONG *LEYMUS RAMOSUS* AND *L. CHINENSIS* (POACEAE)

N.K. Badmaeva¹, D.Ya. Tubanova¹, A.V. Agafonov²

¹Institute of General and Experimental Biology, SB RAS,
670047, Ulan-Ude, Sakhyanovoy str., 6, e-mail: badmayevan@mail.ru, tdolgor@yandex.ru

²Central Siberian Botanical Garden, SB RAS,
630090, Novosibirsk, Zolotodolinskaya str., 101, e-mail: agalex@mail.ru

The variability of storage endosperm proteins, histon H1 and sequences of Internal transcribed spacers *ITS1-5.8S-ITS2* of nuclear rDNA and plastid *matK* of cpDNA in two species of the genus *Leymus* has been explored, the analysis of their phylogenetic relationships has been carried out. The results confirm the specific independence of *L. ramosus* (Trin.) Tzvel. and *L. chinensis* (Trin.) Tzvel.

Key words: Poaceae, *Leymus ramosus*, *L. chinensis*, storage endosperm proteins, histon H1, *ITS1-5.8S-ITS2*, *matK*.

ВВЕДЕНИЕ

Leymus ramosus (Trin.) Tzvel. и *L. chinensis* (Trin.) Tzvel. относятся к секции *Anisopyrum* (Griseb.) Tzvel. рода *Leymus* Hochst. (Triticeae, Poaceae). Эти таксоны очень близки по морфологическим характеристикам и экологическим условиям произрастания. *Leymus ramosus* (Trin.) Tzvel. был впервые описан на основе сборов К.Ф. Ледебера с берегов Иртыша вблизи Семипалатинска К.Б. Триниусом в 1829 г. как *Triticum ramosum* Trin. in Ledeb. Fl. Alt. 1 (1829): 114. *Leymus chinensis* (Trin.) Tzvel. описан также К.Б. Триниусом со сборов Н.Х. Бунге из Северного Китая как *Triticum chinense* Trin. in Mem. Sav. Etr. Petersb. 2 (1835): 146 (цит.: по Н.Н. Цвелеву, 1976). По классификации Г.А. Пешковой (2001) *L. ramosus* является собственно степным видом с европейско-западно-центрально-азиатским ареалом, а *L. chinensis* – лугово-степным видом с восточно-азиатским ареалом. Оба вида экологически пластичны и произрастают в степях, солонцеватых остепненных

лугах, галечниках, у дорог, в населенных пунктах, распространены до нижнего горного пояса.

Комплекс *L. ramosus*–*L. chinensis* является типичным примером близких таксонов с неопределенными филогенетическими связями и таксономическим положением. Значительное морфологическое сходство и огромный полиморфизм, присущий роду, значительно затрудняют определение и выявление филогенетических связей таксонов. Основное морфологическое отличие растений комплекса – гладкие нижние цветковые чешуи и мелкошиповатые членики оси колоска, а также количество колосков на уступе.

Еще М.Г. Попов (1957) рассматривал *L. chinensis* как расу *L. ramosus*, отмечая, что резкой разницы в морфологии и экологии этих видов нет. Ранее нами проведены морфологические исследования, которые не обнаружили четких морфологических признаков, которые могли бы бесспорно разграничить эти виды (Бадмаева и

др., 2006). Чтобы внести ясность в разграничение двух видов, выполнены исследования генетической дифференциации с использованием современных биосистематических и молекулярных методов.

Белки эндосперма зарекомендовали себя как наиболее удобные генетические маркеры (Конарев, 1983) для изучения внутренней структуры таксонов и их филогенетических отношений (Агафонов, Агафонова, 1992; Липин и др., 2008; Агафонов и др., 2015).

Гистон H1 – обязательный компонент хроматина эукариот и весьма эволюционно изменчивый белок с высоким внутривидовым полиморфизмом (Костина, Агафонов, 2002; Агафонов, Костина, 2003; Kosterin et al., 1994). Есть сведения, что изменчивость структуры молекул гистона H1 связана с адаптивной эволюцией растений (Berdnikov et al., 1993). Вследствие высоких темпов эволю-

ционной изменчивости гены гистона H1 могут оказаться полезными для филогенетических реконструкций на внутривидовом уровне и служить уникальными маркерами определенных эволюционных линий (Zaytseva et al., 2012).

Также в настоящее время широко применяются для уточнения спорных вопросов систематики и видовой идентификации молекулярные методы, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР), в том числе секвенирование определенных участков ДНК (Антонов, 2000, 2006; Шнеер, 2005). В нашем исследовании использована изменчивость последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров (*ITS1-5.8S-ITS2*) ядерной рибосомной ДНК и участок хлоропластной ДНК – *matK*, эти регионы применяются для выявления взаимоотношений на разных таксономических уровнях (Baldwin et al., 1995; Hilu, Liang, 1997; Alvarez, Wendel, 2003).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Растительный материал: образцы (живой посадочный материал, семена, высушенные в силикагеле листья) для биохимического и молекулярно-генетического анализов *L. chinensis* и *L. ramosus* большей частью был собран авторами в разных районах Сибири, один образец *L. ramosus* – происходит из Казахстана, один образец *L. chinensis* – из Китая (Внутренняя Монголия) и один образец – из Монголии. Для сравнения были также взяты выборочные образцы *L. littoralis* (Griseb.) Peschkova, *L. dasystachys* (Trin.) Pilger и *Psathyrostachis juncea* (Fischer) Nevski (табл. 1, 2). Ваучерные гербарные образцы хранятся в гербарии УУН. Образцы из разных географических мест произрастания для определения гистона H1 были выращены на экспериментальном участке ЦСБС СО РАН.

Биохимический анализ. Запасные белки эндосперма выделяли из семян с природных популяций по методике для анализа многолетних злаков (Агафонов, Агафонова, 1992). Гистоны H1 получали согласно методике С.М. Розова с соавт. (1986), электрофорез в SDS-системе Laemmli (1970) проводили с модификацией (Костина, Агафонов, 2002). Из каждой зерновки получали два типа белкового экстракта – без добавления 2-меркаптоэтанола (вариант –Me) и с его добавлением (вариант +Me). В качестве стандарта использовали образец ALT-8401 *E. sibiricus* L., белковые компоненты которого определяли ранее по стандартным наборам маркеров молекулярных масс. Для идентификации компонентов построена общая шкала относительной электрофоретической подвижности (ОЭП), позволяющая сравнивать результаты опытов.

Для количественной оценки степени полиморфизма полученные данные представлены в ви-

де матрицы по субфракционному составу бинарных признаков, в которой наличие и отсутствие в гель-спектре одинаковых по размеру фрагментов рассматривались как состояние 1 или 0. На основании полученной матрицы выполнен кластерный анализ сходства образцов по методам Уорда (Ward's method) и "полной связи" (complete linkage) с использованием коэффициента Sity Block (Manhattan distance), построена дендрограмма, отражающая степень родства исследуемых образцов разных видов. Расчеты осуществлялись с использованием компьютерной программы STATISTICA for Windows (version 6.0).

Молекулярно-генетический анализ. Тотальную ДНК выделяли из 20 мг высушенных в силикагеле образцов с использованием набора "NucleoSpin Plant II" (Macherey-Nagel, Германия) по стандартному протоколу производителя. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) осуществляли в термоциклере BIO-RAD T100™ (BIO-RAD, США). Амплификацию ДНК для участка *ITS1-5.8S-ITS2* рДНК проводили в растворе объемом 20 мкл, содержащем 2 мкл 10× *Tag*-буфера; 2 мкл 25 мМ MgCl₂ (финальная концентрация – 2.5 мМ); 2 мкл 10 мМ dNTPs (финальная концентрация – 0.2 мМ); 1 мкл DMSO (4 %); 1 мкл 10 пмоль прямого (F) и 1 мкл 10 пмоль обратного (R) праймеров; 8.7 мкл стерильной деионизированной воды (dd H₂O); 0.3 мкл *Tag*-полимеразы (5 ед./мкл); 2 мкл геномной ДНК (20–40 нг/мкл) (реактивы и праймеры фирмы "Синтол", Россия). Амплификацию ДНК для региона *matK* хпДНК проводили в растворе объемом 25 мкл, содержащем 4 мкл 10× *Tag*-буфера с MgCl₂ в концентрации 3.0 мМ; 3 мкл 10 мМ dNTPs (финальная концентрация – 0.2 мМ); 2 мкл 10 пмоль прямого (F) и 2 мкл 10 пмоль обратно-

**Происхождение образцов *L. ramosus*, *L. chinensis*, *L. littoralis*, *L. dasystachys*
для исследования запасных белков эндосперма и гистона H1**

Номер образца (трека)	Местонахождение, авторы и дата сбора
<i>Leymus ramosus</i>	
OZHL-0420	Россия, Новосибирская обл, Карасукский р-н, степь вокруг оз. Хорошее, alt. 118 м, N 53°34.965' E 78°32.692' (А.Ю. Корольюк), 21.09.04
KCHL-0510	Россия, у границы Красноярского края и Республики Хакасия, вострещово-разнотравная степь, трасса Красноярск–Абакан, alt. 551 м, N 55°04.815' E 089°48.305' (Н.К. Бадмаева, А.С. Липин, А.В. Агафонов), 01.08.05
SHIL-0512	Россия, Красноярский кр., окр. пос. Жемчужный, оз. Шира, остепненный луг, alt. 374 м, N 54°29.968' E 090°09.670' (Н.К. Бадмаева, А.С. Липин), 18.08.05
TKOL-0511	Россия, Республика Тыва, 15 км на юго-запад от г. Туран, Кислые озера, луговая степь, alt. 854 м, N 52°08.417' E 093°45.294' (Н.К. Бадмаева, А.С. Липин, А.В. Агафонов), 16.08.05
TSUL-0509	Россия, Республика Тыва, Пий-Хемский р-н, 5 км восточнее пос. Суш, степь, alt. 729 м, N 52°04.498' E 094°11.016' (Н.К. Бадмаева, А.С. Липин, А.В. Агафонов), 07.08.05
TSHL-0510	Россия, Республика Тыва, Тес-Хемский р-н, дол. р. Шуурмак, высокая терраса, степь, alt. 1032 м, N 50°44.323' E 095°18.799' (Н.К. Бадмаева, А.С. Липин, А.В. Агафонов), 15.08.05
<i>L. chinensis</i>	
MONL-0501	Россия, Республика Бурятия, Тункинский р-н, окр. пос. Монды, дол. р. Иркут, остепненный луг, alt. 1316 м, N 51°40.818' E 100°57.335' (Н.К. Бадмаева, А.В. Агафонов, Д.Е. Герус), 02.09.05
BUGL-0501	Россия, Республика Бурятия, Тункинский р-н, луг в пойме р. Улан-Горхон, alt. 747 м, N 51°41.369' E 102°30.723' (А.В. Агафонов, Д.Е. Герус), 01.09.05
OLHL-0412	Россия, Иркутская обл., о. Ольхон, окр. с. Хужир, разнотравно-вострещовая степь, alt. 468 м, N 53°11.871' E 107°21.500' (Н.К. Бадмаева), 12.08.04
BSDL-0570	Россия, Республика Бурятия, Прибайкальский р-н, окр. с. Степной Дворец, луг, alt. 457 м, N 52°9.461' E 106°21.245' (Н.К. Бадмаева), 20.07.05
BUUL-0820	Россия, Республика Бурятия, окр. г. Улан-Удэ, вострещовая степь у верт. завода, alt. 457 м, N 51°48.265' E 107° 29.452' (Н.К. Бадмаева), 30.08.04
CHIL-0814	Китай, Внутренняя Монголия, Улан-Потунг, песчаная степь, № 14, alt. 1560 м, N 42°34.807' E 117°14.876' (Н.К. Бадмаева), 22.06.07
TURL-0515	Россия, Республика Бурятия, Прибайкальский р-н, южный склон холма вдоль автотрассы Турунтаево–Засухино, alt. 506 м, N 52°11.839' E 107°38.961' (А.В. Агафонов, Д.Е. Герус), 31.08.04
TSHL-9940	Россия, Республика Тыва, Тандинский р-н, 10 км от г. Шагонар, трасса Ак-Довурак–Кызыл (А.В. Агафонов), 2005 г.
<i>L. littoralis</i>	
CHIL-0891	Китай, Внутренняя Монголия, степь, № 9, alt. 1116 м, N 43°14.310' E 117°37.018' (Н.К. Бадмаева), 2007 г.
BUUL-0810	Россия, Республика Бурятия, окр. г. Улан-Удэ, вострещовая степь у верт. завода, alt. 457 м, N 51°48.265' E 107°29.452' (Н.К. Бадмаева), 2008 г.
<i>L. dasystachys</i>	
TKZL-0508	<i>L. dasystachys</i> Россия, Республика Тыва, окр. г. Кызыл, солонцеватая степь, alt. 625 м, N 51° 43.117' E 94°28.084' (Н.К. Бадмаева, А.С. Липин, А.В. Агафонов), 15.08.05

го (R) праймеров; 11.8 мкл стерильной dd H₂O; 0.2 мкл HS *Taq*-полимеразы (5 ед./мкл); 2 мкл геномной ДНК (20–40 нг/мкл) (реактивы и праймеры фирмы “Евроген”, Россия). Участок *ITS1-5.8S-ITS2* рДНК амплифицировали с использованием праймеров: *ITS1* (F), *ITS-B* (R) и *ITS2* (R) (табл. 3) в программе по А. Gardiner et al. (2005).

Регион *matK* хпДНК амплифицировали с двух пар праймеров (см. табл. 3). Условия ПЦР *matK* подбирали опытным путем: денатурация 96 °С – 3 мин; затем 35 циклов: 94 °С – 30 с, 50 °С – 1.30 мин, 72 °С – 3 мин; заключительная стадия 72 °С – 10 мин. Продукты ПЦР визуализировали в 1%-м агарозном геле с использованием SybrGreen (фирмы “BioDye”, Москва, Россия) при

4 В/см. Амплификат очищали набором Mini Elute PCR Purification Kit (Qiagen, Германия). Концентрацию ДНК измеряли флуориметром Qubit (Invitrogen, США). Продукты ПЦР амплифицированного участка *ITS1-5.8S-ITS2* были клонированы с использованием наборов Quick-TA kit (фирма “Евроген”, Москва, Россия) и CloneJet PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, США) по протоколу производителя. На каждый образец получены от трех до пяти клонов, которые были секвенированы. Секвенирование *ITS1-5.8S-ITS2* рДНК выполняли по методу Сэнгера на базе ЦКП “Геномика” СО РАН (Новосибирск) и “Синтол” (Москва) с двух праймеров *M13F* и *M13R* (см. табл. 3). Участок *matK* хпДНК секвенировали с четырех праймеров для

Географические пункты сбора образцов видов, их номенклатурный код и номер нуклеотидной последовательности в Генбанке (GenBank NCBI)

Код образца	Местонахождение, дата и авторы сбора	Номер ITS последовательности в Генбанке	Номер matK последовательности в Генбанке
<i>L. chinensis</i>			
Ch-OL05-44	Россия, Иркутская обл., о. Ольхон, alt. 475 м, N 53°10.533' E 107°17.133' (Н.К. Бадмаева), 2005 г.	KT428717	KX235236
Ch-UU10-6	Россия, Республика Бурятия, г. Улан-Удэ, alt. 519 м, N 51°48.751' E 107°37.359' (Н.К. Бадмаева), 2010 г.	KT428720	KX235238
Ch-UB10-63	Монголия, окр. г. Улан-Батор, alt. 1333 м, N 47°55.62' E 106°56.46' (Н.К. Бадмаева), 2010 г.	KT428719	KX235239
Ch-LU09-43	Китай, Внутренняя Монголия, около 100 км на север от г. Тунляо, alt. 177 м, N 44°20.494' E 121°56.988' (Н.К. Бадмаева), 2009 г.	KT428718	KX235237
<i>L. ramosus</i>			
Ra-ALT09-39	Россия, Алтайский край, окр. г. Веселоярск, alt. 230 м, N 51°16.095' E 081°6.145' (Н.К. Бадмаева, Д.Е. Герус), 2009 г.	KT428715	KX235240
Ra-KAZ09-5	Казахстан, у Чарского водохранилища, alt. 491 м, N 49°14.650' E 81°50.067' (Н.К. Бадмаева, Д.Е. Герус), 2009 г.	KT428716	KX235241
<i>L. littoralis</i>			
Lit-UU10-3	Россия, Республика Бурятия, окр. г. Улан-Удэ, N 51°48.219' E 107°29.655' (Н.К. Бадмаева), 2010 г.	KT428721	KX235234
Lit-EN10-20	Россия, Республика Бурятия, Енхорские пески, N 50°57.805' E 106°23.162' (Н.К. Бадмаева), 2010 г.	KT428722	KX235235
<i>Psathyrostachis juncea</i>			
<i>Ps. juncea</i>	PI222050 (GenBank)	JQ360150.1	-

одного образца по методу Сэнгера на базе “Синтол” (Москва). Данный участок *matK* расшифрован для всех исследованных видов впервые.

Последовательности выравнивали вручную в программе BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999). Секвенированные последовательности *ITS1-5.8S-ITS2* рДНК и *matK* хпДНК депонированы в международную базу данных Генбанк (GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>).

Топология дерева, построенного с использованием метода максимальной экономии (Maximum Parsimony, MP) в программе PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002), идентична с деревом, созданным по методу байесовского сходства (Bayesian similarity) в программе MrBayes v.3.0b3 (Huelsenbeck, Ronquist, 2001). В качестве внешнего корня взят образец *Psathyrostachis juncea* (PI222050, Qinghai, China) JQ360150.1 из Генбанка (GenBank NCBI).

Таблица 3

Праймеры, используемые для ПЦР и секвенирования региона *ITS1-5.8S-ITS2* рДНК и региона *matK* хпДНК

Праймер	Нуклеотидная последовательность	Литературный источник
Праймеры для региона <i>ITS1-5.8S-ITS2</i> рДНК		
<i>ITS1</i> (F)	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White et al., 1990
<i>ITS2</i> (R)	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	
<i>ITS-B</i> (R)	GATATGCTTAAACTCAGCGG	Blattner, 1999
<i>M13F</i>	GTTGTAAAACGACGGCCAGTG	Quick-TA kit, Евроген (протокол)
<i>M13R</i>	AGCGGATAACAATTTACACAGGA	
<i>pJET1.2F</i>	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	CloneJet PCR Cloning Kit, Thermo Scientific
<i>pJET1.2R</i>	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	
Праймеры для региона <i>matK</i> хпДНК		
<i>matK</i> W F	TACCSTATCCTATCCAT	Hilu et al., 1999
<i>matK</i> 9R	TACGAGCTAAAGTTCTAGC	
<i>matK</i> S5-1F	ACCCTGTTCTGACCATATTG	
<i>matK</i> 1210R	GTAGTTGAGAAAGAATCGC	

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Филогенетические отношения *Leymus chinensis* и *L. ramosus* по изменчивости состава запасных белков эндосперма и гистона H1

Изучены популяции *L. chinensis* и *L. ramosus* из разных районов Республики Тыва. Выявлена значительная изменчивость полипептидных спектров не только внутри каждой популяции, но и среди сестринских зерновок, т. е. взятых с одного колоса.

В варианте +Me обнаружены общие компоненты 37 ед. ОЭП (на рис. 1 указаны стрелками) у зерновок *L. chinensis* (TKOL-0511) и *L. ramosus* (TSHL-9940). Оба морфотипа характеризовались изменчивым составом спектров, что свидетельствует о внутрипопуляционном множественном аллелизме соответствующих генов. У зерновок разных таксонов данных популяций обнаружено

визуальное совпадение как отдельных фракций, так и групп полипептидов, особенно субъединиц глютелина (5–8 ед. ОЭП), а также проламина (около 24 ед. ОЭП), выявленного у всех изучаемых в опыте популяций. Виды *L. chinensis* и *L. ramosus* являются типичными представителями перекрестно опыляемых растений, и их популяции характеризуются высокой изменчивостью электрофоретических спектров, отражающих их генетическое разнообразие.

Благодаря процессам рекомбинации у гетерозиготных растений каждая зерновка может иметь отличный от других генотип. Наибольший полиморфизм по белкам эндосперма отмечен у зерновок популяций *L. chinensis* (TKOL-0511 и TSUL-0509).

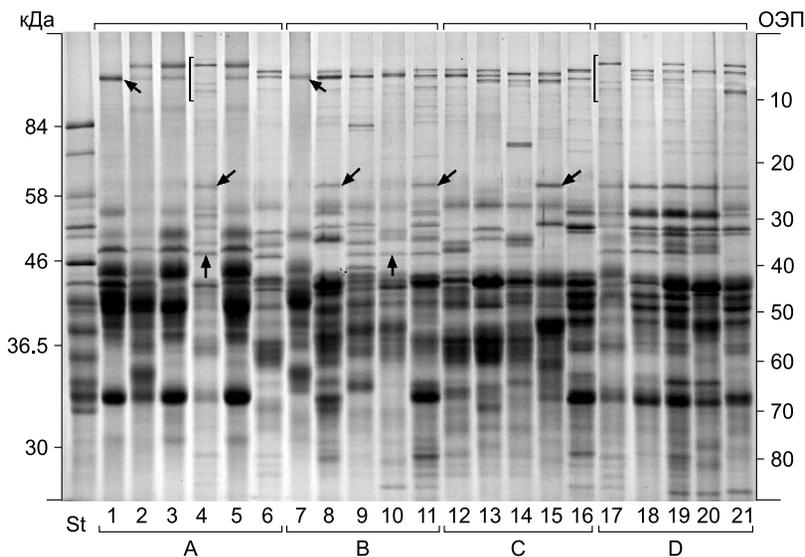


Рис. 1. SDS-электрофореграммы белков эндосперма *Leymus chinensis* (A) и *L. ramosus* (B, C, D) из различных районов Республики Тыва.

Полипептидные спектры отдельных зерновок с разных растений из популяций. Вариант +Me. Стрелками указаны сходные по ОЭП компоненты у *L. chinensis* и *L. ramosus*.

A – TSHL-9940; B – TKOL-0511; C – TSUL-0509; D – TSHL-0510; кДа – ориентировочная шкала молекулярных масс; St – стандартный спектр линии *E. sibiricus* ALT-8401; ОЭП – шкала относительной электрофоретической подвижности.

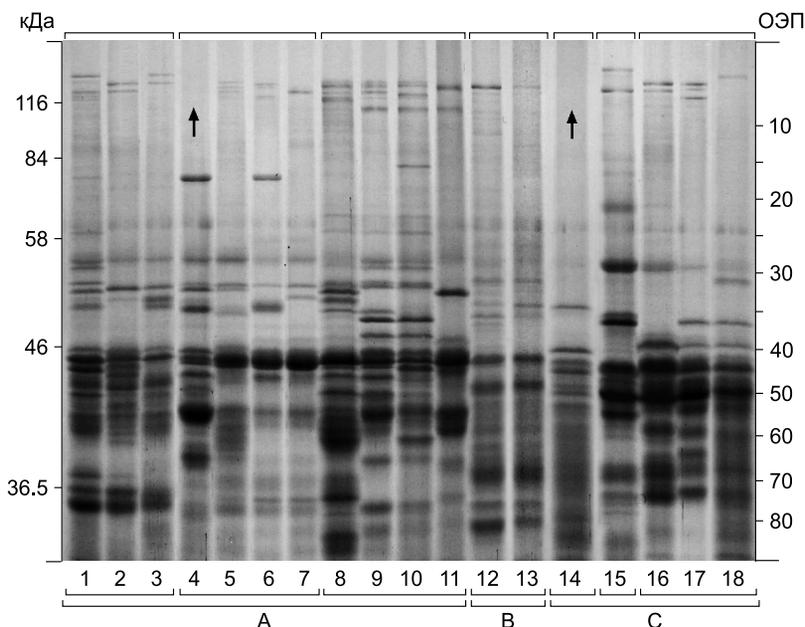


Рис. 2. SDS-электрофореграммы белков эндосперма *L. ramosus* (A) и *L. chinensis* (B, C) из разных районов Южной Сибири.

Полипептидные спектры отдельных зерновок с разных растений из популяций. Вариант +Me. Стрелками отмечены ноль-аллели.

A – *L. ramosus*, слева направо: TSHL-0510, TSUL-0509, KCHL-0510; B – MONL-0501, растения морфологически промежуточные между *L. ramosus* и *L. chinensis*; C – *L. chinensis*, слева направо: BUGL-0501, BSDL-0570, TURL-0515.

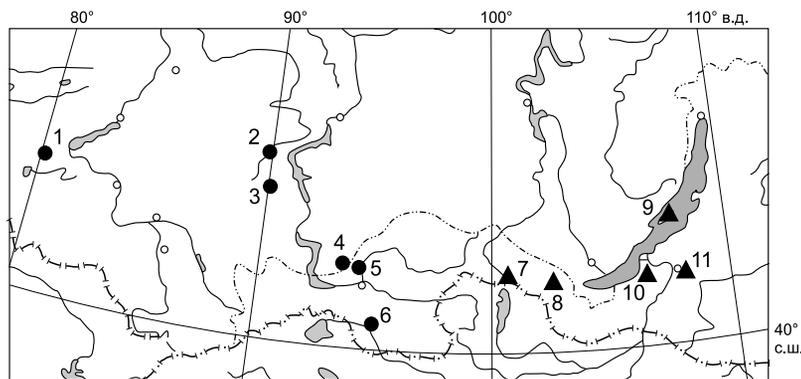


Рис. 3. Географические точки выборок для изучения изменчивости гистона H1 *L. chinensis* и *L. ramosus*. Нумерация соответствует рис. 4 и 5.

Наличие у отдельных зерновок разных видов совпадающих по ОЭП отдельных компонентов и даже целых групп (указаны стрелками) может свидетельствовать о филогенетическом единстве всех популяций обоих видов. Частичное перекрытие по компонентному составу полипептидных спектров было тем выше, чем географически ближе располагались исходные популяции. Тем не менее совпадение отдельных компонентов не может служить абсолютным доказательством генетического единства *L. chinensis* и *L. ramosus* в рамках одного вида.

Выполнено исследование полипептидных спектров белков эндосперма популяций *L. chinensis* и *L. ramosus*, связанное с их географическим замещением в направлении с северо-запада на юго-восток (рис. 2).

Особое внимание уделялось популяциям, географически близким к совместной границе ареалов, а также имеющим морфологические признаки обоих таксонов. Наличие совпадающих компонентов проламина и высокомолекулярных субъединиц глютелина у двух видов также указывает на сходство популяций этих видов. В то же время провести объективный нумерический анализ белковых спектров для подтверждения видовой обо-

собленности не представляется возможным. В отличие от самоопыляющихся таксонов рода *Elymus*, где ранее получены относительно достоверные данные о видовой специфичности белковых спектров (Агафонов, 2004; Агафонов и др., 2015), крайне высокий полиморфизм белков у перекрестно опыляющихся таксонов рода *Leymus* такой возможности не дает.

Для прояснения филогенетических отношений видов рода проведено электрофоретическое изучение изменчивости субфракционного состава гистона H1 у образцов из популяций *L. chinensis*, *L. ramosus*, *L. dasystachys* и *L. littoralis*, также связанное с их географическим замещением в направлении с северо-запада на юго-восток Сибири (рис. 3). Считается, что естественной границей между ареалами видов является Тункинский район Республики Бурятия вблизи пос. Монды (Пешкова, 1990). У обоих видов выявлена высокая неоднородность в субфракционном составе гистона H1 за счет большого числа неповторяющихся субфракций (рис. 4).

В целом спектры образцов *L. chinensis* по расположению субфракций визуально отличались от образцов *L. ramosus*. Заметна тенденция, что субфракции группы **b** у *L. ramosus* имеют более высо-

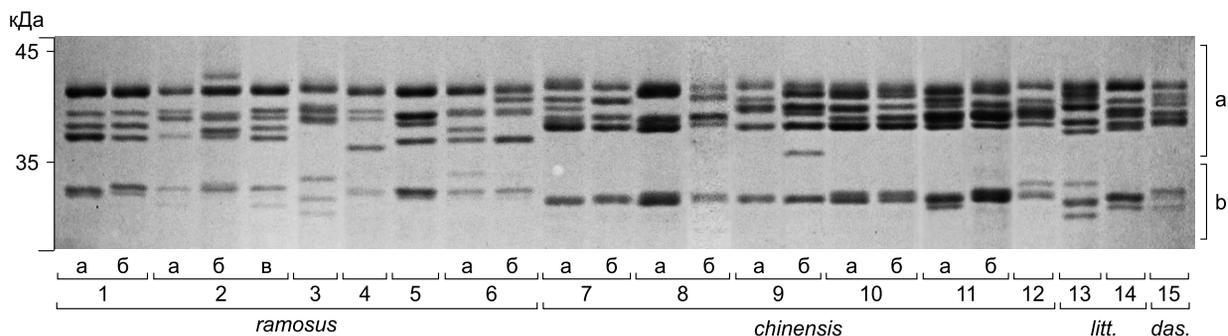


Рис. 4. Изменчивость гистона H1 *L. ramosus* (1–6), *L. chinensis* (7–12), *L. littoralis* (13, 14) и *L. dasystachys* (15), из выборок: 1 – OZHL-0420; 2 – KCHL-0510; 3 – SHIL-0512; 4 – TKOL-0511; 5 – TSUL-0509; 6 – TSHL-0510; 7 – MONL-0501; 8 – BUGL-0501; 9 – OLHL-0412; 10 – BSDL-0570; 11 – BUUL-0820; 12 – CHIL-0814; 13 – CHIL-0891; 14 – BUUL-0810; 15 – TKZL-0508.

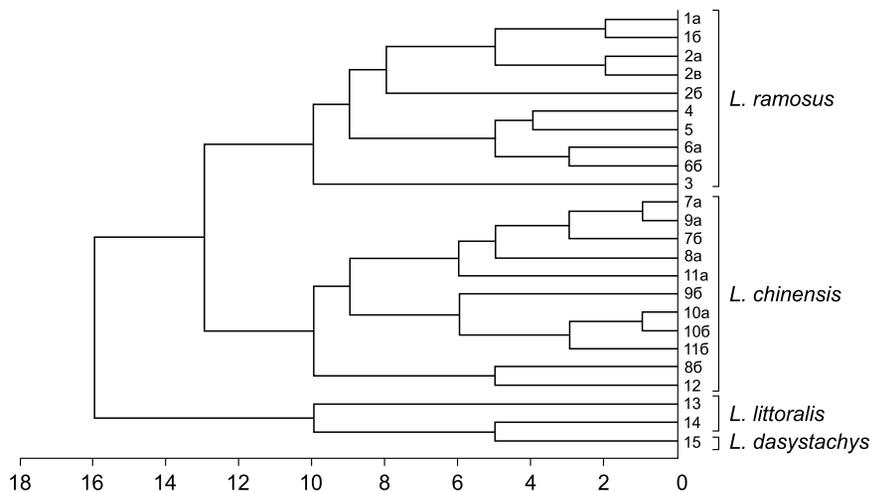


Рис. 5. Дендрограмма, построенная на основе данных по субфракционному составу гистона H1 у *L. chinensis*, *L. ramosus*, *L. littoralis* и *L. dasystachys* по методу полной связи (complete linkage) с использованием коэффициента манхэттенское расстояние (Manhattan distance). Шкала показывает уровень различий.

кие значения молекулярных масс, в то время как субфракции группы **a** у этого вида расположены менее плотно, чем у *L. chinensis*. С этих позиций спектры *L. chinensis* в большей степени сходны с таковыми у *L. littoralis* и *L. dasystachys*, а в группе субфракций **b** есть варианты, сходные с *L. ramosus* (3) и *L. littoralis* (13). Несмотря на наличие у отдельных образцов разных видов, совпадающих по ОЭП отдельных компонентов гистона H1, *L. chinensis* и *L. ramosus* на дендрограмме образовали отдельные клады (рис. 5). По суммарным спектрам *L. chinensis* расположился ближе к выборочным образцам *L. littoralis* и *L. dasystachys*.

В связи с этими данными можно предположить возможность происхождения *L. chinensis* от *L. ramosus* в результате интрогрессии с предковыми формами группы *L. littoralis*–*L. dasystachys*. В этом случае *L. chinensis* должен быть более изменчив, чем *L. ramosus*, что подтверждается и его более высоким морфологическим полиморфизмом, выявленным в природе и на гербарном материале.

В то же время группа *L. ramosus*–*L. chinensis* эволюционно более архаична по системе побегообразования (полурозеточно-озимые), чем группа *L. littoralis*–*L. dasystachys* (розеточные, полициклические). Если судить по виденным нами материалам в гербариях КНР (PE, PKU), комплекс близких видов *L. secalinus*–*L. littoralis* можно рассматривать, как очень молодые таксоны, широко распространяющиеся на Тибет (молодое геологическое образование) и на горы Афганистана.

С учетом морфологических и биохимических сходств и различий наиболее правильным, на наш взгляд, может быть понимание *L. ramosus* и *L. chinensis* как разделяющихся видов, которые обретают все признаки самостоятельности в силу своей географической протяженности.

Филогенетические отношения *Leymus chinensis* и *L. ramosus* на основе сравнения последовательностей *ITS1-5.8S-ITS2* ядерной рДНК и *matK* хлоропластной ДНК

В работе отсеквенированы и проанализированы 28 нуклеотидных последовательностей *ITS1-5.8S-ITS2* рДНК (клонов). Длина выровненных фрагментов *ITS1-5.8S-ITS2* рДНК последовательностей составила 598 пн. Спейсер *ITS1* составил 217 нуклеотидов, ген 5.8S – 164 нуклеотида (от 218 до 381 позиции), *ITS2* – 217 нуклеотидов (от 382 по 598 позиции). Также отсеквенированы и проанализированы 16 последовательностей участка *matK* хпДНК с двух пар праймеров (см. табл. 3). Длина последовательностей *matK* составила 1419 пн. Общая длина последовательностей *ITS1-5.8S-ITS2* рДНК и *matK* хпДНК – 2017 пн.

Минимальное число замен, с помощью которого получено дерево в программе PAUP методом MP, – 15. При этом 10 вариабельных позиций не информативны. Число информативных замен – 5. Индекс согласованности (Consistency index) равен 1.0, что указывает на отсутствие гомоплазии. При байесовском анализе проведен 1 млн генераций цепей Маркова.

На дереве (рис. 6), построенном на основе сравнения отсеквенированных последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров *ITS1-5.8S-ITS2* ядерной рДНК и *matK* хпДНК, виды *L. ramosus* и *L. chinensis* из разных географических мест произрастания четко разделились по разным кладам, что доказывает самостоятельность каждого из видов. При этом *L. ramosus* группируется в сестринскую кладу с *L. littoralis*, который относится к секции *Aphanoneuron*. Это подтверждает, что *L. ramosus* и *L. littoralis* более близкие таксоны, чем *L. ramosus* и *L. chinensis*, объединяемые в настоящее

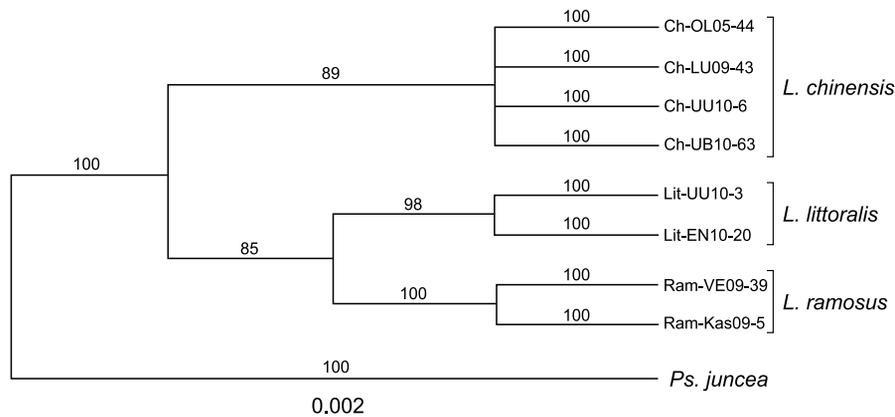


Рис. 6. Филогенетическое дерево, демонстрирующее взаимоотношения *L. chinensis*, *L. littoralis* и *L. ramosus*, построенные на основе *ITS1-5.8S-ITS2*.

Над кладами указаны значения апостериорной вероятности для байесовского дерева.

время в одну секцию *Anisopyrum* на основе морфологических данных (Цвелев, Пробатова, 2010).

Таким образом, анализ филогенетических отношений двух видов *L. ramosus* и *L. chinensis* как по изменчивости состава запасных белков и гистона H1, так и на основе сравнения последовательностей *ITS1-5.8S-ITS2* ядерной рДНК и *matK* хлоропластной ДНК доказал самостоятельность каждого из двух видов.

При подготовке публикации использовались материалы Биоресурсной научной коллекции

ЦСБС СО РАН, УНУ “Коллекции живых растений в открытом и закрытом грунте”, USU 440534.

Исследование выполнено в рамках темы госзадания ИОЭБ СО РАН 0337-2017-0006 (номер гос. регистрации: АААА-А17-11701181), госзадания ЦСБС СО РАН “Оценка морфогенетического потенциала популяций растений Северной Азии экспериментальными методами” (номер гос. регистрации: АААА-А17-117012610051-5), при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 11-04-00861, 16-04-01605).

ЛИТЕРАТУРА

- 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.** 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., Костина Е.В.** Морфологическая изменчивость и полиморфизм белков эндосперма и гистона H1 у типичных и отклоняющихся природных форм *Elymus caninus* L. (Poaceae) // Сиб. экол. журн. 2003. № 1. С. 17–27.
- Агафонов А.В., Кобозева Е.В., Татьков С.И.** Отсутствие генетической интрогрессии между *Elymus ciliaris* и *E. pendulinus* (Triticeae: Poaceae) по результатам SDS-электрофореза белков эндосперма в связи с гипотезами происхождения *E. amurensis* // Вавиловский журн. генетики и селекции. 2015. Т. 19, № 1. С. 97–103.
- Антонов А.С.** Основы геносистематики высших растений / А.С. Антонов. М., 2000. 136 с.
- Антонов А.С.** Геносистематика растений / А.С. Антонов. М., 2006. 293 с.
- Бадмаева Н.К., Яблонская Е.С., Агафонов А.В.** Изменчивость диагностических признаков в сибирских популяциях комплекса *Leymus ramosus* и *L. chinensis* // Сиб. ботан. вестн.: электрон. журн. 2006. Т. 1, вып. 1. С. 59–63. URL: <http://www.csbg.nsc.ru/uploads/journal.csbg.ru/pdfs/i1.pdf> (дата обращения: 02.10.2017).
- Конарев В.Г.** Белки растений как генетические маркеры / В.Г. Конарев. М., 1983. 320 с.
- 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.
- Липин А.С., Бадмаева Н.К., Байков К.С., Агафонов А.В.** О таксономическом статусе *Leymus ordensis* (Poaceae) по результатам морфологического анализа и SDS-электрофореза запасных белков эндосперма и гистона H1 // Раст. мир Азиатской России. 2008. № 1. С. 71–82.
- Пешкова Г.А.** Род Колосняк – *Leymus* // Флора Сибири. Новосибирск, 1990. Т. 2: Poaceae. С. 41–53.
- Пешкова Г.А.** Флорогенетический анализ степной флоры гор Южной Сибири. Новосибирск, 2001. 192 с.
- Попов М.Г.** Флора Средней Сибири / М.Г. Попов. М.; Л., 1957. Т. 1. 554 с.

- Розов С.М., Богданова В.С., Бердников В.А.** Различия в хромосомной локализации генов, кодирующих фракции гистона H1 гороха // Генетика. 1986. Т. 22. С. 2159–2166.
- Цвелев Н.Н.** Злаки СССР / Н.Н. Цвелев. Л., 1976. 788 с.
- Цвелев Н.Н., Пробатова Н.С.** Роды *Elymus* L., *Elytrigia* Desv., *Agropyron* Gaerth., *Psathyrostachys* Nevski, *Leymus* Hochst. (Poaceae: Triticeae) во флоре России // Комаровские чтения. 2010. Вып. 57. С. 5–102.
- Шнеер В.С.** Краткий очерк способов получения. Обработки и трактовки данных по последовательностям ДНК в систематике растений. I. Выделение и секвенирование ДНК; выравнивание последовательностей // Бот. журн. 2005. Т. 90, № 1. С. 3–18.
- Alvarez I., Wendel J.F.** Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference // Mol. Phyl. Evol. 2003. V. 29. P. 417–434.
- Baldwin B.G., Sanderson M.J., Porter J.M., Wojciechowski M.F., Campbell C.S., Donoghue M.J.** The ITS region of nucleare ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny // Ann. Missouri Bot. Gard. 1995. V. 82. P. 247–277.
- Berdnikov V.A., Bogdanova V.S., Rozov S.M., Kosterin O.E.** Geographic patterns of histone H1 allelic frequencies formed in the course of *Pisum sativum* L. (pea) cultivation // Heredity. 1993. V. 71. P. 199–209.
- Blattner F.R.** Direct amplification of the entire ITS region from poorly preserved plant material using recombinant PCR // BioTechniques. 1999. V. 27. P. 1180–1186.
- Gardiner A., Ignatov M., Huttunen S., Troitsky A.** On resurrection of the families Pseudoleskeaceae Schimp. and Pylaisiaceae Schimp. (Musci, Hypnales) // Taxon. 2005. V. 54. P. 651–663.
- Hall T.A.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT // Nucl. Acids. Symp. 1999. Ser. 41. P. 95–98.
- Hilu K.W., Liang H.** The *matK* gene: sequence variation and application in plant systematics // Am. J. Bot. 1997. V. 84 (6). P. 830–839.
- Hilu K.W., Alice L.A., Liang H.** Phylogeny of Poaceae inferred from *matK* sequences // Ann. Missouri Bot. Gard. 1999. V. 86. P. 835–851.
- Huelsenbeck J.P., Ronquist F.** MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees // Bioinformatics. 2001. V. 17. P. 754–755.
- Kosterin O.E., Bogdanova V.S., Gorel F.L., Rozov S.M., Trusov Yu.A., Berdnikov V.A.** Histone H1 of the garden pea (*Pisum sativum* L.): composition, developmental changes, allelic polymorphism and inheritance // Plant Science. 1994. V. 101. P. 189–202.
- Laemmli U.K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. V. 227, No. 5259. P. 680–685.
- Swofford D.L.** PAUP Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Beta version 10. Sunderland: Sinauer Associates. 2002.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Shinsky, T.J. White (Eds.). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. San-Diego, 1990. P. 315–322.
- Zaytseva O.O., Bogdanova V.S., Kosterin O.E.** Phylogenetic reconstruction at the species and intraspecies levels in the genus *Pisum* (L.) (peas) using a histone H1 gene // Gene. 2012. V. 504. P. 192–202.