

**Версия микроэволюционных отношений между биотипами,
близкими к *Elymus caninus* (Poaceae)
по данным секвенирования ядерного гена *GBSS1* (*waxy*)**

The version of microevolutionary relationships between biotypes close to *Elymus caninus* (Poaceae) according to the sequencing of the nuclear gene *GBSS1* (*waxy*)

Агафонов А. В., Шабанова (Кобозева) Е. В., Емцева М. В.

Agafonov A. V., Shabanova (Kobozeva) E. V., Emtseva M. V.

Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, г. Новосибирск, Россия. E-mail: agalex@mail.ru
Central Siberian Botanical Garden, Novosibirsk, Russia

Реферат. Проведено сравнительное изучение последовательностей фрагмента гена *GBSS1* у образцов видов, близких к *Elymus caninus*: *E. prokudinii*, *E. viridiglumis*, *E. goloskokovii*, а также ряда морфологически отклоняющихся форм (МОФ) с территории России и Казахстана. Установлена или подтверждена StH-геномная конституция у всех изученных таксонов и МОФ, проведена оценка микроэволюционных взаимоотношений между видами путем построения отдельных NJ дендрограмм на основе экзонов и интронов вместе и только экзонов. Отмечены различия в расположении субгеномов Y у реперных StY-геномных видов на двух типах построенных дендрограмм. Обсуждаются возможные эволюционные причины таких различий. Характерной чертой всех таксонов, близких к *E. caninus*, является присутствие только St₂ клонов субгенома St, более близких по составу к североамериканской предковой линии *Pseudoroegneria spicata*, чем к азиатской линии, восходящей к *P. strigosa*. Эталонный польский образец *E. caninus* can_5274 находится дальше всех от азиатских образцов по субгеному St₂, но ближе к диплоидному носителю St-генома *P. spicata*. По уровням дифференциации субгенома H все предполагаемые родственники *E. caninus* обладают вариантами субгенома H₁ вокруг азиатского диплоидного носителя *Hordeum jubatum*, при этом разделившись на две отчетливые подгруппы. К североамериканскому виду *H. californicum* – носителю генного варианта H₂ тяготеют только образцы 4 реперных видов. Следует отметить близкое расположение генных вариантов уральского эндемика *E. uralensis* с основной группой образцов *E. caninus* по обоим субгеномам. Вместе с результатами половой гибридизации этот факт дает основание рассматривать *E. uralensis*, как близкородственный основной группе таксонов, заслуживающих внутривидового ранга *E. caninus* s. l.

Ключевые слова. Видообразование, микроэволюция, молекулярные маркеры, таксономия, *Elymus*, Poaceae.

Summary. A comparative study of the sequences of the *GBSS1* gene fragment in accessions of species close to *Elymus caninus*: *E. prokudinii*, *E. viridiglumis*, *E. goloskokovii*, as well as a number of morphologically deviating forms (MDF) from the territory of Russia and Kazakhstan was carried out. The StH-genomic constitution was established or confirmed in all studied taxa and MDF, and the microevolutionary relationships between species were assessed by constructing separate NJ dendrograms based on exons and introns together and exons only. Differences in the location of Y subgenomes in reference StY-genomic species on two types of constructed dendrograms were noted. Possible evolutionary reasons for these differences are discussed. A characteristic feature of all taxa close to *E. caninus* is the presence of only St₂ clones of the St subgenome, which are closer in composition to the North American ancestral line *Pseudoroegneria spicata* than to the Asiatic line ascending to *P. strigosa*. The reference Polish accession *E. caninus* can_5274 is farthest from the Asian accessions in the St₂ subgenome, but closer to the diploid carrier of the St genome *P. spicata*. According to the levels of differentiation of the H subgenome, all putative relatives of *E. caninus* have variants of the H₁ subgenome around the Asian diploid host *Hordeum jubatum*, while being divided into two distinct subgroups. Only the accessions of four reference species gravitate towards the North American species *Hordeum californicum* – the carrier of the H₂ gene variant. It should be noted that the gene variants of the Ural endemic *E. uralensis* are close to the main group of *E. caninus* accessions in both subgenomes. Together with the results of sexual hybridization, this fact gives grounds to consider *E. uralensis* as closely related to the main group of taxa deserving the intraspecific rank of *E. caninus* s. l.

Key words. *Elymus*, microevolution, molecular markers, Poaceae, speciation, taxonomy.

Введение. *Elymus caninus* (L.) L. – многолетний, самоопыляющийся аллотетраплоидный злак трибы Triticeae, один из самых распространенных видов рода *Elymus* на территории Северной и Центральной Евразии (Цвелев, 1976). Ранее на основе изучения variability по репродуктивным свойствам природных биотипов и половых гибридов в 42 комбинациях скрещивания нами было показано, что единый рекомбинационный генпул *E. caninus*, как вида, образован не только типичными особями, но и большим числом морфологически отклоняющихся форм (МОФ), не соответствующих общепринятому диагнозу вида (Агафонов, 2011). Был сделан вывод, что некоторые из таких МОФ целесообразно классифицировать, как разновидности *E. caninus* s. l. В частности, в отличие от разновидностей *E. caninus* var. *glaucum* (Hackel) Volkart, var. *subtriflorum* Parl. и var. *pauciflorum* (Schur) Volkart, изученных М. Mizianty (2005) и имеющих преимущественно непрерывную изменчивость по диагностическим признакам за счет факторов среды, МОФ с волосистыми или шиповатыми НЦЧ имеет четкую дискретность и наследственный фактор в виде редких аллелей. Кроме того, с территории России был описан ряд МОФ, морфологически близких к *E. caninus*, как самостоятельные виды *E. viridiglumis* (Nevski) Czer., *E. prokudinii* (Sered.) Tzvel. и *E. goloskokovii* Kotuch.

С другой стороны, была показана возможность использования нуклеотидных последовательностей низкокопийного гена *waxy* (гранул-связанная синтаза крахмала 1, *GBSS1*) в качестве эффективного инструмента для изучения филогенетических отношений между разными таксонами трибы Triticeae Dum. (Mason-Gamer, 2001, 2004, 2013; Mason-Gamer et al., 2010a, 2010b). Позднее нами были представлены результаты изучения последовательности этого гена у видов *Elymus*, произрастающих на территории Сибири и Дальнего Востока России, с целью установления их геномной конституции и для оценки микроэволюционной дифференциации (Агафонов и др., 2019).

Целью данной работы был анализ микроэволюционных взаимоотношений между биотипами, близкими к *Elymus caninus* (Poaceae) с использованием в качестве генетического маркера последовательностей гена *GBSS1* (*waxy*).

Материалы и методы. Местонахождения и авторы сбора образцов, близких к *E. caninus*, взятых в сравнительное исследование, а также их обозначения на дендрограммах приведены в таблице. В качестве реперных были взяты последовательности других StY-геномных видов и диплоидных носителей геномов **St** (*Pseudoroegneria*) и **H** (*Hordeum*) из генбанка NCBI (National Center for Biotechnology Information, URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>). Амплификацию, клонирование и секвенирование фрагментов *GBSS1* с 9 по 14 экзон выполняли в соответствии с методическими рекомендациями (Mason-Gamer et al., 1998) и с нашими модификациями (Агафонов и др., 2019). Там же приведены обозначения реперных видов и клонов на дендрограммах и номера изученных нами клонов, поданных в NCBI. Построение дендрограмм проведено отдельно по полным фрагментам гена (экзоны и интроны) и только по экзонам в программе TREECON ver. 1.3b (Peer, Wachter, 1994).

Таблица

Местонахождения и авторы сбора образцов, близких к *E. caninus*, взятых в ISSR-анализ

Таксон Код образца	Обозначение на дендрограммах	Место и автор сбора
<i>E. caninus</i> ABZ-1654	canABZ54	Респ. Башкортостан, Белорецкий р-н, окрестности пос. Новоабзаково, просека под ЛЭП, луговое сообщество, alt. 603 м, N 53°48.309' E 58°36.913' (А. Агафонов, С. Асбаганов)
<i>E. caninus</i> МОФ SON-9904	canSON04	Респ. Хакасия, Зап. Саян, 252 км автотрассы Абаза – Ак-Довурак, пойма р. Она, alt. 713 м N 52°10.772' E 89°51.907' (А. Агафонов)
<i>E. caninus</i> МОФ AKL-0703	canAKL03	Алтайский край, Благовещенский р-н, 14 км ССЗ пос. Благовещенка, караганник, alt. 98 м N 52°55.19' E 79°46.22' (Н. Лащинский)
<i>E. caninus</i> МОФ OSE-1427	canOSE27	Респ. Сев. Осетия–Алания, Ирафский р-н, окр. пос. Стур-Дигора, зап. склон хребта Б. Кавказа, дол. прав. притока р. Урух, alt. 1996 м N 42° 52.898' E 43° 35.959' (С. Асбаганов)
<i>E. viridiglumis</i> EK-1418	vir_EK18	Респ. Казахстан, Восточно-Казахстанская обл., хр. Ивановский, южн. макросклон, окр. пос. Березовка, alt. 1202 м N 50°07.623' E 83°49.210' (Д. Герус)

Таблица (окончание)

Таксон Код образца	Обозначение на дендрограммах	Место и автор сбора
<i>E. viridiglumis</i> BEL-1404	virBEL04	Алтайский край, Смоленский р-н, окр. пос. Белокуриха, лесная тропа вдоль склона горы, alt. 287 м N 51° 58.847' E 84° 57.697' (А. Агафонов, М. Агафонова)
<i>E. viridiglumis</i> UKU-1618	virUKU18	Респ. Башкортостан, Белорецкий р-н, окр. пос. Новоабзаково, гора Куркак, высокотравный луг в березовом редколесье, alt. 619 м N 53° 48.718' E 58°40.377' (А. Агафонов, С. Асбаганов)
<i>E. goloskokovii</i> EK-1513	gol_EK13	Респ. Казахстан, Восточно-Казахстанская обл., хр. Ивановский, сев. макросклон, окр. пос. Поперечное, alt. 1202 м N 50°21.128' E 83°53.527' (Д. Герус)
<i>E. goloskokovii</i> TUV-9936	golTUV36	Респ. Тува, Тоджинский р-н, дол. р. Бий-Хем, Тос-Булуцкие мели (Д. Шауло)
<i>E. prokudinii</i> TEB-1806	proTEB06	Респ. Карачаево-Черкесия, Карачаевский р-н, Тебердинский гос. биосферный заповедник, вост. склон г. Малая Хатипара, высокотравный луг, alt. 2020 м N 43°26.508' E 41° 42.693' (С. Асбаганов, А. Агафонов)

Результаты и обсуждение. Были построены две дендрограммы на основе а) единой последовательности экзонов и интронов (рис. 1); б) только экзонов без последовательностей интронов (рис. 2). На основе их анализа сделаны следующие выводы:

Подтверждена **StH**-геномная конституция всех таксонов, взятых в сравнительный анализ. Главные различия между **H**- и **St**-субгеномами заключаются в наличии у **St**- и **Y**-субгеномных клонов последовательностей длиной 17 п.н., отсутствующих у носителей **H**-субгенома. Характерной чертой всех таксонов, близких к *E. caninus*, является присутствие только **St**₂ клонов субгенома **St**, более близких по составу к североамериканской предковой линии *Pseudoroegneria spicata*, чем к азиатской линии, восходящей к *P. strigosa*.

Отдельная ветвь двух субгеномов **Y** от **StY**-геномных видов *E. pendulinus* и *E. gmelinii* на рисунке 1 расположилась между кластерами **St**₁ и **St**₂, что первоначально вызвало сомнения в корректности топологии при построении дерева. Было неясно, почему субгеномы **Y** расположились в едином кластере субгенома **St**. Проблема состоит в том, что в относительно ранних работах по молекулярной специфичности было показано, что **St**- и **Y**-геномы могли происходить от одного и того же предка (Liu et al., 2006), но авторы более поздних публикаций склоняются к выводу о том, что у этих геномов совершенно разное происхождение (Sun, Komatsuda, 2010; Fan et al., 2013; Gao et al. 2014). Когда нами была построена дендрограмма по последовательностям только **экзонов**, дерево приняло несколько другой вид (рис. 2). при котором ветвь последовательностей **Y** занимает самостоятельное положение с высоким значением бутстрепа между субгеномами **St** и **H**. Поскольку последовательности интронов не участвуют в построении молекул фермента и не испытывают на себе жесткого эволюционного отбора, то в них может закрепляться и отражаться множество промежуточных микроэволюционных событий (замен и вставок), которые происходили в процессе эволюции субгеномов. Тогда как в последовательностях экзонов закрепляются через жесткий отбор только адаптивные и эволюционно значимые события. В целом, этот феномен может означать раннее существование общего предка, от которого позднее складывались субгеномы **St** и **Y**. Другими словами, на примере варибельности последовательностей гена *GBSS1* подтверждается происхождение субгенома **Y** не от субгенома **St**, а одновременно с дифференциацией и становлением двух эволюционных ветвей у предковой линии *Pseudoroegneria* (условно североамериканской и азиатской) **St**₁ и **St**₂ (Okito et al., 2009; Dong et al., 2015).

По субгеному **St**₂ дальше от всех азиатских образцов, но ближе к диплоидному **St**-носителю *P. spicata*, расположен реперный польский can5274. Все азиатские и два кавказских образца (*E. caninus* МОФ OSE-1427 и *E. prokudinii* TEB-1806), а также уральский *E. mutabilis* ABZ-1606 и камчатский *E. charkeviczii* KES-9670 расположены относительно близкими ветвями. По уровням дифференциации субгенома **H** все предполагаемые родственники *E. caninus* обладают вариантами субгенома **H**₁ вокруг азиатского диплоидного носителя *Hordeum jubatum*, при этом разделившись на две отчетливые подгруппы. Одна из них состоит исключительно из морфологически отклоняющихся образцов (МОФ), включая короткоо-

стый образец TUV-9936, у которого не был обнаружен клон субгена **St** и отнесенный нами к *E. goloskokovii*. Примечательно, что образец МОФ *E. caninus* SON-9904 показал наличие клонов, относящихся к двум разным ветвям субгена **H₁**. К североамериканскому виду *H. californicum* тяготеют только образцы 4 реперных видов, имеющих вариант **H₂**.

Особо следует отметить близкое расположение по обоим субгенам **St₂** и **H₁** генных вариантов уральского эндемика *E. uralensis* с основной группой типичных образцов *E. caninus*. Вместе с результатами половой гибридизации этот факт дает основание рассматривать *E. uralensis*, как близкородственный основной группе таксонов, заслуживающих внутривидового ранга *E. caninus* s. l. Такой уровень родственности, возможно, позволяет также отнести *E. uralensis* к этому комплексу, но в ранге подвида.

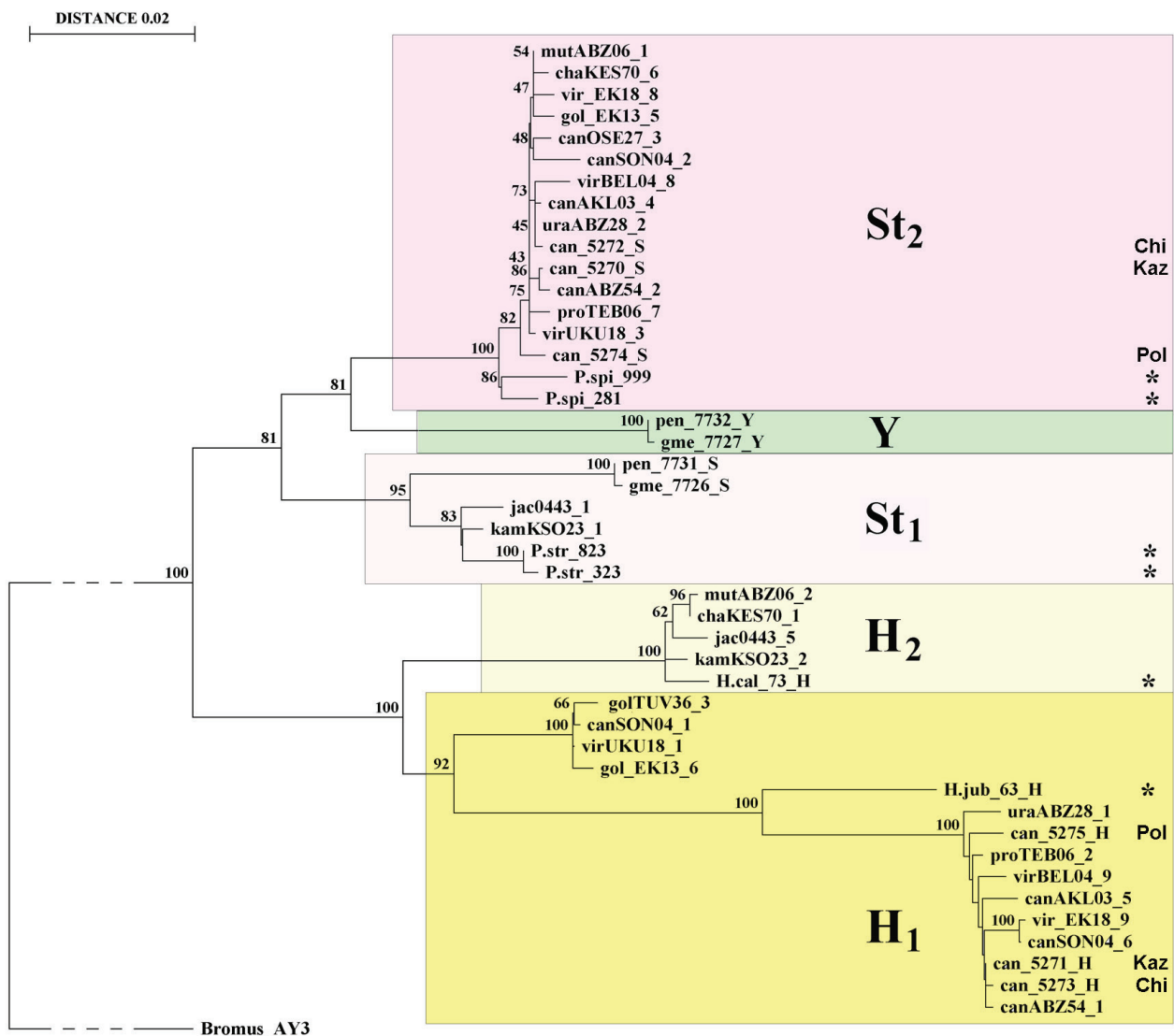


Рис. 1. Дендрограмма NJ, построенная по результатам анализа последовательностей гена *GBSSI* (экзоны и интроны с 9 по 14) у образцов таксонов, близких к *E. caninus*, в сравнении с реперными видами из генбанка NCBI. Звездочками отмечены виды – моногенные носители субгеномов **St** и **H**.

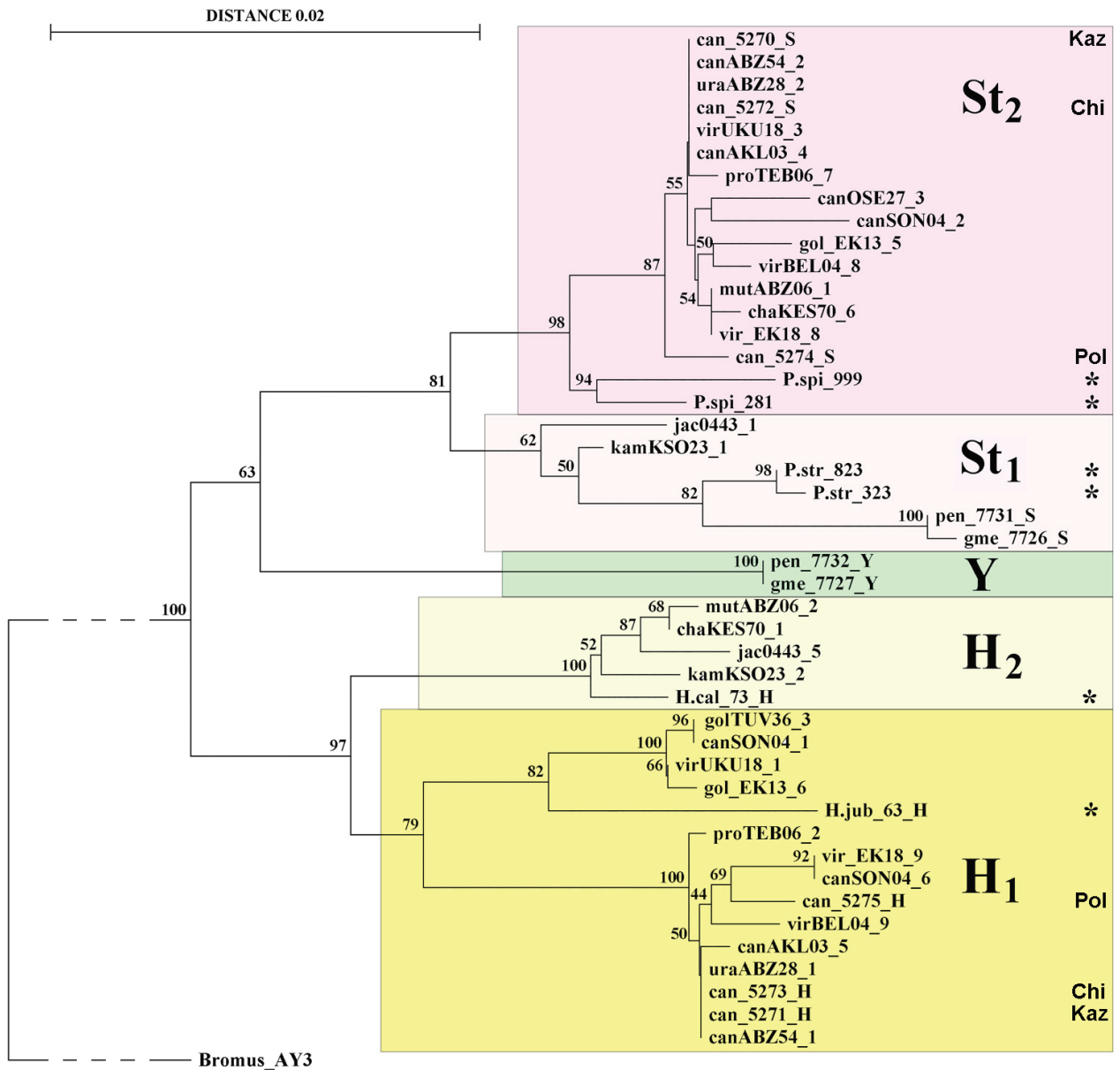


Рис. 2. Дендрограмма NJ, построенная по результатам анализа последовательностей гена *GBSSI* (только экзоны с 9 по 14) у образцов таксонов, близких к *E. caninus*, в сравнении с реперными видами из генбанка NCBI. Звездочками отмечены виды – моногенные носители субгеномов *St* и *H*.

Таким образом, из результатов комплексного исследования проблемы дифференциации таксонов, близких к широко распространенному виду *E. caninus*, логично следует необходимость таксономической ревизии взаимоотношений всей совокупности таксонов. Если рассмотреть результаты изучения репродуктивных отношений таксонов совместно с ранее полученными данными (Агафонов, 2011), то становится очевидным репродуктивное единство большинства из них. Ранее такое единство трактовалось с позиций принципа «рекомбинационных и интрогрессивных генпулов» (РГП-ИГП) (Агафонов, 1997; Agafonov, Salomon, 2002). При этом подчеркивалось, что категория «рекомбинационный генпул» не является таксономической, но создана для решения некоторых вопросов именно таксономии. К настоящему времени несравненно обогатился арсенал экспериментальных методов, используемых в филогении и систематике, поэтому на новом этапе следует сформулировать и совершенствовать более адекватный принцип для сближения двух методологий – традиционной систематики и экспериментальной генетики.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ЦСБС СО РАН «Анализ биоразнообразия, сохранение и восстановление редких и ресурсных видов растений с использованием экспериментальных методов» (№ гос. регистрации: АААА-А21-121011290025-2) при частичной поддержке РФФИ (проект № 18-04-01030). При подготовке публикации использовались материалы биоресурсной научной коллекции ЦСБС СО РАН «Коллекции живых растений в открытом и закрытом грунте», УНУ № USU 440534. Секвенирование ДНК выполнено в ЦКП «Геномика» (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск).

ЛИТЕРАТУРА

Агафонов А. В. Принцип рекомбинационных (РГП) и интрогрессивных (ИГП) генпулов в биосистематике рода Пырейник (*Elymus* L.) Северной Евразии // Сиб. экол. журн., 1997. – Т. 4, №1. – С. 81–89.

Агафонов А. В. Общая структура рекомбинационного генпула *Elymus caninus* (Triticeae: Poaceae) по данным скрещиваемости и оценки наследования некоторых морфологических признаков, используемых в таксономии // Растительный мир Азиатской России, 2011. – №2(8). – С. 61–70.

Агафонов А. В., Асбаганов С. В., Шабанова (Кобозева) Е. В., Морозов И. В., Бондарь А. А. Геномная конституция и дифференциация субгеномов эндемичных сибирских и дальневосточных видов рода *Elymus* (Poaceae) по данным секвенирования ядерного гена *waxy* // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2019. – № 23(7). – С. 817–826.

Цвелев Н. Н. Злаки СССР. – Л.: Наука, 1976. – 788 с.

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

Dong Z.-Z., Fan X., Sha L.-N., Wang Y., Zeng J., Kang H.-Y., Zhang H.-Q., Wang X.-L., Zhang L., Ding C.-B., Y R.-W., Zhou Y.-H. Phylogeny and differentiation of the St genome in *Elymus* L. sensu lato (Triticeae; Poaceae) based on one nuclear DNA and two chloroplast genes // BMC Plant Biology, 2015. – Vol. 15. – P. 179.

Fan X., Sha L.-N., Dong Z.-Z., Zhang H.-Q., Kang H.-Y., Wang Y., Wang X.-L., Zhang L., Ding C.-B., Yang R.-W., Zheng Y.-L., Zhou Y.-H. Phylogenetic relationships and Y genome origin in *Elymus* L. sensu lato (Triticeae; Poaceae) based on single-copy nuclear *Acc1* and *Pgk1* gene Sequences // Mol. Phyl. Evol., 2013. – Vol. 69. – P. 919–928.

Gao G., Gou X., Wang Q., Zhang Y., Deng J., Ding C., Zhang L., Zhou Y., Yang R. Phylogenetic relationships and Y genome origin in Chinese *Elymus* (Triticeae: Poaceae) based on single copy gene *DMC1* // Biochem. Syst. Ecol., 2014. – Vol. 57. – P. 420–426.

Liu Q., Ge S., Tang H., Zhang X., Zhu G., Lu B.-R. Phylogenetic relationships in *Elymus* (Poaceae: Triticeae) based on the nuclear ribosomal internal transcribed spacer and chloroplast *trnL-F* sequences // New Phytologist, 2006. – Vol. 170. – P. 411–420.

Mason-Gamer R. J. Origin of North American *Elymus* (Poaceae: Triticeae) allotetraploids based on granule-bound starch synthase gene sequences // Syst. Bot., 2001. – Vol. 26. – P. 757–768.

Mason-Gamer R. J. Reticulate evolution, introgression, and intertribal gene capture in an allohexaploid grass // Syst. Biol., 2004. – Vol. 53. – P. 25–37.

Mason-Gamer R. J. Phylogeny of a genomically diverse group of *Elymus* (Poaceae) allopolyploids reveals multiple levels of reticulation // PLoS ONE, 2013. – Vol. 8, №11. – e78449.

Mason-Gamer R. J., Weil C. F., Kellogg E. A. Granule-bound starch synthase: structure, function, and phylogenetic utility // Mol. Biol. Evol., 1998. – Vol. 15. – P. 1658–1673.

Mason-Gamer R. J., Burns M. M., Naum M. Phylogenetic relationships and reticulation among Asian *Elymus* (Poaceae) allotetraploids: analysis of three nuclear genes // Mol. Phyl. Evol., 2010a. – Vol. 54. – P. 10–22.

Mason-Gamer R. J., Burns M. M., Naum M. Reticulate evolutionary history of a complex group of grasses: phylogeny of *Elymus* StStHH allotetraploids based on three nuclear genes // PLoS ONE, 2010b. – Vol. 5, № 6. – e10989.

Mizianty M. Variability and structure of natural populations of *Elymus caninus* (L.) L. based on morphology // Pl. Syst. Evol., 2005. – Vol. 251. – P. 199–216.

National Center for Biotechnology Information. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide> (Accessed on 9.07.2021).

Okito P., Mott I. W., Wu Y., Wang R. R. A Y genome specific STS marker in *Pseudoroegneria* and *Elymus* species (Triticeae: Gramineae) // Genome, 2009. – Vol. 52, № 4. – P. 391–400.

Peer Van de Y., Wachter R. D. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment // Comput. Appl. Biosci., 1994. – Vol. 10. – P. 569–570.

Sun G., Komatsuda T. Origin of the Y genome in *Elymus* and its relationship to other genomes in Triticeae based on evidence from elongation factor G (EF-G) gene sequences // Mol. Phylogenetic Evol., 2010. – Vol. 56, № 2. – P. 727–733.