

УДК 575.858

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГЕНОВ *ВМУ2*, *WAXU* И ВНУТРЕННИХ ТРАНСКРИБИРУЕМЫХ СПЕЙСЕРОВ ГЕНОВ РИБОСОМНЫХ РНК В КАЧЕСТВЕ МАРКЕРОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ВИДОВ РОДА *ELYMUS*

© 2014 г. Н.А. Шмаков¹, Д.А. Афонников^{1,2}, П.А. Белавин¹, А.В. Агафонов³

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия, e-mail: shmakov@bionet.nsc.ru;

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия;

³ Центральный Сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 17 октября 2014 г. Принята к публикации 28 ноября 2014 г.

Elymus L. – род семейства Poaceae, включает исключительно полиплоидные виды. Виды рода распространены на всех континентах, не менее половины встречаются в Евразии, которая считается местом происхождения рода. Тем не менее видовое разнообразие, генетические особенности отдельных видов и их эволюционные взаимосвязи во многих частях Евразии, в частности на Дальнем Востоке Российской Федерации, до сих пор не исследованы. В связи с этим представляется перспективным изучение эволюционных взаимоотношений видов, произрастающих в данном регионе. В ходе работы проанализированы имеющиеся в базах данных последовательности двух ядерных генов и внутренних транскрибируемых спейсеров генов рибосомных РНК некоторых видов *Elymus*, встречающихся на Дальнем Востоке. Выявлено, что ядерные гены более пригодны для установления филогении на межвидовом уровне. В работе также показано, что последовательности гена *waxu*, принадлежащие различным гаплогруппам, демонстрируют заметные различия и в силу этого могут быть использованы в качестве маркера для установления геномной конституции видов *Elymus*. Наконец, систематическое положение *E. Kamczadalorum* как отдельного вида было подтверждено.

Ключевые слова: *Elymus*, филогения, микроэволюция, генетические маркеры.

ВВЕДЕНИЕ

Elymus L. (пырейник) – крупнейший род семейства Poaceae, трибы Triticeae, включает 150–200 таксонов видового ранга. В пределах России, по последним данным, насчитывается 53 вида, большинство из которых распространены в Сибири и на Дальнем Востоке (Цвелев, Пробатова, 2010). Все виды *Elymus* – аллополиплоиды. Также они отличаются большой частотой спонтанной межвидовой и межродовой гибридизации с образованием жизнеспособных и часто фертильных форм. Многие виды под влиянием условий среды проявляют большую морфологическую пластичность, нередко она

затрагивает диагностические признаки. Все это очень затрудняет установление систематического и эволюционного положения видов (Агафонов, 2004).

Поскольку виды *Elymus* напрямую не используют в сельском хозяйстве, этот род не так хорошо изучен. Однако возможности по его применению в различных сферах сельского хозяйства достаточно велики. Многие виды *Elymus* являются перспективными кормовыми интродуцентами. Кроме того, *Elymus* – полностью аллополиплоидный род, и его изучение может пролить свет на эволюционное значение полиплоидизации. Полиплоидия характерна для 50–70 %, а, возможно, и более, цветковых

растений (Soltis *et al.*, 2009), в том числе культурных, и более глубокое понимание этого явления может помочь в получении новых сельскохозяйственных сортов.

Гаплом – один моноплоидный набор хромосом (Löve, 1982). В различных геномных конституциях *Elymus* представлены пять гаплов, из которых три встречаются у видов, произрастающих на территории Дальнего Востока Российской Федерации. Гаплом St отмечен у всех видов *Elymus*. Его донором является род *Pseudoroegneria* Nevski. Происхождение гаплома Y на данный момент не установлено: выдвигаются предположения, что его донором мог быть род *Peridictyon* Seberg, Fred & Baden (Fan *et al.*, 2013) либо что он, как и гаплом St, может происходить от рода *Pseudoroegneria* (Okito, 2008). Широко представлен гаплом H, его донором является род *Hordeum* L. (Dewey, 1971). Ранее существовала гипотеза о независимом происхождении гаплома H у евроазиатских и североамериканских видов, однако она не получила экспериментального подтверждения (Mason-Gamer *et al.*, 2010).

Изучение видов *Elymus*, произрастающих в Сибири и на Дальнем Востоке, на Камчатке и на Сахалине, весьма перспективно и актуально по многим аспектам. В частности, большое практическое значение имеет изучение филогенетических отношений между этими видами. Перспективным подходом для решения этой задачи является построение филогении с использованием в качестве маркеров низкокопийных ядерных генов (Mason-Gamer *et al.*, 1998; Mason-Gamer, 2013) и внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS) генов рибосомных РНК – ITS1-5,8 S-ITS2 (Mort *et al.*, 2007). Низкокопийные ядерные гены наследуются по обеим родительским линиям, они мало подвержены конвергентной эволюции. Наличие экзон-интронной структуры предоставляет участки, в которых нуклеотидные замены накапливаются с разными скоростями, благодаря чему можно устанавливать филогению на разных уровнях, основываясь на структурах интронов, межродовом и выше – по структуре экзонов. ITS – широко используемые филогенетические маркеры, отличаются простотой использования в молекулярно-генетических исследованиях за счет очень большой копийности и наличия

универсальных праймеров для амплификации. В базах данных аннотировано большое количество последовательностей ITS для множества видов, что позволяет сравнивать новые результаты с уже имеющимися данными. В ходе работы были проанализированы последовательности двух ядерных генов и внутренних транскрибируемых спейсеров генов рибосомных РНК некоторых видов *Elymus*, встречающихся в Сибири и на Дальнем Востоке с целью установления пригодности их использования в качестве филогенетических маркеров. Цель исследования – установление пригодности таких генетических маркеров, как низкокопийные ядерные гены и спейсеры ITS, для изучения филогенетических отношений внутри рода *Elymus*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проверки эффективности использования низкокопийных ядерных генов в качестве маркеров нами были выбраны: (1) участок со второго по пятый экзон гена *bmy2*, кодирующего β -амилазу; (2) участок с девятого по четырнадцатый экзон гена *waxy*, кодирующего гранул-связанную синтазу крахмала GBSSI. Дополнительно использовали последовательности внутренних транскрибируемых спейсеров в генах рибосомных РНК – ITS1 и ITS2. Для каждого маркера с использованием базы данных NCBI Nucleotide была сформирована выборка, содержащая последовательности данных маркеров из геномов нескольких видов *Elymus*, встречающихся на территории Дальнего Востока и Камчатки. Для каждой из отобранных последовательностей при помощи сервиса BLAST nucleotide (Altschul *et al.*, 1990) мы оценили сходство с последовательностями соответствующих маркеров геномных доноров – родов *Pseudoroegneria* и *Hordeum*. На основании максимальной гомологии определяли принадлежность последовательности к одному из двух гаплов – St или H. Кроме того, последовательности, имеющие сходство более чем 99 % с какой-либо другой последовательностью, уже включенной в выборку, исключали из анализа. Также в выборку включили последовательности соответствующих генов *Hordeum jubatum* и *Pseudoroegneria spicata*. В качестве аутгрупп выбрали последовательности указанных генов *Secale cereale*.

Выявленные последовательности выборок были выравнены программой ClustalW (Larkin *et al.*, 2007). Слишком короткие последовательности (менее 70 % от средней длины последовательностей соответствующего маркера) не рас-

считывали. Оставшиеся последовательности были использованы для анализа. Детальная информация о выбранных для анализа последовательностях и видах, к которым они принадлежат, отражена в табл. 1–3. Кроме того, в

Таблица 1

Выборка последовательностей маркера ITS1-ITS2

Вид	Распространение	Клон	Длина, пн	Обозначение
<i>E. canadensis</i>	Сев. Америка	1	602	canadensis 1
<i>E. caninus</i>	Европа, Центральная Азия, Южная Сибирь	clone 1	698	caninus PI564910 1
		clone 2	702	caninus PI564910 2
		E1-1	605	caninus E1-1
		E1-2	605	caninus E1-2
		E1-3	605	caninus E1-3
		E1-4	605	caninus E1-4
		E1-5	605	caninus E1-5
<i>E. ciliaris</i>	Восточная Азия, Дальний Восток	clone 1	696	ciliaris H7000 1
		clone 5	699	ciliaris H7000 5
<i>E. dahuricus</i>	Южная Сибирь, Центральная и Восточная Азия	XM-14	703	dahuricus XM-14
		GS-21	703	dahuricus GS-21
		XJ-22	703	dahuricus XJ-22
		NM-3	701	dahuricuscilindricus NM-3
		HB-8	702	dahuricuscilindricus HB-8
		WZ-11	703	dahuricuscilindricus WZ-11
		XM-18	703	dahuricuscilindricus XM-18
<i>E. gmelini</i>	Восточная Азия, Дальний Восток	clone 1	698	gmelinii H1033 1
		clone 4	702	gmelinii H1033 4
<i>E. hystrix</i>	Северная Америка	1	603	hystrix 1
		2	603	hystrix 2
		3	603	hystrix 3
<i>E. mutabilis</i>	Сибирь	wx17	600	mutabilis wx17
<i>E. sibiricus</i>	Сибирь, Дальний Восток, Казахстан, Китай	clone 1	607	sibiricus 1
		QH-24	703	sibiricus SD-12
		SC-27	703	sibiricus ZH-24
		SD-12	703	sibiricus WZ-26
		WZ-26	703	sibiricus SC-27
<i>E. trachycaulus</i>	Камчатка, Сев. Америка	wx19	601	trachucaulus wx19
<i>E. virginicus</i>	Северная Америка	wx111	598	virginicus wx111
		wx112	602	virginicus wx112
<i>H. jubatum</i>		A	598	H. jubatum BCC2055(H2324) clone a
		C	598	H. jubatum BCC2055(H2324) clone c
		E	598	H. jubatum BCC2055(H2324) e
<i>P. spicata</i>		–	703	P. spicata
		PI232124	601	P. spicata PI 232124
		3	702	P. spicata PI232124 3
		4	702	P. spicata PI232124 4
<i>S. cereale</i>		pAHSc9	713	S. cerealecereale pAHSc9
		–	601	S. cereale

Таблица 2

Выборка последовательностей маркера *bmy2*

Вид	Распространение	Клон	Длина, пн	Гаплом	Обозначение
<i>E. canadensis</i>	Сев. Америка	4d	1418	H	canad_4d_H
		4a	1428	St	canad_4a_S
<i>E. caninus</i>	Европа, Центральная Азия, Южная Сибирь	1a	1218	St	canin_1a_S
		5d	1430	St	canin_5d_S
		1d	1421	H	canin_1d_H
		4b	1414	H	canin_4b_H
<i>E. ciliaris</i>	Восточная Азия, Дальний Восток	1g	1430	St	cilia_1g_S
		5e	1433	St	cilia_5e_S
		2f	1433	St	cilia_2f_S
		5a	1434	St	cilia_5a_S
<i>E. gmelini</i>	Центральная Азия, Дальний Восток	1e	1432	St	gmeli_1e_S
		1f	1363	St	gmeli_1f_S
<i>E. mutabilis</i>	Сибирь, Сев. Казахстан, Сев. Китай, Монголия	1a	1366	St	mutab_1a_S
		2h	1430	St	mutab_2a_S
		1c	1418	H	mutab_1c_H
		2c	1422	H	mutab_2c_H
<i>E. sibiricus</i>	Сибирь, Дальний Восток	3g	1401	St	sibir_3g_S
		1b	1423	H	sibir_1b_H
<i>E. trachycaulus</i>	Евразия, Сев. Америка	1a	1429	St	trach_1a_S
<i>H. jubatum</i>		1a	1434		H. jubatum-
		2c	1412		H. jubatum-
<i>P. spicata</i>		1a	1322		P. spicata-
		6b	1367		P. spicata-
<i>S. cereale</i>		1a	1445		S. cereale-
		1b	1426		S. cereale-

анализ был взят эндемичный камчатский вид *E. kamczadolorum*. При помощи адаптированного метода подготовки амплифицированных фрагментов ДНК путем клонирования в Т-вектор по методу Сэнгера проведено секвенирование последовательностей гена гранул-связанной синтазы крахмала I *waxy*. Для секвенирования использовали следующую пару праймеров: прямой – GGCACCGGGAAGAAGAAGTT; обратный – GGCGAGCGGCGCGATCCCTCGCC.

Применяли следующий профиль ПЦР: плавление 95 °C, 2 мин; 40 циклов – 30 с 95 °C, 30 с 60 °C, 60 с 72 °C; финальная элонгация – 72 °C, 10 мин. Всего выделили 10 копий гена *waxy*. Восемь последовательностей были отфильтрованы по причине фрагментарности, две оставшиеся поступили в дальнейший анализ.

С целью выявления наиболее достоверных моделей нуклеотидных замен выравнивания обрабатывали в программе jModelTest 0.1.1 (Posada, 2008). Установлено, что для маркеров *bmy2* и

waxy оптимальна модель эволюции Кимуры, в то время как для маркера ITS оптимальной моделью оказалась модель Джукса – Кантора. Далее в программе PhyML 3.0 (Guindon *et al.*, 2010) построили филогенетические деревья для каждого выравнивания. Филогенетические деревья были визуализированы при помощи программы Archaeopteryx (Han, Zmasek, 2009).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Интерпретация филогенетического дерева, построенного на основании маркера ITS (рис. 1), представляет некоторые сложности. Так, многие последовательности группируются согласно видовой принадлежности, в том числе и *H. jubatum*, один из гипотетических доноров гаплома Н. Более того, кластер *H. jubatum* имеет бутстреп-поддержку 100 % и отделен от большинства последовательностей ветвями очень большой длины, что указывает на боль-

Таблица 3

Выборка последовательностей маркера *waxy*

Вид	Распространение	Клон	Длина, пн	Гаплом	Обозначение
<i>E. canadensis</i>	Сев. Америка	4a 1 (4)	1209 1251	H St	canad-4a-H canad-14
<i>E. caninus</i>	Европа, Центральная Азия, Южная Сибирь	6 1a 1 1n	1241 1190 1251 1235	H H St St	canin-6-H canin-1a-H canin-1-St canin-1n-S
<i>E. ciliaris</i>	Восточная Азия, Дальний Восток	1b 1g	1231 1226	St St	cilia-1b-S cilia-1g-S
<i>E. gmelinii</i>	Центральная и Восточная Азия, Дальний Восток	1a 1b	1213 1231	St St	gmeli-1a-S gmeli-1b-S
<i>E. mutabilis</i>	Сибирь, Сев. Казахстан, Сев. Китай, Монголия	1a 1c	1205 1225	H St	mutab-1a-H mutab-1c-S
<i>E. sibiricus</i>	Сибирь, Дальний Восток	1b 3a	1228 1228	St St	sibir-1b-S sibir-3a-S
<i>E. trachycaulus</i>	Северная Америка, Евразия	1b1 3a 1a1 3b 3d	1240 1216 1218 1218 1240	St H H H St	trach-1b1- trach-3a-H trach-1a1-H trach-3b-H trach-3d-S
<i>H. jubatum</i>		1a	1221		H. jubatum-
<i>P. spicata</i>		6a 3a 4a	1251 1255 1251		P. spicata- P. spicata- P. spicata-
<i>S. cereale</i>		1a	1240		S. cereale-

шое количество замен между ними. Однако полученная модель филогении говорит, что последовательности *H. jubatum* обособились в последнюю очередь, что противоречит данным других исследований.

Кроме того, большинство узлов высокого порядка имеет бутстреп-поддержку меньше 30 %. Последовательности многих видов разнесены по далеко отстоящим кластерам. Так, из четырех последовательностей *P. spicata* три сгруппированы в одном кластере, однако четвертая попадает в другой кластер. Такие же разделения наблюдаются для других видов *Elymus* (*E. dahuricus*, *E. sibiricus*, *E. caninus*). Фактически, филогенетическое дерево не дает четкого разделения по гаплогруппам. Для дерева также характерна малая длина ветвей, разделяющих разные виды *Elymus*. Это свидетельствует о практически полной непригодности данного маркера в филогенетических исследованиях рода *Elymus*. В публикации Alvarez и Wendel (2003) обсуждены затруднения, с которыми

можно столкнуться, выстраивая филогению по ITS. Одно из них – конвергентная эволюция, которая в случае ITS может удалить из генома последовательности, доставшиеся с одним из предковых геномов. Учитывая также, что ITS подвержены гомоплазии, возможность полной потери одной из предковых последовательностей ITS и рДНК становится весьма вероятной. В литературе нет упоминаний о широком применении ITS для исследования рода *Elymus*, за исключением публикации Liu с соавт. (2006). Однако это исследование в основном посвящено гаплогруппе St, и делать выводы о влиянии конвергентной эволюции на утрату разнообразия между ITS, унаследованных от разных геномных доноров, сложно.

Филогенетическое дерево последовательностей маркера *bmy2* (рис. 2) дает достоверное (бутстреп-поддержка составляет 100 %) разделение последовательностей *Elymus* вместе с последовательностями доноров соответствующих геномов по гаплогруппам. Последователь-

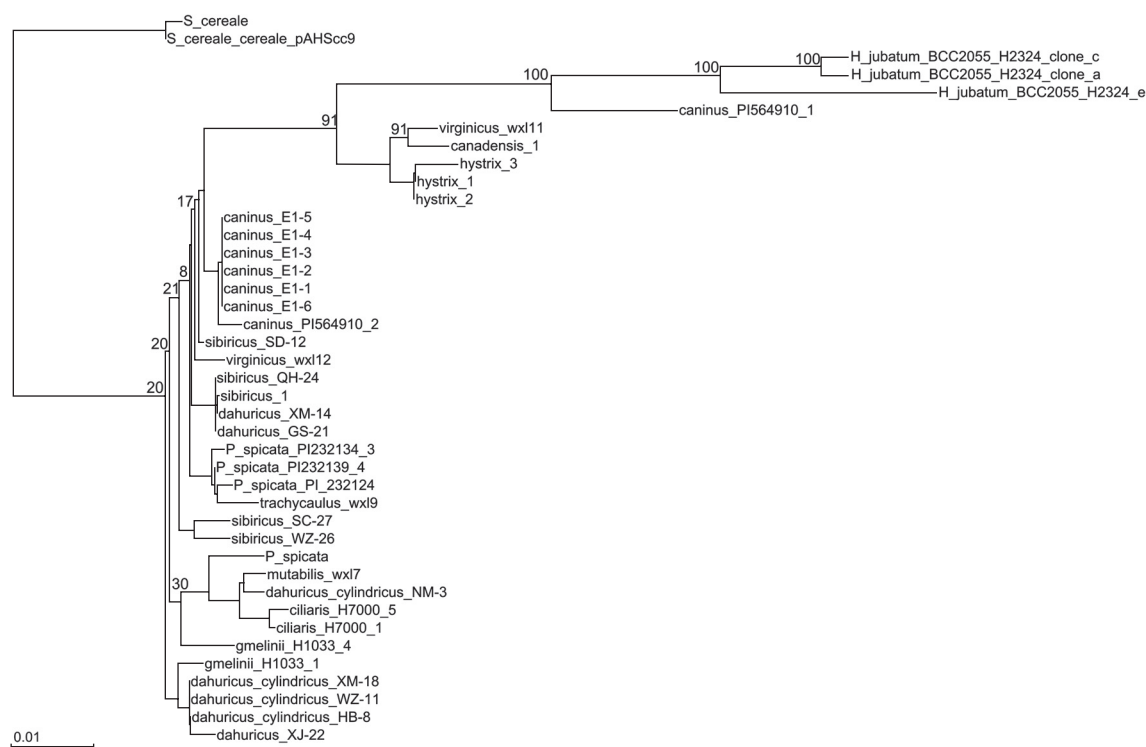


Рис. 1. Филогенетическое дерево, реконструированное на основе последовательностей маркера ITS. Использована программа PhyML 3.0.

ности каждого геномного донора отделяются от последовательностей *Elymus* в соответствующих кластерах с бутстреп-поддержкой 100 и 92–99 %. На основании этого можно сделать вывод, что последовательности маркера *bmy2*, принадлежащие гаплогам H и St, при филогенетическом анализе могут с высокой степенью достоверности быть отнесены к кластерам, представляющим соответствующие гаплогамы. Для обоих гаплогамов последовательности группируются по видам, в частности, для *E. caninus*, *E. ciliaris* в гаплогаме St. Следует отметить, что последовательности генетически близких видов *E. caninus* и *E. mutabilis* формируют хорошо выделяющиеся кластеры для гаплогамов как H, так и St.

На филогенетическом дереве, построенном по маркеру *waxy* (рис. 3), можно наблюдать разделение последовательностей по гаплогам St и H с бутстреп-поддержкой 100 %. Последовательности геномных доноров группируются вместе с последовательностями *Elymus* в соответствующие клады. Однако на этом дереве последовательности обоих геномных доноров

«смешиваются» с последовательностями *Elymus* соответствующих гаплогамов. Три из четырех последовательностей *P. spicata* группируются в один кластер, в который вместе с ними попадает последовательность *E. canadensis* (canad-1-4). Четвертая последовательность *P. spicata* не включена в этот кластер. Из последовательностей гаплогамы H наиболее выраженный кластер формируют последовательности *E. caninus*, за исключением последовательности canin-6-H. Среди последовательностей гаплогамы St три представителя *E. caninus* группируются в отдельный кластер с последовательностями *E. sibiricus* и *E. mutabilis*, причем эта кластеризация имеет бутстреп-поддержку 96 %.

Как в группе гаплогамы H, так и в группе St выделяются в отдельный кластер последовательности североамериканских видов *E. trachycaulus* и *E. canadensis*, с бутстреп-поддержкой 99 и 84 % соответственно. Однако в группе гаплогамы St к ним присоединяется с бутстреп-поддержкой 99 % последовательность gmeli-1a-S. Дополнительно мы провели анализ выравнивания с целью выявления характерных

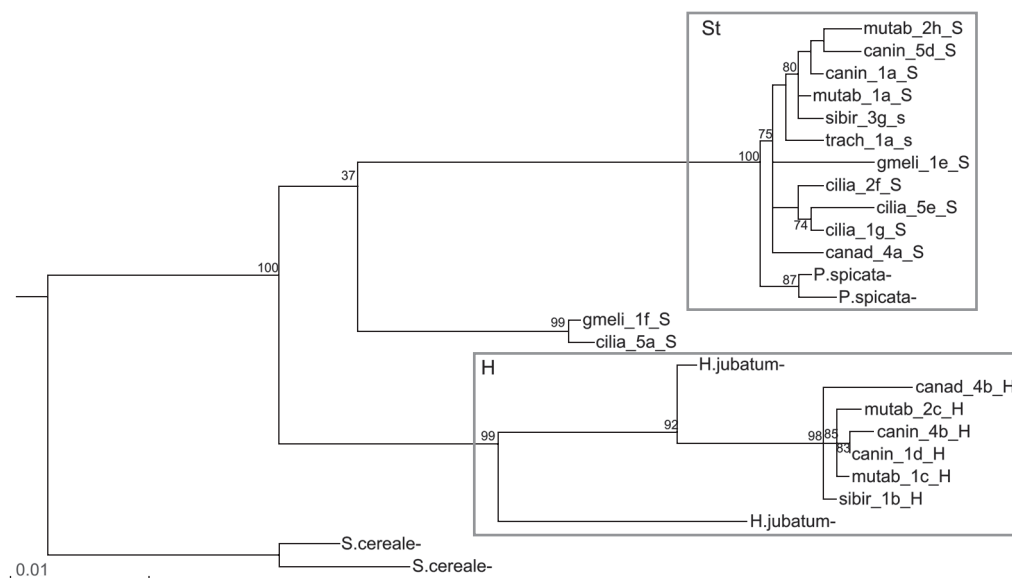


Рис. 2. Филогенетическое дерево, реконструированное по последовательностям маркера *bmy2*. Выделены последовательности, относящиеся к гаплогам St и H. Использована программа PhyML 3.0.

участков, различающихся между гаплогами и консервативных внутри одного гаплога (рис. 4). Для маркера *waxy* такая последовательность была обнаружена. Это консервативный мотив длиной в 39 нуклеотидов, 3'-CATAATTWTTTGGGTTTAAATGGTGGTTTGCACAACAAT-5', в позициях с 1073 по 1111 последовательности 'clone 6' *E. caninus*, соответствующей гаплогу H (обозначение canin-6-H, см. рис. 3). В том же положении выравнивания у последовательностей гаплога St наблюдается фрагмент 3'-GTCGTCTCTGGTTYAGGATACAYTTCCCAGAACAACGAAGA-5'.

Дополнительный анализ Blast Nucleotide NCBI показал, что эти последовательности не имеют гомологии с последовательностями каких-либо других генов *Elymus* из числа опубликованных в базе данных NCBI Nucleotide. Отметим, что эти последовательности расположены в 11-м интроне гена GBSSI, поэтому их вариабельность не влияет напрямую на структуру белка.

В качестве модельного объекта нами выбран эндемик п-ва Камчатка *E. kamczadalarum* (Nevski) Tzvelev, который, по данным ресурса The Plant List (<http://www.theplantlist.org/>), до настоящего времени считается синонимом североамериканского вида *E. trachycaulus* (Link) Gouldex Shinnars. Ранее была

показана специфичность белковых профилей *E. kamczadalarum* по сравнению с заносными образцами *E. trachycaulus* с территории Евразии (Агафонов, Баум, 2000). Тем не менее, учитывая ряд морфологических и биохимических отличий и географическую изолированность, было необходимо подтвердить StH-геномную конституцию *E. kamczadalarum*, поскольку на п-ве Камчатка широко распространен StY-геномный вид *E. gmelinii*, который гипотетически мог участвовать в становлении микроэволюционной обособленности *E. kamczadalarum*.

Среди копий гена *waxy* этого вида, подавленных адекватному выравниванию и уложенных в дендрограмму, маркеры гаплога St не обнаружены. Вместе с тем выявлены два маркера гаплога H. Отсюда можно сделать вывод, что эндемичный вид *E. kamczadalarum* обладает геномной конституцией StStHH. Попадание образцов *E. kamczadalarum* в кластер с североамериканскими видами *E. trachycaulus* и *E. canadensis* можно расценивать как неслучайное, поскольку флора Камчатки филогенетически связана с континентальной североамериканской. Таким образом, полученные результаты демонстрируют преимущество ядерных генов *bmy2* и *waxy* как маркеров для изучения генетического разнообразия видов рода *Elymus* по сравнению с ITS. Эти маркеры позволяют более

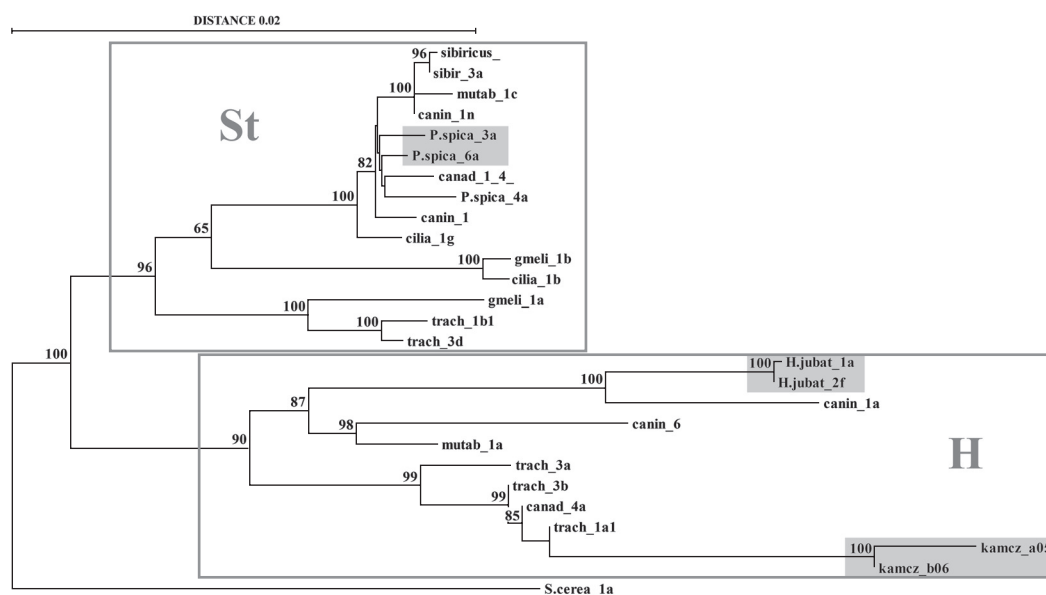


Рис. 3. Филогенетическое дерево, реконструированное на основе последовательностей маркера *waxy*. Выделены последовательности гаплов St, H, Y. Внутри гаплома H отмечены последовательности *E. kameczadolorum*.

canad-4a-H	AAGGTA CATAATTTTTTGGGTTTAAATGGTGGTTGCACAACAAT	----- TTAAGAC -TACA-----	TGGCTCAATGGCGGTTT
canin-5b-H	AAGGTA CATAATTTTTTGGGTTTAAATGGTGGTTGCACAACAAT	----- TTAAGAC -TACA-----	TGGCTCAATGGCGGTTT
canin-4b-H	AAGGTA CATAATTTTTTGGGTTTAAATGGTGGTTGCACAACAAT	----- TTAAGAC -TACA-----	TGGCTCAATGGCGGTTT
canin-2a-H	AAGGTA CATAATTTTTTGGGTTTAAATGGTGGTTGCACAACAAT	----- TTAAGAC -TACA-----	TGGCTCAATGGCGGTTT
canin-6-H	AAGGTA CATAATTTTTTGGGTTTAAATGGTGGTTGCACAACAAT	----- TTAAGAC -TACAC--GGTAGTCGTGTTCCGATACATGGCTCAATGGCGGTTT	
canin-1a-H	AAGGTA CATAATTTTTTGGGTTTAAATGGTGGTTGCACAACAAT	----- TTAAGAC -TACA-----	TGGCTCAATGGCGGTTT
trach-3a-H	AAGGTA CATAATTTTTTGGGTTTAAATGGTGGTTGCACAACAAT	----- TTAAGAC -TACA-----	TGGCTCAATGGCGGTTT
mutab-1a-H	AAGGTA CATAATTTTTTGGGTTTAAATGGTGGTTGCACAACAAT	----- TTAAGAC -TACA-----	TGGCTCAATGGCGGTTT
H. jubatum	AAGGTA CATAATTTTTTGGGTTTAAATGGTGGTTGCACAACAAT	----- TTAAGAC -TACA-----	TGGCTCAATGGCGGTTT
canin-1-St	AAGGTA AGTCGTCCTCT ---GGTTTAGGATACATTCCCGAGAACAACGAAGA ---GTTAAGAC -TACA--ATGGTGCTTGTGTTTCGATGCA	TCCATTAATGGTGGTTT	
canin-5a-S	AAGGTA AGTCGTCCTCT ---GGTTTAGGATACATTCCCGAGAACAACGAAGA ---GTTAAGAC -TACA--ATGGTGCTTGTGTTTCGATGCA	TCCATTAATGGTGGTTT	
canin-2b-S	AAGGTA AGTCGTCCTCT ---GGTTTAGGATACATTCCCGAGAACAACGAAGA ---GTTAAGAC -TACA--ATGGTGCTTGTGTTTCGATGCA	TCCATTAATGGTGGTTT	
canin-1n-S	AAGGTA AGTCGTCCTCT ---GGTTTAGGATACATTCCCGAGAACAACGAAGA ---GTTAAGAC -TACA--ATGGTGCTTGTGTTTCGATGCA	TCCATTAATGGTGGTTT	
canad-1 (4)	AAGGTA AGTCGTCCTCT ---GGTTTAGGATACATTCCCGAGAACAACGAAGA ---GTTAAGAC -TACA--ATGGTGCTTGTGTTTCGATGCA	TCCATTAATGGTGGTTT	
canad-4c-S	AAGGTA AGTCGTCCTCT ---GGTTTAGGATACATTCCCGAGAACAACGAAGA ---GTTAAGAC -TACA--ATGGTGCTTGTGTTTCGATGCA	TCCATTAATGGTGGTTT	
sibir-3a-S	AAGGTA AGTCGTCCTCT ---GGTTTAGGATACATTCCCGAGAACAACGAAGA ---GTTAAGAC -TACA--ATGGTGCTTGTGTTTCGATGCA	TCCATTAATGGTGGTTT	
sibir-1b-S	AAGGTA AGTCGTCCTCT ---GGTTTAGGATACATTCCCGAGAACAACGAAGA ---GTTAAGAC -TACA--ATGGTGCTTGTGTTTCGATGCA	TCCATTAATGGTGGTTT	
gmeli-1a-S	AAGGTA CATAATTTCT ---GGTTTAGGATACATTCCCGAGAACAACGAAGA ---GTTAAGAC -TACA--TAGCTGCTCGAGTTTGAGACA	TCCATTAATGGTGGTTT	
gmeli-1b-S	AAGGTA AGTCGTCCTCT ---GGTTTAGGATGCAATTCACCAACAACGAAGA ---GTTAAGAC -TACACAATGGTGCTCGTGTTCGATGCA	TCCATTAATGGTGGTTT	
cilia-1b-S	AAGGTA AGTCGTCCTCT ---GGTTTAGGATGCAATTCACCAACAACGAAGA ---GTTAAGAC -TACACAATGGTGCTCGTGTTCGATGCA	TCCATTAATGGTGGTTT	
cilia-1g-S	AAGGTA AGTCGTCCTCT ---GGTTTAGGATACATTCCCGAGAACAACGAAGA ---GTTAAGAC -TACA--ATGGTGCTTGTGTTTCGATGCA	TCCATTAATGGTGGTTT	
mutab-1c-S	AAGGTA AGTCGTCCTCT ---GGTTTAGGATACATTCCCGAGAACAACGAAGA ---GTTAAGAC -TACA--ATGGTGCTTGTGTTTCGATGCA	TCCATTAATGGTGGTTT	
trach-1b1	AAGGTA AGTCGTCCTCT ---GGTTTAGGATACATTCCCGAGAACAACGAAGA ---GTTAAGAC -TACA--CCGCTGCTCGTGTTCGATGTA	TCCATTAATGGTGGTTT	
P. spicata-	AAGGTA AGTCGTCCTCT ---GGTTTAGGATACATTCCCGAGAACAACGAAGA ---GTTAAGAC -TACA--ATGGTGCTTGTGTTTCGATGCA	TCCATTAATGGTGGTTT	
P. spicata-	AAGGTA AGTCGTCCTCT ---GGTTTAGGATACATTCCCGAGAACAACGAAGA ---GTTAAGAC -TACA--ATGGTGCTTGTGTTTCGATGCA	TCCATTAATGGTGGTTT	
P. spicata-	AAGGTA AGTCGTCCTCT ---GGTTTAGGATACATTCCCGAGAACAACGAAGA ---GTTAAGAC -TACA--ATGGTGCTTGTGTTTCGATGTA	TCCATTAATGGTGGTTT	
P. spicata-	AAGGTA AGTCGTCCTCT ---GGTTTAGGATACATTCCCGAGAACAACGAAGA ---GTTAAGAC -TACA--ATGGTGCTTGTGTTTCGATGCA	TCCATTAATGGTGGTTT	
P. spicata-	AAGGTA AGTCGTCCTCT ---GGTTTAGGATACATTCCCGAGAACAACGAAGA ---GTTAAGAC -TACA--ATGGTGCTTGTGTTTCGATGCA	TCCATTAATGGTGGTTT	

Рис. 4. Участок гена *waxy*, содержащий гаплом-специфичные последовательности. Светло-серым выделена последовательность, характерная для гаплома H, темно-серым – для гаплома St.

надежно идентифицировать организмы по их видовой принадлежности и отнести последовательность к тому или иному гаплотипу.

В данном контексте существует отчетливая проблема в отношении многих видов рода *Elymus*, описанных с территории России. Состав гаплотипов, или геномная конституция (ГК), установлен только для тех видов, ареал которых выходит за пределы территории РФ и которые были включены в интенсивные цитогенетические исследования конца XX в. (Dewey, 1984; Wang *et al.*, 1994).

У большинства видов геномная конституция остается неизвестной. На наш взгляд, первоначальный акцент должен быть сделан на определении геномной конституции методами молекулярного маркирования, поскольку при этом подразумевается поиск и таксономическая идентификация живого материала неизученных видов. Но следует осознавать, что среди существующих данных о молекулярно-генетических характеристиках известных видов присутствует высокая доля материала с ошибочным определением видовой принадлежности. Еще больший риск включить в исследования ошибочно идентифицированный материал существует при работе с редкими или сомнительными видами из маргинальных местообитаний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы выявлено, что ядерные гены более пригодны для установления филогении на межвидовом уровне. Показано, что последовательности гена *waxy*, принадлежащие различным гаплотипам, демонстрируют заметные различия и в силу этого могут быть использованы в качестве маркера для установления геномной конституции видов *Elymus*.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при частичной поддержке бюджетного проекта VI.61.1.2 (Н.А. Шмаков, Д.А. Афонников).

ЛИТЕРАТУРА

- Агафонов А.В. Система рекомбинационных и интрогрессивных гаплотипов StH-геномных видов рода *Elymus* L. Северной Евразии: дис. д-ра биол. наук. Центральный Сибирский ботанический сад, Новосибирск, 2004.
- 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.
- Цвелев Н.Н., Пробатова Н.С. Роды *Elymus* L., *Elytrigia* Desv., *Agropyron* Gaertn., *Psathyrostachys* Nevski и *Leymus* Hochst. (Poaceae: Triticeae) во флоре России // Комаровские чтения. Владивосток: Дальнаука, 2010. Вып. 57. С. 5–102.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W. *et al.* Basic local alignment search tool // *J. Mol. Biol.* 1990. V. 215. P. 403–410.
- Alvarez I.A., Wendel J.F. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference // *Molecular Phylogenetics Evolution*. 2003. V. 29. P. 417–434.
- Dewey D.R. Synthetic hybrids of *Hordeum bogdanii* with *Elymus canadensis* and *Sitanion hystrix* // *American Journal Botany*. 1971. V. 58. P. 902–908.
- Dewey D.R. The genomic system of classification as a guide to intergeneric hybridization with the perennial Triticeae. Gene manipulation in plant improvement. N. Y.: Plenum Publ. Corp., 1984. P. 209–279.
- Fan X., Sha L., Dong Z. *et al.* Phylogenetic relationships and Y genome origin in *Elymus* L. sensu lato (Triticeae; Poaceae) based on single-copy nuclear *Acc1* and *Pgk1* gene sequences // *Molecular Phylogenetics Evolution*. 2013. V. 69. Issue 3. P. 919–928.
- Guindon S., Dufayard J., Lefort V. *et al.* New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0 // *Systematic Biology*. 2010. V. 59 (3). P. 307–321.
- Han M.V., Zmasek C.M. phyloXML: XML for evolutionary biology and comparative genomics // *BMC Bioinformatics*. 2009. V. 10. P. 356.
- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P. *et al.* ClustalW and ClustalX version 2 // *Bioinformatics*. 2007. V. 23 (21).
- Liu Q., Ge S., Tang H. *et al.* Phylogenetic relationships in *Elymus* (Poaceae: Triticeae) based on the nuclear ribosomal internal transcribed spacer and chloroplast trnL-F sequences // *New Phytologist*. 2006. V. 170. P. 411–420.
- Löve A. Genetic evolution of the wheatgrasses // *New Zealand J. Bot.* 1982. V. 20. P. 169–186.
- Mason-Gamer R. Phylogeny of a genomically diverse group of *Elymus* (Poaceae) allopolyploids reveals multiple levels of reticulation. *Plos ONE*, 2013.
- Mason-Gamer R., Burns M., Naum M. Reticulate evolutionary history of a complex group of grasses: phylogeny of *Elymus* StStHH allotetraploids based on three nuclear genes. *Plos ONE*, 2010.
- Mason-Gamer R., Weil C.F., Kellogg E.A. Granule-bound starch synthase: structure, function and phylogenetic utility // *Mol. Biol. Evol.* 1998. V. 15 (12). P. 1658–1673.

- Mort M., Archibald J., Randle C. *et al.* Inferring phylogeny at low taxonomic levels: utility of rapidly evolving cpDNA and nuclear ITS loci // American Journal Botany. 2007. V. 94 (2). P. 173–183.
- Okito P. Origin of the Y genome in *Elymus*. All Graduate Theses and Dissertation. Paper 95, 2008.
- Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging // Mol. Biol. Evol. 2008. V. 25 (7). P. 1253–1256. doi: 10.1093/molbev/msn083.
- Soltis E.D., Albert V.A., Leebens-Mack J., Bell C.D. Polyploidy and angiosperm diversification // American Journal Botany. 2009. V. 96 (1). P. 336–348.
- The Plant List (2013). Version 1.1. Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org/> (accessed 1st January).
- Wang R., von Bothmer R., Dvorak J. *et al.* Genome symbols in the Triticeae (Poaceae) // Proc. 2nd Int. Triticeae Symp. Logan, Utah, USA, 1994. P. 29–34.

THE SUITABILITY OF THE *BMY2* AND *WAXY* GENES AND INTERNAL TRANSCRIBED SPACERS OF rRNA AS MARKERS FOR STUDYING GENETIC VARIABILITY IN *ELYMUS* SPECIES

N.A. Shmakov¹, D.A. Afonnikov^{1,2}, P.A. Belavin¹, A.V. Agafonov³

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: shmakov@bionet.nsc.ru;

² Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia;

³ Central Siberian Botanical Garden SB RAS, Novosibirsk, Russia

Summary

Elymus L. is a genus of the Poaceae family, which includes only polyploid species. It is widespread over all continents, with at least half of the species occurring in Asia, and this continent is considered to be its motherland. However, the diversity, genetic characteristics, and evolutionary interactions among *Elymus* species of some regions of Asia are still vague, and the Far East of Russia is one of such territories. Thus, investigation of evolutionary relations among species of Far East and Kamchatka is promising. In this work, several sequences of two nuclear genes and rDNA Internal Transcribed Spacers annotated in databases are analyzed. Nuclear genes sequences are shown to be more useful in building phylogeny at the interspecies level. Also, a region of the nuclear gene *waxy* is shown to vary among different haplomes. This variation makes it useful in investigating the genome constitutions of novel *Elymus* species. Finally, systematical status of *E. kamczadalarum* as a species was proven valid.

Key words: *Elymus*, phylogeny, microevolution, genetic markers.