

ВНУТРЕННЯЯ АЗИЯ

УДК 582.542
doi: 10.18101/2542-0623-2017-4-7-12

ТАКСОНОМИЧЕСКИЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ ДВУХ ВИДОВ РОДА *LEYMUS HOCHST.*, НА ОСНОВЕ ISSR (INTER SIMPLE SEQUENCE REPEATS) АНАЛИЗА

Н. К. Бадмаева, Н. С. Мезина, А. С. Агафонов

© **Бадмаева Наталья Карловна**

кандидат биологических наук,
Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН
670047, Россия, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6
E-mail: badmayevan@mail.ru

© **Мезина Наталья Сергеевна**

аспирант,
Биологический институт Томского государственного университета
634050, Россия, г. Томск, ул. Ленина, 36
E-mail: n.s.mezina@gmail.com

© **Агафонов Александр Викторович**

доктор биологических наук,
Центральный Сибирский ботанический сад СО РАН
630090, Россия, г. Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101
E-mail: agalex@mail.ru

Изучались филогенетические взаимосвязи двух видов рода *Leymus*: *L. secalinus* (Georgi) Tzvel и *L. littoralis* (Griseb.) Peschkova методом молекулярно-генетического анализа при помощи ISSR-праймеров. Результаты исследований выявили обособленность *L. secalinus* и ограниченность распространения вида северным побережьем озера Байкал. Также подтверждено мнение Г. А. Пешковой, что вид является эндемиком побережий оз. Байкал. Ареал вида *L. littoralis* более обширен, не ограничивается территорией Восточной Сибири России и охватывает территории Внутренней Монголии Китая, Монголию.

Ключевые слова: вид, *L. secalinus*, *L. littoralis*, ISSR, ISSR-праймеры, полиморфизм, дендрограмма, ареал.

Введение

В молекулярно-генетическом исследовании использован метод ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) для первичного скрининга генома. Метод ISSR, сравнивающий межмикросателлитные повторы последовательностей нуклеотидов, позволяет выявить генетическое разнообразие на видовом и популяционном уровне и широко используется для этих целей. Результаты анализа используются для

выявления родственных отношений внутри и между таксонами, решения фило-географических вопросов.

Виды *L. secalinus* и *L. littoralis* относят в полиморфный род *Leymus* (Hochst.), содержащим много гибридогенных видов.

Оба вида являются многолетними, длиннокорневищными и ветроопыляемыми злакам. Систематика двух таксонов весьма запутанна и до сих пор существует неясность в современной таксономии видов, их объеме и распространении.

Объект и методы исследований

Материал для исследований был собран авторами в семи популяциях этих двух видов: 1) Китай, Внутренняя Монголия — L.sec.Ch; 2) Монголия — L.sec.Mn; 3) Россия, Бурятия, дол. р. Селенга — L.lit.BD; 4) Россия, Бурятия, окр. г. Улан-Удэ, Тулунжа — L.lit.BT; 5) Россия, Бурятия, г. Улан-Удэ — L.lit.BU; 6) Россия, Бурятия, Давша (берег оз. Байкал) — L.sec.BB; 7) Россия, Бурятия, перешеек п-ва Святой Нос (берег оз. Байкал) — L.sec.BP.

Для популяционного ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) анализа были выделены ДНК из 48 высушенных в силикагеле образцов двух видов из 7 популяций с использованием кита «Diamond» (Россия, Барнаул) в соответствии с инструкцией производителя. Ваучерные гербарные образцы хранятся в гербарии УУН. Реакционная смесь для полимеразной цепной реакции объемом 25 мкл при ISSR-анализе содержала: 1 ед. Таг-полимеразы («Синтол»), 2,5 мкл стандартного 10х буфера для ПЦР («Синтол»), 20 пМ праймера, 2,5 мМ Mg²⁺, 0,25 мМ dNTP, 2 мкл геномной ДНК. Амплификацию проводили в термоциклере BioRad T100 (США) для ISSR-анализа по следующей программе: предварительная денатурация 94°C, 2 мин.; первые пять циклов 94°C, 20 сек; t° отжига, 10 сек; 72°C, 10 сек; в последующих тридцати пяти циклах 94°C, 5 сек; t° отжига, 5 сек; 72°C, 5 с. Последний цикл элонгации — 2 мин при 72°C. Температура отжига в зависимости от G/C состава праймеров варьировала от 42 до 56°C.

Продукты амплификации разделяли путем электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле в TBE буфере, окрашивали бромистым этидием и фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете. Для определения длин фрагментов ДНК использовали маркеры молекулярной массы 1 kb DNA Ladder («Fermentas»).

На основе трех электрофореграмм (гелей) составили бинарную матрицу по присутствию и отсутствию компонента (ампликонов) для каждого из изученных образцов. Дендрограммы выполняли с использованием коэффициента «Манхэттен расстояний» (Manhattan distance) полной связи в программе STATISTICA.

Результаты и обсуждение исследований

История изучения L. secalinus и L. littoralis

Впервые *L. secalinus* (Georgi) Tzvel. описан И. И. Георги в 1775 г. как *Triticum secalinum* Georgi на основании долиненевского описания и изображения вида по сборам Стеллера с песчаных берегов Байкала и с о. Ольхон, которые были опубликованы И. Г. Гmeliным в 1 т. «Flora Sibirica» [Gmelin, 1747, табл. 25]. Годом позже, в 1776 г., Паллас назвал это же растение, по тому же описанию и изображению Гмелина — *Triticum littorale* Pall. Типом же *T. littorale* Pall. является тот же рисунок И. Г. Гмелина. Е. Г. Бобров [1960] отмечает, что название, данное

И. И. Георги, является приоритетным. Здесь же Е. Г. Бобров указывает, что Ледебур в 1853 г. во «Flora Rossica» упоминает оба названных биноминала, и именно того растения, о котором шла речь у Стеллера, Гмелина, Георги и Палласа, которое квалифицировалось в качестве особой разновидности колосняка пушистоколосого — *Elymus dasystachys* β *littoralis* Griseb. ex Ledeb. Названный вид был установлен К. Триниусом в 1829 г. во «Flora Altaica» [Ledebour, 1829] с солонцов Чуи. Последующие исследователи — П. Н. Крылов, С. А. Невский, М. Г. Попов пренебрегли разновидностью Гризебаха и отнесли прибайкальское растение к виду, описанному Триниусом — *Elymus dasystachys* Trin. При этом Е. Г. Бобров указывает, что данный вид, по-видимому, состоит из разных рас, одной из которых является раса, населяющая пески Прибайкалья, и высказывает предположение, что изменчивость этого колосняка связана с изменениями характера его местообитания, т.е. является экологической. Кроме того, он разграничил эти виды, восстановив приоритетное название, предложенное в 1775 г. И. И. Георги — «*secalinus*», и предложил свою трактовку вида — *Elymus secalinus* (Georgi) Vobr., типом которого являлся все тот же рисунок И. Г. Гмелина в «Сибирской флоре» и классическое местонахождение вида — о. Ольхон и пески юго-западного побережья Байкала. Типом *Elymus dasystachys* Trin. являются растения из Чуйской долины Алтая. По Е. Г. Боброву, ареал *Elymus secalinus* (Georgi) Vobr., если понимать его узко — пески Прибайкалья; ареал вида в широком понимании охватывает горные области Южной Сибири и Прибайкалья, Восточного Казахстана, Киргизии и Восточного Таджикистана, Джунгарии и Монголии.

Н. Н. Цвелев указывает, что *L. secalinus* является очень полиморфным видом, распадающимся на несколько разновидностей, заслуживающих ранга подвидов. В своих обработках рода [Цвелев, 1968, 1976] он выделяет: *L. secalinus* subsp. *secalinus* (Georgi) Tzvel., *L. secalinus* subsp. *mongolicus* (Meld.) Tzvel., *L. secalinus* subsp. *pubescens* (O. Fedtsch.) Tzvel., *L. secalinus* subsp. *ovatus* (Trin.) Tzvel. Здесь же он указывает, что типы *Elymus dasystachys* («Altai, in argilloso-salsis ad Tschuja, 1826, leg. Bunge» — LE) и *E. littoralis* («In arenosis ad Baikalem prope Possolskoi, 1829, Turczaninow» — LE) являются вполне типичными экземплярами *L. secalinus* subsp. *secalinus* и что тип *E. littoralis* (имеющий 3 изотипа) может быть избран в качестве неотипа *Triticum secalinum*. К числу синонимов *L. secalinus* Н. Н. Цвелев относит *T. littorale* Pall. и *Elymus dasystachys* Trin. [Цвелев, 1968, 1976].

Г. А. Пешкова [1987], исследовав образцы *L. secalinus* s.str. с классического местонахождения (*E. littoralis*) в окр. с. Посольск на юго-восточном побережье Байкала, выделила из *L. secalinus* (Georgi) Tzvel. *L. littoralis* (Griseb.) Peschkova. По мнению Г. А. Пешковой, распространение *L. secalinus* s.str. ограничено северным побережьем Байкала и о. Ольхон; южнее — на побережьях Байкала и в островных степях Предбайкалья, Забайкалья, Якутии, Северной Монголии — произрастает другой вид *L. littoralis* (Griseb.) Peschkova [Пешкова, 1990].

В новейших работах, в синописе рода *Leymus*, Йен с соавторами [Yen et al., 2009], рассматривают *L. littoralis* (Griseb.) Peschkova в качестве синонима *L. secalinus* (Georgi) Tzvel., с широким ареалом, охватывающим юго-восточные провинции Китая, Восточный Казахстан, Японию, Монголию, Восточную Сибирь России. Н. Н. Цвелев и Н. С. Пробатова [2010] при таксономической ревизии этого же рода принимают самостоятельность вида *L. littoralis* (Griseb.) Peschkova, ареал кото-

рого охватывает Восточную Сибирь, а вне России — Монголию. Ранее Н. Н. Цвелев [1968, 1976] включал *Elymus dasystachys* var. *littoralis* Griseb.; *E. littoralis* (Griseb.) Turcz. ex Steud.) в *L. secalinus* subsp. *secalinus* (Georgi) Tzvel. и считал его широко распространенным видом в пустынной и степной частях Азиатского материка.

Результаты аналитических исследований

Для исследования было подобрано семь ISSR праймеров: Pr HB-14; Pr HB-12; Pr 17898B; Pr 17899A; Pr 17899B; 814; 844A с температурами отжига от 42 до 56°C. Проведены ПЦР реакции (амплификация) образцов с ISSR праймерами и получено семь гелей, из которых только три были наиболее информативными. На рисунке 1 представлен гель-электрофорез с праймера 17898B. Проведен анализ полиморфизма 42 ISSR-локусов у двух видов *Leymus* с трех электрофореграмм.

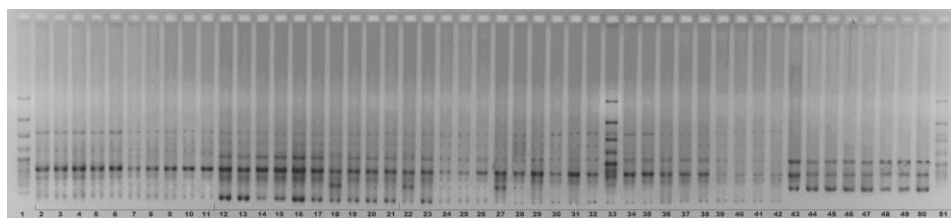


Рис. 1. Гель-электрофорез: ISSR варибельность с праймера 17898B у 48 образцов видов *L. secalinus*, *L. littoralis*. Треки № 1, 33, 51 — молекулярный маркер (1500–100 п.н.). Треки № 2–11 — *L. secalinus* (Китай); № 12–21 — *L. secalinus* (Монголия, *L.sec.Mn*); № 22–32 — *L. littoralis* (дол. р. Селенга – *L.lit.BD*); № 34–38 — *L. littoralis* (окр. г. Улан-Удэ, Тулунжа — *L.lit.BT*); № 39–42 — *L. littoralis* (окр. г. Улан-Удэ, *L.lit.BU*); № 43–47, 50 — *L. secalinus* (Давша, берег оз. Байкал, *L.sec.BB*); № 48–49 — *L. secalinus* (перешеек п-ва Святой Нос, берег оз. Байкал, *L.sec.BP*)

На дендрограмме дерево разделилось на две крупные клады (рис. 2). *L. secalinus* с берегов оз. Байкал образовал отдельную кладу, что указывает на его обособленность.

L. littoralis из Бурятии и *L. secalinus* с Монголии и Китая образовали одну большую кладу, но которая распадается на несколько субклад по географическому распространению. То что *L. littoralis* из Бурятии и *L. secalinus* из Монголии и Китая образовали единую кладу, указывает на их близкое родство и что это, возможно, один вид. Из этого следует, что название таксона — *L. secalinus* (Georgi) Tzvel. относится только к байкальским популяциям, а китайские и монгольские следует отнести к *L. littoralis* (Griseb.) Peschkova.

Наши исследования подтверждают мнение Г. А. Пешковой (1987), что распространение *L. secalinus* ограничено северным побережьем оз. Байкал и вид является эндемиком его побережий, южнее — на побережьях Байкала и в островных степях Предбайкалья Бурятии и Якутии произрастает *L. littoralis*. Результаты изучения подтвердили ранее проведенные исследования, основанные на сравнении отсеквенированных последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1–5.8S-ITS2 ядерной ДНК, и показали, что ареал вида *L. littoralis* более обширен и охватывает Восточную Сибирь России, Внутреннюю Монголию Китая и Монголию.

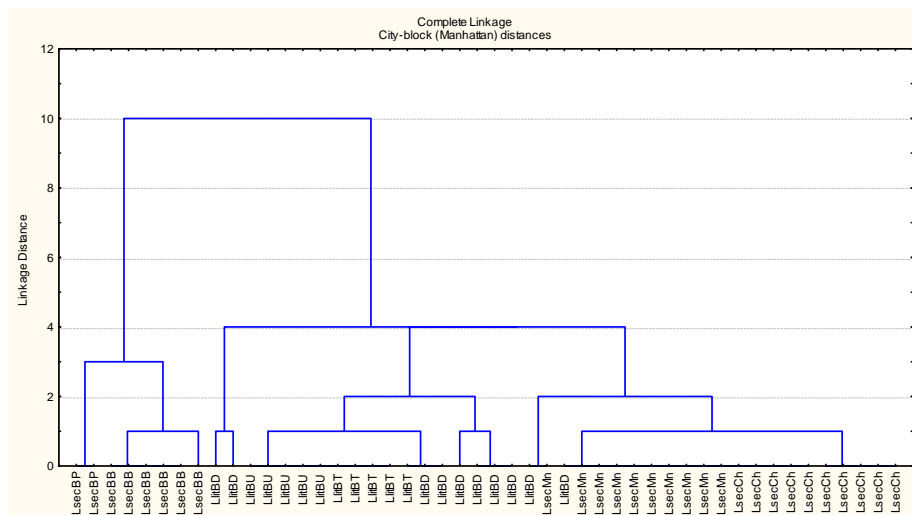


Рис. 2. Дендрограмма, построенная на основе матрицы генетических расстояний между популяциями двух видов *L. secalinus* и *L. littoralis*

Заключение

В результате молекулярно-генетического анализа методом ISSR получены данные о филогенетических взаимосвязях двух видов рода *Leymus*: *L. secalinus* и *L. littoralis*, выявлена обособленность *L. secalinus* и ограниченность распространения вида северным побережьем оз. Байкал. Подтверждены данные Г. А. Пешковой, что вид является эндемиком побережий оз. Байкал. Ареал вида *L. littoralis* более обширен и охватывает Восточную Сибирь России, Внутреннюю Монголию Китая и Монголию.

Работа выполнена в рамках бюджетных проектов СО РАН № VI.52.1.7
(№ гос. регистрации 0337-2016-0001), РФФИ: № 11-04-00861, № 16-04-01605

Литература

- Бобров Е. Г. Забытые виды И. И. Георги из «Байкальской флоры» // Бот. мат. герб. бот. ин-та АН СССР. 1960. Т. XX. С. 1–22.
- Пешкова Г. А. О *Leymus secalinus* s. l. (Georgi) Tzvel. (Poaceae) // Новости систематики высших растений: сборник научных трудов. Т. 24. Л.: Наука, 1987. С. 21–26.
- Пешкова Г. А. Род Колосняк — *Leymus* // Флора Сибири. Т. 2: Poaceae. Новосибирск: Наука, 1990. С. 41–52.
- Цвелев Н. Н. Злаки // Растения Центральной Азии. Вып. 4. Л.: Наука, 1968. 246 с.
- Цвелев Н. Н. Злаки СССР. Л.: Наука, 1976. 788 с.
- Цвелев Н. Н., Пробатова Н. С. Роды *Elymus* L., *Elytrigia* Desv., *Agropyron* Gaerth., *Psathyrotachys* Nevski *Leymus* Hochst. (Poaceae: Triticeae) во флоре России / Комаровские чтения. Вып. 57. Дальнаука, 2010. С. 5–102.
- Gmelin I. G. Flora sibirica. Т. 1. Petropoli, 1747. 247 p.
- Ledebour C. F. Flora Altaica. Т. 1. Berolini, 1829. 440 p.
- Yen C., J.-L. Yang, B. R. Baum Synopsis of *Leymus* Hochst. (Triticeae: Poaceae) // Journal of Systematics and Evolution. 2009. Vol. 47(1). P. 67–86.

**TAXONOMIC RELATIONSHIPS OF TWO SPECIES
OF THE GENUS *LEYMUS* HOCHST. ON THE BASIS OF ISSR
(INTER SIMPLE SEQUENCE REPEATS) ANALYSIS**

N. K. Badmaeva, N. S. Mezina, A. V. Agafonov

© **Badmaeva Natalia Karlovna**

Cand. Sci. (Biol.), Institute of General and Experimental Biology of SB RAS
6, Sakhyanovoy Str., Ulan-Ude, Russia, 670047
E-mail: badmayevan@mail.ru

© **Mezina Natalia Sergeevna**

Post-graduate student of Institute of Biology, Tomsk State University
36, Lenin Avenue, Tomsk, Russia, 634050
E-mail: n.s.mezina@gmail.com

© **Agafonov Alexander Victorovich**

Dr. Sci. (Biol.), Central Siberian Botanical Garden of SB RAS
101, Zolotodolinskaya Str., Novosibirsk, Russia, 630090
E-mail: agalex@mail.ru

Phylogenetic relationships between two species of the genus *Leymus*: *L. secalinus* (Georgi) Tzvel and *L. littoralis* (Griseb.) Peshkova were studied by molecular genetic analysis using ISSR primers. The results of the studies revealed the isolation of the *L. secalinus* species, and that the distribution of the species is limited to the northern coast of Lake Baikal. Also confirmed the view of G. A. Peshkova, that the species of *L. secalinus* is endemic to the shores of Lake Baikal. The range of *L. littoralis* is more extensive and not limited to the territory of Eastern Siberia of Russia, and covers the territory of Inner Mongolia of China, Mongolia.

Keywords: species, *L. secalinus*, *L. littoralis*, ISSR, ISSR-primers, polymorphism, dendrogram, areal.

References

- Bobrov E. G. *Zabytye vidy I. I. Georgi iz «Bajkal'skoj flory»* [Forgotten species Georgi from the «Baikal Flora»] // Bot. Mat. Gerb. Bot. In-ta AN SSSR. 1960. T. XX. pp.1–22.
- Peshkova G. A. About of the *Leymus secalinus* s.l. (Georgi) Tzvel. (Poaceae) // *Novosti sist. vyssh. rast.: sb. nauch. tr.* T. 24. L.: Nauka, 1987. pp. 21–26.
- Peshkova G. A. Genus Kolosnjak – *Leymus* // *Flora Sibiri* [Flora Sibirica]. T. 2: Poaceae. Novosibirsk: Nauka, 1990. pp. 41–53.
- Tzvelev N. N. *Zlaki // Rastenija Central'noj Azii* [Plants of Central Asia] Vyp. 4. L.: Nauka, 1968. 246 p.
- Tzvelev N. N. *Zlaki SSSR* [Poacea of the USSR]. L.: Nauka, 1976. 788 p.
- Tzvelev N. N., Probatova N. S. Genus of *Elymus* L., *Elytrigia* Desv., *Agropyron* Gaerth., *Psathyrostachys* Nevski, *Leymus* Hochst. (Poaceae: Triticeae) *vo flore Rossii* [Genus of *Elymus* L., *Elytrigia* Desv., *Agropyron* Gaerth., *Psathyrostachys* Nevski, *Leymus* Hochst. (Poaceae: Triticeae) in the Flora of Russia] / *Komarovskie chtenija*. Vyp. 57. Dal'nauka, 2010. pp. 5–102.
- Gmelin I. G. *Flora sibirica*. T. 1. Petropoli, 1747. 247 p.
- Ledebour C. F. *Flora Altaica*. T. 1. Berolini, 1829. 440 p.
- Yen C., J.-L. Yang, B. R. Baum Synopsis of *Leymus* Hochst. (Triticeae: Poaceae) // *Journal of Systematics and Evolution*. 2009. Vol. 47(1). pp. 67–86.