

Молекулярно-генетические исследования видов рода *Leymus* Hochst. (Poaceae)**Molecular genetic studies of species of the genus *Leymus* Hochst. (Poaceae)**

Бадмаева Н. К.

Badmaeva N. K.

Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, г. Улан-Удэ, Россия. E-mail: badmayevan@mail.ru
Institute of General and Experimental Biology SB RAS, Ulan-Ude, Russia

Реферат. *Leymus* Hochst. – сложный в таксономическом отношении род семейства Poaceae. Полиплоидные виды рода часто являются гибридогенными. Цель исследований – выяснение таксономического статуса наиболее проблемных и сложных в систематическом отношении представителей рода *Leymus*. Представлено изучение взаимоотношений распространенных на территории Евразии 30 видов рода *Leymus*, основанное на сравнении последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1–5.8S-ITS2 ядерной рДНК, хлоропластной ДНК matK. Показано филогенетическое дерево, построенное байесовским методом. В результате исследований делаются выводы о таксономическом статусе некоторых видов.

Ключевые слова. Таксономия, филогенетическое дерево, ITS1–5.8S-ITS2, *Leymus*, matK.

Summary. *Leymus* Hochst. is a taxonomically complex genus of the family Poaceae. Polyploid species of the genus are often hybridogenic. The purpose of the research is to clarify the taxonomic status of the most problematic and systematically complex representatives of the genus *Leymus*. A study of the relationships between 30 species of the genus *Leymus* Hochst (Poaceae) widespread in Eurasia is presented, based on a comparison of sequenced sequences of internal transcribed spacers ITS1–5.8S-ITS2 of nuclear rDNA and chloroplast DNA matK. A phylogenetic tree constructed using the Bayesian method is shown. As a result of the research, conclusions are drawn about the taxonomic status of some species.

Key words. ITS1–5.8S-ITS2, *Leymus*, matK, phylogenetic tree, taxonomy.

Введение. Виды рода *Leymus* – многолетние длиннокорневищные и плотнокустовые злаки, относятся к трибе Triticeae. Род *Leymus* очень сложен в таксономическом отношении, полиморфный, содержит много гибридогенных видов. Число видов в роде трактуется разными авторами весьма различно. На территории России и сопредельных стран насчитывается около 37 видов и 3 подвида рода *Leymus* Hochst. (Poaceae) (Черепанов, 1995). По Н. Н. Цвелеву и Н. С. Пробатовой (2010, 2019), около 50 видов рода распространено во внутропических странах северного полушария и Южной Америки, а также в горных районах тропиков. Род особенно многочислен в горах Средней Азии и Северной Америки. В СНГ встречаются 33 вида. На территории Китая насчитывается 24 вида, из которых 12 – виды, описанные с 1983 по 2006 гг. (Chen, Zhu, 2006). В настоящее время число видов в роде увеличилось и составляет более 60. Род *Leymus* интенсивно исследуется в тех странах, где имеет наибольшее его разнообразие: России, Китае, США (Цвелев, 1976; Dewey, 1984; Yen et al., 2009). Изучение филогении таксономически сложных родов растений представляет значительный интерес для выявления и изучения биоразнообразия и связанных с ней проблем микроэволюции и филогении.

Цель настоящего исследования – выяснение таксономического статуса наиболее проблемных и сложных в систематическом отношении представителей рода *Leymus* с применением молекулярно-генетических методов исследования. Основой для критического анализа микроэволюционной дифференциации и таксономической принадлежности видов рода *Leymus* являются опубликованные обзоры таксономии злаков трибы Triticeae (Цвелев, 1976; Пешкова, 1990; Chen, Zhu, 2006; Байков, Липин, 2008; Yen et al., 2009; Цвелев, Пробатова, 2010, 2019).

Одной из самых непростых задач в таксономии видов рода *Leymus* можно назвать идентификацию различий между *L. secalinus* (Georgi) Tzvel., *L. littoralis* (Griseb.) Peschkova, *L. dasystachys* (Trin.) Pilger, *L. ovatus* (Trin.) Tzvel. Между специалистами существует значительная несогласованность таксономических взглядов на объем и ареал *L. secalinus*.

Ранее на основе исследования последовательностей ITS1-5,8S-ITS2 рибосомальной ДНК была доказана самостоятельность этих видов, а также искусственность таких видов, как *L. ovatus* (Trin.) Tzvel. и *L. jensseiensis* (Turcz.) Tzvel. (Бадмаева, 2012; Badmaeva et al., 2020; Badmaeva, 2021).

Материалы и методы. Материалом для исследования послужили образцы 21 вида рода *Leymus*, собранные в местах естественного произрастания во время экспедиций по Евразии (Россия: Мурманская и Астраханская области, Республика Дагестан, Западная и Восточная Сибирь, Дальний Восток; ближнее и дальнее зарубежье: Казахстан, Монголия, Китай. Ваучерные гербарные образцы хранятся в гербариях UUN, NS и Тувинского государственного университета.

Тотальную ДНК выделяли из 20 мг высушенных в силикагеле образцов с использованием «NucleoSpin Plant II Kit» (Macherey-Nagel, Germany) по стандартному протоколу производителя. Полимеразная цепная реакция для амплификации участка ITS1-5,8S-ITS2 nrDNA проводилась в растворе объемом 20 мкл, для региона matK – в растворе объемом 25 мкл (табл. 1). Участок ITS1-5,8S-ITS2 nrDNA амплифицировали с использованием праймеров: ITS1 (F), ITS2 (R) и ITS2 (R) в программе по A. Gardiner et al. (2005). Регион matK амплифицировали с двух пар праймеров (табл. 1).

Таблица 1

Протоколы ПЦР и праймеры, использованные в исследовании

Состав ПЦР раствора для региона ITS1-5,8S-ITS2 ядерной rDNA (общий объем раствора: 20 мкл) Реактивы и праймеры фирмы «Синтол»		
Реагенты	Финальная концентрация	Объем в реакции (мкл)
стерильная dd H ₂ O		8,7
Buf B	1x	2
25 mM MgCl ₂	2,5 mM	2
10 μM праймер F	0,2	1
10 μM праймер R	0,2	1
DMSO	4%	1
10 mM dNTPs	0,2 mM	2
Taq Polymerase (5 U/μl)	0,1 U/μl	0,3
Объем		18
Матричная ДНК (20-40ng/μl)		2
Состав ПЦР раствора для региона matK cpDNA (общий объем раствора: 25 мкл) Реактивы и праймеры фирмы «Евроген»		
стерильная dd H ₂ O		11,8
10x Tag Buf с MgCl ₂ в конц. 30mM	1x	4
10 μM праймер F	0,2	2
10 μM праймер R	0,2	2
10 mM dNTPs	0,2 mM	3
HS Taq Polymerase (5 U/μl)	0,1 U/μl	0,2
Объем		23
матричная ДНК (20-40ng/μl)		2
Последовательность		Литература
Праймеры для региона ITS1-5,8S-ITS2 rDNA		
ITS1 (F)	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White et al, 1990
ITS2 (R)	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	
ITS-B (R)	GATATGCTTAAACTCAGCGG	Blattner, 1999
Праймеры для региона matK cpDNA		
matK W F	TACCCTATCCTATCCAT	Hilu et al. 1999
MatK 9R	TACGAGCTAAAGTTCTAGC	
MatK S5-1F	ACCCTGTTCTGACCATATTG	
MatK 1210R	GTAGTTGAGAAAGAATCGC	

Условия ПЦР matK подбирались опытным путем: денатурация 96°C – 3 мин; 35 циклов: 94°C – 30 с, 50°C – 1,30 мин, 72°C – 3 мин; заключительная стадия 72°C – 8 мин. ПЦР-продукты визуализировали в 1%-ном агарозном геле с использованием Sybr Green (фирмы «BioDye» Москва).

Амплификат очищали набором Mini Elute PCR Purification Kit (Qiagen, Германия). Концентрацию ДНК измеряли флуориметром Qubit (Invitrogen). Секвенирование ITS1-5,8S-ITS2 nrDNA выполнялось по методу Сэнгера на базах ЦКП СО РАН «Геномика» (Новосибирск) и «Синтол» (Москва) с двух праймеров для одного образца: прямого и обратного, в некоторых случаях и с внутреннего праймера ITS2(R). Участки matK секвенировали с четырех праймеров для одного образца по методу Сэнгера на базе «Синтол» и «Евроген».

В анализ для построения филогенетического дерева включены последовательности 61 образца 21 вида с шести праймеров, длина объединенной последовательности для одного образца составила 1985 пар нуклеотид. Последовательности выравнивали вручную в программе BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999). Филогенетическое дерево построено в программах PAUP (Swofford, 2002) и MrBayes (Huelsenbeck, Ronquist, 2001) (на основе объединенных последовательностей регионов ITS 1–2, 5,8S рДНК и MatK хлДНК (рис. 1). Деревья, построенные в разных программах, идентичны. Дерево укоренено на последовательностях 2-х образцов вида *Psathyrostachys juncea* (Бурятия, Монголия).

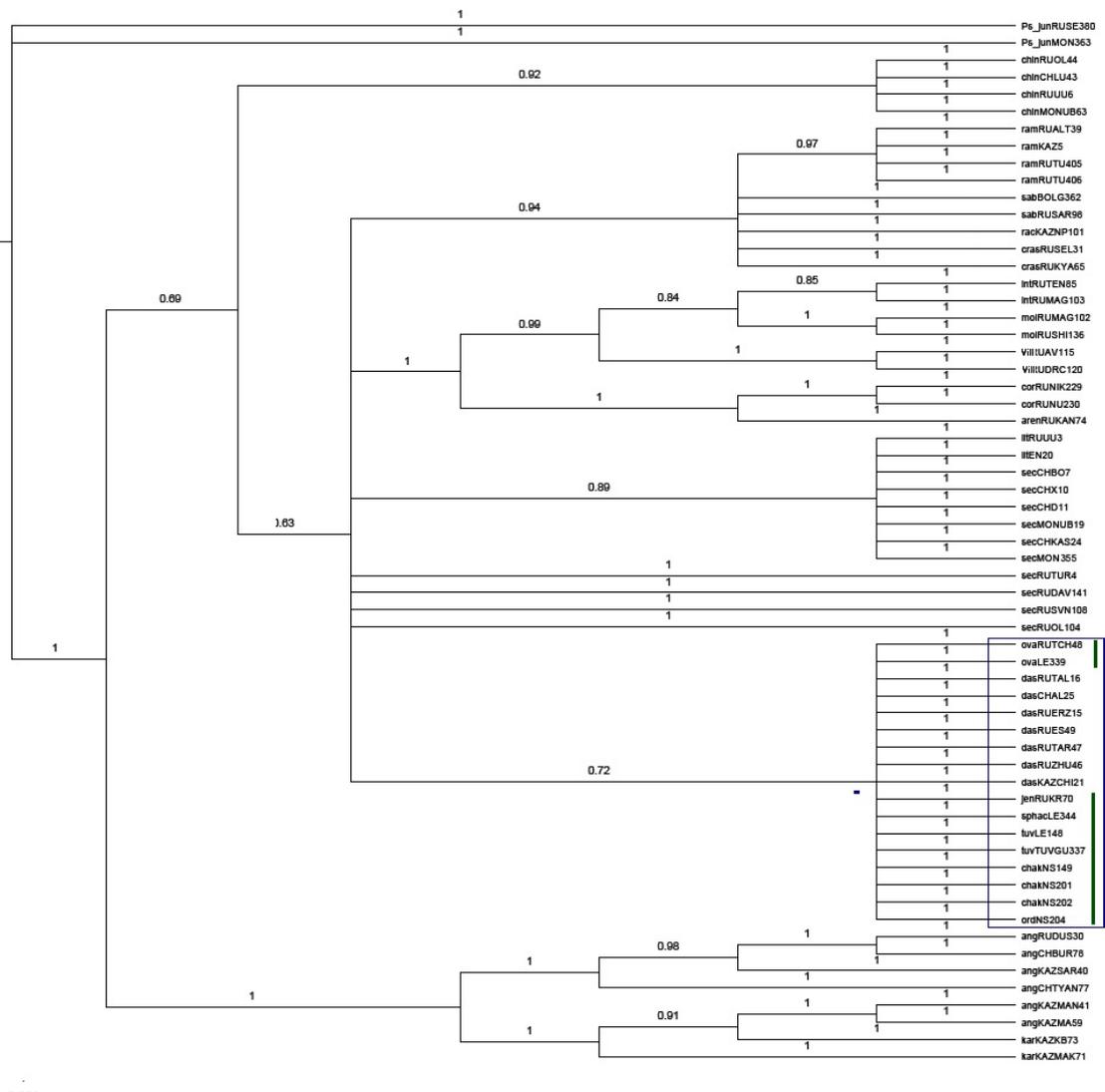


Рис. 1. Объединенное филогенетическое дерево 21 вида рода *Leymus*, основанное на последовательностях ITS 1-2, 5,8S рДНК и MatK хлДНК регионов, построенное байесовским методом в программе MrBayes. Цифрами указана устойчивость ветвей.

Результаты. Было проведено исследование образцов *L. chinensis* (секция *Anisopyrum*) из разных достаточно удаленных друг от друга географических регионов: Иркутская область, Бурятия, Монголия, Китай (рис. 1), подтвердившее принадлежность их к единому таксону. *L. ramosus* (Trin.) Tzvel. из этой же секции *Anisopyrum* сгруппировался с континентальными видами из секции *Leymus* – *L. sabulosus* (Bieb.) Tzvel., *L. crassinervius* (Kar. et Kir.) Tzvel. и *L. racemosus* (Lam.) Tzvel. Следует отметить, что ареал *L. ramosus* в основных чертах совпадает с ареалами видов из секции *Leymus*. Европейский приморский вид *L. arenarius* (L.) Hochst. хоть и обособлен, но сгруппировался в одну подкладу с *L. coreanus* (Honda) Jensen et Wang в большой кладе с дальневосточными приморскими видами *L. mollis* (Trin.) Pilger, *L. interior* (Hult.) Tzvel., *L. villosissimus* (Scribn.) Tzvel. Подтверждается самостоятельность вида *L. interior*.

В одну большую кладу сгруппировались виды секции *Aphanoneuron* (Nevski) Tzvel. – *L. dasystachys* (Trin.) Pilger, *L. chakassicus* Peschkova (NS, Хакассия), *L. tuvunicus* Peschkova (Тувинский государственный университет), *L. ordensis* Peschkova (NS, Чуйская степь Алтай), *L. sphacelatus* Peschkova (NS, Алтай), также как *L. ovatus*, *L. jenseiensis*. Ареал распространения этих видов совпадает.

Можно предположить о неправомерности выделения видов *L. chakassicus*, *L. tuvunicus*, *L. sphacelatus*, *L. ordensis*, что является предпосылкой для закрытия их. Вид *L. ordensis* с берегов реки Куды Иркутской области однозначно нужно синонимизировать. Так как типовой лист представлен двумя побегами, принадлежащими *L. chinensis* и *L. paboanus* (Claus) Pilg. Исследование «locus classicus» вида *L. ordensis* на берегах реки Куды, подтвердило, что там произрастают *L. chinensis* и *L. paboanus*. Побег *L. paboanus*, типового листа *L. ordensis* – молодой с недоразвитым колосом, имеющий опушение нижних цветковых чешуек. Вид *L. angustus* (Trin.) Pilg. с разных мест произрастания сгруппировался с *L. karelinii* (Turcz.) Tzvel. в одну кладу, хотя последний все же обособился в отдельную субкладу, что подтверждает его самостоятельный таксономический статус.

Таким образом, подтверждены таксономические статусы таких видов, как *L. coreanus*, *L. interior*, *L. karelinii*, а видовой статус *L. ordensis* оказался сомнительным.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания № 0271-2021-0001 121030900138-8 (FWSM-2021-0001).

ЛИТЕРАТУРА

Бадмаева Н. К. Расширение ареала *Leymus littoralis* (Griseb.) Peschkova, выявляемое на основе анализа последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1–5,8S–ITS2 рибосомных генов // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии: Сб. науч. статей по матер. XI междунар. науч.-практ. конф. (28–31 августа 2012 г., Барнаул). – Барнаул: Изд-во Жерносенко С. С., 2012. – С. 17–18.

Бадмаева Н. К. *Leymus secalinus* (Georgi) Tzvelev (Poaceae) – эндемик побережья Байкала // История и перспективы заповедного дела России: проблемы охраны, научных исследований и экологического просвещения: матер. науч.-практ. конф. с межд. участием, посвященной 95-летию организации Баргузинского гос. природного биосферного заповедника и Году российской истории. – Улан-Удэ: Изд-во БНЦ СО РАН, 2012. – С. 21–23.

Байков К. С., Липин А. С. Конспект рода *Leymus* (Poaceae) во флоре Азиатской России // Бюл. Моск. общ-ва испытателей природы. Отд. биол., 2008. – Т. 113, № 5. – С. 83–88.

Пешикова Г. А. *Leymus* Hochst. – Колосняк // Флора Сибири. Т. 2: Poaceae (Graminaceae). – Новосибирск: Наука, 1990. – С. 41–53.

Цвелев Н. Н. Злаки СССР. – Л.: Наука, 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. – Владивосток: Дальнаука, 2010. – Вып. 57. – С. 5–102.

Цвелев Н. Н., Пробатова Н. С. Злаки России. – М.: Тов-во науч. изд. КМК, 2019. – 646 с.

Черепанов С. К. Сосудистые растения России и сопредельных государств. – СПб.: Мир и семья-95, 1995. – 992 с.

Badmaeva N. K. Taxonomic status of artificial species *Leymus ovatus* (Trin.) Tzvel. and *Leymus jenseiensis* (Turcz.) Tzvel. (Poaceae) // IV All-Russian Conference with International Participation «Diversity of Soils and Biota of Northern and Central Asia» IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science, 908 (2021). – 012024. DOI:10.1088/1755-1315/908/1/012024

Badmaeva N., Tubanova D., Bukharova E. Widening the area of a Baikal endemic *Leymus secalinus* (Georgi) Tzvelev (Poaceae) northward to the Aldan River basin (Yakutia) based on the molecular genetic study results // Plant Diversity: Status, Trends, Conservation Concept. BIO Web of Conferences 24, 00006 (2020). DOI: 10.1051/bioconf/20202400006

Blattner F. R. Direct Amplification of the Entire ITS Region from Poorly Preserved Plant Material Using Recombinant PCR // BioTechniques, 1999. – Vol. 27. – P. 1180–1186. DOI: 10.2144/99276ST04

Chen S. L., Zhu G. H. *Leymus* Hochstetter // Flora of China / Wu Zh. Y., Raven P. H., Hong D. Y. (eds.). – Beijing; St. Louis: 2006. – Vol. 22. – P. 387–394.

- Dewey D. R.** The genomic system of classification as a quite to intergeneric hybridization with the perennial Triticeae // Gene manipulation in plant improvement / Ed. Gustafson J. P. – New York, 1984. – P. 209–279.
- Gardiner, A., Ignatov M., Huttunen S., Troitsky A.** On resurrection of the families Pseudoleskeaceae Schimp. and Pylaisiaceae Schimp. (Musci, Hypnales) // Taxon, 2005. – Vol. 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. DOI: 10.12691/ajmr-3-2-1.
- Hilu K. W., Lawrence A. A., Liang H.** Phylogeny of Poaceae Inferred from matK Sequences // Annals of the Missouri Botanical Garden, 1999. – Vol. 86, № 4. – P. 835–851.
- Huelsenbeck J. P., Ronquist F.** MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees // Bioinformatics, 2001. – Vol. 17, № 8. – P. 754–755. DOI: 10.1093/bioinformatics/17.8.754.
- Swofford D. L.** PAUP: phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0 b10. Sinauer Associates; Sunderland, MA, USA: 2002.
- White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J.** Amplification and direct sequence of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR Protocols: a guide to methods and amplifications. – New York: Academic, 1990. – P. 315–322.
- Yen C., Yang J.-L., Baum B. R.** Synopsis of *Leymus* Hochst. (Triticeae: Poaceae) // Journal of Systematics and Evolution, 2009. – Vol. 47(1). – P. 67–86.