



Изменчивость ISSR-маркеров и оценка наследования диагностических признаков у StY-геномных видов *Elymus pendulinus*, *E. brachypodioides* и *E. vernicosus* (Poaceae: Triticeae)

Е.В. Кобозева^{1, 2}✉, С.В. Асбаганов¹, О.В. Дорогина¹, А.В. Агафонов¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск, Россия

В настоящее время предлагаются к признанию три самостоятельных вида рода *Elymus* подсекции *Pendulini* в пределах России: *E. pendulinus*, *E. brachypodioides* и *E. vernicosus*. Диагностическими признаками для различения видов считаются наличие и типы трихом узлов стебля (УС) и нижних цветковых чешуй (НЦЧ), а также экологические условия произрастания. В Приморском крае и Республике Алтай нами обнаружен ряд смешанных популяций, в которых существует визуально непрерывная изменчивость по типу трихом НЦЧ: от голых и гладких до длинноволосистых. Кроме того, в Приморском крае найден ряд популяций, в которых совместно произрастают особи как с гладкими, так и с волосистыми УС. Изучен полиморфизм ISSR-маркеров среди выборочных образцов трех видов из разных точек ареала вместе с реперными видами *E. ciliaris* и *E. gmelinii*. Консенсусная дендрограмма, построенная по результатам использования ISSR-маркеров, показала отсутствие видовой специфичности у образцов подсекции *Pendulini*. Созданы гибриды между особями разных видов подсекции в шести комбинациях скрещиваний. У всех растений F₁ были нормально развитые открытые пыльники, семенная фертильность в разных комбинациях составляла от 8 до 89 %. В выборках F₂ отсутствовали стерильные особи и наблюдалось увеличение семенной фертильности до нормальных значений. Следовательно, три таксона формируют единый рекомбинационный генопул. Выявлено, что диагностические признаки контролируются одной парой аллелей по опушению УС и одной или двумя парами аллелей (в различных комбинациях скрещивания) по опушению НЦЧ. Данные признаки представляют собой нормальное проявление внутривидовой изменчивости. Предложено рассматривать виды *E. brachypodioides* и *E. vernicosus* в качестве внутривидовых таксонов *E. pendulinus* s. l. в ранге разновидностей.

Ключевые слова: *Elymus*; таксономия; диагностические признаки; ISSR-маркеры; гибридизация; семенная фертильность.

Variability of ISSR markers and estimation of inheritance of diagnostic characters among StY-genome species of *Elymus pendulinus*, *E. brachypodioides* and *E. vernicosus* (Poaceae: Triticeae)

E.V. Kobozeva^{1, 2}✉, S.V. Asbaganov¹,
O.V. Dorogina¹, A.V. Agafonov¹

¹ Central Siberian Botanical Garden SB RAS, Novosibirsk, Russia

² National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

Currently three species are recognized in Russia within the genus *Elymus* subsection *Pendulini*, namely, *E. pendulinus*, *E. brachypodioides* and *E. vernicosus*. The degree and quality of lemma and stem node vestitures and ecology are considered important characters for species delineation. In Primorsky krai and Altai Republic we have found a number of mixed populations in which there is visually continuous variation in lemmas vestitures from being completely glabrous to densely puberulent or pilose. Additionally, there are a number of populations in Primorsky krai in which individuals having either smooth or pilous stem nodes grow together. A study of polymorphism of ISSR markers among selective accessions of three species from different locations was carried out together with the reference species *E. ciliaris* and *E. gmelinii*. The consensus dendrogram constructed by results of ISSR markers has shown no taxon specific patterns in accessions of the subsection *Pendulini*. Hybrids between the individuals of different species of the subsection in six cross combinations have been created. All F₁ plants had normally developed open anthers, seed fertility (SF) ranged from 8 % to 89 % in different combinations. In F₂ populations no sterile individuals or increase of SF up to normal values were observed. Hence, three taxa form a unified recombination gene pool. The diagnostic characters were found to be controlled by one pair of alternative alleles for glabrous vs. hairy stem nodes, and by one or two pairs of alleles in different cross combinations for glabrous vs. hairy

lemmas. These characters can be considered as normal inter- and/or intra-population variation. Therefore, *E. brachypodioides* and *E. vernicosus* need to be relegated to infraspecific rank within *Elymus pendulinus* s. l. as varieties.

Key words: *Elymus*; taxonomy; diagnostic features; ISSR markers; hybridization; seed fertility.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Кобозева Е.В., Асбаганов С.В., Дорогина О.В., Агафонов А.В. Изменчивость ISSR-маркеров и оценка наследования диагностических признаков у StY-геномных видов *Elymus pendulinus*, *E. brachypodioides* и *E. vernicosus* (Poaceae: Triticeae). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(1):135-145. DOI 10.18699/VJ17.232

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Kobozeva E.V., Asbaganov S.V., Dorogina O.V., Agafonov A.V. Variability of ISSR markers and estimation of inheritance of diagnostic characters among StY-genome species of *Elymus pendulinus*, *E. brachypodioides* and *E. vernicosus* (Poaceae: Triticeae). Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(1):135-145. DOI 10.18699/VJ17.232

Проблема критериев таксона любого уровня и в первую очередь критериев вида остается актуальной для эволюционной биологии в целом и особенно для систематики дикорастущих растений. По мнению К.М. Завадского (1968), развившего учение о виде Н.И. Вавилова, характерными признаками, присущими всем видам, являются: численность, дискретность, экологическая и географическая определенность, многообразие форм, целостность и внутренняя структура, единая наследственная основа и эволюционное развитие в виде самостоятельной филогенетической ветви, воспроизводимость, устойчивость существования в природе. Идентифицировать вид только с какой-либо одной позиции было бы ошибочным, поскольку среди перечисленных признаков нет ни одного, который можно было бы использовать как единственный, абсолютный видовой критерий (Завадский, 1968). При изучении популяционной и таксономической структуры, происхождения и эволюции видов необходимо опираться на комплекс признаков и все доступные видовые критерии – морфологический, географический, экологический, биохимический, репродуктивный, генетический и др. (Тахтаджян, 1970).

В последние годы вопрос самостоятельности (обособленности) таксонов видового и подвидового рангов в ботанике становится особенно актуальным. Накопление множества данных, извлекаемых из гербарного материала традиционными методами (сравнительно-морфологическим и эколого-географическим), а также размытость критериев вида ведут к разработке все более субъективных оценок диагностической значимости выявляемых признаков (Агафонов, 2004). Если проанализировать критерии, на основании которых были признаны новые виды рода *Elymus* L. в пределах России за последние десятилетия (Цвелёв, 2008; Цвелёв, Пробатова, 2010), то среди них практически не упоминается репродуктивный критерий (с учетом механизмов изоляции и их последствий в поколениях), так же как какие-либо генетические, цитогенетические или биохимические критерии. По данным Н.Н. Цвелёва и Н.С. Пробатовой (2010), на территории России в составе рода *Elymus* секции *Gouldardia* (Husn.) Tzvelev, подсекции *Pendulini* (Nevski) Tzvelev существуют три близкородственных, но самостоятельных вида: *E. pendulinus* (Nevski) Tzvelev, *E. brachypodioides* (Nevski) Peschkova и *E. vernicosus* (Nevski ex Grubov) Tzvelev. Критериями для выделения этих видов являются их морфологические различия и эколого-географические особен-

ности произрастания. По мнению авторов, *E. pendulinus* распространен в Приморском крае и в бассейне Среднего Амура и представлен главным образом лесными растениями. *E. brachypodioides* приурочен к открытым каменистым местообитаниям юга Сибири от Алтая до Читинской области, с восточной границей ареала в Амурской области, низовье Амура и в Ханкайском районе Приморского края. Наиболее ксерофитный вид *E. vernicosus* в основном распространен в полупустынных районах Центральной Азии, на территории России вид встречается в пограничных районах Горного Алтая, Забайкальского края и Республики Бурятия (Цвелёв, 2008).

Elymus pendulinus, согласно последнему диагнозу (Цвелёв, Пробатова, 2010), отличается от видов *E. brachypodioides* и *E. vernicosus* наличием жестких щетинок по бокам и в верхней части нижних цветковых чешуй (НЦЧ) и обычно голыми, реже коротковолосистыми узлами стебля (УС). У видов *E. brachypodioides* и *E. vernicosus* НЦЧ только с шипиками, в верхней части без жестких щетинок, при этом *E. brachypodioides* отличается от *E. vernicosus* наличием коротких волосков на УС, поскольку у последнего они голые. В то же время нами обнаружено, что в пределах дальневосточных фитоценозов существуют особи с различными диагностическими признаками – как с голыми УС, так и с волосистыми (Кобозева и др., 2012). Так, в некоторых гетерогенных популяциях Приморского края были найдены образцы, которые по морфологическим признакам могут быть отнесены ко всем трем видам: *E. pendulinus*, *E. brachypodioides* и *E. vernicosus*, а в популяциях Горного Алтая – к *E. pendulinus* и *E. vernicosus*. Кроме того, в популяциях Южного Приморья и Горного Алтая обнаружены формы с разным проявлением признака опушения НЦЧ: голые и гладкие, безреснитчатые, длиннощетиныстые с ресничками, а также все переходные фенотипы. По признаку опушения УС в некоторых смешанных популяциях Южного Приморья найдены особи как с голыми, так и с волосистыми в разной степени узлами, в том числе с полуопушенными. В поисках наиболее стабильных признаков, помимо диагностических, нами была изучена изменчивость ряда морфологических признаков (Кобозева и др., 2012), но признаков, которые было бы возможно применять как ключевые для подразделения на отдельные виды, не найдено. Относительно экологической приуроченности каждого из видов мы наблюдали следующее: микропопуляции и отдельные особи, соответствующие по морфотипам *E. pendulinus* и *E. brachypodi-*

oides, в Южном Приморье чаще всего занимали границы лесов и кустарников или нарушенные антропогенные местообитания – обочины дорог и прочие урбанизированные территории. Среди горно-алтайских популяций большинство особей, обитающих во влажных местах, формально следует отнести не к *E. brachypodioides*, а к *E. vernicosus* (гладкие НЦЧ и УС). Образцы *E. vernicosus* были обнаружены в лесных фитоценозах южных районов Бурятии и провинции Китая (Внутренней Монголии), так же как образцы *E. brachypodioides* с гладкими НЦЧ и опушенными УС – в Забайкальском крае.

Для понимания взаимосвязи генотипической и фенотипической изменчивости необходимо изучение генетического сходства между морфотипами с учетом экологических особенностей произрастания и репродуктивных свойств изучаемых таксонов. Если посмотреть на распространение видов *E. pendulinus*, *E. brachypodioides* и *E. vernicosus* через призму «мозаичности фитоценозов» (Работнов, 1972; Миркин, Розенберг, 1978), то можно обнаружить отчетливую экологическую приуроченность этих видов согласно правилам эпизодической и антропогенной мозаичности. Формированию мозаичности способствуют относительно короткий срок жизни (два-три года) особей этих трех видов, а также семенной способ размножения путем автогамии. В результате растения не нуждаются в опылителях и проявляют высокую вариативность в численности микропопуляций, а также в местонахождениях отдельных адвентивных особей. Как правило, популяции с высокой численностью встречаются редко и на нарушенных местообитаниях существуют временно, а отдельные особи можно встретить практически в любом месте в пределах общего ареала видов.

Таким образом, нами установлено, что каждый из трех рассматриваемых видов может занимать в пределах их ареалов различные экологические ниши. Это позволяет предполагать, что *E. pendulinus*, *E. brachypodioides* и *E. vernicosus* могут быть морфотипами одного крупного полиморфного таксона видового ранга без выраженной экологической приуроченности. По нашему мнению, виды *E. pendulinus*, *E. brachypodioides* и *E. vernicosus* образуют единый рекомбинационный генопул, в котором присутствует определенный набор аллельных генов, контролирующих разные морфологические типы. Вероятно, распределение частот аллелей в отдельных частях ареала может существенно различаться. Для понимания взаимоотношений этих морфотипов необходимо провести более глубокие комплексные исследования, включающие помимо классических методов ботаники (сравнительно-морфологического и эколого-географического) современные методы экспериментальной биологии. Одним из современных методов, позволяющих выявить признаки специфичности и генетического полиморфизма близкородственных таксонов, является молекулярно-генетический анализ изменчивости межмикросателлитных последовательностей ДНК (inter-simple sequence repeat – ISSR). Другой эффективный метод для изучения уровней родства растений – межвидовая гибридизация или гибридизация особей, различающихся рядом морфологических признаков. Ранее на примере некоторых видов рода *Elymus* было показано, что дифференциация по уровням скрещиваемо-

сти особей является важным показателем микроэволюционных событий, и этот принцип можно использовать для выяснения уровней родства между близкородственными таксонами (Agafonov, Salomon, 2002).

Цель данного исследования – уточнить микроэволюционные взаимоотношения между видами *E. pendulinus*, *E. brachypodioides* и *E. vernicosus* с помощью молекулярно-генетического и гибридологического анализов.

Материал и методы

Материалом для исследований служили отдельные образцы и популяционные выборки из различных местообитаний Приморского края, Горного Алтая, Бурятии, Забайкальского края и КНР. Для ISSR-анализа в качестве реперного был привлечен образец рода *Leymus* Hochst. из Северо-Восточного Казахстана. Кроме того, для сравнения, помимо исследуемой группы образцов, были взяты образцы видов из секции *Gouldardia* (Husn.) Tzvelev – *E. gmelinii* (Ledeb.) Tzvelev и *E. ciliaris* (Trin.) Tzvelev. Точки сбора природного материала приведены в табл. 1.

Молекулярно-генетический анализ изменчивости межмикросателлитных последовательностей ДНК (ISSR-анализ) проведен с применением праймеров (табл. 2), успешно использованных ранее для маркирования видов рода *Elymus* L. (Кобозева и др., 2015). Для количественной оценки полиморфизма маркеров и определения уровня дивергенции между изученными генотипами полученные данные были представлены в виде матрицы состояний бинарных признаков, в которой наличие или отсутствие ПЦР-фрагментов одинакового размера рассматривалось как состояние 1 и 0. Для статистической обработки данных использовали пакет программ TREECON (version 1.3b) (van de Peer, de Wachter, 1994). Генетические дистанции рассчитывали по методу (Nei, Li, 1979). Для построения дендрограмм применяли метод Neighbor-Joining (NJ) (Nei, 1987), расчет бутстреп-индексов проводили на 100 псевдорепликациях.

Родительские биотипы для гибридизации подбирали на основании различающихся морфологических признаков (табл. 3). Кроме диагностических признаков (опушение НЦЧ и УС) были учтены признаки опушения листовых пластинок (ЛП) верхних листьев и опушение влагалищ нижних листьев. Растения для гибридизации выращивали на коллекционном участке или в климокамере ЦСБС из семян дикорастущих экземпляров, собранных в разных точках ареала. В результате выполнены скрещивания в шести комбинациях.

Гибридизацию растений проводили по ранее разработанной экспресс-методике (Агафонов, 2004). Главным отличием методики от традиционной и преимуществом (Lu, Bothmer, 1990) является стимуляция естественного раскрытия цветков и одновременное удаление еще не лопнувших пыльников. Применение данной методики дает более надежные результаты, поскольку не требует предварительной эмаскуляции нежных незрелых цветков и ведет к повышению эффективности гибридизации.

Семенную фертильность (СФ) растений определяли как отношение выполненных зерновок к общему числу цветков в колосе. Показатели фертильности определяли не менее чем с трех хорошо развитых колосьев, из которых

Table 1. Coordinates (WGS-84) of locations of the *E. pendulinus* complex accessions from Primorskiy krai and Republic Altai and of the reference species from different locations

Accession code*	Location coordinates, collectors**
<i>E. pendulinus</i>, Primorskiy krai	
SHA-0843	Nearby Vladivostok, alt. 71 m, N 43°12.276' E 132°9.047' [1, 4]
VBG-1105	Nearby Vladivostok, alt. 168 m, N 43°13.091' E 131°59.048' [1, 2]
VSE-1018	Nearby Vladivostok, alt. 3 m, N 43°13.169' E 131°57.330' [1]
VOK-0738	Nearby Vladivostok, alt. 7 m, N 43°14.10' E 132°0.19' [1]
VOK-1015	Nearby Vladivostok, alt. 8 m, N 43°13.94' E 131°59.95' [1]
SAD-0841	Nearby Vladivostok, alt. 14 m, N 43°15.850' E 132°1.723' [1]
SAD-0842	Nearby Vladivostok, alt. 6 m, N 43°15.943' E 132°1.103' [1]
SAD-1011	Nearby Vladivostok, alt. 26 m, N 43°15.734' E 132° 2.483' [1]
GTS-1101	Ussuriysk raion, alt. 121 m, N 43°41.650' E 132°09.324' [1, 2]
GTS-1102	Ussuriysk raion, alt. 123 m, N 43°41.617' E 132°09.521' [1, 2]
USS-0720	Ussuriysk outskirts, alt. 49 m, N 43°51.23' E 131°57.60' [1, 4]
<i>E. brachypodioides</i>, Primorskiy krai	
ZAR-0746	Hasanskiy raion, nearby Zarubino Village, alt. 5 m, N 42°38.341' E 131°04.578' [1, 3]
MES-0721	Hasanskiy raion, nearby Andreevka Village, alt. 38 m, N 42°37.306' E 131°08.353' [1, 3]
AND-1107	Hasanskiy raion, nearby Andreevka Village, alt. 38 m, N 42°38.067' E 131°08.179' [1, 2]
SLA-1123	Nearby Slavyanka, alt. 38 m, N 42°52.052' E 131°23.002' [1, 2]
RUS-0716	Russkiy Island, alt. 28 m, N 43°00.894' E 131°53.415' [1, 3]
RUS-0732	
VBG-0722	Nearby Vladivostok, alt. 169 m, N 43°13.137' E 132°59.359' [1, 2]
VLA-0719	Nearby Vladivostok, alt. 17 m, N 43°13.686' E 132°00.035' [1]
BKA-0921	Nearby Bolshoy Kamen, alt. 41 m, N 43°7.301' E 132°25.083' [1]
<i>E. vernicosus</i>, Primorskiy krai	
SAD-1002	Nearby Vladivostok, alt. 26 m, N 43°15.734' E 132° 2.483' [1]
<i>E. pendulinus</i>, Mountain Altai	
CHE-1022–CHE-1028 CHE-1040	Chemalskiy raion, nearby Chemal Village, a transect from point alt. 438 m, N 51°23.919' E 86°00.112' to point alt. 434 m, N 51°23.533' E 86°00.197' [2, 3]
AUS-1015	Shebalinskiy raion, nearby Ust-Sema Village, alt. 345 m, N 51°38.371' E 85°45.384' [1, 2]
<i>E. vernicosus</i>, Mountain Altai	
CHE-1031, CHE-1032, CHE-1034, CHE-1043	Chemalskiy raion, nearby Chemal Village, a transect from point alt. 438 m, N 51°23.919' E 86°00.112' to point alt. 434 m, N 51°23.533' E 86°00.197' [2, 3]
CHE-1044	Chemalskiy raion, nearby Chemal Village, alt. 457 m, N 51°23.481' E 86°00.116' [1, 2]
CHE-1066	Chemalskiy raion, nearby Chemal Village, alt. 391 m, N 51°23.476' E 86°00.127' [1, 2]
Reference accessions	
CHI-0803	<i>E. brachypodioides</i> , Zabaykalskiy krai, nearby Nerchinsk, alt. 690 m, N 51°56.574' E 116°33.634' [5]
BBI-1114	<i>E. vernicosus</i> , Republic of Buryatia, nearby Bichura Village, alt. 710 m, N 50°32.458' E 107°37.216' [1, 2]
CIM-1133	<i>E. vernicosus</i> , People's Republic of China, Inner Mongolia Autonomous Region, alt. 1589 m, N 42°25.991' E 115°42.971' [5]
VBG-0844	<i>E. ciliaris</i> , Primorskiy krai, nearby Vladivostok, alt. 169 m, N 43°13.091' E 131°59.048' [1, 4]
MES-1111	<i>E. ciliaris</i> , Primorskiy krai, Hasanskiy raion, alt. 93 m, N 42° 37.045' E 131° 8.650' [1, 2]
BKA-0962	<i>E. gmelinii</i> , Primorskiy krai, nearby Bolshoy Kamen, alt. 41 m, N 43°7.513' E 132°25.133' [1]
ALK-0678	<i>E. gmelinii</i> , Altai Republic, Ust-Koksinskiy raion, alt. 1476 m, N 50°45.75' E 84°55.38' [3]
KAZ-2011	<i>Leymus sp.</i> , North-East Kazakhstan [3]

* Codes of the accessions included in hybridization are shown in bold.

** Collectors: [1], A.V. Agafonov; [2], E.V. Kobozeva; [3], D.E. Nikonova (Gerus); [4], M.A. Agafonova; [5], O.A. Anenkhonov.

Table 2. The primers used for study of DNA polymorphism among *Elymus* accessions

Primer	Nucleotide sequence 5'- 3'	Tann, °C	Total number of DNA fragments	Fragment sizes, bp
17899B	(CA) ₈ GG	47	47	350–1400
814	(CT) ₈ TG	51	67	250–1700
844A	(CT) ₈ AC	51	45	350–1500
M2	(AC) ₈ YG*	56	72	300–2000
HB14	(CTC) ₃ GC	41	40	450–1700
HB12	(CAC) ₃ GC	42	51	450–1700

*Y = C or T.

Table 3. Morphology of parental plants used in the crosses

No.	Lemma pubescence	Culm node pubescence	Upper leaf pubescence	Lower leaf-sheath pubescence
<i>E. brachypodioides</i> MES-0721 (1) × <i>E. pendulinus</i> USS-0720 (2)				
1	glabrous, short sparse bristles on sides	pilose	glabrous	glabrous
2	long bristles on sides	pilose	glabrous, short- puberulent leaf apex	glabrous
<i>E. brachypodioides</i> ZAR-0746 (3) × <i>E. pendulinus</i> SAD-0842 (4)				
3	glabrous, unciliated	pilose	glabrous	glabrous
4	long-pilose, long-ciliated	glabrous	densely long- puberulent	puberulent
<i>E. brachypodioides</i> BKA-0921 (5) × <i>E. pendulinus</i> SAD-0842 (6)				
5	glabrous, sparse bristles on sides, unciliated	pilose on upper parts	glabrous	glabrous
6	long-pilose, long-ciliated	glabrous	densely long- puberulent	puberulent
<i>E. brachypodioides</i> VLA-0719 (7) × <i>E. pendulinus</i> VOK-0738 (8)				
7	scabrous nerves, short bristles on sides, sparsely ciliated	pilose	glabrous	puberulent, ciliated
8	sparse long-pilose, long-ciliated	glabrous	puberulent	glabrous
<i>E. pendulinus</i> AUS-1015 (9) × <i>E. brachypodioides</i> VBG-0722 (10)				
9	long-pilose, long-ciliated	glabrous	glabrous	glabrous
10	glabrous, sparse bristles on sides, unciliated	pilose	sparse puberulent	glabrous
<i>E. vernicosus</i> CHE-1044 (11) × <i>E. pendulinus</i> AUS-1015 (12)				
11	glabrous, unciliated	glabrous	glabrous	glabrous
12	long-pilose, long-ciliated	glabrous	glabrous	glabrous

учитывалось наивысшее значение СФ. Репродуктивную совместимость генотипов (Cs) с подразделением на α1- и α2-уровни определяли согласно (Агафонов, 1997; Агафонов, Salomon, 2002) с позиций принципа рекомбинационных и интрогрессивных генпулов. Оценку наследования морфологических признаков проводили на выборках растений гибридов F₂, выращенных на открытом участке ЦСБС. Соответствие расщепления гибридов по фенотипу моно- и дигенному контролю признаков проверяли по критерию χ² (хи-квадрат) (Лобашев, 1967).

Результаты и обсуждение

Молекулярно-генетический анализ

Для выявления признаков специфичности и генетического полиморфизма у *E. pendulinus*, *E. brachypodioides*, *E. vernicosus* нами использовался анализ изменчивости межмикросателлитных последовательностей ДНК (ISSR). При сравнении ISSR-профилей, полученных с помощью шести эффективных праймеров (17899B, 814, 844A, M2, HB14, HB12), был выявлен высокий полиморфизм меж-

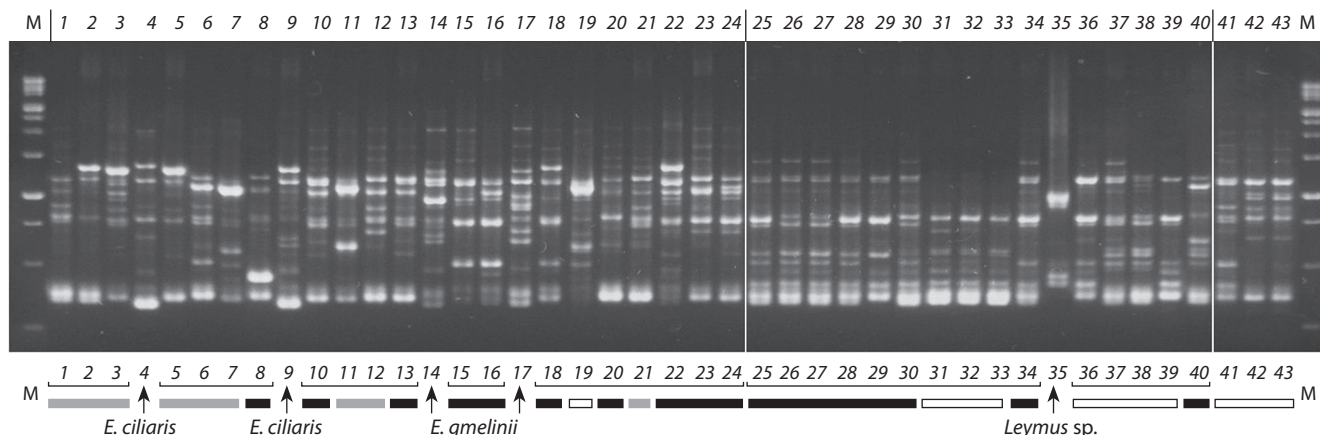


Fig. 1. ISSR variation in accessions of *E. pendulinus* (black), *E. brachypodioides* (grey), *E. vernicosus* (white) and the reference species *E. ciliaris* and *E. gmelinii* as analyzed with the M2 primer: 1-24 – Primorskiy kraj; 25-40 – Altai Republic; 41 – Republic of Buryatia; 42 – Zabaykalskiy kraj; 43 – China, Inner Mongolia.

1 – ZAR-0746; 2 – MES-0721; 3 – AND-1107; 4 – *E. ciliaris* VBG-0844; 5 – SLA-1103; 6 – RUS-0716; 7 – RUS-0732; 8 – SHA-0843; 9 – *E. ciliaris* MES-1111; 10 – VBG-1105; 11 – VBG-0722; 12 – VLA-0719; 13 – VSE-1018; 14 – *E. gmelinii* BKA-0962; 15 – VOK-0738; 16 – VOK-1015; 17 – *E. gmelinii* ALK-0678; 18 – SAD-0841; 19 – SAD-1002; 20 – SAD-1011; 21 – BKA-0921; 22 – GTS-1101; 23 – GTS-1102; 24 – USS-0720; 25 – CHE-1022; 26 – CHE-1023; 27 – CHE-1024; 28 – CHE-1025; 29 – CHE-1027; 30 – CHE-1028; 31 – CHE-1031; 32 – CHE-1032; 33 – CHE-1034; 34 – CHE-1040; 35 – *Leymus* sp.; 36 – CHE-1043; 37 – CHE-1044; 38 – CHE-1066; 39 – AUS-1002; 40 – AUS-1015; 41 – BBI-1114; 42 – CHI-0803; 43 – CIM-1133.

микросателлитных последовательностей ДНК у исследованных видов. Все 322 амплифицируемых фрагмента с длинами, варьирующими в диапазоне от 250 до 2000 пар нуклеотидов, были полиморфны. Наибольшее число ISSR-фрагментов (72) получено при использовании праймера M2 – (AC)₈YG, а наименьшее (40) – при использовании праймера HB14 – (CTC)₃GC. С помощью праймера M2 были выявлены наибольшие различия между приморскими и алтайскими образцами, независимо от их формальной видовой принадлежности (рис. 1).

Консенсусная дендрограмма, построенная по результатам использования шести праймеров, подтвердила наши предположения о взаимоотношениях данных видов (рис. 2). В целом образцы распределились по географическому принципу. Единственным труднообъяснимым фактом является то, что от всех образцов значительно обособились три образца *E. vernicosus* алтайского происхождения. Наибольшее генетическое сходство обнаружено у образцов из смешанных популяций, где чаще произрастают близкородственные особи с одинаковыми морфологическими признаками. Вместе с тем попарно группировались образцы *E. pendulinus* и *E. vernicosus* из Горного Алтая. В Приморском крае значительное генетическое сходство обнаружено между образцами, относящимися к разным видам: *E. pendulinus* группируется с *E. brachypodioides* и *E. vernicosus*. Кроме того, общую кладу с образцами из Приморского края сформировали образцы *E. vernicosus* из Забайкальского края и Китая.

Спектры привлеченных видов *E. gmelinii* и *E. ciliaris* хорошо отличались от видов подсекции *Pendulini*. Образец рода *Leymus* Hochst., взятый в качестве реперного (outgroup) для укоренения дендрограммы, достоверно отделился от изучаемой группы видов (бутстреп-индекс равен 100).

В результате ISSR-анализа выявлена высокая дифференциация образцов из Приморского края, несколько

меньшие различия установлены среди горно-алтайских образцов (см. рис. 1 и 2). Вероятно, это связано с тем, что данные таксоны распространены в Приморском крае значительно шире и представлены в природных сообществах гораздо большим числом микропопуляций, чем в Горном Алтае.

Наряду с отмеченным полиморфизмом приморских и горно-алтайских выборок, выявлены признаки специфичности, вероятно, обусловленные географической изоляцией в течение многих поколений. При этом на дендрограмме (см. рис. 2) не выражено сколько-нибудь заметной корреляции между диагностическими признаками и генетическим расстоянием между образцами подсекции *Pendulini*. Такое распределение образцов, безусловно, свидетельствует о том, что виды *E. pendulinus*, *E. brachypodioides* и *E. vernicosus* являются близкородственными. Тем не менее данные по вариабельности любых молекулярных маркеров необходимо подтверждать прямыми гибридологическими опытами.

Гибридизация и оценка наследования диагностических признаков

С целью выяснения репродуктивных отношений близкородственных таксонов нами создана серия гибридов между особями видов *E. pendulinus*, *E. brachypodioides* и *E. vernicosus*. Ранее было неоднократно показано, что природные растения самоопыляющихся видов рода *Elymus* гомозиготны по многим генам, даже если растут в составе гетерогенных популяций. Можно было бы ожидать, что хазмогамный тип цветения, характерный для большинства видов *Elymus*, должен приводить к перекрестному опылению с высокой частотой. Однако в норме самоопыление обеспечивается рядом факторов (Агафонов, 2007): 1) достаточным количеством собственной пыльцы, которая созревает в цветке одновременно с женскими гаметофитами; 2) отсутствием генетических систем само-

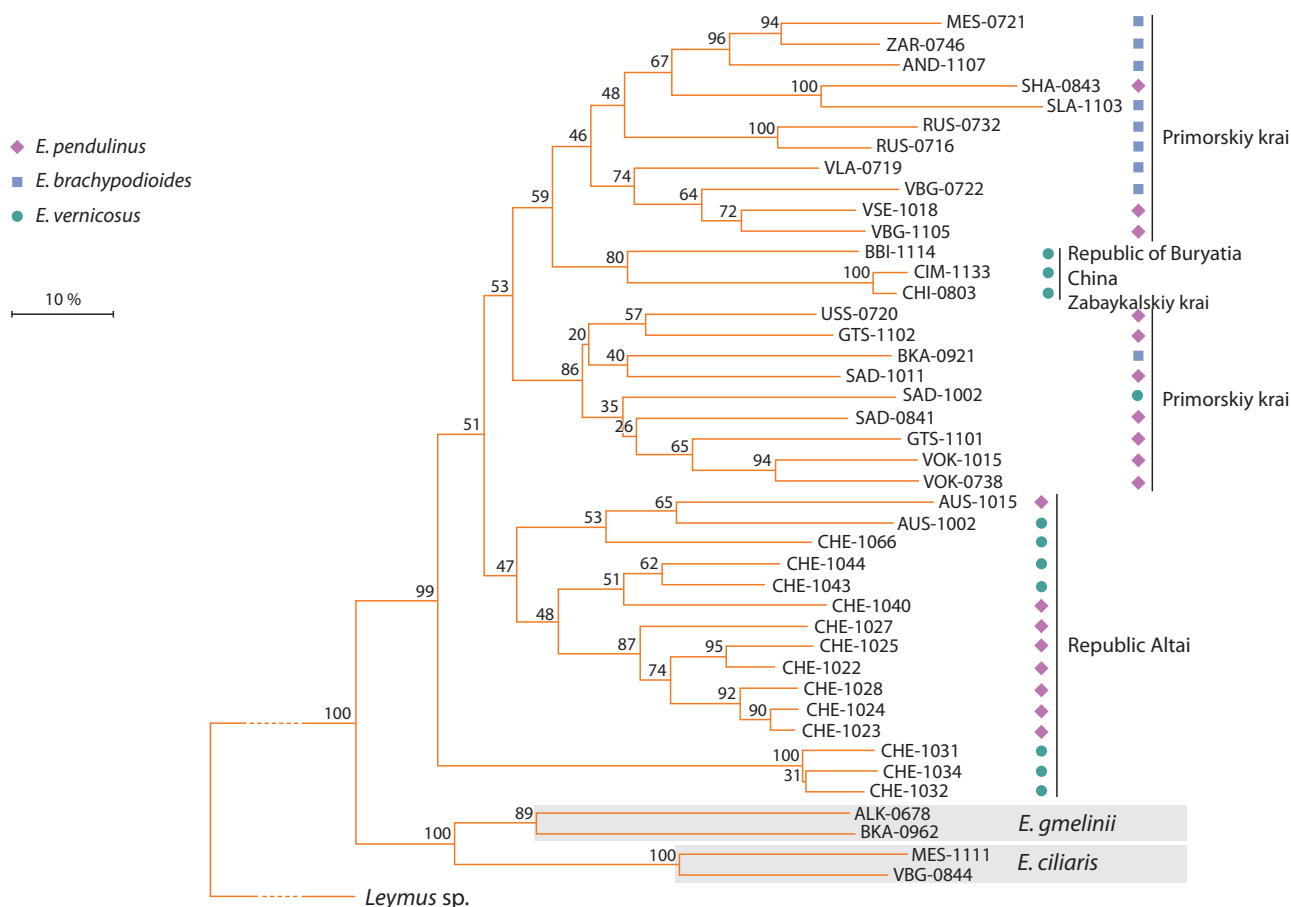


Fig. 2. The consensus NJ dendrogram built with six ISSR markers with bootstrap support values.

несовместимости, функционирующих на презиготических стадиях образования зародышей; 3) аллотетраплоидной природой генома, обеспечивающей при самоопылении необходимый уровень гетерозиготности по большому числу жизненно важных генетических систем.

Поэтому уровень гетерозиготности растений в популяциях довольно низок, а число межвидовых гибридов даже в смешанных местообитаниях относительно невелико. По данным электрофоретического анализа белков эндосперма уровень гетерозиготности составляет от 0 до 2 % (Kostina et al., 1998; Агафонов, Баум, 2000; Агафонов и др., 2008).

Небольшие выборки родительских растений, выращенные для гибридизации (3–5 особей), также не показали расщепления по маркерным признакам. Взятые в гибридизацию родители различались в парах по разным наборам признаков. При этом нами учитывались все наблюдаемые признаки, как диагностические, так и потенциально значимые в таксономии рода. Большее количество данных по различным морфологическим признакам позволяет более детально рассматривать сходство и различия изучаемых видов.

Результаты межвидовой гибридизации в шести комбинациях скрещивания показали высокую репродуктивную совместимость этих видов. Все гибридные растения F₁ обладали нормально развитыми пыльниками (рис. 3) и

относительно высокими значениями семенной фертильности (табл. 4). Репродуктивная совместимость (Cs) большинства биотипов с разной видовой принадлежностью соответствует уровню α1 и свидетельствует о свободной рекомбинации генетического материала. Условной границей между α1- и α2-уровнями совместимости было принято значение СФ = 40 % (Агафонов, 1997).

В комбинации скрещивания биотипов из отдаленных популяций Приморья и Горного Алтая (*E. pendulinus* AUS-1015 × *E. brachypodioides* VBG-0722) обнаружены более низкие значения СФ, так же как в комбинации биотипов из Приморского края (*E. brachypodioides* ВКА-0921 × *E. pendulinus* SAD-0842). Совместимость родительских биотипов в данных скрещиваниях соответствует уровню α2 (ограниченная рекомбинация генетического материала).

Анализ расщепления альтернативных признаков гибридов в шести комбинациях скрещивания показал, что моногенно наследуются следующие признаки (табл. 5): наличие ресничек НЦЧ, опушение наружной поверхности влагалищ нижних листьев (НПВНЛ), опушение УС, опушение верхней стороны ЛП перед колосом (флаговый лист). Признак опушения НЦЧ у разных гибридов наследуется то по моногенному, то по диаллельному типу. Это объясняется тем, что родительские пары могут различаться как по одному аллелю в гомозиготном состоянии, так и по

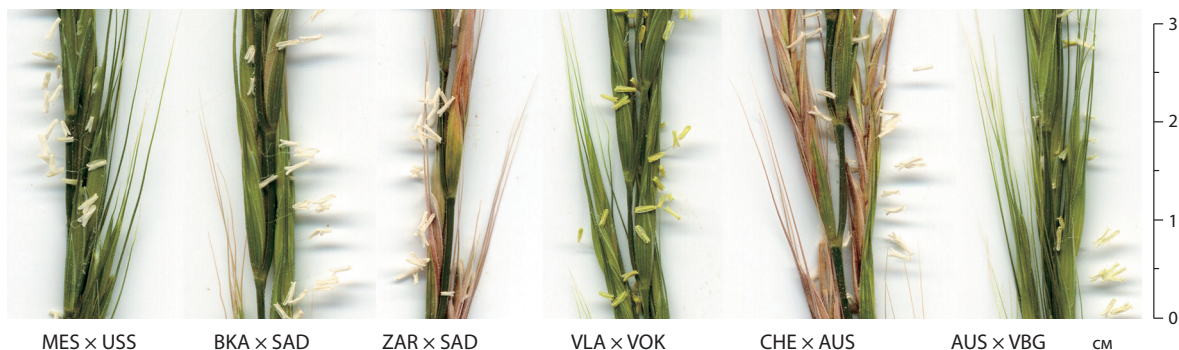


Fig. 3. Spike fragments of the F1 hybrids with opened anthers.

Table 4. Highest values of seed fertility (SF) in hybrids and levels of sexual compatibility (Cs) between biotypes *E. pendulinus*, *E. brachypodioides*, and *E. vernicosus* in F₁ and F₂ generations

No	Cross combination	Highest seed fertility (SF) values in hybrid generations, %				Cs level
		F ₁	N _{F₁} [*]	F ₂	N _{F₂} [*]	
1	MES-0721 brach × USS-0720 pend	78.8	3	92.4	80	α1
2	VLA-0719 brach × VOK-0738 pend	75.9	1	84.2	72	α1
3	ZAR-0746 brach × SAD-0842 pend	43.0	1	75.0	43	α1
4	BKA-0921 brach × SAD-0842 pend	18/5 ^{**}	2	73.6	14	α2
5	AUS-1015 pend × VBG-0722 brach	98/18 ^{**}	2	72.2	21	α2
6	CHE-1044 verni × AUS-1015 pend	89.0	2	89.8	78	α1

* N_{F₁} and N_{F₂} – number of plants studied in F₁ and F₂ respectively.

** N/M, number of grains (N) gathered from M spikes.

двум, согласно схемам AAbb × aabb или AABB × aabb. Поскольку одни и те же признаки выражались у родительских особей в разной степени, их распределение в F₂ также различалось. Рассмотрим подробнее результаты расщепления признаков каждой комбинации скрещивания.

В поколении F₂ у гибридов комбинации (1) *E. brachypodioides* MES-0721 × *E. pendulinus* USS-0720 обнаружено расщепление по наличию трихом на НЦЧ (см. табл. 5). По анализируемому признаку растения можно разделить на два класса: шиповатые и щетинистые по бокам НЦЧ (61) и голые, единичные щетинки по жилкам НЦЧ (19), что соответствует гипотезе расщепления 3 : 1. Значение χ^2 для признака наличия трихом на НЦЧ равно 0.066 при одной степени свободы. Расхождения между теоретическими и экспериментальными значениями допустимы, поскольку они меньше значения χ^2 для одной степени свободы и 5%-го уровня значимости (теоретическое равно 3.84). Следовательно, данные эксперимента согласуются с гипотезой моногибридного скрещивания и различия между ожидаемыми и наблюдаемыми значениями объясняются случайными причинами. При выяснении наиболее точного уровня значимости или возможной вероятности мы использовали способ математического выражения, где значения пределов вероятностей указывают на соответствие полученных и ожидаемых частот (Лобашов, 1967). Величина критерия χ^2 , равная 0.066, означает, что полученные отклонения случайны (соответствие полученных и ожидаемых частот примерно в одном случае из

двух), и указывает на совпадение фактических данных с теоретически ожидаемыми.

В результате проведенной гибридизации в комбинации (2) *E. brachypodioides* VLA-0719 × *E. pendulinus* VOK-0738 из окрестностей г. Владивостока было получено расщепление ряда качественных признаков у гибридных растений в F₂. Согласно ключам определителя сводки Н.С. Пробатовой (1985), образец VOK-0738 морфологически был похож на *E. kurilensis* Probat., формально отличаясь от него лишь местонахождением. Позднее *E. kurilensis* был обозначен как синоним *E. pendulinus* (Цвелёв, Пробатова, 2010). При анализе растений второго поколения межвидового гибрида VLA-0719 × VOK-0738 нами рассматривались следующие признаки: опушение влагалищ нижних листьев и наличие ресничек по краю влагалища листа; опушение УС; опушение верхней стороны ЛП перед колосом (флаговый лист). Анализируемая выборка первоначально состояла из 95 растений, затем часть растений погибла. Признаки опушения влагалищ и наличия ресничек по краю влагалища листа наиболее хорошо идентифицировались в прегенеративный период на живых растениях, тогда как расщепление остальных признаков было зафиксировано на генеративных побегах у 72 и 69 растений. Этим объясняется разница в числе анализируемых особей F₂.

Множественные варианты распределения признаков опушения поверхности влагалища листа и наличия ресничек по краю влагалища позволили сделать вывод об их

Table 5. Segregation of phenotypes in F₂ populations of interspecific hybrids and χ^2 values

Characters	Total number of individuals	Phenotypes	Number of individuals		χ^2
			expected	observed	
Monogenic inheritance of characters					
1. <i>E. brachypodioides</i> MES-0721 × <i>E. pendulinus</i> USS-0720					
Pubescence of lemmas	80	glabrous, sparse bristles on nerves	20	19	0.066
		scabrous, bristles on lemma sides	60	61	
2. <i>E. brachypodioides</i> VLA-0719 × <i>E. pendulinus</i> VOK-0738					
Pubescence of lemmas	95	glabrous	71.25	67	1.014
		puberulent	23.75	28	
Pubescence of culm nodes	72	glabrous	18	17	0.074
		pilose	54	55	
Pubescence on the abaxial surfaces of upper leaves	69	glabrous	17.25	19	0.236
		puberulent	51.75	50	
Cilia on lemmas	69	unciliated	17.25	15	0.391
		ciliated	51.75	54	
3. <i>E. brachypodioides</i> ZAR-0746 × <i>E. pendulinus</i> SAD-0842					
Pubescence of lemmas	40	glabrous	10	5	3.333
		pilose	30	35	
Cilia on lemmas	40	unciliated	10	5	3.333
		ciliated	30	35	
Pubescence of culm nodes	40	glabrous	10	10	0
		pilose	30	30	
4. <i>E. brachypodioides</i> BKA-0921 × <i>E. pendulinus</i> SAD-0842					
Pubescence of lemmas	13	glabrous	3.25	4	0.23
		pilose	9.75	9	
Cilia on lemmas	13	unciliated	3.25	3	0.025
		ciliated	9.75	10	
Pubescence of culm nodes	13	glabrous	3.25	3	0.025
		pilose	9.75	10	
5. <i>E. pendulinus</i> AUS-1015 × <i>E. brachypodioides</i> VBG-0722					
Pubescence of lemmas	21	scabrous	5.25	8	1.92
		long-pilose	15.75	13	
Pubescence of culm nodes	21	glabrous	5.25	3	1.285
		pilose	15.75	18	
Pubescence on the abaxial surface of upper leaves	21	sparse puberulent	5.25	2	2.682
		glabrous	15.75	19	
Digenic inheritance of characters (15:1)					
2. <i>E. brachypodioides</i> VLA-0719 × <i>E. pendulinus</i> VOK-0738					
Pubescence of lemmas	69	glabrous	4.3125	6	0.704
		pilose	64.6875	63	
6. <i>E. vernicosus</i> CHE-1044 × <i>E. pendulinus</i> AUS-1015					
Pubescence of lemmas	63	sparse scabrous	3.9375	4	0.975
		pilose	59.0625	59	

независимом наследовании и подтвердили необходимость рассматривать эти признаки отдельно друг от друга. Если рассмотреть расщепление гибридов F_2 по признакам опушения поверхности влагалища листа без учета ресничек (см. табл. 5), то проявлялось моногенное наследование, что было подтверждено статистически.

Признак «опушение узлов стебля» проанализирован на генеративных побегах 72 особей. Отмечены растения с разным проявлением признака: голые гладкие УС, коротковолосистые слабоопушенные, длинно-густоопушенные УС, которые составили два фенотипических класса – голые УС и опушенные (см. табл. 5), поскольку идентификация промежуточных форм оказалась весьма затруднительной из-за различной степени выраженности признака. Распределение признаков в фенотипические классы согласуется с нулевой гипотезой о моногенном наследовании признака, о достоверности которой свидетельствует критерий χ^2 .

Признак опушения верхней поверхности ЛП перед колосом характеризовался различной степенью фенотипического проявления: от голых, шероховатых до длинно-густоволосистых ЛП. Особенность ЛП *E. pendulinus* s. l. в том, что она не бывает абсолютно голой и гладкой. На обеих сторонах листа в большей или меньшей степени проявляются мельчайшие шипики, расположенные в основном по жилкам, возможность визуализации которых открывается только при более чем 50-кратном увеличении. Таким образом, при отсутствии опушения на верхней части ЛП мы использовали термин «голые, шероховатые». Нижняя часть ЛП при характеристике признака опушения ЛП не учитывалась, поскольку для всех образцов растений характерна голая, шероховатая поверхность нижней стороны ЛП. По классам выборка распределилась на волосистые и голые фенотипы в численном соотношении 50:19, что соответствует расщеплению 3:1 (см. табл. 5). Варибельность ресничек НЦЧ невысокая по длине и плотности их расположения, поэтому фенотипические классы определялись по наличию или отсутствию ресничек по краям НЦЧ: реснитчатые и безреснитчатые НЦЧ. Значение критерия χ^2 свидетельствует о достоверности гипотезы моногенного контроля признака.

При анализе расщепления гибридов F_2 по признаку «опушение НЦЧ» мы столкнулись с множеством различающихся фенотипов. Все проявления признака можно распределить по типу трихом на четыре фенотипических класса (голые гладкие НЦЧ, шиповатые, щетинистые, длинноволосистые НЦЧ) и предположить дигенный контроль признака. При этом модель расщепления по фенотипу больше соответствует полимерному взаимодействию генов и проявляется в теоретическом соотношении 15:1, как волосистые и голые. Гипотеза дигенного наследования признака в данной комбинации скрещивания подтвердилась.

Таким образом, в трех вариантах скрещиваний растений из Приморского края выявлено расщепление по признаку «выраженность трихом на НЦЧ» в соответствии с моногенным наследованием, а в одном (2) *E. brachypodioides* VLA-0719 × *E. pendulinus* VOK-0738 – по дигенному типу.

Успешно была проведена межвидовая гибридизация образцов алтайского и приморского происхождения (5):

E. pendulinus AUS-1015 × *E. brachypodioides* VBG-0722. Расщепление потомков в F_2 фиксировали по трем признакам (два из которых являются диагностическими): «опушение НЦЧ», «опушение УС» и «опушение ЛП перед колосом». В данной выборке у всех растений присутствовали реснички на НЦЧ. Фертильность растений F_1 была относительно низкой (не выше 10 %). Следовательно, при образовании поколения F_2 прошел более жесткий отбор гамет и зигот, и расщепление признаков нельзя оценивать как свободное. Так, соотношение 19:2 в F_2 между особями с голыми и волосистыми ЛП при столь малой выборке не означает доминирования признака «голые ЛП».

У межвидовых гибридов F_2 между растениями из популяций Горного Алтая (6) *E. vernicosus* СНЕ-1044 × *E. pendulinus* AUS-1015 обнаружено расщепление по признаку «опушение НЦЧ» на четыре фенотипических класса: редкошиповатые, щетинистые, коротковолосистые и длинноволосистые НЦЧ. Поскольку изменчивость этого признака довольно велика, то граница между опушением, щетинками и короткими волосками в известной степени условна. Здесь также можно предположить полимерное взаимодействие генов, принимая теоретическое соотношение 15:1 между волосистыми в разной степени и редкошиповатыми НЦЧ. Значение критерия χ^2 свидетельствует о достоверности гипотезы дигенного контроля признака (см. табл. 5). Данное расщепление можно объяснить тем, что при наследовании признака «опушение НЦЧ» в ряде случаев имеет место полимерное взаимодействие неаллельных множественных генов. При этом признак проявляется при наличии хотя бы одного из доминантных аллелей полимерных генов. Наследование происходит по дигенному типу и проявляется как соотношение фенотипов 15:1.

Таким образом, по результатам проведенной гибридизации выявлены закономерности, необходимые для понимания структуры и микроэволюционных взаимоотношений среди группы таксономических видов рода *Elymus*. Достаточно высокие значения семенной фертильности гибридов во всех комбинациях свидетельствуют об отсутствии генетической изоляции между биотипами, формально относящимися к разным видам. Примечательно, что у гибрида в комбинации (2) VLA-0719 × VOK-0738, образованного родительскими биотипами из наиболее отдаленных ветвей NJ-дендрограммы (см. рис. 2), величина СФ близка к нормальной. Анализ расщепления потомств гибридных растений на рекомбинантные фенотипы с разной экспрессией признаков свидетельствует о наличии в генофонде трех таксонов не только множественного аллелизма генов, но и определенного множества генных локусов, ответственных за диагностические признаки.

Заключение

Для самоопыляющихся видов рода *Elymus* при сравнении биологической информативности гибридологического и ISSR-критериев нам видится несравненно более важным репродуктивный критерий. Причина в том, что при полном отсутствии апоцитоза точнейший механизм мейотических делений визуализирует уровни гомологии между геномами родительских биотипов, как показано в многочисленных работах по цитогенетике гибридов рода (Dewey, 1984; Lu, von Bothmer, 1993; Lu et al., 1995; и др.).

Любые нарушения в процессе мейотических делений, вызванные ошибками в конъюгации гомологов, неизбежно проявляются в уменьшении пыльцевой и семенной фертильности гибридов. И наоборот, высокие значения СФ свидетельствуют о полной гомологии геномов, а значит, о близком родстве родительских биотипов.

По результатам исследования сделан вывод, что на территории России генотипы видов *E. pendulinus*, *E. brachypodioides* и *E. vernicosus* представляют собой единый рекомбинационный генпул. Характер наследования диагностических признаков подтверждает целесообразность перевода названных видов в ранг разновидностей *E. pendulinus* s. l. Ключ для их определения опубликован в специализированном ботаническом издании (Кобозева, Агафонов, 2015).

Acknowledgments

The authors are grateful to Cand. Sci. (Biol.) D.E. Nikonova (Gerus) and the staff of the Gorny Altay Botanical Garden (Kamlak Village, Altay Republic) for assistance in field studies. This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, projects 11-04-00861 and 16-34-00505.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Agafonov A.V., Salomon B. Genepools among SH genome *Elymus* species in boreal Eurasia. *Triticeae* IV. Eds. P. Hernández et al. *Consejería de Agricultura y Pesca*. Spain, Sevilla, 2002;37-41.
- Agafonov A.V. The principle of recombinational (RGP) and introgressive (IGP) gene pools in the taxonomy of the genus *Elymus* L. *Sibirskiy Ekologicheskij Zhurnal*=Siberian Ecological Journal. 1997;4(1):81-89. (in Russian)
- Agafonov A.V. Intraspecific structure and reproductive relationships between *Elymus mutabilis* and *E. transbaicalensis* (Poaceae) in Southern Siberia from the viewpoint of taxonomical genetics. *Genetika*=Genetics. 2004;40(11):1229-1238. (in Russian)
- Agafonov A.V. Differentiation of the genus *Elymus* L. (Triticeae: Poaceae) in the Asiatic part of Russia in the view of taxonomical genetics. *Sibirskij botanicheskiy vestnik: elektronnyy zhurnal* = Siberian Botanical Bulletin: online journal. 2007;2(1):5-15. Available at: <http://www.csbg.nsc.ru/uploads/journal.csbg.ru/pdfs/i2.pdf>. (in Russian)
- Agafonov A.V., Baum B.R. Individual variation and reproductive properties of sexual hybrids in the complex of *Elymus trachycaulus* (Poaceae: Triticeae) and closely related taxa. 1. Polymorphism of storage endosperm proteins in biotypes from Northern America and Eurasia. *Turczaninowia*. 2000;3(1):63-75. (in Russian)
- Agafonov A.V., Gerus D.E., Dorogina O.V. Self-pollination in species of the genus *Elymus* (Triticeae: Poaceae) and its reflection in polypeptide patterns of endosperm proteins. *Sibirskij botanicheskiy vestnik: elektronnyy zhurnal*=Siberian Botanical Bulletin: online journal. 2008;3(1-2):21-26. Available at: <http://www.csbg.nsc.ru/uploads/journal.csbg.ru/pdfs/i4.pdf>. (in Russian)
- Agafonov A.V., Salomon B. Genepools among SH genome *Elymus* species in boreal Eurasia. *Triticeae* IV. Eds. P. Hernández et al. *Consejería de Agricultura y Pesca*. Spain, Sevilla, 2002;37-41.
- Dewey D.R. The genomic system of classification as a guide to intergeneric hybridization with the perennial *Triticeae*. *Gene Manipulation in Plant Improvement*. Ed. J.P. Gustafson. N.Y.: Plenum Publ. Corp., 1984;209-279.
- Kobozeva E.V., Agafonov A.V. Revision of the subsection *Pendulini* (Nevski) Tzvelev of the genus *Elymus* L. (Poaceae). Systematic notes on the materials of P.N. Krylov Herbarium of Tomsk State University. 2015;112:22-31. (in Russian)
- Kobozeva E.V., Olonova M.V., Asbaganov S.V., Agafonov A.V. Polymorphism and specificity of StY-genome species *Elymus gmelinii* and *E. pendulinus* (Triticeae, Poaceae) in the territory of Asian part of Russia. *Rastitel'nyy mir Aziatskoj Rossii* = Plant Life of Asian Russia. 2015;2(18):45-55. (in Russian)
- Kobozeva E.V., Ovchinnikova S.V., Agafonov A.V. Variation and taxonomic relationships between StY-genome species *Elymus pendulinus*, *E. brachypodioides* and *E. vernicosus* (Triticeae: Poaceae). *Rastitel'nyy mir Aziatskoj Rossii* = Plant Life of Asian Russia. 2012;2(10):87-93. (in Russian)
- Kostina E.V., Agafonov A.V., Salomon B. Electrophoretic properties and variability of endosperm proteins of *Elymus caninus* (L.) L. *Triticeae* III. Ed. A.A. Jaradat. Enfield, New Hampshire: Sci. Publ., 1998;265-272.
- Lobashev M.E. *Genetika* [Genetics]. Leningrad, Leningrad State University Publ., 1967. (in Russian)
- Lu B.-R., von Bothmer R. Intergeneric hybridization between *Hordeum* and Asiatic *Elymus*. *Hereditas*. 1990;112:109-116.
- Lu B.-R., von Bothmer R. Meiotic analysis of *Elymus caucasicus*, *E. longearistatus*, and their interspecific hybrids with twenty-three *Elymus* species: *Triticeae* (Poaceae). *Plant Syst. Evol.* 1993;185(1):35-53.
- Lu B.-R., Salomon B., von Bothmer R. Interspecific hybridization with *Elymus confusus* and *E. dolichaterus*, and their genomic relationships (Poaceae: Triticeae). *Plant Syst. Evol.* 1995;197(1):1-17.
- Mirkin B.M., Rozenberg G.S. *Fitotsenologiya. Printsipy i metody* [Phytocenology: Fundamentals and Methods]. Moscow, Nauka, 1978. (in Russian)
- Nei M. *Molecular evolutionary genetics*. N.Y.: Columbia Univ. Press, 1987.
- Nei M., Li W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979;76(10):5269-5273.
- Probatova N.S. *Myatlikovy, ili Zlaki – Poaceae Barnh.* (Gramineae Juss.) Poaceae – Poaceae Barnh. *Sosudistye rasteniya sovetskogo Dal'nego Vostoka* [Vascular plants of the Soviet Far East]. Leningrad, 1985;1:89-382. (in Russian)
- Rabotnov T.A. Mosaic meadow phytocenoses. *Biull. MOIP. otd. biol.* = Bulletin of the Moscow Society of Naturalists. Biological Series, 1. 1972;77(4):104-117. (in Russian)
- Takhtajan A.L. *Biosystematics: the past, present and future*. *Botanicheskiy Zhurnal* = Botanical Journal (St. Petersburg). 1970;55(3):331-345. (in Russian)
- Tzvelev N.N. On the genus *Elymus* (Poaceae) in Russia. *Botanicheskiy Zhurnal* = Botanical Journal (St. Petersburg). 2008;93(10):1587-1596. (in Russian)
- Tzvelev N.N., Probatova N.S. The genera *Elymus* L., *Elytrigia* Desv., *Agropyron* Gaertn., *Psathyrostachys* Nevski, and *Leymus* Hochst. (Poaceae: Triticeae) in the Russian flora [Komarovskie chteniya [V.L. Komarov Memorial Lectures (Vladivostok)]. 2010;57:5-102. (in Russian).
- van de Peer Y., de Wachter R. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Appl. Biosci.* 1994; 10:569-570.
- Zavadskij K.M. *Vid i vidoobrazovanie* [Species and speciation]. Leningrad, Nauka, 1968. (in Russian)