

EDN: XCDCZL

УДК 581.95 (571.1/.5)

## Microevolutionary Relationships Between the Siberian Species *Elymus margaritae*, *E. komarovii*, and *E. transbaicalensis* (Poaceae) Based on Sequencing of the Nuclear Gene *GBSS 1* (waxy) and Hybridization

Alexander V. Agafonov\*,  
Elena V. Shabanova (Kobozeva) and Sergey V. Asbaganov  
Central Siberian Botanical Garden SB RAS  
Novosibirsk, Russian Federation

Received 22.11.2023, received in revised form 06.09.2024, accepted 12.09.2024

**Abstract.** A comparative study of the sequence of the low-copy nuclear gene *waxy* (granule-bound starch synthase 1, *GBSS 1*) fragments was carried out in samples of closely related species *Elymus margaritae*, *E. komarovii*, and *E. transbaicalensis* from the Altai Mountains and the Eastern Sayan Mountains. An assessment of microevolutionary relationships between the species was carried out by constructing ML dendrograms based on gene fragments in two versions: a) separately for exons with introns from exons 9 to 14; b) only in introns between exons 9 and 14. The study showed that the variants of the **St** subgenomes in the *E. margaritae* AUK-0650 accession, the *E. komarovii* GAR-0501 accession, and three *E. transbaicalensis* accessions are located in a common branch (clade) and belong to the Asian ancestral line **St**<sub>1</sub> of the genus *Pseudoroegneria* along with the subgenomes in the *E. gmelinii* and *E. pendulinus* species. The only identified variant of the **St** subgenome in *E. margaritae* GUK-1709 is located in a clade that includes a group of species with **St**<sub>2</sub> subgenomes close to the North American lineage of *Ps. spicata*. The species studied in this research did not show any noticeable differences in differentiation of the **H** subgenome. The dynamics of seed fertility (SF) values in generations **F**<sub>1</sub>–**F**<sub>2</sub> was as follows: a) SF of hybrids of *E. margaritae* GUK-1709 and AUK-0650 biotypes corresponded to intraspecific relationships at the **α1** level, despite the distance between their *GBSS 1* clones; b) SF values in the *E. margaritae* GUK-1709 × *E. komarovii* GAR-0501 cross variant corresponded to sexual compatibility at the **α2** level; c) reproductive compatibility between *E. margaritae* GUK-1709 and two biotypes of *E. transbaicalensis* showed different results. In the GUK-1709 × AUL-1742 combination, the hybrids turned out to be completely sterile, while in the GUK-1709 × AUR-1713 combination, the

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

\* Corresponding author E-mail address: agalex@mail.ru

ORCID: 0000-0002-1403-5867 (Agafonov A.); 0000-0002-6566-9325 (Shabanova (Kobozeva) E.); 0000-0002-7482-7495 (Asbaganov S.)

results were consistent with intraspecific relationships. The basis for classifying biotype AUR-1713 as a short-awned morphotype of the species *Elymus margaritae* is discussed.

**Keywords:** speciation, hybridization, inheritance, taxonomy, *Elymus*, Poaceae.

**Acknowledgements.** This work was supported by the grant of the Russian Science Foundation No. 23–24–00260, <https://rscf.ru/project/23–24–00260/>. The materials of the bio-resource scientific collections of the CSBG SB RAS USU No. 440534 and USU No. 440537 (NS, NSK) were used. DNA sequencing was performed in Genomics Core Facility (ICBFM SB RAS, Novosibirsk).

Citation: Agafonov A. V., Shabanova (Kobozeva) E.V., Asbaganov S. V. Microevolutionary relationships between the Siberian species *Elymus margaritae*, *E. komarovii*, and *E. transbaicalensis* (Poaceae) based on sequencing of the nuclear gene *GBSS 1* (waxy) and hybridization. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2024, 17(3), 248–263. EDN: XCDCZL



## Микроэволюционные отношения между сибирскими видами *Elymus margaritae*, *E. komarovii* и *E. transbaicalensis* (Poaceae) по данным секвенирования ядерного гена *GBSS 1* (waxy) и гибридизации

А. В. Агафонов, Е. В. Шабанова (Кобозева), С. В. Асбаганов  
Центральный сибирский ботанический сад СО РАН  
Российская Федерация, Новосибирск

**Аннотация.** Проведено сравнительное изучение последовательности фрагмента малокопийного ядерного гена *waxy* (гранул-связанная синтаза крахмала 1, *GBSS 1*) у образцов близкородственных видов *Elymus margaritae*, *E. komarovii* и *E. transbaicalensis* из Горного Алтая и Восточного Саяна. Проведена оценка микроэволюционных взаимоотношений между видами путем построения МЛ дендрограмм на основе фрагментов гена (с 9 по 14 экзон) в двух вариантах: а) отдельно по экзонам с интронами; б) только по интронам между 9 и 14 экзонами. Показано, что варианты субгеномов **St** у образца *E. margaritae* AUK-0650, образца *E. komarovii* GAR-0501, а также трех образцов *E. transbaicalensis* расположены в общей ветви (кладе) и относятся к азиатской предковой линии **St**<sub>1</sub>, *Pseudoroegneria strigosa* вместе с субгеномами видов *E. gmelinii* и *E. pendulinus*. Единственный идентифицированный вариант субгенома **St** у *E. margaritae* GUK-1709 расположен в кладе, объединяющем группу видов с субгеномами **St**<sub>2</sub>, близких к североамериканской линии *Pseudoroegneria spicata*. По дифференциации субгенома **H** изучаемые виды заметных различий не проявили. Динамика значений семенной фертильности (СФ) в поколениях **F**<sub>1</sub>–**F**<sub>2</sub> показала следующие результаты: а) СФ гибридов между биотипами *E. margaritae* GUK-1709 и AUK-0650 соответствовала внутривидовым отношениям на уровне **α**<sub>1</sub>, несмотря на отдаленность между клонами *GBSS 1*; б) значения СФ в варианте скрещивания *E. margaritae* GUK-1709 × *E. komarovii* GAR-0501 соответствуют половой совместимости на **α**<sub>2</sub>-уровне; в) репродуктивная совместимость

между *E. margaritae* GUK-1709 и двумя биотипами *E. transbaicalensis* показала разные результаты. В комбинации GUK-1709 × AUL-1742 гибриды оказались полностью стерильными, в то время как в комбинации GUK-1709 × AUR-1713 получены результаты, соответствующие внутривидовым отношениям. Обсуждаются основания для отнесения биотипа AUR-1713 к короткоостому морфотипу вида *Elymus margaritae*.

**Ключевые слова:** видообразование, гибридизация, наследование, таксономия, *Elymus*, Poaceae.

**Благодарности.** Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 23–24–00260, <https://rscf.ru/project/23–24–00260/>. Использованы материалы биоресурсных научных коллекций ЦСБС СО РАН УНУ № 440534 и УНУ № 440537 (Гербарии NS, NSK). Секвенирование ДНК выполнено в ЦКП «Геномика» (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск).

---

Цитирование: Агафонов А. В. Микроэволюционные отношения между сибирскими видами *Elymus margaritae*, *E. komarovii* и *E. transbaicalensis* (Poaceae) по данным секвенирования ядерного гена *GBSS I* (waxy) и гибридизации / А. В. Агафонов, Е. В. Шабанова (Кобозева), С. В. Асбаганов // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2024. 17(3). С. 248–263. EDN: XCDCZL

---

## Введение

Вид *Elymus margaritae* A. V. Agaf., Kobozeva et B. Salomon был описан по сборам из Республики Алтай (голотип: Усть-Коксинский р-н, г. Красная; паратип: Кош-Агачский р-н, плато Укок), но первоначально эти образцы относили к *E. komarovii* (Nevski) Tzvelev (Агафонов и др., 2015). Перед описанием нового вида *E. margaritae* растения наблюдали при смене поколений в условиях открытого грунта и климокамеры. Был сделан вывод, что особи предполагаемого нового вида сохраняли природную морфологию, заметно отличную от типичных форм *E. komarovii*. От этого вида *E. margaritae* отличается компактными колосьями (до 10 см дл.), более широкими колосковыми чешуями (КЧ), переходящими в острие или ость до 9 мм длиной, более короткими остями нижних цветковых чешуй (НЦЧ) до 10 мм, а также узко закругленной верхушкой верхних цветковых чешуй (ВЦЧ), тогда как верхушки ВЦЧ у *E. komarovii* показывают широкую изменчивость – от заостренных до закругленных и выемчатых. Кроме того, колосья

*E. margaritae* в большей или меньшей степени уплощенные, что не характерно для колосьев *E. komarovii*, которые часто бывают односторонними, но не уплощенными. Данные о более коротких пыльниках у *E. margaritae* нельзя считать достоверными ввиду полиморфизма по этому признаку у широко распространенных в Сибири *E. komarovii* и *E. transbaicalensis* (Nevski) Tzvelev.

Последние два вида неоднократно включались нами в исследования (Агафонов, 2004; Агафонов и др., 2018), но что важно подчеркнуть в контексте данного изучения, так это их обширные ареалы в Северной Азии и множество морфологически отклоняющихся и промежуточных морфотипов, затрудняющих создание унифицированного определителя. Поэтому *E. transbaicalensis* также рассматривается нами в настоящей работе. В первом приближении наиболее заметным формальным признаком этого вида, отличительным от *E. komarovii*, следует назвать отсутствие остей НЦЧ (наличие острия до 3 мм). Фрагменты цветущих колосьев изучаемых видов и межвидовых гибридов приведены на рис. 1.

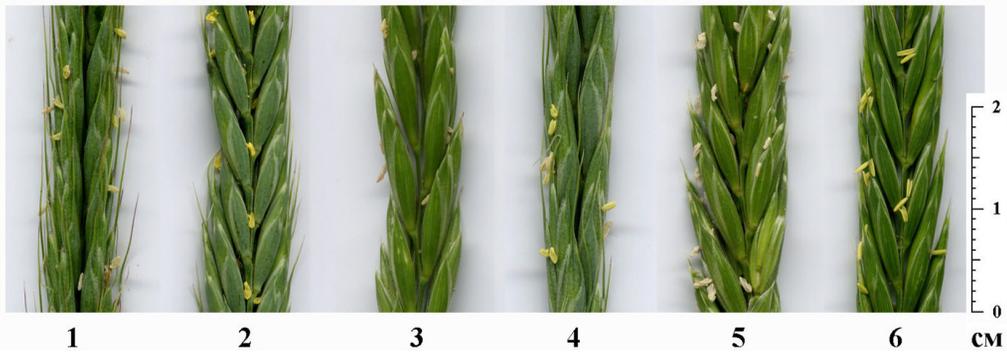


Рис. 1. Фрагменты цветущих колосьев видов и межвидовых гибридов: 1. *E. komarovii* GAR-0501; 2. *E. margaritae* GUK-1709; 3. *E. transbaicalensis* AUR-1713; 4. *E. margaritae* GUK-1709 × *E. komarovii* GAR-0501; 5. *E. margaritae* GUK-09 × *E. transbaicalensis* AUR-1713; 6. *E. margaritae* GUK-1709 × *E. transbaicalensis* AUL-1742

Fig. 1. Fragments of flowering spikes in species and interspecific hybrids: 1. *E. komarovii* GAR-0501; 2. *E. margaritae* GUK-1709; 3. *E. transbaicalensis* AUR-1713; 4. *E. margaritae* GUK-1709 × *E. komarovii* GAR-0501; 5. *E. margaritae* GUK-09 × *E. transbaicalensis* AUR-1713; 6. *E. margaritae* GUK-1709 × *E. transbaicalensis* AUL-1742

Форма зерновок *E. margaritae* и *E. komarovii* рассматривалась нами вместе с цветковыми чешуями согласно В. Н. Доброхотову и др. (2008). По этому признаку виды в целом различаются: у *E. margaritae* длина нижних в колоске цветков 8–11 мм, нижняя цветковая чешуя (НЦЧ) ланцетная, довольно резко заужающаяся к ости, тогда как у *E. komarovii* длина нижних цветков в колоске 10–13 мм, НЦЧ удлинненно-ланцетная плавно переходящая в ость, форма зерновки – ладьевидно-сдавленная. Соответственно, у *E. komarovii* зерновки более узкие и длиннее, чем у *E. margarita*. При рассмотрении семян *E. margaritae* образцов АУК-0650 в целом обнаружено сходство по морфологии цветковых чешуй и форме зерновок с некоторыми образцами *E. komarovii*, но отмечены существенные отличия от *E. komarovii* из того же местонахождения на плато Укок.

При изучении признака опушения листовых пластинок (ЛП) выявлено, что оба вида могут иметь как голые, так и волосистые ЛП по верхней стороне. Нижняя сторона ЛП у обоих видов голая, слегка шероховатая от мельчайших шипиков по всей поверхно-

сти. Характер опушения верхней стороны ЛП *E. margaritae* при наличии волосков подобен *E. komarovii*, отличаясь от него только частыми мелкими шипиками по всей поверхности между волосками. У *E. komarovii* опушение более разнообразно, и в некоторых популяциях нами был обнаружен жестко-шиповатый покров ЛП под волосками. Вероятно, этот микроморфологический признак необходимо изучить специально, в том числе в сравнении с *E. margaritae*. На данном этапе исследования признак опушения верхней поверхности ЛП не может являться диагностическим, поскольку отчетливых различий по этому признаку не выявлено.

Ранее были представлены результаты изучения последовательности малокопийного гена *waxy* (гранул-связанная синтаза крахмала 1, *GBSS 1*) у видов *Elymus*, произрастающих на территории Сибири и Дальнего Востока России, с целью установления их геномной конституции и для оценки филогенетической дифференциации (Agafonov et al., 2019). Эффективность данного молекулярного маркера для филогенетических исследований была неоднократно показана ранее (Mason-Gamer

et al., 1998; Mason-Gamer et al., 2010; Mason-Gamer, 2013).

В нашем исследовании в наборах из восьми секвенированных клонов у каждого из образцов *E. komarovii* GAR-0501 и *E. margaritae* GUK-1709 последовательности, принадлежащие субгеному **St**, выявлены не были. Поэтому были проведены дополнительные процедуры по выделению и секвенированию генов с целью выявления клонов **St**-субгеномов у этих ключевых образцов, поскольку образец GAR-0501 был собран в районе классического местообитания *E. komarovii* (Невский, 1934), а образец GUK-1709 – в точке сбора голотипа *E. margaritae* (Агафонов и др., 2015). При изучении нового вида актуальными остаются вопросы, связанные с происхождением, изменчивостью, генетической специфичностью и возможностью гибридизации *E. margaritae* с другими видами.

Цель данного исследования – изучить микроэволюционные взаимоотношения *E. margaritae* с морфологически близкими видами *E. komarovii* и *E. transbaicalensis* с использованием последовательностей гена *GBSS 1 (waxy)* в качестве генетического маркера, а также результатов межвидовой гибридизации.

### Материалы и методы

Происхождение образцов *E. margaritae*, *E. komarovii* и *E. transbaicalensis* и номера клонов, представленных в GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information; URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>), показаны в табл. 1. Места сборов реперных образцов видов *Elymus*, взятых в сравнительные исследования (*E. caninus* (L.) L., *E. confusus* (Roshev.) Tzvelev, *E. jacutensis* (Drob.)

Таблица 1. Клоны образцов *E. margaritae*, *E. komarovii* и *E. transbaicalensis*, включенные в сравнительное исследование последовательности гена *GBSS 1*

Table 1. Clones of *E. margaritae*, *E. komarovii* and *E. transbaicalensis* accessions included in the comparative study of the *GBSS 1* gene sequence

№ п/п	Вид, образец	Местонахождение, автор сбора	Клон (последовательность в генбанке NCBI)
1	<i>E. margaritae</i> , GUK-1709	Респ. Алтай, Усть-Коксинский р-н, гора Красная, комплекс курумов и высокогорных лугов, alt. 2028 м N 50°4.495' E 85°13.073' (Е.В. Кобозева)	marGUK09_1-H (MN 164818) marGUK09_4-St (MT263972)
2	<i>E. margaritae</i> , AUK-0650	Респ. Алтай, Кош-Агачский р-н, пл. Укок, 80 м сев. автотрассы, каменистый луг в долине ручья, alt. 2438 м N 49°30.418' E 88°05.012' (А.В. Агафонов, В. Salomon)	marAUK50_2-H (MN 164820) marAUK50_4-St (MN 164819)
3	<i>E. komarovii</i> , GAR-0501	Респ. Бурятия, Окинский р-н, автотрасса на пос. Орлик, галечникур. Гарган, alt. 1610 м N 52°05.947' E 100°23.005' (А.В. Агафонов, Д.Е. Герус)	komGAR 01_2-H (MN 136107) komGAR 01_3-St (MT263971)
4	<i>E. komarovii</i> , AUK-9803	Респ. Алтай, Кош-Агачский р-н, пл. Укок, р. Сарытас, 1 км выше места впадения в р. Жумалы, alt. 2120 м N 49°33.455' E 87°58.329' (А.В. Агафонов)	komAUK03_3-St (MN 164816) komAUK03_1-H (MN 164817)
5	<i>E. transbaicalensis</i> , GAR-0530	Респ. Бурятия, Окинский р-н, автотрасса на пос. Орлик, галечникур. Гарган, alt. 1610 м N 52°05.947' E 100°23.005' (А.В. Агафонов, Д.Е. Герус)	trnGAR 30_1-H (MN 164822) trnGAR 30_4-St (MN 164821)
6	<i>E. transbaicalensis</i> , AUR-1713	Респ. Алтай, Улаганский р-н, окр. пос. Акташ, южный макросклон Курайского хребта, дол.р. Ярлы-Амры, остепненный луговой склон, alt. 2125 м N 50°19.058' E 87°42.584' (Е.В. Кобозева)	—

Продолжение табл. 1

Table 1 Continued

№ п/п	Вид, образец	Местонахождение, автор сбора	Клон (последовательность в генбанке NCBI)
7	<i>E. transbaicalensis</i> , AUL-1742	Респ. Алтай, Улаганский р-н, бер. оз. Чейбеккель, alt. 2034 м N 50°23.117' E 087°36.957' (Е. В. Кобозева)	–

Tzvelev, *E. kamczadalarum* (Nevski) Tzvelev, *E. kronokensis* (Kom.) Tzvelev, *E. macrourus* (Turcz.) Tzvelev, *E. mutabilis* (Drob.) Tzvelev, *E. prokudinii* (Sered.) Tzvelev, *E. sibiricus* L., *E. uralensis* (Nevski) Tzvelev, *E. viridiglumis* (Nevski) Czer.), приведены в публикации А. В. Агафонова и др. (Agafonov et al., 2020). Клоны двух **StY**-геномных видов и диплоидных носителей **St**- и **H**-геномов (рода *Pseudoroegneria* и *Hordeum*), взятые в качестве реперных из генбанка NCBI, приведены в табл. 2.

Выделение ДНК, клонирование и секвенирование фрагментов *GBSS 1* с 9 по 14 экзон выполняли в соответствии с методическими рекомендациями (Mason-Gamer et al., 1998) и с нашими модификациями (Agafonov et al., 2019). Множественное выравнивание последовательностей проводили с помощью алгоритма «Т-Coffee» в программе Unipro UGENE v1.31.0 (Okonechnikov et al., 2012) и проверяли вручную. Выравненные последовательности исследуемого фрагмента *GBSS 1* использовали для расчета филогенетических деревьев отдельно

Таблица 2. Образцы видов и их клоны, взятые из NCBI

Table 2. Accessions of species and their clones taken from NCBI

Вид	Образец, происхождение	Клон в NCBI
<i>E. gmelinii</i> (Ledeb.) Tzvelev	PI 499447, China	St GQ847726 Y GQ847727
<i>E. pendulinus</i> (Nevski) Tzvelev	PI 499452, China	St GQ847731 Y GQ847732
<i>Pseudoroegneria strigosa</i> (M. Bieb.) Á. Löve	PI 499637, China	St EU 282323
<i>P. strigosa</i>	PI 531755, China	St AY 360823
<i>P. spicata</i> (Pursh) Á. Löve	PI 232117, USA	St AF079281
<i>P. spicata</i>	PI 610986, USA	St AY 010999
<i>P. libanotica</i> (Hack.) D. R. Dewey	PI 228391, Iran	St EU 282324
<i>P. tauri</i> (Boiss. & Balansa) Á. Löve	PI 380652, Iran	St EU 282326
<i>P. stipifolia</i> (Czern. ex Nevski) Á. Löve	PI 313960, Russia	St JX259496
<i>Hordeum jubatum</i> L.	RJMG 106, USA	H AY 010963
<i>H. bogdanii</i> Wilensky	PI 531760, China	H EU 282317
<i>H. brevisubulatum</i> (Trin.) Link	PI 401387, Iran	H AY 010961
<i>H. pusillum</i> Natt.	CIho 15654, USA	H EU 282321
<i>H. californicum</i> Covas & Stebbins	MA-138-1-4, USA	H AF079273
<i>Bromus tectorum</i> L.	–	AY 362757

по экзонам с интронами и только по интронам методом максимального правдоподобия (ML) (Felsenstein, 1981). Построение дендрограмм было проведено в программе MEGA ver. 11 (Kumar et al., 2018) с использованием двухпараметрической эволюционной модели K2P (Kimura, 1980). Клон *Bromus tectorum* L. применяли в качестве маркера outgroup.

В гибридизацию были взяты биотипы образцов, приведенных в табл. 1, кроме *E. transbaicalensis* GAR-0530. Все процедуры по созданию половых гибридов, оценке их семенной фертильности (СФ) в поколениях F<sub>1</sub>-F<sub>2</sub> и уровней половой совместимости биотипов (Сs) были выполнены, как описано ранее (Lu et al., 1990; Agafonov, Salomon, 2002).

## Результаты и обсуждение

### Филогенетические отношения на основе секвенирования малокопийного гена *GBSS I*

По результатам секвенирования установлены нуклеотидные последовательности ядерного гена *GBSS I* у образцов *E. margaritae*, *E. komarovii* из классических местообитаний и выборочных биотипов *E. transbaicalensis* из Горного Алтая и Восточного Саяна. Подтверждена ранее установленная нами **StH**-геномная конституция, проведена оценка микроэволюционных взаимоотношений между изучаемыми видами. Были построены две дендрограммы для фрагментов гена с 9-го по 14-й экзон на основе: а) последовательностей экзонов вместе с интронами; б) отдельно интронов как наиболее подвижных в микроэволюционном плане последовательностей. Дендрограмма, построенная по данным экзонов с интронами, показана на рис. 2.

Из дендрограммы следует, что варианты субгенома **St** у образцов *E. margaritae* AUK-0650, *E. komarovii* GAR-0501 и трех образцов *E. transbaicalensis* относятся к азиат-

ской предковой линии **St**<sub>1</sub> рода *Pseudoroegneria* в отличие от образца *E. margaritae* GUK-1709. В этом же кластере, маркируемом моногеномным носителем этого варианта *P. strigosa*, расположены клоны *E. kamczadalarum*, *E. jacutensis* и *E. macrourus*, а также клоны **StY**-геномных видов *E. gmelinii* и *E. pendulinus*. Образец *E. margaritae* GUK-1709 обладает вариантом субгенома, относящимся, вероятнее всего, к североамериканской ветви **St**<sub>2</sub>. Образец *E. komarovii* AUK-9803 из Горного Алтая также заметно отделился от азиатской группы клонов и занял промежуточное положение, но ближе к кластеру **St**<sub>2</sub>.

Таким образом, по уровням дифференциации субгенома **St** Горно-Алтайские образцы *E. margaritae* GUK-1709 и AUK-0650 значительно отдалены друг от друга, при этом последний близок к образцам *E. komarovii* и *E. transbaicalensis* из Восточного Саяна.

Ранее нами было показано, что образец *E. margaritae* AUK-0650 содержит оба варианта субгенома **St** (Agafonov et al., 2019). Этот факт свидетельствует о специфичной микроэволюции этого относительно редкого высокогорного вида, поскольку у других сибирских видов такое сочетание в одном генотипе разных по происхождению вариантов субгенома **St** обнаружено не было.

Субгеномы **Y** у реперных **StY**-геномных видов *E. gmelinii* и *E. pendulinus* образуют малую ветвь, которая расположена ближе к кластеру **St**<sub>1</sub> и **St**<sub>2</sub> субгеномов, чем клоны трех ближневосточных реперных видов *P. libanotica*, *P. tauri* и *P. stipifolia*. Именно поэтому мы обозначили эту группу как **St**<sub>0</sub> в отличие от азиатской и североамериканской эволюционных групп.

По уровням дифференциации субгенома **H** виды *E. margaritae*, *E. komarovii* и *E. transbaicalensis* заметных различий не проявили, но при этом подтвердили свою принад-

лежность к эволюционному варианту **H**<sub>1</sub> в отличие от реперных видов *E. kamczadolorum*, *E. mutabilis*, *E. jacutensis* и *E. macrourus*, относящихся к варианту **H**<sub>2</sub>. То есть все образцы

трех изучаемых видов составляют единую линиюку близкородственных клонов.

Три клона носителей генома **H**: *Hordeum bogdanii*, *H. brevisubulatum* и *H. pusillum* об-

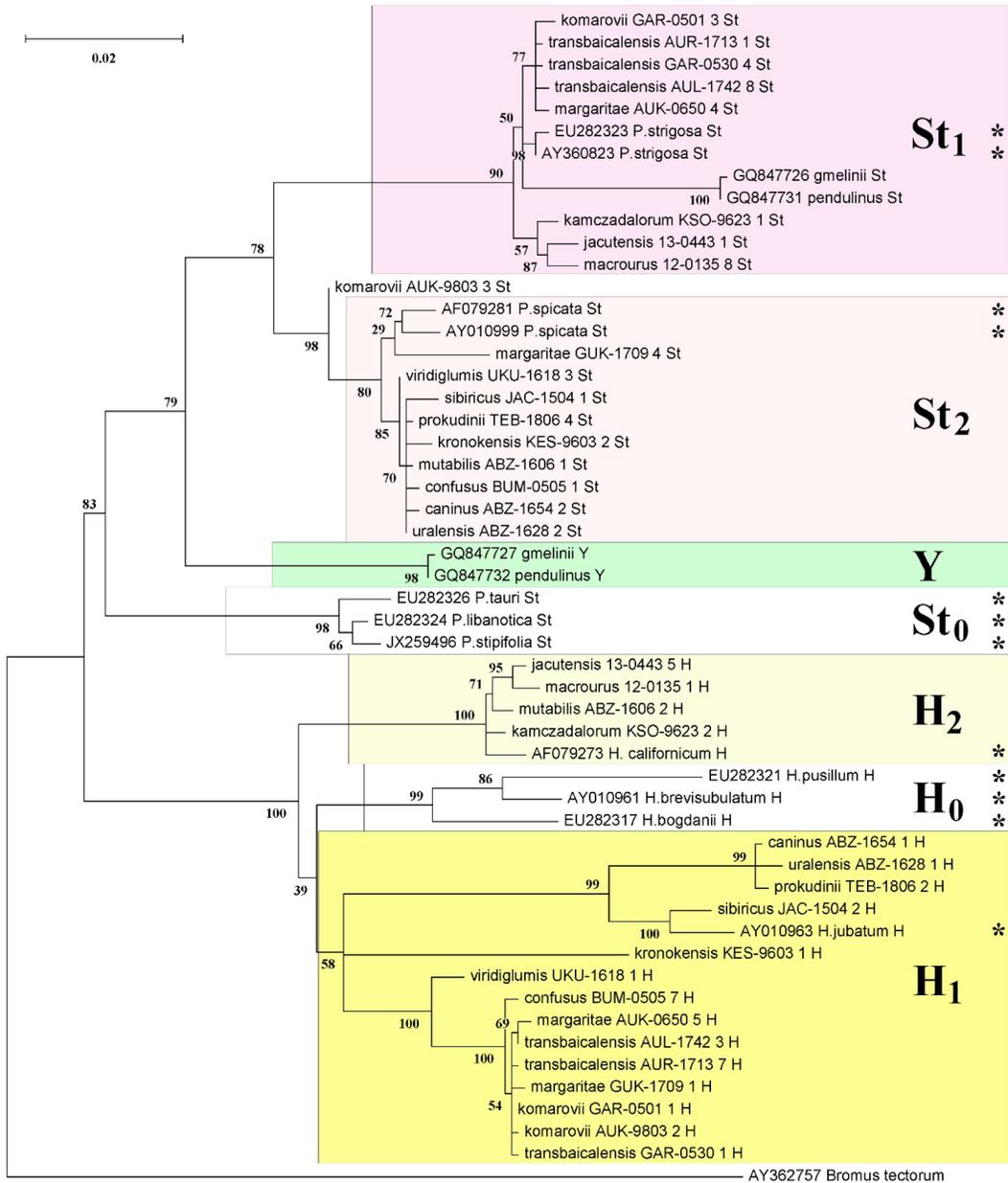


Рис. 2. Дендрограмма ML, построенная по результатам анализа последовательностей гена *GBSS 1* (экзоны 9–14 вместе с интронами) у видов, близких к *E. margaritae* в сравнении с реперными видами. Звездочками отмечены моногеномные носители **St** и **H** субгеномов

Fig. 2. Dendrogram ML constructed based on the results of the analysis of the *GBSS 1* gene sequences (exons 9–14 together with introns) in species close to *E. margaritae* compared with reference species. Asterisks mark monogenomic carriers of the **St** and **H** subgenomes

разовали отдельную ветвь между основными кластерами  $H_1$  и  $H_2$ , но ближе к азиатскому кластеру  $H_1$ . В нашей системе отсчета эти клоны с ближневосточным происхождением обозначены как  $H_0$ , поскольку преимущественно отделены от азиатской группы, хотя и с невысоким бутстрепом.

Биологическая функция интронов, как одной из составных частей нуклеотидных последовательностей ряда функциональных генов, представляется достаточно важной в отношении регуляции экспрессии генов (Koonin, 2006). При этом интроны не кодируют аминокислотные последовательности белков, поэтому предположительно могут сохранять дополнительный спектр мутаций, обретенных в ходе эволюции, по сравнению с более консервативными экзонами.

Нами была построена дендрограмма на основе последовательностей интронов между 9 и 14 экзонами (рис. 3), из которой вытекают следующие особенности взаимоотношений. Кластер субгенома  $St_1$  с маркерными клонами *P. strigosa*, клонами реперных видов *E. kamczadalarum* и *E. jacutensis*, а также  $StY$ -геномных видов *E. gmelinii* и *E. pendulinus* сохранил свой состав и расположение клонов внутри кластера. При этом несколько уменьшилось значение бутстрепа, отделяющего кластер  $St_1$  от  $St_2$ , с величины 78 до 50. Незначительно изменилось положение двух клонов *E. komarovii* AUK-9803 и *E. margaritae* GUK-1709, но по-прежнему в пределах кластера  $St_2$  и со значительным отделением по значениям бутстрепа (по сути, в достоверности отделения 99 и 97) от остальных клонов группы. Этот факт с трудом поддается интерпретации. Самое логичное объяснение – два клон близкородственных видов по данному маркеру проявляют родство с другими клонами близкородственных видов *E. margaritae* – *E. komarovii* – *E. transbaicalensis*.

В дендрограмме интронов сменила свое положение группа трех реперных видов – маркеров генома  $St_0$ . Если их первоначальное положение клонов (экзоны + интроны) было отчетливо промежуточным между  $Y$  и  $H$  субгеномами, в случае с интронами они заняли более близкое положение по отношению к  $H$  субгеномам. Это может указывать на древнее родство или даже общее происхождение предков ветви  $St_0$  с предками ветви *Hordeum*. Клоны, содержащие варианты субгенома  $H_1$ , так же как в варианте «экзоны+интроны», разделились на две ветви, при этом клон *E. kronokensis* KES-9603\_1 расположился не между ветвями, а ближе к малой ветви  $H_1$  с реперным клоном *H. jubatum*. Ветвь с тремя реперными видами  $H_0$  также сменила положение и оказалась ближе к ветви  $H_2$ .

В целом изменения в расположении ветвей и отдельных клонов, на наш взгляд, не являются принципиальными, так как не нарушают общую картину филогенетических отношений между видами рода *Elymus* (Agafonov et al., 2019). Для дальнейшего прояснения неоднозначных отношений между образцами изучаемых видов *E. margaritae*, *E. komarovii* и *E. transbaicalensis* был проведен гибридологический анализ, в основе которого лежит тончайший механизм мейоза у гибридов и последующая динамика семенной фертильности в условиях самоопыления.

*Репродуктивные отношения между выборочными биотипами E. margaritae, E. komarovii и E. transbaicalensis*

Ранее было проведено исследование репродуктивных взаимоотношений между *E. margaritae* AUK-0650 (прямой потомок паратипа вида) и выборочными образцами *E. komarovii* из Горного Алтая и Восточного

Саяна. Была создана серия гибридов в шести комбинациях скрещиваний и изучены их репродуктивные свойства в поколении  $F_1$  (Ко-

бозева, Агафонов, 2017). Анализ зрелых колосов растений в первой вегетации показал их полную стерильность, которая на стадии цве-

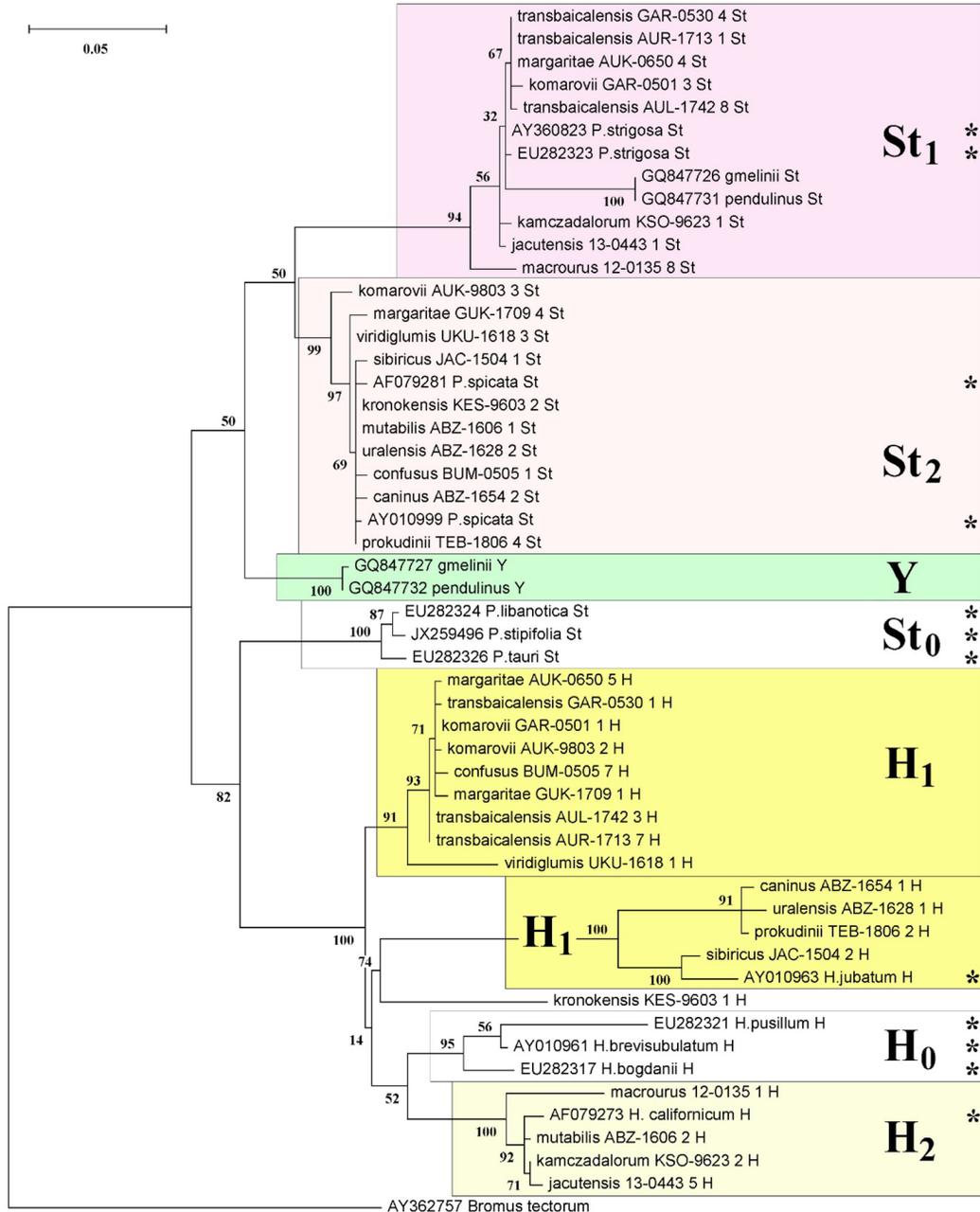


Рис. 3. Дендрограмма ML, построенная по результатам анализа последовательностей гена *GBSS I* (интроны между 9–14 экзонами) у видов, близких к *E. margaritae* в сравнении с реперными видами. Звездочками отмечены моногеномные носители **St** и **H** субгеномов

Fig. 3. Dendrogram ML constructed based on the results of the analysis of the *GBSS I* gene sequences (introns between exons 9–14) in species close to *E. margaritae* compared with reference species. Asterisks mark monogenic carriers of the **St** and **H** subgenomes

тения проявлялась в виде закрытых, не раскрывающихся пыльников.

С того времени остался ряд вопросов и возникли новые проблемы с позиций репродуктивной биологии и филогении. Первоначальное предположение о родстве *E. margaritae* с StY-геномными видами *E. fedtschenkoi* и *E. abolinii* (Агафонов и др., 2015) оказалось ошибочным. Более верной представилась гипотеза о филогенетической близости *E. margaritae* к St-геномным видам *E. komarovii* и *E. transbaicalensis*. Поэтому была создана новая серия гибридов с участием образца GUK-1709. Результирующие данные по значениям семенной фертильности (СФ) в поколениях F<sub>1</sub> и F<sub>2</sub> представлены в табл. 3.

Динамика значений СФ гибридов между биотипами двух образцов *E. margaritae* GUK-1709 × AUK-0650, как потомков изотипа и паратипа, соответствовала внутривидовым отношениям на уровне α1, несмотря на отдаленность между клонами GBSS I по результатам секвенирования гена. Отношения между биотипами *E. margaritae* GUK-1709 и *E. komarovii* GAR-0501 в принципе соответствовали внутривидовым отношениям, когда в двух поколениях проявляются достаточно высокие значения СФ.

В данном случае особенно показательными следует рассматривать не только величину СФ в поколении F<sub>1</sub>, но и наивысшее и среднее значения СФ в выборке F<sub>2</sub>. Такие значения по нашим критериям следует трактовать как отношения биотипов на уровне α2. Такие отношения допускают одноступенчатую рекомбинацию (обмен) генетическим материалом при гибридизации.

Обращает на себя внимание различие в динамике СФ между двумя гибридами *E. margaritae* × *E. transbaicalensis*. Два гибридных растения *E. margaritae* GUK-1709 × *E. transbaicalensis* AUL-1742 показали полную семенную стерильность в отличие от гибридов *E. margaritae* GUK-1709 × *E. transbaicalensis* AUR-1713. Подробное изучение особей *E. transbaicalensis* AUR-1713 и AUL-1742 показало различие в их морфологии. Так, у образца AUR-1713 отмечен диагностический признак *E. transbaicalensis* var. *burjaticus* (Sipliv.) Tzvelev (волосистые верхние поверхности листовых пластинок, ЛП), не встречающийся в популяциях Горного Алтая, но отмеченный у некоторых особей в популяции *E. margaritae* GUK-17. Кроме того, все растения из популяции AUR-1713 обладали компактным, несколько уплощенным ко-

Таблица 3. Значения СФ гибридов и уровни половой совместимости Cs биотипов среди видов *E. margaritae*, *E. komarovii* и *E. transbaicalensis* в поколениях F<sub>1</sub> и F<sub>2</sub>

Table 3. SF values in hybrids and levels of sexual compatibility of biotypes Cs among the species *E. margaritae*, *E. komarovii*, and *E. transbaicalensis* in the F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub> generations

№ п/п	Комбинация скрещивания	Значения семенной фертильности (СФ) гибридов в поколениях F <sub>1</sub> -F <sub>2</sub> (%)						
		N <sub>F1</sub>	F <sub>1</sub> (max)	N <sub>F2</sub>	F <sub>2</sub> (min)	F <sub>2</sub> (max)	F <sub>2</sub> (average)	Level Cs
1	marg GUK-1709 × marg AUK-0650	3	45,2	9	14,6	89,9	49,2	α1
2	marg GUK-1709 × komar GAR-0501	3	11,2	13	0,0	74,2	35,2	α2
3	marg GUK-1709 × trans AUR-1713	5	77,6	18	12,6	91,5	73,3	α1
4	marg GUK-1709 × trans AUL-1742	2	0	–	–	–	–	β?

N<sub>F1</sub> и N<sub>F2</sub> – число растений, проанализированных в F<sub>1</sub> и в F<sub>2</sub> соответственно; F<sub>N</sub> (max), F<sub>N</sub> (min), F<sub>N</sub> (average) – максимальные, минимальные и средние значения СФ в поколениях F<sub>1</sub> и F<sub>2</sub>

лосом, характерным для особей *E. margaritae*. Тем не менее отсутствие остей НЦЧ (острия на НЦЧ длиной около 2 мм) дало формальное основание для причисления растений AUR-1713 к *E. transbaicalensis*.

Для получения более ясных результатов в гибридизацию *E. margaritae* GUK-1709 × *E. transbaicalensis* AUR-1713 были взяты растения с двумя альтернативными признаками: GUK-1709 (голые поверхности ЛП, ости НЦЧ 12 мм) × AUR-1713 (волосистые поверхности ЛП, острия НЦЧ 2 мм). Среди пяти растений  $F_1$  значения СФ варьировали в диапазоне 55,4–77,6 %, то есть в пределах незначительно ниже величин у родительских

биотипов (88,0–92,5 %). Анализ гибридной выборки  $F_2$  показал следующее (рис. 4):

1. Все растения  $F_2$  имели раскрытые пыльники и высокие значения СФ, при которых только два характеризовались фертильностью ниже 40 % (табл. 4).

2. Длины остей НЦЧ в выборке варьировали в пределах 2–15 мм. Наибольшие ости до 15 мм отмечены у двух особей № 11 и № 15.

3. Отчетливая дискретность длин остей НЦЧ свидетельствует о малом числе аллелей (не больше двух), по которым различаются родительские биотипы. Присутствие в выборке особей со значениями 2, 3 и 4 мм может объясняться двояко: а) ошибкой измерения,

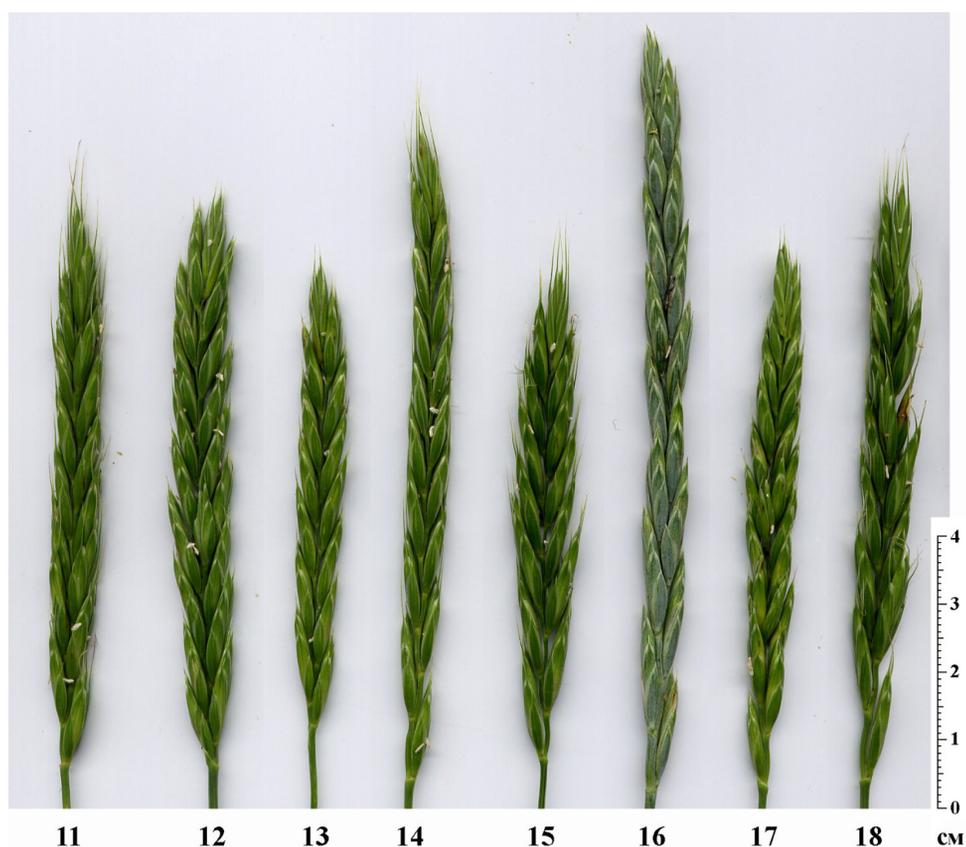


Рис. 4. Колосья растений в выборке  $F_2$  гибрида *E. margaritae* GUK-1709 × *E. transbaicalensis* AUR-1713. Номера соответствуют растениям в табл. 4

Fig. 4. Spikes of plants in the  $F_2$  sample of the *E. margaritae* GUK-1709 × *E. transbaicalensis* AUR-1713 hybrid. The numbers correspond to the plants in Table 4

Таблица 4. Расщепление гибрида *E. margaritae* × *E. transbaicalensis* GUK-1709 × AUR-1713 по морфологическим признакам и репродуктивным характеристикам в поколении F<sub>2</sub>. Жирным шрифтом выделены номера растений, показанных на рис. 4

Table 4. Splitting of the hybrid *E. margaritae* × *E. transbaicalensis* GUK-1709 × AUR-1713 by morphological features and reproductive characteristics in the F<sub>2</sub> generation. The numbers of the plants shown in Fig. 4 are indicated in bold type

№ раст.	Опушенность ЛП сверху	Длина остей НЦЧ	СФ (%)	№ раст.	Опушенность ЛП сверху	Длина остей НЦЧ	СФ (%)
1	Волосистые	8 мм	83,0	10	Волосистые	3 мм	68,2
2	Волосистые	2 мм	87,5	<b>11</b>	Волосистые	15 мм	83,0
3	Волосистые	4 мм	32,7	<b>12</b>	Волосистые	2 мм	87,5
4	Волосистые	8 мм	78,6	<b>13</b>	Волосистые	2 мм	52,7
5	Волосистые	8 мм	85,5	<b>14</b>	Голые	8 мм	78,6
6	Волосистые	3 мм	68,8	<b>15</b>	Волосистые	15 мм	84,5
7	Волосистые	12 мм	91,5	<b>16</b>	Голые	2 мм	88,6
8	Голые	12 мм	89,9	<b>17</b>	Волосистые	4 мм	56,4
9	Волосистые	2 мм	90,3	<b>18</b>	Волосистые	12 мм	12,6

вызванной прямой корреляцией между длиной наибольших остей и длиной несущего колоса; б) наличием генов-модификаторов или плейотропными эффектами.

4. Число особей с голыми верхними сторонами ЛП (3 особи из 18-и) также поддерживает предположение, что родительские особи различаются по одной паре аллелей соответствующих локусов. При этом признак голых ЛП свободно рекомбинирует с признаком длины остей НЦЧ, то есть встречается в сочетании с длинами остей 12, 8 и 2 мм.

5. Растение № 16 выборки показало отчетливую сизую окраску колоса, которая отсутствовала у родительских особей. Дополнительный анализ родительских биотипов привел нас к выводу о гетерозиготном состоянии генотипа GUK-1709 по данному признаку, в отличие от генотипа AUR-1713, формирующего фенотип с ярко-зеленой окраской, лишенной сизого оттенка.

### Заключение

В результате исследования выявлено, что по уровням дифференциации субгена

**St** Горно-Алтайские образцы *E. margaritae* GUK-1709 и AUK-0650 значительно отдалены друг от друга, при этом последний близок к образцам *E. komarovii* и *E. transbaicalensis* из Восточного Саяна.

Результаты гибридизации и анализ динамики значений семенной фертильности (СФ) в поколениях F<sub>1</sub>–F<sub>2</sub> показали следующее: а) СФ гибридов между биотипами *E. margaritae* GUK-1709 и AUK-0650 соответствовала внутривидовым отношениям на уровне **a1**, несмотря на отдаленность между клонами *GBSS 1*; б) значения СФ в варианте скрещивания *E. margaritae* GUK-1709 × *E. komarovii* GAR-0501 соответствуют половой совместимости на **a2**-уровне.

Репродуктивная совместимость между *E. margaritae* GUK-1709 и двумя биотипами *E. transbaicalensis* показала разные результаты. В комбинации GUK-1709 × AUL-1742 гибриды оказались полностью стерильными, в то время как в комбинации GUK-1709 × AUR-1713 получены результаты, соответствующие внутривидовым отношениям.

Таблица 5. Основные морфологические признаки видов *E. margaritae*, *E. komarovii* и *E. transbaikalensis*, по данным авторов протологов  
 Table 5. The main morphological features of the species *E. margaritae*, *E. komarovii*, and *E. transbaikalensis* according to the authors of the protologs.

Орган растений	<i>Elymus margaritae</i> (Агафонов и др., 2015, с дополнениями)	<i>Roegneria komarovii</i> comb. nova (Невский, 1934, стр. 615)	<i>Roegneria transbaikalensis</i> comb. nova (Невский, 1934, стр. 620)
Стебли	Стебли сизовато-зеленые 60–90 см выс., голые. Узлы стелбей голые и гладкие, от зеленовато-коричневых до темно-коричневых.	Ст. прямые или при основании слегка колечато-изогнутые, 50–75 см выс., гладкие, вл. гладкие, нижние иногда волосистые	Ст. при основании б.м. колечатые, до 100 см выс., гладкие; вл. гладкие или <b>нижние б.м. волосистые (волоски вниз направленные)</b> ;
Листовые пластинки (ЛП)	ЛП плоские, до 40 см дл. и до <b>12 мм шир., голые или с верхней стороны с рассеянными или плотными волосками</b>	Л. плоские, <b>0,4–0,8 см шир., сверху волосистые и шероховатые</b> , снизу шероховатые и голые	Л. сизовато-зеленые, до 1–1,2 см шир., с <b>обеих сторон голые</b> , шероховатые
Колоосья	Колоосья <b>6–10 см дл.</b> , 0,5–0,7 см шир., прямостоячие, <b>плотные, часто односторонние, уплотненные</b> , серовато-зеленые или с <b>антоциановым оттенком при созревании</b> . Ось колоса голая, по ребрам с короткими жесткими щетинками с промежутками между уступами 3–5 мм	Колоосья густые, 8,5–15 см дл., прямые, почти односторонние, с осью на ребрах шероховатой	Колоосья сизозеленые или зеленые, часто однобокие, прямоторчащие, до <b>20 см дл.</b> ; ось колоса по ребрам шероховатая
Колооски (клк.)	клк. сидячие, 10–15 мм дл. с 3–4 развитыми цветками.	клк. 3–5-цветковые, зеленовато-фиолетовые или зеленые	клк. 3–5-цветковые
Колоосковые чешуи (КЧ, клк. чш.)	КЧ немного неравные, <b>широколанцетные</b> , на верхушке круто заостренные, часто с дополнительными зубцами, с острым заострением 2–3 мм или с <b>прямой остью до 9 мм</b> дл., с 4–6 жилками, по жилкам шероховатые, короче прилегающей цветковой чешуи, отчетливо белопленчатые по краям. Наружная поверхность КЧ по жилкам почти гладкая между жилками, внутренняя поверхность голая или иногда короткошпиговатая у основания	клк. чш. почти равные, 0,8–1 см дл., о 5–7 жилках, широко-ланцетные, слегка неравнобокие, сразу заостренные, верху иногда односторонние, <b>остистые (ости 0,2–0,7 см дл.)</b> , шероховатые, по краю белопленчатые	клк. чш. <b>ланцетные</b> или широко-ланцетные, верху часто односторонние, <b>иногда с небольшим заострением</b> , сразу <b>остевидным окончанием</b> , по краю белопленчатые, шероховатые, с 5–7 жилками, 0,8–1,1 см дл.
Нижние цветковые чешуи (НЦЧ)	<b>НЦЧ широколанцетные</b> , длинношпиговатые, с прямой остью до <b>12 мм</b>	нижн. цв. чш. <b>ланцетная</b> , волосистая, 1–1,2 см дл., продолженная в прямую, шероховатую ость, <b>0,8–1,5 см дл.</b>	нижн. цв. чш. ланцетная, 0,85–1,1 см дл. <b>волосистая, с очень короткой остью (0,1–0,3 см дл.)</b>
Верхние цветковые чешуи (ВЦЧ)	ВЦЧ узко закругленные, по жилкам с негустыми короткими ресничками в количестве более чем 100 на каждом, между жилками голые.	верх. цв. чш. почти равна нижней, 0,9–1,1 см дл., туповатая или слабовыемчатая, по жилкам ресничатая;	верх. цв. чш. почти равна нижней, 0,9–1,1 см дл., туповатая или слабовыемчатая, по жилкам ресничатая
Пыльнички (плн.)	Пыльнички около 1–1,5 мм дл., желтые	плн. 2 мм дл.	плн. 2 мм дл.

На основании названных фактов нами сделан вывод, что образец AUR-1713 представляет собой безостую разновидность *E. margaritae* из нового местонахождения этого вида, который ранее был найден только в трех точках Республики Алтай. При этом сам вид обладает внутренней вариабельностью по ряду морфологических признаков: «волосистость верхних поверхностей ЛП», «длина остей НЦЧ», «наличие – отсутствие сизого налета на стеблях и колосьях», а также «длина остей колосковых чешуй (КЧ)». Вариабельность по последнему признаку обнаружена в наиболее обширной популяции GUK-2017 (гора Крас-

ная), откуда был описан голотип вида. Можно предположить, что *E. margaritae* продолжает свое микроэволюционное развитие в различных точках ареала путем гибридизации с близкими видами и последующими событиями межвидовой интрогрессии с выщеплением жизнеспособных промежуточных фенотипов.

На примере вышеназванных родительских биотипов можно отчетливо идентифицировать наиболее специфичные признаки трех видов. Приводим уточненную табл. 5 различительных признаков природных морфотипов *E. margaritae* и первоначальные описания *E. komarovii* и *E. transbaicalensis*.

### Список литературы / References

Агафонов А. В., Кобозева Е. В., Salomon B. (2015) Новый вид рода *Elymus* (Poaceae) из Горного Алтая. *Растительный мир Азиатской России*, 4: 36–40 [Agafonov A. V., Kobozeva E. V., Salomon B. (2015) New species of the genus *Elymus* (Poaceae) from the Altai Mountains. *Flora and Vegetation of Asian Russia* [Rastitel'nyi mir Aziatskoi Rossii], 4: 36–40 (in Russian)]

Агафонов А. В., Шабанова (Кобозева) Е. В., Асбаганов С. В. (2018) Взаимоотношения между сибирскими видами *Elymus komarovii* и *E. transbaicalensis* (Poaceae), выявляемые с помощью молекулярных ISSR-маркеров. *Растительный мир Азиатской России*, 4: 65–71 [Agafonov A. V., Shabanova (Kobozeva) E. V., Asbaganov S. V. (2018) Relations between Siberian species *Elymus komarovii* and *E. transbaicalensis* (Poaceae) revealed by molecular ISSR-markers. *Flora and Vegetation of Asian Russia* [Rastitel'nyi mir Aziatskoi Rossii], 4: 65–71 (in Russian)]

Доброхотов В. Н., Малько А. М., Кистанова В. Ю. (2008) *Семена сорных растений*. Москва, Московские учебники, 496 с. [DobrokhotoV V. N., Mal'ko A. M., Kistanova V. Yu. (2008) *Weed seeds*. Moscow, Moskovskie uchebniki, 496 p. (in Russian)]

Кобозева Е. В., Агафонов А. В. (2017) Микроэволюционные взаимоотношения сибирских видов *Elymus margaritae* и *E. komarovii* (Poaceae) по экспериментальным данным. *Проблемы изучения и сохранения растительного мира Евразии: Материалы II Всероссийской конференции с международным участием, посвященной памяти Л. В. Бардунова (1932–2008 гг.) (Иркутск, Кырен, 11–15 сентября 2017 г.)*. Иркутск, Издательство Института географии им. В. Б. Сочавы СО РАН, с. 20–22 [Kobozeva E. V., Agafonov A. V. (2017) Microevolutionary relationships among Siberian species *Elymus margaritae* and *E. komarovii* (Poaceae) on experimental data. *Problems of studying and preserving the plant world of Eurasia: Proceedings of the II All-Russian Conference with the international participation, dedicated to the memory of Doctor of Biological Sciences, Professor, Honored Scientist of the Russian Federation L. V. Bardunov (1932–2008) (Irkutsk, Kyren, September 11–15, 2017)*. Irkutsk, V. B. Sochava Institute of Geography SB RAS Publishers, p. 20–22 (in Russian)]

Невский С. А. (1934) Род 196. Рэгнерия – *Roegneria* С. Koch. *Флора СССР. Том 2*. Комаров В. Л. (ред.) Ленинград, Наука, с. 599–627 [Nevskii S. A. (1934) Genus 196. *Roegneria* – *Roegneria* С. Koch. *Flora of the USSR. Volume 2*. Komarov V. L. (ed.) Leningrad, Nauka, p. 599–627 (in Russian)]

Agafonov A. V. (2004) Intraspecific structure and reproductive relationships between *Elymus mutabilis* and *E. transbaicalensis* (Poaceae) in Southern Siberia from the viewpoint of taxonomical genetics. *Russian Journal of Genetics*, 40(11): 1229–1238

Agafonov A. V., Asbaganov S. V., Shabanova (Kobozeva) E. V., Morozov I. V., Bondar A. A. (2019) Genome constitution and differentiation of subgenomes in Siberian and Far Eastern endemic species of the genus *Elymus* (Poaceae) according to the sequencing of the nuclear gene *waxy*. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 23(7): 817–826

Agafonov A. V., Shabanova (Kobozeva) E. V., Asbaganov S. V., Mglinets A. V., Bogdanova V. S. (2020) Identification of genome compositions in allopolyploid species of the genus *Elymus* (Poaceae: Triticeae) in the Asian part of Russia by CAPS analysis. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 24(2): 115–122

Agafonov A. V., Salomon B. (2002) Gene pools among SH genome *Elymus* species in boreal Eurasia. *Triticeae IV*. Hernández P. (ed.) Sevilla, Spain, Consejería de Agricultura y Pesca, p. 37–41

Felsenstein J. (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, 17(6): 368–376

Kimura M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2): 111–120

Koonin E. V. (2006) The origin of introns and their role in eukaryogenesis: a compromise solution to the introns-early versus introns-late debate? *Biology Direct*, 1: 22

Kumar S., Stecher G., Li M., Nnyaz C., Tamura K. (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6): 1547–1549

Lu B.-R., Salomon B., Bothmer R. von (1990) Cytogenetic studies of progeny from the intergeneric crosses *Elymus* × *Hordeum* and *Elymus* × *Secale*. *Genome*, 33(3): 425–432

Mason-Gamer R. J. (2013) Phylogeny of a genomically diverse group of *Elymus* (Poaceae) allopolyploids reveals multiple levels of reticulation. *PLoS One*, 8(11): e78449

Mason-Gamer R. J., Weil C. F., Kellogg E. A. (1998) Granule-bound starch synthase: structure, function, and phylogenetic utility. *Molecular Biology and Evolution*, 15(12): 1658–1673

Mason-Gamer R. J., Burns M. M., Naum M. (2010) Phylogenetic relationships and reticulation among Asian *Elymus* (Poaceae) allotetraploids: Analyses of three nuclear gene trees. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54(1): 10–22

Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., the UGENE team (2012) Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, 28(8): 1166–1167