

На правах рукописи



Копылов-Гуськов Юрий Олегович

**АНАЛИЗ РАЗНООБРАЗИЯ ПЕРИСТЫХ КОВЫЛЕЙ
ГРУППЫ РОДСТВА *STIPA DASYPHYLLA* НА ТЕРРИТОРИИ
ЕВРОПЕЙСКОЙ ЧАСТИ РОССИИ**

Специальность 03.02.01 – Ботаника

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Москва — 2016

Работа выполнена на биологическом факультете ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Научный руководитель:

Тимонин Александр Константинович
доктор биологических наук,
профессор, профессор кафедры высших растений
биологического факультета МГУ

Официальные оппоненты:

Курченко Елена Ивановна
доктор биологических наук,
старший научный сотрудник,
заведующий сектором Учебно-научного центра экологии и биоразнообразия
ФГБОУ ВО
«Московский педагогический государственный университет»

Агафонов Владимир Александрович
доктор биологических наук,
профессор, заведующий кафедрой ботаники и микологии
ФГБОУ ВО
«Воронежский государственный университет»

Ведущая организация:

ФГБУН
«Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН»

Защита состоится 14 октября 2016 г. в 15:30 на заседании диссертационного совета Д 501.001.46 при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, по адресу: 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биолого-почвенный корпус МГУ, ауд. 389.

Факс: 8(495) 939-43-09

Интернет-сайт: www.bio.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова и на сайте www.bio.msu.ru

Автореферат разослан «__» июня 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



А.В. Щербаков

Общая характеристика работы

Актуальность темы. Несмотря на почти вековую историю подробного изучения перистых ковылей (начиная с работ К.М. Залесского 1918 года), до сих пор среди ученых нет консенсуса по системе рода (Vázquez, Gutiérrez, 2011; Gonzalo et al., 2013), особенно в отношении перистых ковылей из секции *Stipa*. Различные подходы к построению системы дают несовпадающие результаты, а распространенные молекулярные методы не всегда позволяют выявить филогению таксонов (Hamasha et al., 2012). Поэтому построение системы, адекватно отражающей филогению ковылей, остается актуальной задачей.

Предки современных ковылей, согласно Н.Н. Цвелеву (1977), возникли в горных районах Центральной или Передней Азии в эпоху Альпийского орогенеза и затем расселились по равнинным районам Евразии, что сопровождалось широкой диверсификацией группы и формированием нескольких групп близкородственных видов. При этом процессы видообразования до сих пор активно идут во многих группах как перистоостистых, так и волосовидноостистых ковылей. Из продолжающегося видообразования следует необходимость изучения полиморфизма внутри и между популяциями.

Ситуация еще более усугубляется путаницей в номенклатуре группы, что особенно заметно при сравнении до сих пор актуальных сводок «Flora Europaea» (Martinovský, 1980) и «Злаки СССР» (Цвелев, 1976), где под одним названием понимают разные виды.

Таксономические исследования ковылей востребованы также из-за их природоохранной значимости. Будучи доминантами (или содоминантами) в сообществах степей, ковыли привлекают внимание ботаников с позапрошлого века. Эти дерновинные злаки являются ценозоообразователями и эдификаторами различных типов степных сообществ (Лавренко, 1980). Поэтому сохранение видов ковылей и их местообитаний по существу равнозначно сохранению некоторых типов степного биома. Однако если не существует единого мнения о границах видов, то эффективность их охраны может снизиться. Соответственно при составлении «Красных книг» и организации охраняемых природных территорий необходима точная видовая идентификация видов *Stipa*, опирающаяся на строго обоснованную систему рода.

В целях охраны природы особенно важно исследовать устойчивость конкретных видов в условиях антропогенного пресса, поскольку даже у разных популяций одного вида со сходной ролью в сообществах подчас возможны сильные отличия в экологической устойчивости (Saltonstall, 2002). Сходные

работы на ковылях как на ценозообразователях степей и значимых кормовых растениях проведены в Китае (Shan et al., 2006) и в Центральной Европе (Wagner et al., 2012), но до сих пор не проводились в южной России. Исследования, требующие четкого представления о таксономической принадлежности ковылей данного региона, могут быть полезны не только для разработки эффективных мер их сохранения в природе, но и при восстановлении поврежденного растительного покрова.

Цели и задачи исследования. Цель работы – сопоставление морфологической и молекулярно-генетической изменчивости в группе родства *Stipa dasyphylla* в Европейской части России как основание для таксономической ревизии этой группы.

В соответствии с поставленной целью были сформулированы следующие задачи: 1) провести исследование изменчивости морфологических признаков группы; 2) изучить экологические особенности группы; 3) выявить генетическую структуру группы с помощью молекулярно-генетических методов (SSR, ISSR); 4) сопоставить картину морфологической и генетической изменчивости представителей комплекса в различных регионах юга и юго-востока Европейской части России.

Научная новизна. Впервые проведены микросателлитный и межмикросателлитный анализы популяций *S. dasyphylla*, *S. pontica*, *S. ucrainica* и *S. zaleskii*. Для этих четырех видов также впервые вычислены основные показатели генетической изменчивости и выявлены спектры микросателлитных фрагментов. Показана значительная обособленность представителей *Stipa zaleskii*, произрастающих в Оренбургской области, от остальных изученных растений. На основании комплексного подхода показано, что растения, произрастающие на восточных отрогах Донецкого кряжа и по морфологическим признакам промежуточные между *S. pontica* и *S. ucrainica*, должны быть отнесены к последнему виду.

Теоретическая и практическая ценность работы. Полученные результаты подтверждают значимость комплексного подхода, заключающегося в использовании различных типов данных, при решении таксономических вопросов в сложных группах. На примере четырех близких видов ковылей – *S. dasyphylla*, *S. pontica*, *S. ucrainica* и *S. zaleskii* – показано, что использование какого-либо одного анализа (морфологического, микросателлитного, межмикросателлитного) не позволяет четко различить исследованные виды. Получены данные, подтверждающие наибольшую важность исследований сложных таксономических групп в местах перекрытия ареалов видов таких

групп. Так, на примере морфологических признаков исследованных видов показано, что, несмотря на отсутствие хиатусов между видами в целом по выборке, такие хиатусы проявляются при раздельном рассмотрении их популяций в местах симпатрии видов. Эти результаты согласуются с концепцией расхождения близких видов в местах перекрывания их ареалов. Показан промежуточный по результатам всех анализов характер популяции из Белгородской области между *S. ucrainica* и *S. dasyphylla*, что представляет косвенное подтверждение концепции существования в природе нетаксономического разнообразия организмов.

Показана пригодность праймеров, разработанных для других видов *Stipa* и родов трибы Stipeae, для микросателлитного анализа *S. dasyphylla*, *S. pontica*, *S. ucrainica* и *S. zalesskii*. Пересмотрена диагностическая значимость морфологических признаков изученных видов, показано, что при различении этих видов следует отдавать приоритет признакам опушения листьев. Составлены региональные определительные ключи для различения видов группы родства *Stipa dasyphylla* в Курской, Оренбургской и Ростовской областях.

Положения, выносимые на защиту:

1. Комплексное исследование морфологических и молекулярно-генетических признаков в группе родства *S. dasyphylla*, как правило, позволяет выявлять не только реальные достаточно хорошо обособленные таксоны, но и «нетаксономическое разнообразие».
2. Ранг выявляемых форм ковылей группы родства *Stipa dasyphylla* наиболее адекватно возможно установить при анализе разнообразия популяций с территорий их совместного произрастания.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на II (X) и III (XI) Международных Ботанических конференциях молодых ученых в Санкт-Петербурге (Санкт-Петербург, 2012, 2015), на VII конференции по кариологии, кариосистематике и молекулярной филогении (Санкт-Петербург, 2013) и на XIII Московском совещании по филогении растений (Москва, 2015.)

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 работ, из них 2 – статьи в журналах из списка ВАК, 1 – статья в рецензируемом научном журнале, не включенном в список ВАК, 4 – материалы и тезисы докладов конференций.

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, четырех глав, выводов, списка литературы и 8 приложений. Список литературы включает 136 работ, из них 60 работ на русском и 76 на иностранных языках. Общий объем

диссертации – 209 страниц (основной текст – 146 страниц, приложения – 63 страницы). Диссертация включает 17 таблиц и 40 рисунков.

Благодарности. Автор благодарит А.К. Тимонина за научное руководство и помощь в подготовке диссертации; О.Н. Демину за всестороннюю помощь в сборе материала в Ростовской области и Краснодарском крае и при работе в гербариях RV и RWBG; Н.И. Золотухина за помощь во время работы в Центрально-черноземном заповеднике; Т.Е. Крамину за помощь в освоении методики ISSR-анализа и ценные замечания по содержанию работы; М.М. Белоконь и Ю.С. Белоконя за помощь в освоении методики SSR-анализа, О.В. Юрцеву и Д.Д. Соколова за ценные замечания по содержанию работы и улучшению текста работы, а также всех, кто чем-либо помогал автору на любом из этапов работы. Работа поддержана грантом РФФИ № 14-50-00029 (частично микросателлитный анализ, частично межмикросателлитный анализ, частично апробация работы) и грантами РФФИ №№ 14-04-01094 А и 15-29-02486 офи_м.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В разделе 1.1. описаны основные этапы развития систематики рода *Stipa* L. и перистоостистых ковылей в целом начиная с Линнея (Linnaeus, 1753). Особое внимание уделено истории изучения группы видов, близких к *S. dasyphylla*. Отражена несогласованность мнений разных авторов относительно числа и статуса таксонов, входящих в данную группу. Проанализированы работы П.А. Смирнова, Р.Ю. Рожевица, J. Martinovský, Н.Н. Цвелева, М.В. Клокова и В.В. Осычнюка.

Раздел 1.2. посвящен анализу и оценке морфологических признаков, использовавшихся для различения наиболее часто признаваемых таксонов группы родства *S. dasyphylla*, произрастающих в Европейской части России – *Stipa dasyphylla* (Czern. ex Lindem.) Traut., *S. pontica* P. Smirn., *S. ucrainica* P. Smirn. и *S. zaleskii* Wilensky s. l. Приведена таблица сравнения изменчивости этих ковылей по 7 морфологическим признакам, использованным в наиболее значимых обработках рода – «Флора Юго-Востока европейской части СССР» (Смирнов, 1928), «Флора СССР» (Рожевиц, 1934), «Злаки СССР» (Цвелев, 1976), «Злаки Украины» (Слюсаренко, 1977) и «Flora Europaea» (Martinovský, 1980).

В данном разделе также рассмотрены работы по систематике ковылей, выполненные на основе анализа значительного числа морфологических, микроморфологических и анатомических признаков, а также проанализировано таксономическое значение признаков, не используемых ранее в систематике

ковылей, но оказавшихся ценными таксономическими и диагностическими признаками других злаков.

Завершается раздел списком отобранных нами на основании изучения литературных источников признаков для морфологического анализа.

В разделе 1.3. приведены имеющиеся литературные данные по времени цветения и фитоценотической приуроченности видов группы родства *S. dasyphylla*.

В разделе 1.4. рассмотрены работы, авторы которых применяли молекулярно-генетические методы в систематике ковылей. На основании изученных литературных источников показана бóльшая эффективность методов, разработанных для микроэволюционных исследований: микросателлитный анализ (SSR) и межмикросателлитный анализ (ISSR).

Раздел 1.5. содержит обоснования важности изучения близких видов в районах их симпатрии, а также описание возможного расселения перистых ковылей в Европе в неогене.

Глава 2. Материалы и методы

В разделе 2.1. описаны: методика сбора включенных в последующие анализы 12-ти выборок, из исследованной группы (БО-1 из Белгородской области, КК-1 из Краснодарского края, КО-1, КО-2, КО-3 из Курской области, ОО-1, ОО-2 из Оренбургской области, РОВ-1 из восточной части Ростовской области, РОЗ-1, РОЗ-2, РОЗ-3, РОЗ-4 из западной части Ростовской области; всего 204 растения), методика измерений морфологических признаков с указанием точности измерений количественных признаков. Указаны статистические критерии, использованные при морфологическом анализе.

Раздел 2.2. содержит описание проведенного микросателлитного (SSR) анализа. ДНК 115 взятых в анализ образцов была выделена с помощью набора Nucleospin Plant II (Macherey-Nagel) и методом СТАВ (Doyle, 1991). Так как специальных праймеров для SSR-анализа для изучаемых видов не разработано, были взяты праймеры, разработанные для *Stipa purpurea* Griseb. – SP18, SP52, SP90, SP152, SP166, SP182, SP185, SP199, SP202, SP207, SP396, SP419, SP441, SP462, SP475 (Liu et al., 2011) и у *Achnatherum sibiricum* (L.) B.S.Sun et J.Qian – Asi002, Asi003, Asi012, Asi015, Asi024, Asi026, Asi032, Asi043, Asi048, Asi061, Asi070 (Chen et al., 2008). Для приготовления реакционной смеси были использованы готовые наборы реактивов GenePak® PCR Core (ООО «Лаборатория Изоген»). Амплифицированные фрагменты разделяли электрофоретически в ПААГ в соответствии с методическими указаниями, приведенными Д.В. Политовым и др. (2011). Определение длин искомым фрагментов проводили в программе Photo-Capt (Vilber Lourmat, 2006). На

основании полученных данных были вычислены следующие показатели генетической изменчивости: частоты аллелей, среднее число аллелей на локус (N_a), эффективное число аллелей (N_e), наблюдаемая (H_o) и ожидаемая (H_e) гетерозиготность, индекс фиксации Райта (F_{is}), генетическое расстояние Неи ($Nei D$, Nei, 1972) между отдельными популяциями. Также было проведено апостериорное переопределение образцов. Эти вычисления проводили в программе GenAlEx 6.5 (Peakall, Smouse, 2006). Также была проведена обработка (анализ внутренней структуры) данных в программе STRUCTURE 2.3 (Pritchard et al., 2000; Falush et al., 2007; Pritchard et al., 2010).

В разделе 2.3. описана методика межмикросателлитного (ISSR) анализа. В анализ взяты 93 образца, в качестве праймеров для полимеразной цепной реакции (ПЦР) были использованы 5 олигонуклеотидных последовательностей, комплементарных микросателлитным повторам: HB12, HB13, M2, M4 и UBC868. Условия ПЦР и методика электрофореза амплифицированных фрагментов в агарозном геле взяты из работ Т.Е. Краминой и И.А. Шанцера (2010) и Т. Kramina et al. (2012). Полученные фотографии гелей анализировали в программе Cross Checker 2.91 (Buntjer, 2000). Ординация образцов по степени их генетического родства была выполнена в программе PAST (Hammer et al., 2001). Анализ внутренней структуры данных был проведен в программе STRUCTURE 2.3.

В разделе 2.4. описаны особенности составления 131 проанализированного геоботанического описания в Воронежской и Ростовской областях, а также приведены методы статистической обработки полученных данных.

В разделе 2.5. охарактеризованы изученные в рамках работы типовые образцы: *Stipa dasyphylla* (Czern. ex Lindem.) Trautv. Lectotypus (LE!); *Stipa pontica* P. Smirn. Isotypus (P; W); *Stipa pontica* P. Smirn. Paratypus (MW!); *Stipa ucrainica* P. Smirn. Holotypus (MW!); *Stipa zaleskii* Wilensky. Lectotypus (LE!); *Stipa rubens* P. Smirn. Holotypus (MW!).

В разделе 2.6. перечислены гербарные коллекции – MW, LE, RV, RWBG, МНА и гербарий Центрально-Чернозёмного заповедника, – по материалам которых (всего 1003 гербарных листа) были построены ареалы видов изученной группы в Европе.

Глава 3. Результаты и их обсуждение

Раздел 3.1. Проверка собранных выборок на однородность показала, что однородны 11 выборок из 12. Неоднородной по трем из четырех проанализированных количественным признакам оказалась выборка РОЗ-1. Таким образом, мы сочли 11 однородных выборок униспецифичными и

рассматривали их в дальнейшем как популяции, а выборку РОЗ-1 рассматривали как смешанную из 2-х популяций, собственно РОЗ-1 и РОЗ-5.

Приведена таблица и рисунки, отражающие изменчивость диаметра листовой пластинки в свернутом состоянии, числа волосков на 10 мм длины абаксиальной стороны листовой пластинки, опушения влагалищ листьев вегетативных побегов, длины нижней цветковой чешуи и расстояния от окончания краевой полоски волосков на нижней цветковой чешуе до ости в 13 изученных популяциях. Показано, что с одной стороны, изученные популяции в большинстве своем не формируют четко обособленных групп, а с другой, - что большинство пар популяций между собой достоверно различаются. Кроме того, несмотря на показанную непрерывную изменчивость признаков по объединенной выборке, при рассмотрении изученных популяций по регионам их произрастания выявлены их явные отличия вплоть до очень четких хиатусов в распределениях признаков. Так, популяции из Оренбургской области отличаются друг от друга по удельному числу волосков на абаксиальной стороне листовой пластинки и по диаметру свернутых листовых пластинок, из Курской области – по удельному числу волосков, из Ростовской области – по опушению влагалищ листьев вегетативных побегов и по удельному числу волосков.

Сравнение полученных результатов с литературными данными позволило отнести большинство изученных популяций к тому или иному виду: ОО-1, КО-1, РОЗ-1 – к *S. dasyphylla*, КК-1 – к *S. pontica*, КО-2, РОВ-1, РОЗ-2 – к *S. ucrainica*, КО-3, ОО-2, РОЗ-3, РОЗ-4 – к *S. zaleskii*. Популяции БО-1 и РОЗ-5 не удалось отнести к какому-либо виду. Представлены таблицы и диаграммы изменчивости морфологических признаков по видам.

Исследованные растения по значениям трех наиболее часто используемых в основных сводках диагностических вегетативных признаков (диаметра листовой пластинки в свернутом состоянии, числа волосков на 10 мм длины абаксиальной стороны листовой пластинки и опушения влагалищ листьев вегетативных побегов) образовали три группы. Наложение результатов промеров типовых образцов на картину распределения исследованных образцов показывает, что типовые образцы попадают в границы изменчивости соответствующих, определенных нами, видов. Дополнительно даны таблицы сравнения промеров изученных выборок, изученных типовых образцов и данных литературы.

Показана соотносительная диагностическая значимость рассмотренных морфологических признаков: так, признак недохождения полоски волосков до ости предпочтительнее использовать в качестве дополнительного, а удельное число волосков на листовой пластинке – в качестве основного.

В разделе 3.2. приведена таблица, отражающая изменчивость длины язычка листьев вегетативных побегов, длины колонки, длины сеты, отношения длины сеты к длине колонки, тип возобновления и тип побегов в 13 изученных популяциях.

У всех исследованных растений возобновление побегов внутривлагалищное, а вегетативные побеги розеточные. Длина язычка на листьях вегетативных побегов в изученных популяциях достоверно не различалась, равно как и длина колонки. Длина же сеты и отношение длины сеты к длине колонки у растений из популяций РОЗ-3 и РОЗ-4 (обе отнесены нами к *S. zaleskii*) достоверно меньше, чем у представителей остальных изученных популяций.

Подробное изучение состава трихом на абаксиальной стороне листовых пластинок показало, что даже на незначительном по протяженности участке листовой пластинки можно обнаружить практически непрерывный ряд переходных по длине трихом (от шипика до волоска). По этой причине от описания качественного состава опушения абаксиальной стороны листовых пластинок мы отказались.

Предпринятые нами попытки найти новые морфологические признаки, пригодные для различения видов, увенчались успехом лишь отчасти: были обнаружены достоверные отличия популяций *S. zaleskii* из Ростовской области от других популяций по длине сеты и отношению длины сеты к длине колонки. Также только у этих популяций был обнаружен особый тип опушения влагалищ листьев вегетативных побегов – реснички по краям влагалища (Копылов-Гуськов, 2012). Полученные данные позволяют предположить, что, несмотря на сходство по основным морфологическим признакам с растениями из Курской области, популяции РОЗ-3 и РОЗ-4 стоят от них особняком.

П.А. Смирнов (1928) и J.O. Martinovský (1980) отмечали в качестве одного из диагностических признаков окраску влагалищ листьев вегетативных побегов, вызванную накоплением антоцианов. Мы предприняли попытки использовать этот признак, но столкнулись с трудностями в формализации его состояний. По нашим наблюдениям, общая окраска формируется не в результате равномерного изменения окраски всех клеток эпидермы, а вследствие изменения доли окрашенных и неокрашенных клеток. Принимая во внимание связь синтеза антоцианов с погодными условиями (Раздорский, 1949; Lundegardh, 1960), мы полагаем, что решение вопроса о таксономической значимости признака окраски влагалищ листьев в роде *Stipa* требует дополнительных специальных исследований.

Завершается раздел заключением, что в пределах сравнительно небольших конкретных регионов морфологические признаки позволяют с приемлемой

точностью различать сообитающие там виды. Поэтому имеет смысл создавать определительные ключи для региональных флор, и при определении растений из того или иного региона отдавать предпочтение именно региональному ключу перед ключом для определения видов группы в целом.

Раздел 3.3. Из 26 протестированных пар праймеров 6 показали четкие полиморфные (на уровне 5%) амплифицируемые фрагменты ДНК. Это праймеры SP18, SP152, SP185, SP419, Asi024, Asi061. Отобранные локусы были протестированы на наличие скрытых аллелей (нуль-аллелей). По результатам обработки наличие нуль-аллелей с вероятностью более 95% было предсказано для локусов SP152 и SP419. Последующие анализы проводили по уточненной таблице генотипов.

Так как микросателлитные маркеры являются высокоспецифичными (Slatkin, 1995), то сам факт того, что праймеры, разработанные для *S. purpurea* и даже для рода *Achnatherum*, оказались применимы к исследованным видам, говорит о высоком сходстве геномов не только внутри отдельных групп видов *Stipa*, но и в роде в целом.

Наибольшее число аллелей (15) было обнаружено у локуса SP185, наименьшее (3) – у локуса SP18. Частота присутствующих аллелей в популяциях колебалась от 1,9% до 100%. Наибольшее число уникальных аллелей было обнаружено в уральской популяции *S. zaleskii* (7 аллелей разных локусов). Из 16 обнаруженных уникальных аллелей больше всего (6) аллелей дал локус SP419, меньше всего – по одному аллелю – дали локусы SP18 и Asi024.

Основываясь на отнесении популяций к тому или иному виду по морфологическим признакам, мы проанализировали полученные результаты в контексте видовой принадлежности образцов. Так же как и в отдельных популяциях, у видов наблюдается картина избытка гетерозигот ($F_{is} < 0$), причем наибольший избыток наблюдается у *S. dasyphylla* ($F_{is} = -0,653$), а наименьший у *S. zaleskii* ($F_{is} = -0,172$). Это может служить косвенным подтверждением возможной межвидовой гибридизации.

Выборка в целом и отдельные виды характеризуются высокими показателями изолированности популяций ($F_{st} > 0,25$). Наибольшее значение этот параметр имеет у *S. dasyphylla* (0,396), наименьшее – у *S. ucrainica* (0,276). Полученные нами данные о генетической обособленности отдельных популяций укладываются в границы, выявленные для других видов *Stipa* по AFLP-маркерам (Wagner et al., 2012)

Вычисление генетического расстояния Неи (Nei, 1972) показало, что наиболее далеки друг от друга популяции из Оренбургской области: *S. dasyphylla* (популяция ОО-1) и *S. zaleskii* (популяция ОО-2). Наиболее близкими

оказались популяции *S. dasyphylla* из Оренбургской области (ОО-1) и *S. dasyphylla* с запада Ростовской области (РОЗ-1).

Популяция *S. zaleskii* из Оренбургской области (ОО-2) резко отличается не только от других популяций этого вида (КО-3 и РОЗ-3), но и от всех исследованных популяций прочих видов.

Байесовский анализ структуры данных, совмещенный с методом определения истинного числа групп в выборке, предложенным G. Evanno et al. (2005), проведенный в программе STRUCTURE, показал, что с наибольшей вероятностью изучаемая выборка разбивается на 6 групп. Наиболее обособленными оказались популяции *S. zaleskii* из Оренбургской области (ОО-2), *S. dasyphylla* из Курской области (КО-1) и группа, состоящая из популяций *S. dasyphylla* из Оренбургской и с запада Ростовской областей (ОО-1 и РОЗ-1 соответственно). Не выделились в отдельную группу образцы *S. pontica* (популяция КК-1), эти растения объединились с *S. ucrainica*.

Что касается популяций неясной видовой принадлежности, то популяция запада Ростовской области (популяция РОЗ-5) оказалась «между» западной и восточной популяциями *S. ucrainica* из Ростовской области (РОЗ-2 и РОВ-1) и популяцией *S. pontica* из урочища Утриш (КК-1), но ближе к популяции *S. ucrainica* с запада Ростовской области. Согласно результатам апостериорного переопределения каждого образца в отдельности в программе GenAlEx, 6 из 7 ее представителей были отнесены к *S. ucrainica*. Оставшееся растение было все же отнесено к *S. pontica*, хотя и с незначительным перевесом. Популяция БО-1 расположена практически на равном генетическом расстоянии от популяций *S. dasyphylla*, *S. ucrainica* и *S. zaleskii* из Курской области и популяции *S. dasyphylla* из Ростовской области. По результатам апостериорного переопределения одно из растений БО-1 отнесено к *S. dasyphylla*, а другое – к *S. ucrainica*,

Раздел 3.4. В общей сложности были получены 72 различных ISSR-фрагмента, из которых полиморфизм на уровне выше 5% проявили 56. Доля несовпадающих полос при проверке воспроизводимости результатов составила 2,6%.

Картина распределения образцов в пространстве первых трех главных координат по присутствию/отсутствию ISSR-фрагментов при отнесении образцов к тому или иному виду по морфологическим признакам показывает (рис. 1) обособленность *S. ucrainica* из Ростовской области (популяции РОЗ-2 и РОВ-1). Кроме того, проявляется близость образцов из популяции неясной видовой принадлежности из Ростовской области (РОЗ-5) к представителям *S. ucrainica* из Ростовской области по результатам ISSR-анализа.

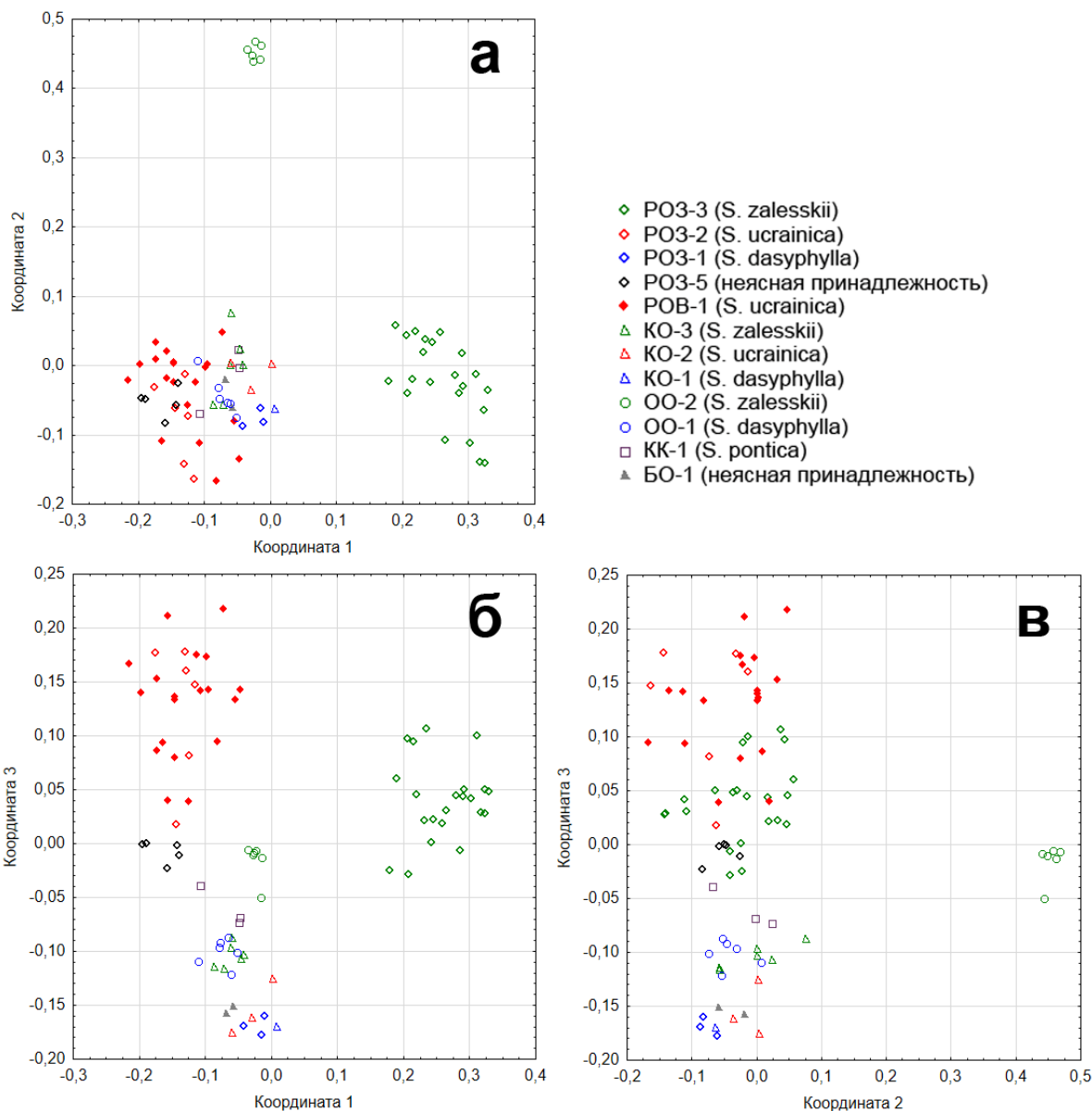


Рисунок 1. Соответствие распределения образцов в пространстве первых трех главных координат по спектрам IRRS-фрагментов и отнесения этих образцов к изучаемым видам по морфологическим признакам.

Цвет точек соответствует принадлежности к тому или иному виду на основании морфологических признаков: синий – *S. dasyphylla*, фиолетовый – *S. pontica*, красный – *S. ucrainica*, зеленый – *S. zaleskii*, черный, серый – не определено.

Форма значков отражает регион сбора: ромб – запад Ростовской обл., ромб закрашенный – восток Ростовской обл., треугольник – Курская обл., треугольник закрашенный – Белгородская обл., круг – Оренбургская обл., квадрат – Краснодарский край.

Байесовский анализ структуры данных, проведённый в программе STRUCTURE и дополненный методом определения числа групп G. Evanno et al. (2005), показал, что с наибольшей вероятностью изучаемая выборка разбивается на 4 группы. С вероятностью более 95% одну группу формируют образцы *S. zaleskii* из Оренбургской области (OO-2), вторую – образцы *S. zaleskii* с запада Ростовской области (PO3-3). Третью группу сформировали

представители *S. ucrainica* из Ростовской области, как с запада, так и с востока (популяции РОЗ-2 и РОВ-1), а также образцы из популяции неясной видовой принадлежности с запада Ростовской области (РОЗ-5). Четвертая же группа образована образцами остальных популяций (РОЗ-1, ОО-1, КО-1, КО-2, КО-3, КК-1 и БО-1).

Только один из образцов – один из 3-х представителей *S. pontica* (популяция КК-1) – продемонстрировал практически равную вероятность отнесения к нескольким группам (52,5% к третьей против 46,9% к четвертой).

Математический аппарат программы STRUCTURE подтверждает выявленную по морфологическим признакам обособленность популяций *S. zaleskii* из Оренбургской (ОО-2) и с запада Ростовской (РОЗ-3) областей. Также подтверждена близость между собой для двух популяций *S. ucrainica* из Ростовской области (РОЗ-2 и РОВ-1). Кроме того, к группе двух последних популяций также относятся все образцы популяции неясной видовой принадлежности с запада Ростовской области (РОЗ-5). Эти три популяции (РОЗ-2, РОВ-1 и РОЗ-5) вместе формируют группу, обособленную от других.

Оставшиеся же 7 популяций (РОЗ-1, ОО-1, КО-1, КО-2, КО-3, КК-1 и БО-1), в свою очередь, также образуют единую группу. Таким образом, она состоит из всех трех взятых в анализ популяций *S. dasyphylla* (РОЗ-1, КО-1 и ОО-1), популяций *S. zaleskii* и *S. ucrainica* из Курской области (КО-2 и КО-3), популяции *S. pontica* (КК-1) и популяции неясной видовой принадлежности из Белгородской области (БО-1).

Раздел 3.5 включает таблицу соответствия исследованных популяций тем или иным группам, выявленным в каждом из анализов и комментарии к несоответствиям.

Межмикросателлитный (ISSR) анализ, с одной стороны, показал обособленность популяции ОО-2 и позволил отнести все образцы из Ростовской области к той или иной из 4 выделенных групп. При этом ни разу не возникла ситуация, когда образцы из одной популяции были бы отнесены к разным группам. С другой же стороны, не очевидны причины объединения в одну группу таких различающихся по морфологии и географии произрастания популяций как РОЗ-1, КО-1, ОО-1, КО-2, КО-3, КК-1 и БО-1.

При обработке программой STRUCTURE данных по набору аллелей микросателлитных локусов встречались ситуации как менее 95% отнесения образца к той или иной группе (популяции БО-1, КК-1, КО-3, РОВ-1, РОЗ-2, РОЗ-3, РОЗ-5), так и отнесения образцов одной популяции к разным группам (популяции БО-1, КО-3, РОВ-1, РОЗ-5). Результаты апостериорного переопределения образцов на основании наборов аллелей микросателлитных

локусов наилучшим образом согласуются с разбиением выборки программой STRUCTURE по этим же маркерам.

Имеющиеся несовпадения между результатами молекулярно-генетических анализов могут быть связаны с большей вариабельностью микросателлитов, чем межмикросателлитных участков. Также возможной причиной несовпадений может быть небольшое число исследованных микросателлитных локусов.

Раздел 3.6. Анализ встречаемости четырех видов ковылей на основании 131 геоботанического описания показал, что чаще других изучаемых видов на описанных площадках встречался *S. ucrainica* (отмечен на 115 площадках). *S. zaleskii* встречался реже (найден на 32 площадках), *S. dasyphylla* был найден только на 18 площадках. При этом на 27 площадках отмечено совместное произрастание *S. ucrainica* и *S. zaleskii* и на 7 площадках – совместное произрастание *S. ucrainica* и *S. dasyphylla*. Совместного произрастания на одной площадке *S. dasyphylla* и *S. zaleskii*, а также всех трех видов не отмечалось. Содоминирование видов на одной площадке наблюдалось исключительно редко – на 3 площадках вместе и обильно произрастали *S. ucrainica* и *S. dasyphylla* и на 2 – *S. ucrainica* и *S. zaleskii*.

Кластерный анализ совместного произрастания видов методом ближайшего связывания показал, что совместно с *S. dasyphylla* чаще всего произрастают *Ajuga genevensis* L., *Erysimum repandum* L., *Fragaria viridis* (Duch.) Weston, *Stipa pennata* L., *Trifolium montanum* L. и *Vicia tenuifolia* Roth. На одних площадках с *S. ucrainica* мы чаще других видов фиксировали *Arenaria serpyllifolia* L., *Artemisia austriaca* Jaqc., *Elytrigia repens* (L.) Nevski, *Festuca valesiaca* Gaud., *Galatella villosa* (L.) Reichenb. fil., *Koeleria cristata* (L.) Pers., *Poa bulbosa* L., *Scorzonera mollis* Bieb. и *Stipa lessingiana*. Вместе с *S. zaleskii* чаще произрастали *Bromopsis riparia* (Rehm.) Holub, *Eryngium campestre* L., *Erysimum canescens* Roth., *Euphorbia seguieriana* Neck., *Festuca pseudovina* Hackel ex Wiesb., *Stipa capillata* L. и *Thymus marschallianus* Willd. Полученные результаты позволили оценить степень ксерофильности изученных видов. Так, совместно с *S. ucrainica* чаще произрастают наиболее ксерофильные виды (например, *Galatella villosa*, *Festuca valesiaca* и *Stipa lessingiana*), а с *S. dasyphylla* – наименее ксерофильные (*Ajuga genevensis*, *Fragaria viridis* и *Trifolium montanum*; Лавренко, 1980). Совместно с *S. zaleskii* произрастали как ксерофильные (*Festuca pseudovina*), так и более мезофильные виды (*Bromopsis riparia*).

В мае 2014 г. на западе Ростовской области нам удалось наблюдать цветение *S. zaleskii* и *S. ucrainica*. Цветущие растения *S. zaleskii* были обнаружены в вечернее время (в 18:05 час.), а цветение *S. ucrainica* было отмечено утром (в 10:15 час.). Цветение *S. dasyphylla* и *S. pontica* наблюдать не удалось.

Полученные данные согласуются с литературными (Пономарев, 1966; Слюсаренко, 1977) в отношении *S. ucrainica* и не согласуются в отношении *S. zaleskii*. Мы связываем это с тем, что А.Н. Пономарев проводил свои наблюдения в Троицком заказнике (Южный Урал), где суточные ритмы цветения ковылей могут отличаться от таковых в Ростовской области, а данные приведенные Л.П. Слюсаренко, получены в Донецкой области, граничащей с Ростовской областью.

Раздел 3.7. На основании данных этикеток образцов, хранящихся в фондах LE, MW, МНА, RV, RWBG и гербария ЦЧЗ, а также собственных сборов были построены значковые ареалы изучаемых видов. Дополнительным результатом геоботанических исследований стало уточнение распространения видов *Stipa* в Ростовской области. (Копылов-Гуськов и др., 2015).

Ареал *Stipa ucrainica* занимает восточные и юго-восточные районы Украины, юг европейской части России, Кавказ (LE). На север вид доходит лишь до Курской (гербарий ЦЧЗ) и Тамбовской (Соколов, Соколова, 2015) областей. Самая восточная находка вида вне отрыва от основного ареала известна с востока Астраханской области (МНА). *S. ucrainica* обнаружен на западе Румынии (Stefanut, 2009) и на западе Болгарии (Apostolova et al., 2008). Местонахождения из Болгарии, по имеющейся у нас информации, являются самыми южными местонахождениями вида. Если учитывать находку М.М. Ильина и М.Н. Аврамчика, описанную Р.Ю. Рожевицем как *S. krascheninnikowii*, то вид проникает на восток до 57° восточной долготы.

S. zaleskii, в отличие от предыдущего вида, не проникает на запад дальше Крыма (LE). Крымские местонахождения одновременно являются и самыми южными. Ареал *S. zaleskii* на востоке проходит по южным районам Сибири и Казахстану. Голотип *S. rubens* (являющегося синонимом *S. zaleskii*) собран в юго-восточной части ареала – в окрестностях Астаны (Казахстан). Самые северные точки сборов вида – север республики Башкортостан (LE) и правый берег Волги на юге Нижегородской области (MW). Согласно данным Е.М. Лавренко и Н.И. Синской (1965), *S. zaleskii* проникает на восток до Тянь-Шаня.

Ареал *S. dasyphylla* в широтном аспекте схож с ареалом *S. zaleskii*: самые северные местонахождения – юг Нижегородской области (MW) и север Башкортостана (LE), а самые южные – Ставропольский край (MW) и северный Казахстан (MW). Но в отличие от *S. zaleskii*, *S. dasyphylla* не заходит в Восточную Сибирь (Ломоносова, 1990).

S. pontica имеет самый ограниченный ареал в Европе и явно тяготеет к горным степям Причерноморья и Кавказа. Данный вид встречается в гористых районах южной части Крыма (LE), в Армении, Грузии и Азербайджане (MW).

Раздел 3.8. На основании результатов всех проведенных анализов, а также литературных источников (Расницын, 1975; Грант, 1984; Скворцов, 2001; Северцов, 2005) обоснована принадлежность популяций ОО-1, КО-1, РОЗ-1 к *S. dasyphylla*, КО-2, РОВ-1, РОЗ-2, РОЗ-5 – к *S. ucrainica*, КК-1 – к *S. pontica*, КО-3, ОО-2, РОЗ-3, РОЗ-4 – к *S. zaleskii*, а также именно видовой статус этих таксонов. Заострено внимание на разнородности *S. zaleskii*, и поддержано предложение Н.Н. Цвелева (2012) выделить широколистные экземпляры вида в *S. rubens* P. Smirn. (согласно голотипу из MW), а узколистные оставить в *S. zaleskii* (согласно лектотипу из LE). Также обращено внимание на наличие в популяции РОЗ-5 (*S. ucrainica*) отдельных признаков, сближающих ее с *S. pontica* как на морфологическом, так и на генетическом уровнях, что может быть следствием произошедшей в прошлом гибридизации при встрече ковылей, расселявшихся в Европе двумя разными путями. Сделан вывод, что популяция БО-1, которую не удалось отнести ни к одному из видов, представляет собой пример нетаксономического разнообразия в понимании И.Я. Павлинова (1992).

Глава 4. Заключение

В главе приведен список признанных на основании комплексного подхода видов: *Stipa dasyphylla* (Czern. ex Lindem.) Traut., *S. pontica* P. Smirn., *S. ucrainica* P. Smirn. и *S. zaleskii* Wilensky. Для этих видов приведены номенклатурные цитаты, наиболее характерные морфологические и экологические (если таковые данные были получены) признаки, кратко охарактеризовано распространение видов. Номенклатурная цитата *S. zaleskii* Wilensky включает как обобщенную цитату (для *S. zaleskii* Wilensky s. l.), так и отдельные цитаты для *S. zaleskii* Wilensky s. str. и *S. rubens* P. Smirn. В главе также приведены определительные ключи для различения видов группы родства *Stipa dasyphylla* для изученных территорий их совместного произрастания (Курской, Оренбургской и Ростовской областей).

Завершается глава формулировкой положений, выносимых на защиту.

ВЫВОДЫ

1. *Stipa dasyphylla* (Czern. ex Lindem.) Traut., *S. pontica* P. Smirn., *S. ucrainica* P. Smirn. и *S. zaleskii* Wilensky представляют собой самостоятельные виды. Не исключена возможность деления *S. zaleskii* на два вида – *S. zaleskii* Wilensky s. str. и *S. rubens* P. Smirn., различающиеся по диаметру листовых пластинок, а также по удельному числу волосков на абаксиальной стороне листа.
2. Популяции *S. zaleskii* Wilensky s. l. из Ростовской области, отличающиеся более короткой волосистой частью ости (сетой), пониженному отношению

длины сеты к длине колонки (скрученной части ости) и ресничками по краю влагалищ вегетативных побегов, заслуживают дополнительных исследований таксономического статуса.

3. В районах совместного произрастания изученных видов степень различий между их популяциями выше, чем по изученной территории в целом.
4. Популяции *S. dasyphylla*, *S. ucrainica* и *S. zalesskii* из Ростовской и Воронежской областей различаются по спектрам сопутствующих видов, а *S. ucrainica* и *S. zalesskii* в Ростовской области – и по времени цветения.
5. Праймеры SP18, SP152, SP185, SP419, разработанные для *Stipa purpurea*, и Asi024, Asi061, разработанные для *Achnatherum sibiricum*, пригодны для микросателлитного анализа *S. dasyphylla*, *S. pontica*, *S. ucrainica* и *S. zalesskii*.
6. Несоответствие между результатами морфологического и молекулярно-генетических анализов относительно степени отличий изученных популяций *S. ucrainica* и *S. zalesskii* из Курской области может быть связано с нарушением их изоляции из-за неоптимальных условий обитания на границе ареалов соответствующих видов.
7. Популяцию из Ростовской области, по морфологическим признакам промежуточную между *S. ucrainica* и *S. pontica*, на основании комплексного анализа следует относить к *S. ucrainica*.
8. Растения неясной видовой принадлежности из Белгородской области проявляют примерно равное сходство и с *S. dasyphylla*, и с *S. ucrainica* как по морфологическим, так и по молекулярно-генетическим признакам и не могут быть включены ни в один исследованный вид.
9. Для различения *Stipa dasyphylla*, *S. pontica*, *S. ucrainica* и *S. zalesskii* пригодны такие признаки, как удельное число волосков на абаксиальной стороне листа, характер опушения влагалищ листовых пластинок и расстояние недохождения краевой полоски волосков на нижней цветковой чешуе до основания ости.
10. Удельному числу волосков на абаксиальной стороне листовой пластинки необходимо придавать первостепенное диагностическое значение, а расстоянию недохождения краевой полоски волосков на нижней цветковой чешуе до основания ости – второстепенное.
11. Длина язычка листьев вегетативных побегов, длина нижней цветковой чешуи, длина колонки и способ возобновления не имеют таксономического и диагностического значения в исследованной группе. Для оценки таксономической значимости окраски влагалищ листьев в изученной группе требуются дополнительные исследования.

Список публикаций по теме диссертации.

Статьи в рецензируемых научных журналах из списка ВАК

1. **Копылов-Гуськов Ю.О.** Ковыли украинский и Залесского: морфологическое и ареалогическое сравнение // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. — 2012. — № 3. — С. 49–52.
2. **Копылов-Гуськов Ю.О.**, Крамина Т.Е. Изучение *Stipa ucrainica* и *Stipa zalesskii* (Poaceae) из Ростовской области с использованием морфологического и ISSR-анализов // Бюллетень Московского общества испытателей природы. Отдел биологический. — 2014. — Т. 119, № 5. — С. 46–53.

Статьи в рецензируемых научных журналах, не включенных в список ВАК

3. **Копылов-Гуськов Ю.О.**, Дудов С.В., Серегин А.П. Новые находки видов Красной книги Ростовской области // Фиторазнообразие Восточной Европы. — 2015. — Т. 9, № 3. — С. 129–134.

Тезисы и материалы конференций

4. **Копылов-Гуськов Ю.О.**, Майоров С.Р., Дёмина О.Н. Сравнение ковыля украинского (*Stipa ucrainica*) и ковыля Залесского (*S. zalesskii*) на основании данных морфологии, распространения и фитоценотической приуроченности // Тезисы докладов II (X) Международной Ботанической конференции молодых ученых в Санкт-Петербурге. — Санкт-Петербург, 2012. — С. 17.
5. **Копылов-Гуськов Ю.О.**, Крамина Т.Е. Результаты исследования ковылей украинского (*Stipa ucrainica*) и залесского (*S. zalesskii*) на территории Ростовской области методом ISSR-PCR // Хромосомы и эволюция. Материалы VII конференции по кариологии, кариосистематике и молекулярной филогении и II Школы-Симпозиума молодых ученых памяти Г.А. Левитского "Хромосомы и эволюция". — Санкт-Петербург, 2013. — С. 61–62.
6. **Копылов-Гуськов Ю.О.**, Белоконь М.М. Результаты микросателлитного анализа перистых ковылей из группы родства *Stipa dasyphylla* Европейской части России // XIII Московское совещание по филогении растений. 50 лет без К.И. Мейера / Под ред. А. К. Тимонина. — Макс-Пресс Москва, 2015. — С. 156–159.
7. **Копылов-Гуськов Ю.О.** Результаты микросателлитного (SSR) и межмикросателлитного (ISSR) анализов перистых ковылей группы родства *Stipa dasyphylla* Европейской части России // Тезисы докладов III (XI) Международной Ботанической конференции молодых ученых в Санкт-Петербурге. — Санкт-Петербург, 2015. — С. 6–7.

Копылов-Гуськов Юрий Олегович
Анализ разнообразия перистых ковылей группы родства *Stipa dasyphylla* на
территории Европейской части России

Формат 60×90/16 Тираж 130 экз. Усл.п.л. 1.2

Подписано в печать 31.05.2016 Заказ № 403

Типография ООО «Генезис» 8 (495) 246-12-21

119571, г. Москва, пр-т Вернадского, 86