

ХАРАКТЕРИСТИКА СТАРО-МЕСТНЫХ ФОРМ ОВСА ПОСЕВНОГО (*AVENA SATIVA* L.) ИЗ КОЛЛЕКЦИИ ВИР ПО ПОЛИМОРФИЗМУ АВЕНИНА

Я. Г. Зеленская, А. В. Конарев, И. Г. Лоскутов,
Н. К. Губарева, П. П. Стрельченко

Методом электрофореза авенина — запасного белка зерна — изучен внутривидовой и внутривидовой полиморфизм оригинальных и репродуцированных образцов старо-местных форм овса посевного из коллекции ВИР им. Н. И. Вавилова. Установлено, что эти образцы овса обладают значительным генетическим полиморфизмом, выявляемым по спектрам авенина. Это подтверждает высокий уровень генетического разнообразия старо-местных сортов овса и свидетельствует в пользу перспективности использования спектра авенина для идентификации генофонда овса.

Составлен электронный каталог белковых формул, который может быть использован в дальнейшем как элемент паспортной базы данных. Регистрация спектров авенина поможет надежнее сохранить все разнообразие старо-местных образцов посевного овса. Выявлено, что в процессе репродукции образцов овса встречаемость биотипов и их состав могут меняться, что может привести к утрате образцами ценных хозяйственных и биологических свойств. Спектры авенина могут также быть полезными для выявления дублетных форм и для контроля генетической стабильности образцов коллекции овса.

Спектры авенина могут быть использованы при классификации генофонда овса. Наиболее эффективно это может быть осуществлено при обработке данных по полиморфизму белков методами многомерной статистики, в частности, методами АГК и КА. Представленная в работе группировка образцов по степени генетического сходства может быть полезна при обсуждении результатов оценки генофонда овса посевного по селекционно-ценным признакам.

Введение

Овес — одна из важнейших сельскохозяйственных культур. Зерно овса характеризуется повышенным содержанием в белке незаменимых аминокислот, витаминов и других биологически активных соединений (например, β -глюканов). Среди зерновых злаков овес занимает особое место как высокомасличная культура. Все это дает возможность использовать овес как высокопитательный и лечебный продукт. Зерно овса — это и незаменимый корм для многих сельскохозяйственных животных [11].

Овес посевной (*Avena sativa* L.) — 42-хромосомный аллогексаплоид ($2n = 6x = 42$), объединивший в ходе эволюции предковые геномы А, С и D [11]. Овес является более молодой культурой по сравнению с пшеницей и ячменем. Он относится ко вторичным культурам, т.е. растениям, возникшим из сорняков, засорявших посева более древних культур [3]. Овес посевной распространен почти на всех континентах мира (Европа, Северная и Юго-Восточная Азия, Северная и Южная Америка, Австралия). Существуют различные классификации *A. sativa*: ботанические, эколого-географические, селекционные и др. Согласно “Культурной флоре” [11] овес посевной делится на два подвида (subsp. *sativa* — пленчатый и subsp. *nudi* — голозерный). Различают формы сорно-посевного овса, засоряющие посева полбы. Эколого-географический принцип классификации предполагает выделение до 30 групп. При изучении коллекции овса в различных почвенно-климатических условиях выявлена изменчивость признаков, ранее считавшихся константными, например,

формы зерна и цветковой чешуи [11]. Классификация овса посевного крайне затруднена ввиду отсутствия достаточного числа надежных критериев — признаков или маркеров, наследование которых может быть четко прослежено.

Электрофорез запасных белков зерна злаков — проламинов — успешно используют для идентификации и регистрации видов, сортов и биотипов [1, 4 – 10, 13, 14, 16, 22]. Авенин — запасной белок семян овса относится к группе спирторастворимых белков — проламинов [9, 24, 25]. Не существует общепринятой номенклатуры авенинов. На первом этапе при электрофорезе в ацетатном буфере (рН 3,1) компоненты авенина классифицировали на α -, β - и γ -фракции, основываясь на номенклатуре глиадинов пшеницы [9, 22, 24]. В дальнейшем было показано, что спектр авенина включает компоненты с большей электрофоретической подвижностью (при рН 3,1), чем α -глиадины. Эти компоненты были обозначены как быстрые проламины (БП) [14]. Проламиновая природа последних была доказана результатами изучения аминокислотного состава и N-концевых аминокислотных последовательностей [14]. Индивидуальные авениновые компоненты иногда нумеруют в порядке элюирования при ионно-обменной хроматографии [25].

Изучение авенинов показало, что эти белки характеризуются более низким уровнем электрофоретического полиморфизма по сравнению с глиадинами пшеницы, но, тем не менее, могут быть использованы для анализа генетического разнообразия овса, в том числе

для идентификации видов, сортов, образцов и биотипов культивируемого и дикорастущего овса [5, 9, 20, 22].

В ВИР сосредоточена одна из крупнейших коллекций овса *A. sativa*, которая представлена большим сортовым и эколого-географическим разнообразием этого вида, что позволяет в полной мере познать степень генетического полиморфизма данной культуры и с максимальной эффективностью использовать ее генофонд для нужд селекции [12].

Старо-местные сорта и формы овса посевного представляют особый интерес для современной селекции. В ходе длительного отбора среди них вырабатывались приспособленные к специфическим условиям экологические типы. Сорта народной селекции, как правило, представляют собой сложные популяции [1, 2]. Сохранение всего генетического разнообразия этих сортов является одной из важных задач и серьезных проблем генных банков [1, 13, 23].

Рациональная организация коллекции (наличие классификации коллекции, паспортных и оценочных данных, отсутствие дублирования, перемешивания и перепутывания, сохранение генетической стабильности в ходе репродукции и т.д.) обеспечивает более эффективное использование образцов в селекции и меньшие затраты при их сохранении, поддержании и изучении [7, 13, 23].

Основным при работе с коллекциями в генных банках традиционно является анатомо-морфологический подход. С его использованием осуществляют идентификацию, паспортизацию и дифференциацию образцов, выявление дублетов и засорения, анализ генетической стабильности и пр. [11, 12, 23]. В последние десятилетия белковые (изоферменты и запасные белки семян) и ДНК-маркеры стали все более часто использоваться в популяционных и эволюционных исследованиях генофонда, а также в селекционных программах [1, 4 – 10, 13 – 20, 22 – 28].

В отличие от большинства морфологических признаков молекулярные маркеры (ММ) не подвержены влияниям окружающей среды, а также находятся под простым генетическим контролем. Наиболее надежные маркерные системы имеют кодоминантный характер наследования. В первую очередь это касается белковых маркеров — изоферментов и запасных белков, а также RFLP- и SSR-маркеров (микросателлиты) [7, 9, 14]. В ВИР молекулярные маркеры (главным образом белковые) уже более 30 лет используются в решении всего комплекса проблем генетических ресурсов растений (ГРП) [9, 10, 14]. Наиболее успешным оказалось использование белковых маркеров в анализе родства видов и геномов, а также для идентификации образцов коллекций, сортов, биотипов, линий (наряду с ДНК-маркерами); генетической дифференциации генофонда [5, 9, 10, 13 – 17, 28].

Преимуществом использования запасных белков является то, что эта кодоминантная маркерная система позволяет работать с отдельными зерновками (т.е. характеризовать генотипический состав образцов), в том

числе длительно хранившимися, в частности для зерновых злаков — более 100 лет [26]. Запасные белки легко доступны выделению и идентификации, специфичны, полиморфны. Принципиально важно, что семя, из которого извлекаются белки, — фиксированная фаза онтогенеза. Спектры запасных белков семян остаются неизменными в течение многих лет [10]. На электрофорезе запасных белков основаны все международные и принятые в РФ стандартные методы идентификации сортов [6, 7, 13, 20].

Цель данного исследования — характеристика генофонда старо-местных сортов и форм овса посевного из коллекции ВИР по спектрам запасного белка семени овса — авенина.

В задачи исследований входило:

- изучить внутривидовой и внутривидовой полиморфизм старо-местных форм овса посевного по авенинам;

- оценить по спектрам авенина генетическую стабильность образцов овса после многократных репродукций и выявить наличие дублетных образцов;

- охарактеризовать генетическое разнообразие коллекции и выявить степень и характер генетической дифференциации генофонда старо-местных форм культивируемого овса из коллекции ВИР с использованием данных по белковому полиморфизму и методов многомерной статистики.

Методы исследования

Объектом исследования послужили семена 31 оригинального образца, которые были собраны экспедициями ВИР в 1921 – 1950 гг., а также семена репродукций этих образцов (в количестве 115), полученные в 1963 – 2000 гг. на опытных станциях (ОС) института. В качестве экспериментального подхода использовали анализ полиморфизма запасного белка зерна авенина стандартным методом электрофореза в ПААГ при рН 3,1 [5, 6, 20].

Осуществляли позерновой анализ (50 зерен на образце). Идентификацию компонентов и запись белковых формул проводили по унифицированному эталонному спектру, принятому для злаков триб: *Triticeae* Dum. (Пшеницевые), *Aveneae* Dum. (Овсовые), *Phleaeae* Dum. (Тимофеевковые) и *Poeae* R. Br. (Мятликовые) [14]. Интенсивность компонентов оценивали визуально по пятибалльной шкале. В качестве стандартов использовали спектры глиаина пшеницы (сорт Миrowsкая-808) и авенина овса (сорт Astor).

При создании компьютерной матрицы исходных данных для полиморфных образцов использовали только биотип с наибольшей частотой встречаемости (доминирующий биотип). Учитывали не только “наличие-отсутствие” компонентов, но и их интенсивность. При этом наличие компонента с определенной интенсивностью (от 1 до 5) в матрице исходных данных обозначали цифрой 1, а его отсутствие — цифрой 0. Обработку матрицы проводили двумя независимыми методами многомерной статистики: главных компонент

(АГК) и кластерным анализом (КА). Выделенные главные компоненты рассматривали как группы. Вывод о принадлежности биотипа к той или иной группе делался на основе максимальной величины факторной нагрузки на соответствующий главный компонент. Для КА на основе исходной матрицы данных рассчитывали матрицу коэффициентов сходства биотипов по Дайсу [20], обработку которой проводили методом Ворда [28]. Использовали программы STATISTICA 5.5 [29] и NCSS 2000.

Результаты и обсуждение

Общая характеристика суммарного электрофоретического спектра авенина овса посевного *A. sativa*. Анализ состава электрофоретических спектров авенина исследованных образцов овса подтвердил его отличие от глиадинового спектра пшеницы [5, 6, 14, 20]. Спектр овса представлен компонентами α - и β -зон (фракций), соответствующих α - и β -фракциям глиадина пшеницы, и компонентами БП, соответствующих БП представителей триб злаков *Aveneae*, *Phleae* и *Poeae* [5, 6, 14]. Компонентов, соответствующих γ - и ω -фракциям глиадина выявлено не было. В целом суммарный электрофоретический спектр авенина овса может быть записан в виде следующей белковой формулы: БП 7 6 5 4 3 2 1 α 1₁ 1₂ 2 3 4 5 6 7 β 1₁ 1₂ 1₃ 2 3₁ 3₂ 3₃ 4 5 (табл. 1). Цифрами обозначены позиции компонентов. Подстрочным шрифтом — их субпозиции.

В электрофоретических спектрах изученных образцов овса обнаружено от 6 до 15 компонентов. По составу и интенсивности компонентов БП7, БП5, БП3 и БП1 спектры авенина разделили на четыре группы. Компоненты БП2, БП4 и БП6 встречались редко. Для всех вариантов спектров характерна 100%-ная встречаемость компонента БП7. По зоне БП идентифицировано 20 различных комбинаций компонентов, из которых чаще встречались сочетания БП7531 и БП753.

Наиболее разнообразной по количеству различных сочетаний компонентов в спектрах оказалась α -зона (число компонентов — от 0 до 7). Общее число комбинаций компонентов (типов спектра) по этой зоне достигает 87. Очень часто встречались сочетания компонентов: α 357, α 46. Компоненты α 4, α 5, α 6, α 7 иногда встречаются в единичном варианте, из них наиболее часто — α 5. Позиция α 1 может быть занята одновременно двумя субкомпонентами.

В β -зоне может присутствовать от 1 до 5 компонентов, дающих 70 различных комбинаций. Наиболее распространенные сочетания компонентов в этой зоне — β 13 и β 123, в свою очередь имеющие варианты, различающиеся по интенсивности и подвижности компонентов в пределах позиции. Позиции β 1 и β 3 могут быть заняты двумя субкомпонентами. Компоненты β 1, β 2 и β 3 являются, как правило, интенсивными. Четыре компонента встречаются в единичном варианте — β 1₁, β 2, β 3₁, β 3₂.

Таблица 1. Пример записи электрофоретических спектров авенина оригинального и репродуцированного образцов овса *Avena sativa* L. с учетом интенсивности компонентов

№ по каталогу ВИР – биотип	Фракции и позиции компонентов														Встречаемость, %										
	БП							β -авенинов																	
	7	6	5	4	3	2	1	1 ₁	1 ₂	2	3	4	5	6	7	1 ₁	1 ₂	1 ₃	2	3 ₁	3 ₂	3 ₃	4	5	
<i>Оригинальный образец (1920 г.)</i>																									
2468 – 1	1	2	3	1				3				4	1					4	5		4			58	
2468 – 2	1	2	3									2	2					4	5		4			33	
2468 – 3	1	2	3									1	4					1	5		1	4			9
<i>Репродуцированный образец (1995 г.)</i>																									
2468 – 1	1	2	3	1				3				4	1					4	5		4			92	
2468 – 2	1	2	3									1	4					1	5		1	4			8

В общей сложности у всех проанализированных образцов овса (оригинальные и репродуцированные образцы) выявлено и зарегистрировано 423 типа спектра авенина.

В табл. 1 приведен пример записи спектров авенина оригинального образца овса *A. sativa* (к-2468) и его репродукции с учетом интенсивности компонентов и в порядке убывания встречаемости типов спектра.

Характеристика спектров авенина оригинальных и репродуцированных образцов коллекции овса посевного *A. sativa*. Для 31 оригинального образца идентифицирован 51 основной тип спектра (встречаемость выше 10%), из которых 37 оказались специфичными для отдельных образцов. Для характеристики современного состояния коллекции старо-местных форм овса были изучены 115 поздних репродукций этих образцов. Среди них выявлен 21 мономорфный образец (т.е. с одним типом спектра) и 17 условно мономорфных (встречаемость доминирующего биотипа 93% и выше). Для остальных репродуцированных образцов идентифицировано от 2 до 9 типов спектра авенина. Всего для них выявлено 164 основных типов спектра, из которых специфичными для отдельных образцов являются 146 спектров.

Выявление дублетных образцов. Выявлено 12 групп образцов, которые имели идентичные или близкие доминирующие типы спектра авенина (табл. 2): две группы мономорфных образцов (№№ 1 и 2), пять групп условно мономорфных образцов (№№ 3 – 7) и пять групп образцов, которые отнесены нами к генетически близким (№№ 8 – 12). Представленные в табл. 2 образцы на основе полученных результатов могут быть с разной степенью вероятности отнесены к дублетным.

Анализ изменений биотипного состава образцов овса посевного после многократных репродукций. Для характеристики генетической стабильности образцов коллекции овса проведено сравнительное изучение спектров авенина 31 оригинального образца овса посевного, хранящихся в коллекции ВИР с 20-х годов прошлого столетия, а также их репродукций, полученных путем многократных пересевов в течение 80 лет на ОС института.

Установлено, что в процессе репродукций у некоторых образцов изменялась встречаемость как основных,

Таблица. 2. Образцы овса *A. sativa* с идентичными или близкими спектрами авенина

№ группы	№ по каталогу ВИР (происхождение, разновидность)
<i>Идентичные мономорфные образцы</i>	
1	к-1302 (Московская обл., <i>v. aristata</i>) = к-2131 (Татарстан, <i>v. volgensis, v. kasanensis</i>)
2	к-2606 (Ульяновская обл., <i>v. kasanensis</i>) = к-2612 (Татарстан, <i>v. kasanensis, segetalis</i>) = к-10055 (Удмуртия, <i>v. flava, v. ligulata</i>)
<i>Идентичные условно мономорфные образцы (встречаемость основного доминирующего биотипа 93% и выше)</i>	
3	к-1255 (Саратовская обл., <i>v. aristata</i>) = к-1269 (Пензенская обл., <i>v. aristata</i>)
4	к-1705 (Киевская обл., <i>v. flava</i>) = к-1706 (Херсонская обл., <i>v. flava</i>)
5	к-1712 (Франция, <i>v. eligulata</i>) = к-1714 (Литва, <i>v. eligulata</i>)
6	к-1926 (Китай, <i>v. mongolica</i>) = к-1927 (Китай, <i>v. chinensis</i>)
7	к-4494 (Грузия, <i>v. aristata</i>) = к-4505 (Грузия, <i>v. asiatica</i>)
<i>Генетически близкие образцы (встречаемость основного доминирующего биотипа 70% и выше)</i>	
8	к-1302 (Московская обл., <i>v. aristata</i>) ≈ к-2131 (Татарстан, <i>v. volgensis, v. kasanensis</i>) ≈ к-7022 (Дагестан, <i>v. persica</i>) ≈ к-2680 (Башкортостан, <i>v. segetalis</i>) ≈ к-6526 (Воронежская обл., <i>v. aurea</i>)
9	к-2471 (Монголия, <i>v. inermis</i>) ≈ к-2472 (Монголия, <i>v. inermis</i>)
10	к-8096 (Польша, <i>v. aristata</i>) ≈ к-8614 (Тамбовская обл., <i>v. mutica</i>)
11	к-2165 (Ульяновская обл., <i>v. volgensis, v. kasanensis, v. bashkirorum</i>) ≈ к-6752 (Татарстан, <i>v. volgensis</i>) ≈ к-6793 (Татарстан, <i>v. volgensis</i>) ≈ к-9929 (Латвия, <i>v. mutica</i>)

так и минорных типов спектра (или биотипов). Минорные биотипы оригинальных образцов в ряде случаев не были обнаружены в поздних репродукциях соответствующих образцов, у которых в свою очередь были найдены новые типы спектра.

Изучение динамики биотипного состава в ходе многократных репродукций образцов старо-местных форм овса посевного показало следующее.

Для семи образцов (к-1711, к-2132, к-2195, к-4184, к-4958, к-5537 и к-7781) выявлено полное несоответствие биотипного состава репродуцированных образцов таковому соответствующих оригинальных. Репродукция образца к-7781 (1978 г., Московское отделение ВИР) по биотипному составу идентична сорту Astor. Последний в данной работе использовался в качестве стандарта. Для ряда образцов выявлено полное несоответствие биотипного состава ряда промежуточных репродукций таковому соответствующих оригинальных образцов (к-3446, репродукция 1976 г., Екатерининская ОС ВИР; к-3479 — 1977 г., Устимовская ОС ВИР; к-4718 — 1978 г., Московское отделение ВИР; к-4957 — 1978 г., Устимовская ОС ВИР и 1992 г., Екатерининская ОС ВИР; к-8077 — 1976 г., Украина). Ряд мономорфных по спектрам авенина образцов после репродукций

стали полиморфными: появились новые биотипы, отсутствовавшие у соответствующих оригинальных образцов. Из-за этого снизилась встречаемость основного биотипа. У двух образцов (к-8479, к-10475) основной биотип остался доминирующим (встречаемость выше 80%). У других образцов встречаемость основного биотипа снизилась на 70 – 90% (к-2864, к-3446, к-4718, к-8256).

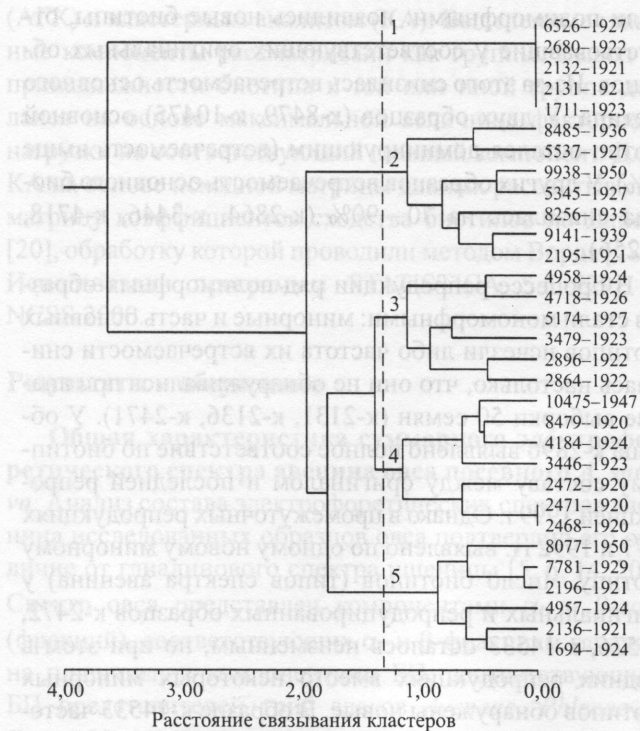
В процессе репродукции ряд полиморфных образцов стали мономорфными: минорные и часть основных биотипов исчезли либо частота их встречаемости снизилась настолько, что они не обнаруживались при анализе выборки 50 семян (к-2131, к-2136, к-2471). У образца к-2896 выявлено полное соответствие по биотипному составу между оригиналом и последней репродукцией 1999 г. Однако в промежуточных репродукциях 1977 и 1992 гг. выявлено по одному новому минорному биотипу. Число биотипов (типов спектра авенина) у оригинальных и репродуцированных образцов к-2472, к-6526, к-14533 осталось неизменным, но при этом в поздних репродукциях вместо некоторых минорных биотипов обнаружены новые. В образце к-14533 частота встречаемости основного биотипа снизилась на 34%, и он стал минорным.

У ряда полиморфных образцов наблюдали появление новых биотипов. При этом встречаемость основного биотипа снижалась на 10 – 30% (к-1694, к-2196, к-6526, к-8485, к-9938, к-14533). У трех полиморфных образцов наблюдали снижение частоты встречаемости основного биотипа на 50 – 80% (к-4957, к-5174, к-9141). У образца к-3479 встречаемость основного биотипа увеличилась на 34%. У пяти полиморфных образцов наблюдалось уменьшение количества биотипов.

Изучение динамики биотипного состава в процессе многократных репродукций позволило оценить характер и степень изменений, происходящих при поддержании коллекции старо-местных форм овса на ОС ВИР (т.е. в разных условиях среды).

Генетическая дифференциация генофонда старо-местных форм овса посевного из коллекции ВИР по спектрам авенина. Ранее дифференциация образцов (форм) осуществлялась путем визуального отбора идентичных и в разной степени сходных спектров с последующей их группировкой [4, 5, 9]. Результаты такой дифференциации могут быть несколько субъективными, особенно если предметом сравнения является большой массив информации (типы спектра, частота их встречаемости, интенсивность компонентов и т.д.). Кроме того, сам процесс сравнения большого числа образцов может быть достаточно трудоемким.

Опыт предыдущих исследований генетического разнообразия разных культур с использованием полиморфизма белков и ДНК показал эффективность применения при обработке данных сравнительного анализа большого числа спектров множественных белков и фрагментов ДНК различных методов многомерной статистики [12, 13, 15 – 17, 22]. Полученные нами результаты были обработаны методами КА и АГК.



Фенограмма кластеризации 31 оригинального образца овса посевого *Avena sativa* L.: 1, 2, 3, 4, 5 — кластеры; 6526-1927... — № по каталогу ВИР и годы репродукции

На рисунке представлена фенограмма кластеризации основных доминирующих биотипов овса с учетом интенсивности компонентов авенина. Фенограмма состоит из пяти кластеров, которые отделяются друг от друга при расстоянии связывания равном 1,3.

Пленчатые образцы овса сформировали три различных кластера — 1, 2 и 5, в то время как кластеры 3 и 4 оказались смешанными и содержали как пленчатые, так и голозерные образцы. В кластер 1 объединились пленчатые образцы с идентичными спектрами: три сорно-полевых и два возделываемых (возможно, дублетные образцы). Кластер 2 составили преимущественно пленчатые возделываемые овсы. Исключение составил сорно-полевой образец к-5537. В кластер 3 вошли образцы пленчатого овса: четыре возделываемых и один сорно-полевой, а также один голозерный. Кластер 4 состоит из пленчатых и голозерных форм. При этом голозерные овсы сформировали отдельную группу (к-2472, к-2471, к-2468). В кластер 5 объединились образцы пленчатого овса различного происхождения: четыре возделываемых и две сорно-полевые формы.

АГК позволил разделить все исследованные образцы (по их доминирующим биотипам) по степени сходства электрофоретических спектров авенина на 10 групп, соответствующих 10 значимым ГК со значениями факторных нагрузок от 0,99 до 0,40 (табл. 3). Восемь групп, включавших от 3 до 6 биотипов, были отнесены к основным.

Пять образцов группы 1 со сходными величинами факторной нагрузки относятся к пленчатым овсам, происхождением из России: четыре из них являются сорно-полевыми, три из которых — полбяные, а один отно-

сится к степной подгруппе (образец к-6526). По составу образцов группа 1 соответствует кластеру 1 на фенограмме. Исключение составил образец к-2195 происхождением из Норвегии, который относится к возделываемым овсам северо-скандинавской подгруппы (имеет величину факторной нагрузки 0,4). Группа 2 объединила три голозерные формы происхождения из Монголии (все *Avena sativa* v. *inermis*). Эта группа вошла в кластер 4.

Группа 3 (соответствует кластеру 5) состояла из пяти пленчатых образцов различного происхождения, принадлежащих к разным эколого-географическим группам, причем три образца относятся к возделываемым, а два — к сорно-полевым овсам. Группу 4 сформировали два пленчатых возделываемых образца овса происхождения из Румынии и Португалии, вошедшие в кластер 2 на фенограмме. Группа 5 оказалась смешанной, так как в ней объединились два пленчатых возделываемых и один сорно-полевой, а также один голозерный образцы овса (входят в кластер 3). Группу 6 составили пленчатые возделываемые овсы из России и Норвегии. Образцы этой группы обнаружены одновременно в двух кластерах — 2 и 5. В группу 7 объединились пленчатые образцы овса: два возделываемых овса из России и один сорно-полевой из Армении (идентифицированы в кластере 4 вместе с голозерными овсами). В группы 8 и 9 вошли по одному возделываемому овсу из Испании (пиренейская подгруппа) и Украины (южно-европейская подгруппа), соответственно, которые объединились в субкластер в кластере 3. Неоднородной по происхождению оказалась группа 10, которую сформировали три образца (все v. *aurea*): один полбяной овес из Башкирии (пленчатый сорно-полевой) и два пленчатых возделываемых — из Польши (южно-европейская подгруппа) и Германии (европейская желтозерная подгруппа).

Белковые и ДНК-маркеры в последние десятилетия успешно используются для решения многих проблем прикладной ботаники, генетики и селекции. Большие надежды возлагают на молекулярные маркеры и специалисты генных банков, поскольку молекулярные подходы хорошо зарекомендовали себя в решении ряда практических проблем. Среди них такие насущные, как контроль генетической стабильности образцов, выявление дублетных или генетически очень близких образцов, наконец, создание интегрированной информационно-поисковой системы регистрации генетического разнообразия (образцов коллекции) и управления им с использованием комплекса подходов и методов, включая молекулярные [12 – 14, 23].

Одно из широко распространенных направлений использования молекулярного полиморфизма, выявляемого электрофорезом белков и ДНК, — анализ генетической дифференциации биоразнообразия. Для этих целей используют спектры изоферментов, запасных белков, а также фрагментов ДНК [13, 14, 16 – 18, 28]. Полученные в ходе такого рода исследований результаты, как правило, могут быть использованы не только

для выяснения степени родства образцов или групп образцов между собой, но и в целях их идентификации, а также оценки состояния коллекции. Можно, в частности, получить независимую информацию о соответствии образца его паспортным характеристикам. Многолетний опыт работы ВИР с различными культурами — от злаков до плодовых — свидетельствует об эффективности запасных белков семян для решения проблем контроля генетической стабильности образцов коллекции, выявления дублетов, засорения и перепутывания образцов [9, 10, 13, 14].

В ходе наших исследований установлено следующее. Коллекция старо-местных форм овса посевного, хранящаяся в ВИР, обладает значительным полиморфизмом по спектрам авенина (идентифицировано более 400 типов спектра). Выявлены как мономорфные, так и полиморфные по спектрам авенина образцы. Проведенные ранее аналогичные исследования генетического разнообразия старо-местных мягких пшениц Крымок и Банаток показали, что они также являются высокополиморфными и представляют собой сложные популяции [1, 13]. RAPD-анализ разнообразия местных и стародавних селекционных сортов мягкой пшеницы также показал, что они обладают высоким уровнем генетического полиморфизма [17]. В нашей работе мы подтвердили высокий уровень генетического разнообразия старо-местных овсов из коллекции ВИР, что делает такие формы потенциально ценными источниками различных хозяйственных и биологических признаков [2, 3, 11, 13].

Серьезной проблемой для генных банков является наличие в коллекциях дублетных или “генетически очень близких образцов”. Селекционер в этом случае может получить дважды один и тот же материал, но под разными номерами каталога. Кроме того, на поддержание и изучение одних и тех же образцов затрачиваются дополнительные средства [7, 23]. Наши исследования выявили образцы с идентичными или близкими по составу спектрами авенина, что указывает на вероятную дублетную природу или генетическую близость таких образцов. В ходе работы по анализу полиморфизма глиадинов в коллекции пшеницы спельта ВИР были также выявлены группы образцов (как мономорфных, так и полиморфных по спектрам белков) со сходными спектрами глиадина [16], которые вполне могут быть отнесены к дублетам или к “генетически очень близким образцам”. В ВИР исследования по выявлению в коллекциях образцов с одинаковыми спектрами маркерных белков проводятся на протяжении многих лет на самых разных культурах. После дополнительного сравнительного изучения по другим признакам и в случае подтверждения дублетной природы таких образцов они могут быть переведены в ранг резервных с более редким циклом репродукции [7, 16].

Как было изложено выше, одной из важнейших задач генных банков при работе с генетическими ресурсами растений является поддержание в неизменном виде генетической конституции образцов [23]. В ВИР

спектры запасных белков семян успешно используются для анализа генетической стабильности образцов мировой коллекции после многократных репродукций, а также динамики биотипного (генотипического) состава в процессе селекции и семеноводства [1, 4 – 17, 26].

Было установлено, что в ходе неоднократных пересевов образцов частота встречаемости биотипов (генотипов), их число и состав могут меняться, что ведет к обеднению и изменению структуры генофонда. Это было показано как для самоопыляющихся, так и для перекрестноопыляющихся культур [1, 6–8, 15–17, 19, 27]. С формальной точки зрения, такие изменения приводят к потере образцами коллекции оригинальности (подлинности). Но, что более важно, такие образцы могут утратить ценные хозяйственные и биологические признаки и поэтому регистрация образцов по спектрам авенина позволяет не только полнее изучить, но и надежнее сохранить все генетическое разнообразие посевного овса.

По результатам исследований коллекционных образцов овса с использованием запасных белков семян овса сделан вывод, что одна из возможных причин изменений в биотипном составе коллекционных образцов — технические ошибки при пересевах [27]. Вполне справедливо замечено, что для поддержания генетической стабильности образцов необходимо тщательно работать с паспортными базами данных и использовать молекулярные методы контроля за процессом воспроизведения и хранения коллекционных образцов [19].

В нашей работе сравнение оригинальных образцов с их более поздними репродукциями по спектрам белков было также проведено с целью выяснения характера и степени генетических различий, идентифицируемых по локусам полиморфного белка — авенина, которые могли произойти в ходе многочисленных пересевов при поддержании коллекционных образцов овса.

Было установлено, что в процессе репродуцирования изменялась встречаемость как основных, так и минорных биотипов: минорные биотипы, идентифицированные в оригинальных образцах, иногда отсутствовали в соответствующих образцах более поздних репродукций. В ряде случаев у последних были идентифицированы биотипы, не найденные в ранних репродукциях. В то же время минорные авениновые биотипы, зарегистрированные в оригинальных образцах, часто отсутствовали в последующих репродукциях.

Данные сравнительного анализа биотипного состава соответствующих оригинальных и репродуцированных коллекционных образцов позволили оценить современное состояние коллекции овса посевного. Для большинства образцов коллекции изменения в биотипном составе носят несущественный характер. Было показано, что степень изменения в биотипном составе в значительной мере зависит от условий (места) репродукции. Аналогичные выводы были сделаны ранее в нашей лаборатории по данным анализа генетической стабильности образцов злаковых трав [8, 14]. Используемый в данной работе подход к оценке генетиче-

ской стабильности образцов овса посевного позволяет контролировать поддержание мировой коллекции и оптимизировать процесс репродукции (например, выбрать оптимальные условия и место репродукции, что особенно важно при закладке образцов на длительное хранение).

Большое число публикаций посвящено использованию запасных белков семян, изоферментов и ДНК-маркеров (RFLP, RAPD, AFLP, SSR) для выявления генетической дифференциации у видов культурных растений и их диких сородичей [12, 13, 15 – 18, 23, 28]. Сравнительный анализ спектров авенина методами АГК и КА подтвердил сложность внутривидовой классификации генофонда старо-местных форм овса посевного. Идентифицированы “группы родства”, что может быть использовано для корректировки существующей классификации и дифференциации генофонда овса посевного. Данные, представленные в табл. 3 и на рисунке, могут быть обсуждены по нескольким аспектам. Формы пленчатого овса сформировали в АГК восемь различных групп: 1, 3, 4, 6 – 10 (табл. 3). Например, интересно посмотреть, какие морфо-биологические особенности либо другие показатели (например, происхождение образцов, таксономическая принадлежность и др.) могут быть характерными для каждой из этих групп.

В группу 1 объединились формы овса, характеризующиеся примитивными признаками зерновки (опушенность, сдвоенность). Представители групп 1 и 3 — пленчатые формы, а группы 2 — голозерные. И те и другие засоряли посеы полбы и мягкой пшеницы. Что касается группы 2, то она объединила голозерные местные формы из Монголии, собранные в 1920 г. экспедицией В. Е. Писарева. Относительно этих образцов можно с уверенностью сказать, что это местные голозерные формы овса происхождением из Монголии. Другие, взятые в исследование голозерные формы, были собраны в разное время другими исследователями. Так, образец голозерного овса к-4958 поступил из Тулунской государственной селекционной станции. Мы не можем с уверенностью говорить о его происхождении. Таким образом, три изученных образца голозерного овса, о которых достоверно известно, что это местные формы, сформировали соответствующие отдельные группы как на фенограмме (см. рисунок), так и в АГК (табл. 3, группа 2).

Группа 3 объединила примитивные (сорно-полевые) формы овса и селекционные сорта, полученные отбором из местных форм. Группа 4 объединила местные и селекционные примитивные формы европейского происхождения. В группу 10 вошли образцы из Башкирии, Польши и Германии. Единственный образец из Испании выделился в отдельную группу 8 и т.д. Потребуется, видимо, дополнительный анализ других признаков для понимания причин объединения образцов в группы по данным АГК и КА. Так, выделенные по этим данным группы у пшеницы спельта в основном соответствовали систематическому и эколого-географическому делению этого вида [16].

Таблица 3. Классификация оригинальных образцов *A. sativa* по результатам анализа доминирующих спектров авенина методом АГК

№ по каталогу ВИР – год сбора	Группа по АГК	Величина факторной нагрузки	Разновидность	Происхождение	Форма овса*
6526 – 1927	1	0,99	<i>aurea</i>	Воронежская обл.	Пленчатая (в)
2680 – 1922	1	0,99	<i>bashkirorum</i>	Башкирия	Пленчатая (с/п)
1711 – 1923	1	0,99	<i>ligulata</i>	Смоленская обл.	Пленчатая (с/п)
2131 – 1921	1	0,99	<i>volgensis</i>	Татария	Пленчатая (с/п)
2132 – 1921	1	0,99	<i>segetalis</i>	Татария	Пленчатая (с/п)
2195 – 1921	1	0,40	<i>aristata</i>	Норвегия	Пленчатая (в)
2472 – 1920	2	0,82	<i>inermis</i>	Монголия	Голозерная
2468 – 1920	2	0,81	<i>inermis, chinensis</i>	Монголия	Голозерная
2471 – 1920	2	0,81	<i>inermis</i>	Монголия	Голозерная
2136 – 1921	3	0,80	<i>kasanensis</i>	Татария	Пленчатая (с/п)
1694 – 1924	3	0,77	<i>persica</i>	Иран	Пленчатая (с/п)
7781 – 1929	3	0,64	<i>mutica</i>	Польша	Пленчатая (в)
4957 – 1924	3	0,58	<i>aurea, grisea</i>	Монголия	Пленчатая (в)
8077 – 1950	3	0,53	<i>mutica</i>	Украина	Пленчатая (в)
9938 – 1950	4	0,83	<i>mutica</i>	Румыния	Пленчатая (в)
5345 – 1927	4	0,80	<i>mutica</i>	Португалия	Пленчатая (в)
4718 – 1926	5	0,78	<i>aurea</i>	Украина	Пленчатая (в)
4958 – 1924	5	0,77	<i>chinensis</i>	Монголия	Голозерная
2896 – 1922	5	0,51	<i>segetalis</i>	Кировская обл.	Пленчатая (с/п)
2864 – 1922	5	0,34	<i>aurea</i>	США	Пленчатая (в)
8256 – 1935	6	0,82	<i>mutica</i>	Краснодар. край	Пленчатая (в)
9141 – 1939	6	0,73	<i>mutica</i>	Иркутская обл.	Пленчатая (в)
2196 – 1921	6	0,66	<i>aurea</i>	Норвегия	Пленчатая (в)
3446 – 1923	7	0,84	<i>cinerea</i>	Кировская обл.	Пленчатая (в)
4184 – 1924	7	0,72	<i>montana</i>	Армения	Пленчатая (с/п)
8479 – 1920	7	0,54	<i>flava</i>	Амурская обл.	Пленчатая (в)
5174 – 1927	8	0,71	<i>cinerea</i>	Испания	Пленчатая (в)
3479 – 1923	9	0,83	<i>aurea</i>	Украина	Пленчатая (в)
5537 – 1927	10	0,82	<i>aurea</i>	Башкирия	Пленчатая (с/п)
8485 – 1936	10	0,66	<i>aurea</i>	Польша	Пленчатая (в)
10475 – 1947	10	0,43	<i>aurea</i>	Германия	Пленчатая (в)

* с/п — сорно-полевая; в — возделываемая.

Сложность интерпретации полученных в настоящей работе данных по спектрам белков в связи с проявлением агрономических признаков связана с тем, что имеющиеся в нашем распоряжении оценочные данные были получены довольно давно. В связи с этим мы приступили к оценке данного набора образцов овса по ряду важнейших селекционных признаков и, в первую очередь, по устойчивости к кислым почвам и засолению. Следует напомнить, что на большом числе примеров показано наличие связей между компонентным составом спектров проламина и такими признаками, как зимостойкость, хлебопекарные качества и ряд других [8, 9, 13, 14].

Таким образом, оказалось сложным связать характер распределение образцов по кластерам (см. рисунок) и группам, выявленным в АГК (табл. 3) с их принадлежностью к систематическим, эколого-географическим или иным группам. В то же время наблюдается достаточно хорошее соответствие результатов дифференциации образцов овса, полученной в АГК и КА.

Представленная в работе группировка образцов по спектрам авенина была проведена только по доминирующим биотипам. Аналогичная классификация может быть осуществлена по полиморфизму авенина с учетом большего числа биотипов. С классификацией репродуцированных образцов могут быть сопряжены дополнительные проблемы, связанные, в первую очередь, с возможными изменениями биотипного состава у некоторых образцов в процессе многократных репродукций. Очевидно, что как в практической работе с коллекцией, так и при построении классификаций генофонда следует отдавать предпочтение оригинальному материалу либо репродуцированному — наиболее соответствующему последнему.

Выводы

Коллекция старо-местных форм посевного овса, собранная и поддерживаемая в ВИР, обладает значительным генетическим полиморфизмом, выявляемым по спектрам авенина. В общей сложности у проанализированных образцов овса выявлено и зарегистрировано 423 типов спектра авенина, что подтверждает высокий уровень генетического разнообразия старо-местных сортов овса посевного и свидетельствует в пользу перспективности использования спектра авенина для идентификации генофонда овса.

Среди образцов овса репродукций последних лет обнаружено 12 групп с идентичными или очень близкими спектрами авенина, что указывает на их вероятную дублетную природу или генетическую близость. Для подтверждения дублетной природы данных образцов необходимы дополнительные исследования.

Выявлено, что в процессе репродукции образцов овса встречаемость биотипов и их состав могут меняться, что в дальнейшем может привести к утрате образцами ценных хозяйственных и биологических свойств.

Составлен электронный каталог белковых формул, который может быть использован в дальнейшем как

элемент паспортной базы данных. Регистрация спектров авенина поможет надежнее сохранить все разнообразие старо-местных образцов посевного овса. Спектры авенина могут также быть полезными для выявления дублетных форм и для контроля генетической стабильности образцов коллекции овса.

Спектры авенина могут быть использованы при классификации генофонда овса. Наиболее эффективно это может быть осуществлено при обработке данных по полиморфизму белков методами многомерной статистики, в частности, методами АГК и КА. Представленная группировка образцов по степени генетического сходства может быть полезна при обсуждении результатов оценки генофонда овса посевного по селекционно-ценным признакам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алпатьева Н. В., Губарева Н. К. Анализ биотипного состава староместных сортов мягкой пшеницы из коллекции ВИР в процессе хранения и репродукции // *Аграрная Россия*. — 2002. — № 3. — С. 28 — 30.
2. Вавилов Н. И. Ботанико-географические основы селекции // *Теор. осн. селекции*. — 1935. — Т. 1. — С. 17 — 73.
3. Вавилов Н. И. Центры происхождения культурных растений // *Тр. по прикл. бот. и сел.* — Л., 1926. — Т. 16, № 2, — С. 1 — 138.
4. Гаврилюк И. П., Губарева Н. К., Конарев В. Г. Электрофоретическая идентификация фатуоидов и гибридов между культурным и диким овсом // *Сел. и сем.* — 1984. — № 7. — С. 12 — 16.
5. Губарева Н. К., Юмагузина Х. А., Павлова Н. Е. Электрофорез авенина в сортовой идентификации овса // *Тр. по прикл. бот., ген. и сел.* — 1987. — Т. 114. — С. 76 — 82.
6. Идентификация сортов и регистрация генофонда культурных растений по белкам семян / Под ред. акад. РАСХН В. Г. Конарева — СПб.: ВИР, 2000. — С. 186.
7. Конарев А. В. Использование молекулярных маркеров в работе с генетическими ресурсами растений // *С.-х. биол.* — 1998. — № 5. — С. 3 — 25.
8. Конарев А. В., Перчук И. Н., Накаяма С. Использование полиморфизма проламинов в изучении исходного материала и семеноводстве кормовых злаковых трав // *Аграрная Россия*. — 2002. — № 3. — С. 63 — 65.
9. Конарев В. Г. Белки растений как генетические маркеры. — М.: Колос, 1983. — 320 с.
10. Конарев В. Г. Морфогенез и молекулярно-биологический анализ растений. — СПб.: ВИР, 2001. — 417 с.
11. Культурная флора. Овес. Том. II. Часть 3 / Ред. В. Д. Кобылянский и В. Н. Солдатов. — М.: Колос, 1994. — 367 с.
12. Лоскутов И. Г. Видовое разнообразие и селекционный потенциал рода *Avena L.* / Автореф. докт. дис. — СПб.: ВИР, 2003. — 39 с.
13. Молекулярные маркеры в решении проблем генетических ресурсов растений и селекции // *Аграрная Россия*. — 2002. — № 3. — С. 4 — 65.
14. Молекулярно-биологические аспекты прикладной ботаники, генетики и селекции. Серия: Теоретические основы селекции. Т. I / Ред. В. Г. Конарев. — М.: Колос, 1993. — 447 с.
15. Перчук И. Н., Лоскутов И. Г., Окуно К. Изучение видового разнообразия овса с использованием RAPD-анализа // *Аграрная Россия*. — 2002. — № 3. — С. 41 — 44.
16. Романова Ю. А., Губарева Н. К., Конарев А. В. и др. Исследование коллекции вида пшеницы *Triticum spelta L.* по полиморфизму глиадинов // *Генетика*. — 2001. — Т. 37, № 9. — С. 1258 — 1265.

17. Стрельченко П. П., Митрофанова О. П., Малышев Л. Л. и др. Генетическая дифференциация евразийского подвида мягкой пшеницы по данным RAPD-анализа // *Аграрная Россия*. — 2002. — № 3. — С. 11 – 22.
18. Allard R. W. Genetic basis of the evolution of the adaptedness in plants. *Adaptation in plant breeding* / Ed. P. M. A. Tigerstedt. — 1997. — P. 1 – 12.
19. Borner A., Chebotar S., Korzun V. Molecular characterization of the genetic integrity of wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm after long-term maintenance // *Theor. Appl. Genet.* — 2000. — № 100. — P. 194 – 497.
20. Cooke R. J. The standartization of electrophoresis methods for variety identification / *Biochemical Identification of Varieties (Mater. 3rd Int. Symp. ISTA, Leningrad, USSR, 1978)*. — Leningrad: VIR, 1988. — P. 14 – 27.
21. Dice L. R. Measures of the amount of ecologic association between species // *Ecology*. — 1945. — V. 26. — P. 297 – 302.
22. Kim S. J., Charbonnier L., Mosse J. Heterogeneity of avenin, the oat prolamins. Fractionation, molecular weight and amino acid composition // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1978. — V. 537, No. 1. — P. 22 – 30.
23. Molecular genetic techniques for plant genetic resources. / Rep. of an IPGRI Workshop, 9 – 11 October, 1995, Rome, Italy // Ed. Ayard W. G., Hodgkin T., Jaradat A., and Rao V. R. — IPGRI, 1997. — 137 p.
24. Pernollet J.-C., Huet J.-C., Galle A.-M., Sallantin M. N-terminal sequences of oat avenins compared to other cereal prolamins // *Biochimie*. — 1987. — № 69. — P. 683 – 689
25. Pernollet J.-C., Potier B., Galle A.-M., et al. 2D-HPLC separation, electrophoretic characterization and N-terminal sequences of oat seed prolamins // *Phytochemistry*. — 1989. — № 28. — P. 2565 – 2570.
26. Schulze A., Steiner A., and Ruckenbauer P. Variability of an Austro-Hungarian landrace of barley (*Hordeum vulgare* L.) Electrophoretic analysis of the hordeins of the Vienna sample of 1877 // *Variet. Seeds*. — 1994. — № 7. — P. 193 – 197.
27. Steiner A. M., Ruckenbauer P., Goecke E. Maintenance in genebanks, a case study: contaminations observed in the Nurnberg oats of 1831 // *Genet. Res. Crop Evol.* — 1997. — № 44. — P. 533 – 538.
28. Strelchenko P., Gubareva N., Kovaleva O., Graner A. Geographical and breeding trends within Eurasian cultivated barley germplasm revealed my molecular markers // *Plant Genet. Res. Char. Eval.* — NIAR, Tsukuba, Japan, 1998. — P. 115 – 133.
29. STATISTICA for Windows (Computer program manual). StatSoft, Inc. 2325 East 13th Street. Tulsa. Ok 74104, USA. — 1995.
30. Ward J. H. Hierarchical grouping to optimize an objective function. // *J. Am. Stat. Assoc.* — 1963. — V. 58. — P. 236 – 244 (цит. по Дюран Б., Одделл П. Кластерный анализ. — М.: Статистика, 1977. — 128 с.).

Зеленская Я. Г.;

Конарев А. В., докт. биол. наук, профессор;

Лоскутов И. Г., докт. биол. наук;

Губарева Н. К., канд. биол. наук;

Стрельченко П. П., канд. биол. наук;

Всероссийский НИИ растениеводства им. Н. И. Вавилова