

ИЗУЧЕНИЕ ВИДОВОГО РАЗНООБРАЗИЯ ОВСА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ RAPD-АНАЛИЗА

И. Н. Перчук, И. Г. Лоскутов, К. Окуно

ВВЕДЕНИЕ

Овес обладает такими полезными свойствами, как устойчивость к неблагоприятным факторам среды и болезням, высоким содержанием белка и масла в зерне и др. Род *Avena* L. характеризуется большим видовым и внутривидовым разнообразием, что позволяет находить формы с сочетанием различных признаков: высота растений, продолжительность вегетационного периода, устойчивость к болезням и показатели качества зерна [2, 3, 6, 8].

Виды овса, большинство из которых являются дикорастущими, образуют полиплоидный ряд и представлены большим разнообразием форм. В настоящее время среди исследователей не существует единого мнения в отношении системы рода овес. Для современных классификаций, основанных, главным образом, на изучении морфологических и кариологических различий, характерны две тенденции: укрупнение видов и увеличение их числа. Для рода овес такими крайними примерами могут служить классификации, где число видов ограничивалось 7-ю или достигало 34-х [4, 7]. В первом случае неоправданное укрупнение видов основано только на данных кариологии без учета географического распространения. Во втором случае часто ранг вида присваивается гибридным видам, формам и мутантам. В связи с этим актуальным является поиск новых подходов к решению вопросов родства видов и геномов, а также систематического положения видов рода *Avena* L.

Перспективными для исследований в данном направлении являются активно разрабатываемые в последнее десятилетие методы молекулярных маркеров, в том числе RAPD-анализ [1, 11, 13].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В данной работе использовались образцы из мировой коллекции овса ВИР. Всего было изучено 74 образца овса, относящихся к 20 видам различного уровня ploидности (табл. 1), из районов происхождения и наибольшего разнообразия видов данного рода преимущественно из стран бассейна Средиземного и Черного морей.

ДНК выделяли из листьев 3–5-недельных проростков по методу [10] с небольшими модификациями. RAPD-анализ проводили по методу, принятому в лаборатории генетических ресурсов растений Института агробиологических ресурсов [12]. После проведения электрофореза в агарозном геле с последующим окрашиванием его бромистым этидием амплифицированные фрагменты ДНК идентифицировали как четко выявляемые компоненты в проходящем ультрафиолетовом свете. В качестве меры сходства между образцами использовали коэффициент сопряженности по Dice [5],

который основан на учете присутствия или отсутствия компонентов. Кластерный анализ проводили на базе матрицы коэффициентов сопряженности с использованием программы NTSYS (UPGMA-алгоритм).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данном исследовании для оценки взаимосвязей между образцами разных видов овса было проверено 113 праймеров, из которых отобрали только 15, дающих наибольшее число полиморфных компонентов (табл. 2). Анализ полученных данных показал, что наиболее высокий уровень полиморфизма отмечался у диплоидных видов. Для 15 образцов этих видов было выявлено 50 полиморфных компонентов (амплифицированных фрагментов ДНК). Полиплоидные виды были менее полиморфны. Так, для 12 образцов тетраплоидных видов было выявлено только 32 компонента, а для 47 форм гексаплоидных видов — лишь 26 компонентов.

Таким образом, анализ полиморфизма видов рода овес разного уровня ploидности методом RAPD выявил четкую зависимость между степенью полимор-

Таблица 1. Характеристика образцов овса по данным RAPD-анализа

Вид	Геномный состав	Изучено образцов
Диплоидные		
<i>A. ventricosa</i> Bal.	Cv	1
<i>A. clauda</i> Dur.	Ср	1
<i>A. pilosa</i> M. B.	Ср	1
<i>A. longiglumis</i> Dur.	Al	2
<i>A. canariensis</i> Baum	Ac	1
<i>A. wiestii</i> Steud.	As	2
<i>A. hirtula</i> Lag.	As	2
<i>A. atlantica</i> Baum	As	1
<i>A. strigosa</i> Schreb.	As	4
Тетраплоидные		
<i>A. barbata</i> Pott.	AB	7
<i>A. vaviloviana</i> Mord.	AB	1
<i>A. magna</i> Mur. et Terr.	AC	1
<i>A. murphyi</i> Ladiz.	AC	1
<i>A. abyssinica</i> Hoch.	AB	2
Гексаплоидные		
<i>A. fatua</i> L.	ACD	8
<i>A. occidentalis</i> Dur.	ACD	2
<i>A. ludoviciana</i> Dur.	ACD	5
<i>A. sterilis</i> L.	ACD	6
<i>A. byzantina</i> Koch.	ACD	7
<i>A. sativa</i> L.	ACD	19
ВСЕГО		74

Таблица 2. Характеристика праймеров, использованных в RAPD-анализе

№ п/п	Последовательность	Количество полиморфных компонентов
1	CCGACAGCTT	3
2	ATGGCCTTA	2
3	CAGGCCCTTC	5
4	GGTAACGCC	2
5	GTTGCGATCC	5
6	GGCTCGTACC	3
7	GCCTCCTACC	5
8	GGGGTCGATT	2
9	GTTAGGTCGT	5
10	CTGTGCTGTG	5
11	GGTGATGTCC	4
12	GGGTTGCCGT	2
13	CGTTGGATGC	3
14	CCGATCTAGA	6
15	CGCATAGGTT	4
Общее количество компонентов		56

физма видов и уровнем плоидности. Диплоидные виды обладали наибольшим полиморфизмом по сравнению с тетра- и гексаплоидными видами овса.

Результаты кластерного анализа показали, что все изученные образцы овса разделились на шесть кластеров, два из которых (1 и 6) были основными, а остальные минорными (рис. 1). Кластер 1 состоял из двух подкластеров. Подкластер 1а объединял образцы большинства тетраплоидных видов – *A. abyssinica*, *A. barbata* и *A. vaviloviana* с геномом АВ (рис. 1, 4X). В состав подкластера 1б вошли образцы всех гексаплоидных и два образца тетраплоидных видов с геномом АС — *A. magna* и *A. murphyi*, а также образцы диплоидного вида *A. atlantica*, имеющего, предположительно, геном As (рис. 1, 6X, 4X, 2X). Следует отметить, что именно два указанных выше тетраплоидных вида рассматриваются как источники геномов А и С гексаплоидных видов овса [14]. Это может объяснить совместную кластеризацию, по нашим данным, тетраплоидных образцов с образцами гексаплоидных видов. Кластер 6, резко отличающийся от предыдущих кластеров, включал в себя только трех представителей диплоидных, наиболее примитивных, видов овса с вариантами генома С – Cv и Cp.

При сравнении данных RAPD-анализа образцов только диплоидных видов установлено, что они сгруппировались в два кластера 1 и 2 (рис. 2). При этом показатель степени сходства, соответствующий коэффициенту сопряженности по Dice, между кластерами равнялся только 0,35, что говорит о большой степени различий между образцами диплоидных видов. Кластер 1 состоял из образцов видов с различными вариантами генома А. Причем большинство представителей этих видов, для которых характерны различия в структуре кариотипов, образовали два подкластера. Первый

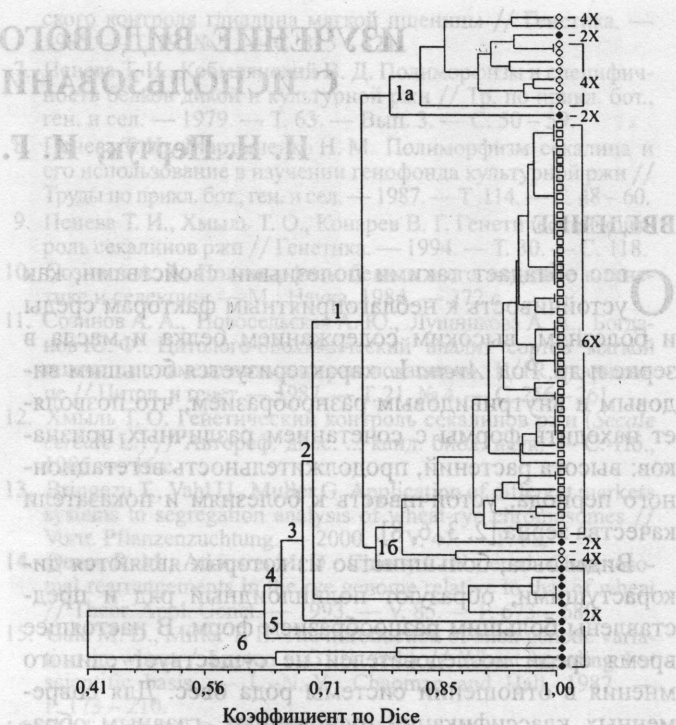


Рис. 1. Распределение образцов всех изученных видов овса на фенограмме, полученной по результатам RAPD-анализа

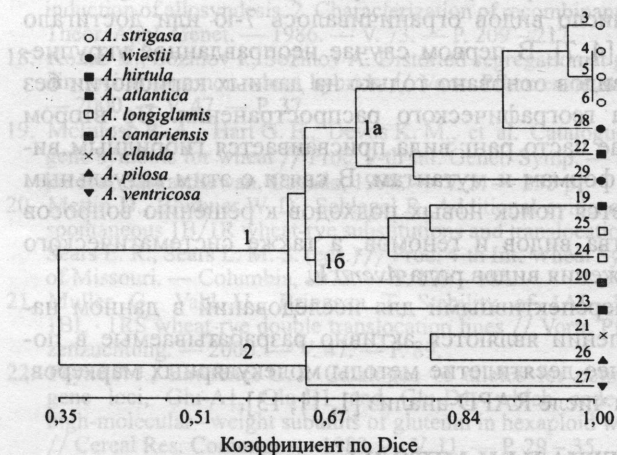


Рис. 2. Распределение образцов диплоидных видов овса на фенограмме, полученной по результатам RAPD-анализа

из них (1а) объединял представителей видов с As геномом, среди которых был культурный вид *A. strigosa*. Образцы этого вида, имеющие идентичные спектры, происходили из континентальной Европы (Испании, Франции и Германии). Второй подкластер (1б) объединял представителей видов с геномами Al и As. В то же время образец вида *A. canariensis*, обладающий геномом As, значительно отличался от образцов вида *A. longiglumis* с геномом Al. Данные о косвенном родстве этих видов подтверждают выводы, сделанные другими исследователями с использованием RFLP- и RAPD-анализов [11]. Кластер 2 объединил виды с вариантами генома С, причем выявляется четкое разделение форм с Cv и Cp геномом. Следует отметить, что

все представители видов с вариантами генома С имели низкий уровень сходства. При этом различия видов *A. pilosa* и *A. clauda*, имеющих одинаковую структуру генома Ср, также были значительны, что подтверждает правильность разделения их на два отдельных вида.

Согласно результатам RAPD-анализа образцы тетраплоидных видов были разделены на два кластера (1 и 2, рис. 3). Кластер 1 объединял образцы всех видов с одинаковой структурой генома (АВ) — *A. abyssinica* (культурный вид), *A. barbata* и *A. vaviloviana*. Было установлено, что культурный вид *A. abyssinica*, который является эндемиком Эфиопии и в целом мноморфен по морфологическим признакам, характеризовался двумя самостоятельными отличными друг от друга спектрами, входящими в одну группу. Родственные дикорастущие виды *A. barbata* и особенно *A. vaviloviana*, который является эндемиком Эфиопии, были выделены в отдельные, но близкородственные к культурному виду группы. Степень различия между всеми видами этой группы была значительной, что подтверждает правильность их систематической обособленности. Как в кластерном анализе, так и по географическому происхождению все образцы *A. barbata* разделились на три группы: в первую вошли образцы из региона Каспийского моря, которые имели идентичные спектры, во вторую группу вошли формы из региона Средиземноморья и в третью — региона Черного моря. Кластер 2 состоял из форм видов, имеющих одинаковую структуру генома (АС) — *A. magna* и *A. murphyi*. Степень различия между последними видами была также существенной, что подтверждает правильность их систематической обособленности.

Как отмечалось ранее, гексаплоидные виды оказались наименее полиморфны (рис. 4). При этом показатель степени сходства между образцами этой группы, соответствующий коэффициенту сопряженности по Дике, между кластерами был более 0,90. При анализе данных не было выявлено четких кластеров, объединяющих представителей одного вида, хотя были выделены формы, которые имели идентичные спектры. Только представители культурных видов *A. sativa* и *A. byzantina* образовали относительно компактные группы. Четких закономерностей во взаимосвязях между образцами дикорастущих гексаплоидных видов не было найдено. Такое распределение видов можно объяснить тем, что все они имеют единую структуру генома — АСД. Местные сорта *A. sativa* из Турции, объединенные в две независимые подгруппы в одной группе, и образцы из Испании, Португалии и Марокко в другой группе были идентичны. Также идентичными оказались образцы *A. byzantina* из Испании, Италии и Туниса. Кроме того, от них не отличался образец из Португалии, который первоначально был таксономически определен как промежуточная форма *A. sativa-byzantina*. Данные же RAPD-анализа показали, что его следует отнести к виду *A. byzantina*. Дикорастущие виды из стран СНГ — Казахстана, Таджикистана (были идентичны), Азербайджана, Грузии, а также не-

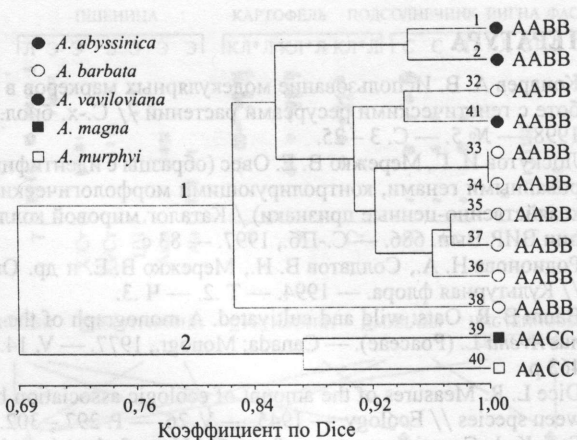


Рис. 3. Распределение образцов тетраплоидных видов овса на фенотипической диаграмме, полученной по результатам RAPD-анализа

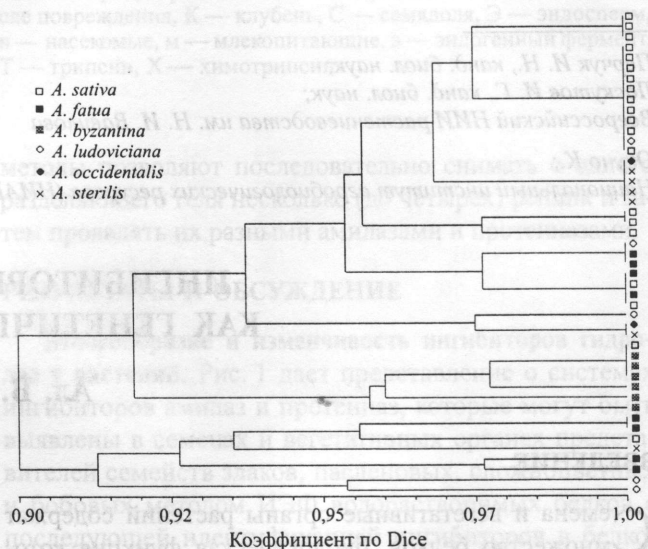


Рис. 4. Распределение образцов гексаплоидных видов овса на фенотипической диаграмме, полученной по результатам RAPD-анализа

которые образцы из Турции группировались отдельно от основной массы кластеров, объединяющих культурные и дикорастущие виды.

Таким образом, продемонстрирована возможность выявления различий между видами овса в соответствии с их геномным составом и уровнем пloidности. Анализ компонентного состава позволил выявить фрагменты ДНК, которые могут быть использованы в качестве маркеров А, В и С геномов. Было показано, что диплоидные виды обладали наибольшим полиморфизмом по сравнению с тетраплоидными и гексаплоидными видами овса. На основе этого изучения были выделены близкородственные образцы с идентичными спектрами. Установлено, что как диплоидные, так и тетраплоидные родственные виды со сходной структурой геномов объединяются в отдельные кластеры и группы, что свидетельствует об их таксономической обособленности. Данные, полученные в результате проведенного исследования, подтверждают систему классификации рода *Avena* L., принятую в ВИР [3] и дополненную в последнее время новыми данными [9].

ЛИТЕРАТУРА

1. Конарев А. В. Использование молекулярных маркеров в работе с генетическими ресурсами растений // С.-х. биол. — 1998. — № 5. — С. 3 – 25.
2. Лоскутов И. Г., Мережко В. Е. Овес (образцы с идентифицированными генами, контролирующими морфологические и хозяйственно-ценные признаки) / Каталог мировой коллекции ВИР. Вып. 686. — С.-Пб., 1997. — 83 с.
3. Родионова Н. А., Солдатов В. Н., Мережко В. Е. и др. Овес // Культурная флора. — 1994. — Т. 2. — Ч. 3.
4. Baum B. R. Oats: wild and cultivated. A monograph of the genus *Avena* L. (Poaceae). — Canada: Monogr., 1977. — V. 14. — 463 p.
5. Dice L. R. Measures of the amount of ecologic association between species // Ecology. — 1945. — V. 26. — P. 297 – 302.
6. Frey K. J. Genetic resources of oats // Use of plant introductions in cultivar development. — Part 1. — 1991. — № 17.
7. Ladizinsky G., Zohary D. Notes on species delimitation species relationships and polyploidy in *Avena* L. // Euphytica. — 1971. — V. 20, № 3. — P. 380 – 395.
8. Loskutov I. G. The collection of wild species of CIS as a source of diversity in agricultural traits // Gen. Resour. Crop Evol. — 1998. — V. 45, № 4. — P. 291 – 295.
9. Loskutov I. G. On the taxonomy of genus *Avena* L. // Proc. XVI Int. Botan. Congr., USA. — 1999. — P. 422.
10. Murray G. M., Thompson W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // Nucl. Acid Res. — 1980. — № 8. — P. 4321 – 4325.
11. Nocelli E., Giovannini T., Bioni M., and Alicchio R. RFLP- and RAPD-based genetic relationships of seven diploid species of *Avena* with the A genome // Genome. — 1999. — V. 42. — P. 950 – 959.
12. Okuno K., Ebana K., Noov B., and Yoshida H. Genetic diversity of Central Asian and north Caucasian Aegilops species as revealed by RAPD markers // Gen. Resour. Crop Evol. — 1998. — V. 45, № 4. — P. 389 – 394.
13. Perchuk I. N., Okuno K., Loskutov I. G., and Ebana K. Interspecies variability of oats by RAPD markers // Proc. XVI Int. Botan. Congr., USA. — 1999. — P. 615.
14. Thomas H. New species of *Avena* // Proc. 3rd Int. Oat Conf., Lund, Sweden. — 1989. — P. 18 – 23.

Перчук И. Н., канд. биол. наук;

Лоскутов И. Г., канд. биол. наук;

Всероссийский НИИ растениеводства им. Н. И. Вавилова

Окуно К.;

Национальный институт агробиологических ресурсов (НИАР), Цукуба, Япония