

ФЕНОТИПИЧЕСКОЕ И ГЕНОТИПИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ *LATHYRUS SATIVUS* L. ИЗ КОЛЛЕКЦИИ ВИР

М.О. Бурляева, М.А.Вишнякова

ГНУ ВИР Россельхозакадемии, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: m.burlyueva@vir.nw.ru

Изучены образцы введенного в культуру вида *Lathyrus sativus* L. из коллекции ВИР по комплексу морфологических и фенологических признаков и посредством RAPD-маркирования. По результатам канонического и дискриминантного анализов в качестве значимых морфологических признаков (из 30 изученных) для классификации внутривидового разнообразия выделены тип куста, окраска семенной кожуры, диаметр и ширина крыльев стебля, толщина боба и высота семени. При этом обнаружена их взаимосвязь с происхождением образца. Группирование образцов на основе RAPD-анализа отразило наличие двух подвидов и нескольких экологических типов почти в соответствии с имеющейся внутривидовой классификацией. В целом данные молекулярного анализа отражают эколого-географическую дифференциацию изученных образцов и их филогению. По степени генетической оригинальности – частоте встречаемости аллелей – выявлены образцы с уникальными аллелями, которые могут оказаться полезными для селекции.

Ключевые слова: *Lathyrus sativus*, чина посевная, фенотипическое и генетическое разнообразие, RAPD-анализ, коэффициент генетической оригинальности.

Введение

Lathyrus sativus L. (чина посевная) – однолетняя бобовая культура, имеющая обширный ареал (рис. 1). Основные районы ее возделывания – страны с засушливым и полусушливым климатом. В диком или одичавшем виде встречается крайне редко: в степях около Каспийского моря, в окрестностях г. Ленкорань, в северных районах Индии и как сорное растение – среди злаковых и бобовых культур в западном Средиземноморье и в горных районах Юго-Западной Азии (Памир).

В коллекции Всероссийского НИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова (ВИР) вид представлен 950 образцами практически из всех частей ареала. Он имеет важное экономическое значение в качестве кормовой и отчасти продовольственной и технической культуры. Выявление внутривидового полиморфизма культуры – важная составляющая процесса изучения коллекции. Понимание эволюции вида, его географии, путей расселения и истории доместики важно для селекционного улучшения культуры.

Существует несколько внутривидовых классификаций чины посевной, из которых наиболее информативной мы считаем классификацию, созданную в ВИР монографом вида Ф.Л. Залкинд (1937, 1953). В ее основе – эколого-географическая дифференциация вида, выявляющаяся по комплексу морфологических и хозяйственно-биологических признаков. Географическая обособленность ареалов растений с темноокрашенными и светлоокрашенными семенами и цветками дала основание для выделения двух подвидов (климатипов): *ssp. asiaticus* и *ssp. europaeus*. Впоследствии эти подвиды были узаконены Т.Н. Смекаловой (1991) в соответствии с современными требованиями ботанической номенклатуры как *ssp. sativus* и *ssp. albus* Smekal.

Ф.Л. Залкинд (1937) выделила 30 разновидностей, объединенных в 7 групп – географических ветвей или экологических типов (рис. 2). Она отметила, что разновидности не имеют строго ограниченных ареалов, хотя имеют некоторую определенность и закономерности в распределении.



Рис. 1. Ареал *L. sativus* (по: Ф.Л. Залкинд, 1937).

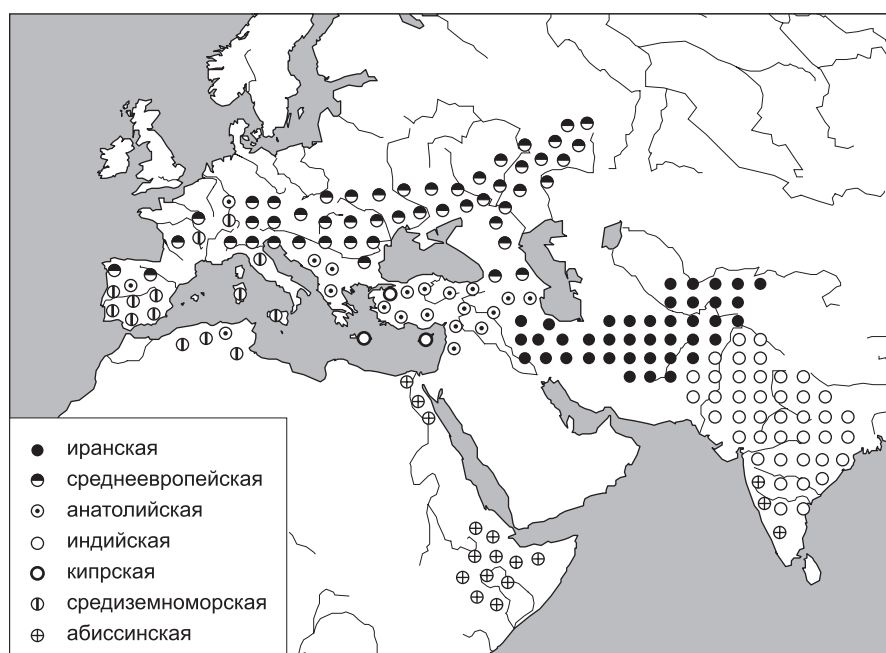


Рис. 2. Географическое распространение групп разновидностей *L. sativus* (по: Залкинд Ф.Л., неопubl. данные).

Первичным центром формообразования вида считается Северная Индия и прилегающие к ней районы – там до настоящего времени сохранились эндемичные наиболее примитивные формы. Средиземноморье – район вторичного

формообразования культурного типа чины, при этом прибрежные и горные экотипы сильно различаются. Чины из горных районов Испании и Эфиопии по своим морфологическим признакам сходны с азиатскими (индийскими)

чинами, что говорит о связи между ними и о том, что ранее ареал азиатских чин был более обширным и охватывал все древнее Средиземноморье (Залкинд, 1937).

Судя по классификации Ф.Л. Залкинд (1937, 1953) и последующим исследованиям, чина посевная отличается значительным внутривидовым полиморфизмом (Przybylska *et al.*, 1998; Tadesse, Bekele, 2003; Polignato *et al.*, 2005; Hanbury *et al.*, 2006; Sammour *et al.*, 2007 и др.). Это подтверждено на уровне белковых и молекулярных маркеров (Croft *et al.*, 1999; Costa *et al.*, 2007 и др.). Данные, полученные на основе анализа изоферментов, свидетельствуют о большом полиморфизме мирового разнообразия чины посевной, обнаруживая наличие генетического сходства образцов из различных географических точек земного шара и нередко – отсутствие генетической близости образцов одного географического происхождения (Gutierrez-Marcos *et al.*, 2006). Высокая изменчивость белковых фракций у образцов одного географического происхождения была показана и другими исследователями (Roy *et al.*, 2001). AFLP-маркеры выявили значительное разнообразие даже у популяций, растущих в сравнительно небольшом районе Центральной Италии, при этом принципиальное генетическое различие выявилось между мелко- и крупносемянными формами (Tavoletti, Iommarini, 2007).

Начато картирование генома чины посевной с целью определения маркеров хозяйственно ценных признаков. Определено несколько групп сцепления RAPD-маркеров, окраски цветка и двух изоферментов (Choudhury, Slinkard, 1999). На образцах, устойчивых и восприимчивых к *Mycosphaerella pinodes* (Berk. and Blox.) Vestergren, показана перспективность PCR-RFLP-маркеров для маркирования генов устойчивости к этой болезни (Skiba *et al.*, 2003).

Целью нашего исследования было изучение внутривидового разнообразия чины посевной из коллекции ВИР на основе анализа фенотипических признаков, а также поиск RAPD-маркеров, выявляющих внутривидовую дифференциацию генофонда. Кроме того, в наши задачи входило определение частоты встречаемости редких аллелей с помощью коэффициента генетической оригинальности (КГО) у представителей разных эколого-географических групп.

Материал и методы

Растительный материал. Исследовали 35 образцов *L. sativus*, отобранных из коллекции ВИР, принадлежащих по классификации Ф.Л. Залкинд (1937, 1953) к различным эколого-географическим группам: (*средиземноморской* – страны Средиземноморья; *среднеевропейской* – Средняя Европа и европейская часть России, Закавказье (светлосемянные формы); *кипрской* – о-ва Кипр и Крит; *анатолийской* (*псевдоазиатская*) – Малая Азия, Закавказье (темносемянные формы), горная Кабилия; *иранской* – Афганистан, Иран, Средняя Азия; *абиссинской* – Эфиопия, Египет; *индийской* – Индия) и одного представителя вида чина красная *L. cicera* L. (табл. 1). Изученные образцы являются типовыми для вышеперечисленных групп чины посевной.

Фенотипическое изучение образцов проводили на Екатерининской опытной станции ВИР (Тамбовская область) и в Пушкинском филиале ВИР (г. Пушкин) в 2005 и 2007 гг. Анализировали по 10 растений каждого образца по 30 признакам: высота растения (см), тип куста, число ветвей первого и второго порядка, высота до прикрепления первого боба (см), диаметр стебля (мм), длина среднего междоузлия (см), длина листа (см), ширина листа (мм), длина листочка (см), ширина листочка (см), длина цветоноса (см), длина чашечки (мм), длина венчика (мм), окраска венчика (балл), число бобов на растении (шт.), длина боба (мм), ширина боба (мм), толщина боба (мм), число семян в бобе (шт.), масса 1000 семян (г), длина семени (мм), ширина семени (мм), высота семени (мм), окраска семенной кожуры (балл), окраска рубчика (балл), продолжительность периодов: всходы–начало цветения, всходы–налив бобов, всходы–созревание (дни). Всего было проанализировано 1440 растений.

Выделение ДНК. Выделение ДНК осуществляли по методике S. Edwards с соавт. (1991) из 10–14-дневных проростков индивидуальных растений каждого образца, а также смеси из 5–10 проростков одного образца. Для полимеразной цепной реакции использовали наборы реактивов производства «Диалат ЛТД». Реакционная смесь для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) объемом 25 мкл содер-

Таблица 1

Список изученных образцов

Каталог ВИР	Происхождение	Эколого-географическая группа	Примечание
704(1)	Италия	средиземноморская	
704(2)	Италия	средиземноморская	
705	Эфиопия	средиземноморская	
773	Испания	средиземноморская	
775	Испания	средиземноморская	
390	Кипр	кипрская	
393	Кипр	кипрская	
401	Восточный Кипр	кипрская	
407	Кипр	кипрская	
408	Кипр	кипрская	
772	Испания (Севилья)	анатолийская	
800(1)	Малая Азия	анатолийская	Крупные семена
800(2)	Малая Азия	анатолийская	Мелкие семена
801(1)	Малая Азия	анатолийская	Крупные семена
801(2)	Малая Азия	анатолийская	Мелкие семена
413	Алжир	анатолийская	
415	Алжир	анатолийская	
416	Алжир	анатолийская	
592	Эфиопия	абиссинская	
701	Эфиопия	абиссинская	
964	Грузия	среднеевропейская	
965(1)	Грузия	среднеевропейская	Белые семена
965(2)	Грузия	среднеевропейская	Бурые семена
240	Германия	среднеевропейская	
936	Аргентина	среднеевропейская	
1218	Украина	среднеевропейская	
1246	Россия	среднеевропейская	
13	Иран	иранская	
841	Памир	иранская	
998	Памир	иранская	
22(1)	Индия	индийская	Мелкие семена
22(2)	Индия	индийская	Крупные семена
583(1)	Индия	индийская	Низкорослые растения
583(2)	Индия	индийская	Высокорослые растения
1684	Сирия		<i>L. cicera</i>

жала 50 нг геномной ДНК, 10 мМ TAG буфера pH 8,6 25м Mg²⁺, 0,2 мМ каждого dNTPs, 1 мкМ праймера, 0,2 ед. Taq-полимеразы.

RAPD-анализ. Использовали 14 стандартных десятинуклеотидных праймеров серии

OPA, OPH, OPK, OPC (Operon Technologies, USA): OPA10, OPA11, OPA14, OPA16, OPA19, OPH2, OPH3, OPH4, OPH6, OPH9, OPK4, OPK8, OPK9 и OPK10 (Operon Technologies, USA). ПЦР проводили в амплификаторе Teche (США) в

следующих условиях: предденатурация – 5 мин при 94 °С; 38 циклов: денатурация – 30 сек при 94 °С, отжиг праймера – 45 сек при 37 °С и синтез – 50 сек при 72 °С; элонгация – 10 мин при 72 °С. Продукты реакции разделяли электрофорезом в 1,8 %-м агарозном геле в 1 × TAE буфере с добавлением этидиум бромид и фотографировали с помощью Transilluminator UVP Bio Doc-It™ Imaging System, модель M-20. Размеры амплифицированных фрагментов определяли относительно маркера 1 kb SmartLader 1700-02. RAPD-анализ всех образцов проводили в 2–3 повторностях, и только в случае воспроизводимости фрагменты включались в анализ.

Статистический анализ данных. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакетов программ STATISTICA 6.0, NTSYSpс 2.02, TREECON и WINCLADA-NONA.

Статистический анализ включал составление бинарных матриц по каждому из праймеров, в которых отмечалось «присутствие» (1) или «отсутствие» (0) фрагментов с одинаковой молекулярной массой на электрофореграмме. Каждый RAPD-фрагмент рассматривался как отдельный генетический локус. На основании суммарной матрицы RAPD-спектров с помощью компьютерного программного пакета NTSYSpс 2.02 были определены генетические дистанции между исследуемыми образцами. Для построения кладограммы, отражающей генетическое сходство образцов или филогенетическую близость таксонов, применяли метод невзвешенного парногруппового кластерного анализа с арифметическим усреднением (UPGMA) с использованием программы TREECON. Для построения наиболее оптимального дерева (критерий оптимальности – максимальная парсимония) использовали программу WINCLADA-NONA.

Изучение образцов по встречаемости у них редких аллелей проводили при помощи коэффициента генетической оригинальности (КГО) в Excel из пакета Microsoft Office 2003 и в пакете программ STATISTICA 6.0 (Потокина, Александрова, 2008).

Анализ морфометрических признаков осуществляли с помощью дискриминантного и канонического анализа с использованием программы STATISTICA 6.0.

Результаты и обсуждение

Для выявления из изученного нами комплекса 30 морфологических и фенологических признаков, значимых для внутривидовой классификации чины посевной, был проведен пошаговый дискриминантный анализ с последовательным исключением признаков. Это позволяет произвести перегруппировку данных и вычислить значения дискриминантной функции, которая отличается минимально возможной трансгрессией своих распределений в исследуемых совокупностях (группах). Использование полученной дискриминантной функции позволяет отнести отдельно взятое наблюдение (образец) к одной из этих совокупностей. Достоверные различия образцов по группам были получены по 7 признакам: тип куста, окраска семенной кожуры, диаметр стебля, ширина листа и крыльев стебля, толщина боба и высота семени. Число переменных в дискриминантной функции (модели) было равно 7, значения лямбды Уилкса равнялось 0,014, т. е. мощность дискриминации была близка к 1.

При анализе расположения образцов по группам в классификационной матрице дискриминации (табл. 2.) было отмечено, что ряд образцов, первоначально отнесенных по классификации Ф.Л. Залкинд (1937) к определенной эколого-географической группе, находятся в других группах. При рассмотрении квадратов расстояний Махаланобиса для данных случаев было обнаружено, что эти образцы находятся примерно на одинаковом расстоянии от разных групп. Например, образцы из Грузии, относящиеся к среднеевропейской группе, располагаются примерно на равных расстояниях как от средиземноморской, так и от иранской групп, более тяготея к первой. Подобная картина в распределении образцов наблюдалась и для К-800 и К-801 из Малой Азии, которые были близки и к анатолийской, и среднеевропейской группе. Такое положение данных образцов можно объяснить отсутствием значительных различий по изученным нами признакам между вышеперечисленными группами. Возможно также, что образцы из Грузии являются гибридами образцов из иранской и средиземноморских групп. О возможности естественной гибридизации (ауткроссинга) и низком проценте самоопыле-

Таблица 2

Классификационная матрица

Группы	Корректное определение (%)	Группы (по результатам классификации)						
		1	2	3	4	5	6	7
1 – средиземноморская	57,2	4	0	3	0	0	0	0
2 – абиссинская	100,0	0	2	0	0	0	0	0
3 – среднеевропейская	71,4	0	0	5	2	0	0	0
4 – анатолийская	83,3	0	0	0	5	0	0	1
5 – кипрская	100,0	0	0	0	0	5	0	0
6 – индийская	100,0	0	0	0	0	0	5	0
7 – иранская	100,0	0	0	0	0	0	0	4
Всего	85,7	4	2	8	7	5	5	5

ния у европейского климата упоминается и в исследовании Ф.Л. Залкинд (1937). Степень аут-кроссинга у вида *L. sativus*, по оценкам разных авторов, может варьировать от 17 % (Дорофеев и др., 1990) до 36 % (Choudhury, Slinkard, 1999). В целом распределение образцов в полученной нами классификационной матрице практически совпадает с их внутривидовой классификацией, данной Ф.Л. Залкинд (1937), которой мы пользуемся при систематизации коллекции (табл. 1).

Интересно отметить, что включенный в исследование близкий к чине посевной вид чина красная (*L. cicera* L.), характеризующийся широкой амплитудой изменчивости признаков (Залкинд, 1937) и по классификациям некоторых исследователей относящийся к *L. sativus*, не занимал обособленного положения на графике и располагался примерно на одинаковом расстоянии от анатолийской и иранской групп и в классификационной матрице оказался в иранской группе.

Для выяснения закономерностей межгрупповой вариации признаков был проведен канонический анализ. В результате были выделены две основные канонические оси. С первой канонической осью (R1) были связаны признаки: тип куста, окраска семенной кожуры, диаметр стебля, ширина листа и крыльев стебля, толщина боба, а со второй (R2) – число семян в бобе и высота семени.

Таким образом, и канонический, и дискриминантный анализы выявили, что значимыми признаками при классификации внутривидового разнообразия образцов являются тип куста,

окраска семенной кожуры, диаметр стебля и ширина крыльев стебля, ширина листа, толщина боба и высота семени. При этом в ходе проведенного статистического анализа всех изученных признаков была выявлена их четкая взаимосвязь с происхождением образца. По своим морфометрическим признакам образцы объединились в несколько групп (рис. 3).

Образцы из Италии, Кипра, Испании и образец из Алжира обладают максимальной высотой растений, сильной ветвистостью, самыми широкими крыльями стебля, светлыми семенами, средней высотой семян и бобов (средиземноморская, анатолийская группы). Образцы из Сирии, Ирана, Памира и Индии отличаются низкорослостью, слабой ветвистостью, узкими крыльями стебля, темными семенами и средней высотой семян и бобов (индийская, иранская группы). В левой части графика находятся местные сорта из Алжира, Эфиопии, Украины, Германии, России, Аргентины, имеющие средние показатели по параметрам: высота растения, ветвистость, ширина крыльев стебля и окраска семенной кожуры, плоские бобы и семена (анатолийская, абиссинская, среднеевропейская группы). Образцы из Грузии (среднеевропейская группа), имеющие схожий габитус растений и относящиеся к среднеевропейской группе, отличаются от последних максимальной высотой семян и толщиной бобов.

Таким образом, по совокупности морфометрических признаков четко дифференцированными оказались 4 группы образцов: 1) из Западного и Среднего Средиземноморья (Испа-

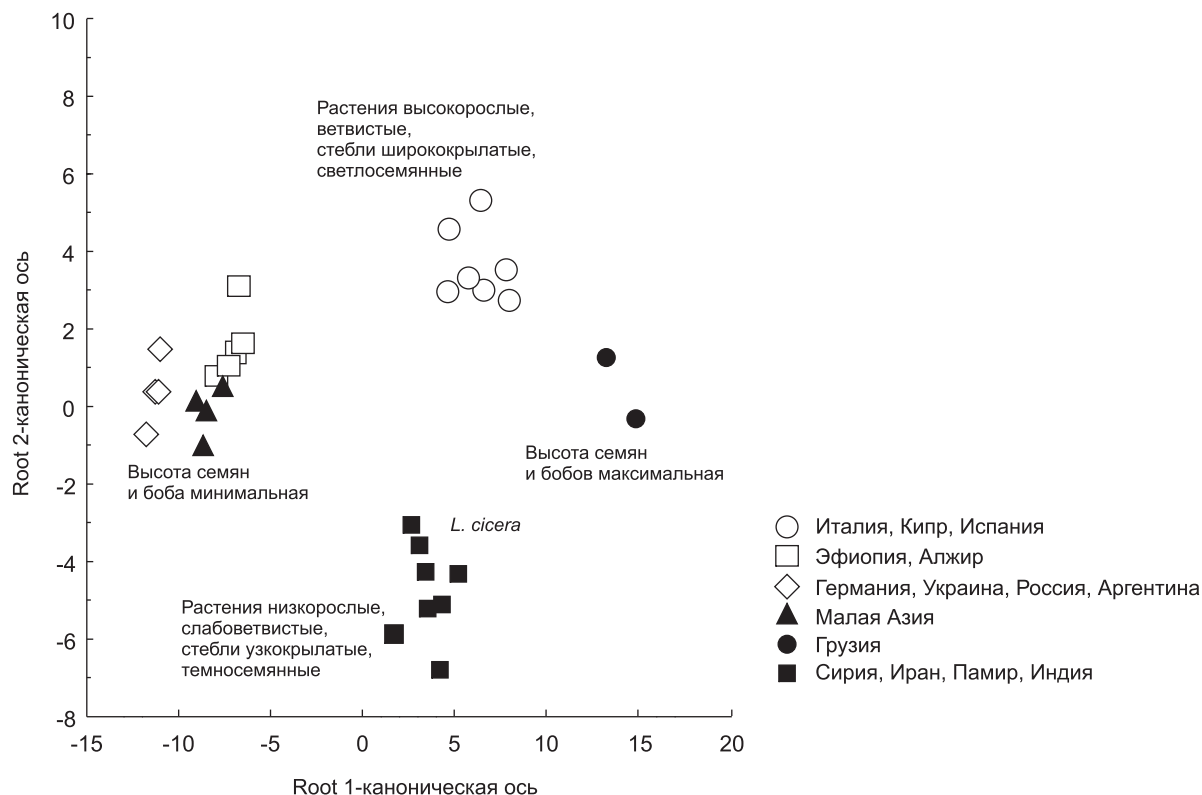


Рис. 3. Распределение образцов *L. sativus* разного географического происхождения и образца *L. cicera* в пространстве двух канонических осей по результатам морфометрической оценки.

ния, Италия, Кипр); 2) из Грузии; 3) из Средней, Центральной, Юго-Западной и Южной Азии; 4) из Северной Африки, Средней и Восточной Европы и Малой Азии (условно Восточного Средиземноморья). Образец из Аргентины, попавший в группу образцов из Германии, Украины и России, является селекционным сортом и, видимо, имеет европейское происхождение. Такое распределение образцов не полностью совпадает с экологическими типами, выделяемыми по Ф.Л. Залкинд (1937). Оно выявляет более крупные группировки, но в целом не вступает в противоречие с ее классификацией. В нашем исследовании объединились образцы из близких средиземноморской и кипрской групп; сравнительно смешанную группу сформировали местные сорта из географически близких иранской и индийской групп, а образцы из анатолийской, абиссинской и среднеевропейской групп образовали ассоциации с не очень строго определенной спецификой и значительной трансгрессией, что характерно для форм с промежуточными или перекрывающимися признаками и вполне

согласуется с пограничным положением их ареала. Как переходную между азиатским и европейским типами анатолийскую (псевдоазиатскую) группу характеризует и Ф.Л. Залкинд (1937). Образцы из Грузии отличались от других представителей среднеевропейской группы, к которой они относятся, и проявляли некоторые признаки иранской (азиатской) группы.

Безусловным результатом в выполненном нами анализе фенотипического разнообразия чины посевной оказалось деление вида на две основные группы (климатипы, или подвиды), признаваемые всеми систематиками культуры: европейскую и азиатскую (*ssp. albus* и *ssp. sativus*). При этом очевидно, что с окраской семян и цветков – основными признаками, которые наряду с географическим обособлением определяют это деление, связан еще ряд признаков: размеры семян, бобов, крыльев стебля, диаметр стебля, тип ветвления и др.

Проведенное с помощью RAPD-анализа молекулярно-генетическое маркирование изученных образцов выявило значительное внутри-

видовое разнообразие генома чины посевной (рис. 4). Большинство образцов имели свой определенный спектр амплифицированных RAPD-продуктов, отличающийся от других числом фрагментов, их размером и степенью выраженности (интенсивностью). Основная зона разделения компонентов находилась в пределах 150–2500 п.н. Девять праймеров выявили наличие 28 мономорфных фрагментов у всех исследуемых образцов. Данные мономорфные фрагменты могут считаться RAPD-маркерами для всех представителей *L. sativus*. Один праймер показал наличие фрагментов, характерных для группы образцов азиатского происхождения, – Памира, Индии, Малой Азии (ОРА-16–1300 п.н.) – азиатского типа или подвида.

На основе идентифицированных индивидуальных RAPD-спектров были составлены базы данных амплифицированных фрагментов ДНК. С помощью статистических программ определен уровень внутривидового полиморфизма изученных образцов и построена кладограмма UPGMA (рис. 5).

Обособленное положение на кладограмме заняли образцы из Индии, Памира, имеющие невысокий рост, тонкие стебли, мелкие темноокрашенные семена, относящиеся к подвиду *sativus* (индийская, иранская и 1 образец из анатолийской (псевдоазиатской) групп разновидностей).

Большинство исследуемых образцов объединились в большую кладу, в которую вошли образцы из подвида *albus* и анатолийской группы подвида *sativus*. Эта клада, в свою очередь, разделилась на две субклады.

В одной из них расположились типичные средиземноморские чины из Италии и Кипра (высокорослые, с толстыми, ширококрылатыми стеблями и крупными светлоокрашенными семенами) – средиземноморская группа разновидностей. Образец из Ирана (среднерослый, тонкостебельный, с узкими крыльями стебля, со средними темноокрашенными семенами) – иранской группы разновидностей – оказался близким к образцам из Испании (высокорослые, со стеблями средней толщины и крупными светлоокрашенными семенами) – средиземноморской группы.

Во второй субкладе оказались образцы из Грузии и Алжира (высокорослые, со стеблями

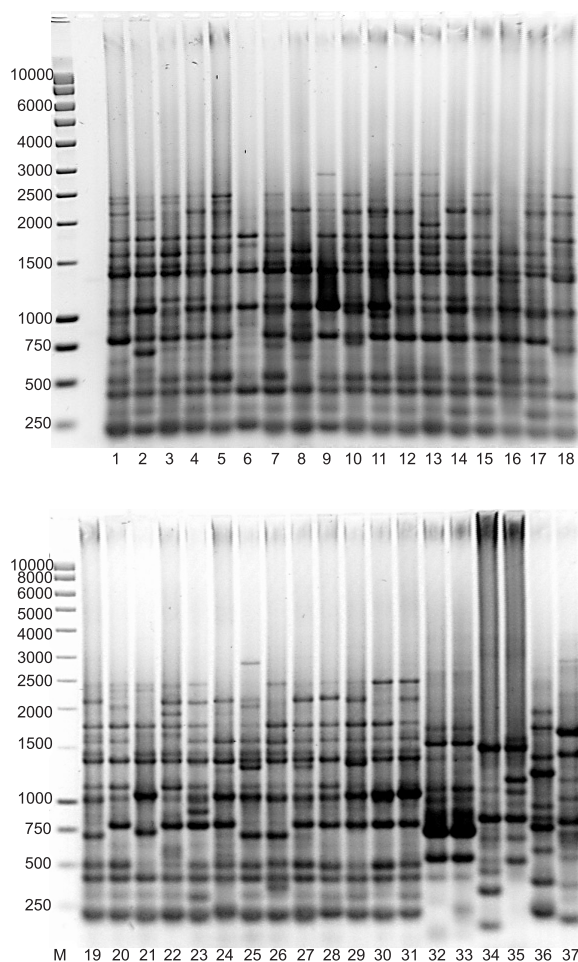


Рис. 4. Электрофоретические спектры RAPD-фрагментов 31 образца *L. sativus* (1–31) разного происхождения и 2 образцов *Pisum sativum* L. (32, 33), 2 образцов *Vicia faba* L. (34, 35), 1 образца *Lens culinaris* Medik. (36) и 1 образца *Vicia ervilia* Willd. (37), полученные с помощью праймера ОРК 09.

М – маркер молекулярной массы SmartLader 1700-02; 1 – к-704 (1) (Италия); 2 – к-704 (2) (Италия); 3 – к-705 (Италия); 4 – к-773 (Испания); 5 – к-775 (Испания); 6 – к-240 (Германия); 7 – к-390 (Кипр); 8 – к-393 (Кипр); 9 – к-401 (Кипр); 10 – к-407 (Кипр); 11 – к-408 (Кипр); 12 – к-772 (Испания); 13 – к-800 (Малая Азия); 14 – к-801 (Малая Азия); 15 – к-592 (Эфиопия); 16 – к-701 (Эфиопия); 17 – к-413 (Алжир); 18 – к-415 (Алжир); 19 – к-416 (Алжир); 20 – к-965(1) (Грузия); 21 – к-965(2) (Грузия); 22 – к-1684 (Сирия); 23 – к-13 (Иран); 24 – к-841 (Памир); 25 – к-998 (Памир); 26 – к-22(1) (Индия); 27 – к-22(2) (Индия); 28 – к-583 (Индия); 29 – к-936 (Аргентина); 30 – к-1218 (Украина); 31 – к-1246 (Россия).

средней толщины и темноокрашенными средними по величине семенами), а также *L. cicera*. В эту же субкладу попали образцы из Германии и Кипра (среднерослые, толстостебельные, со средними светлоокрашенными семенами) –

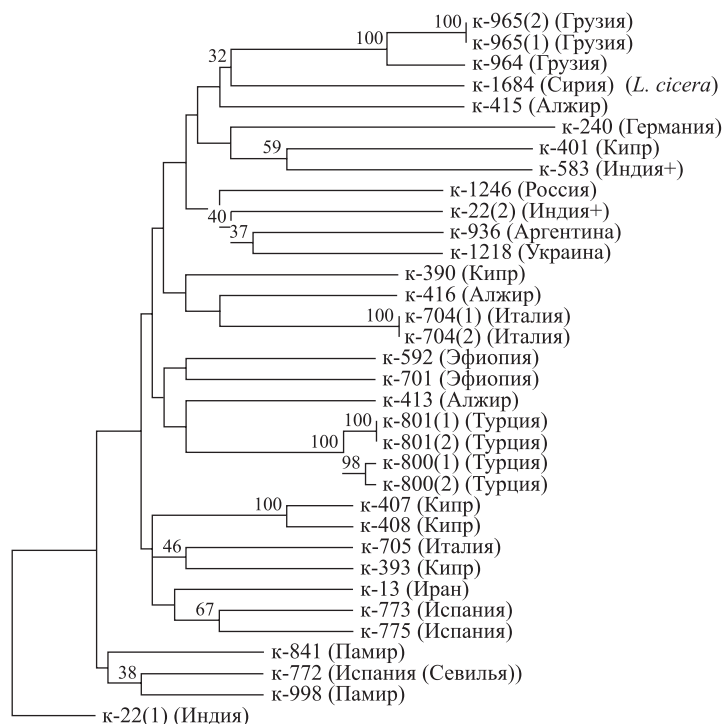


Рис. 5. Кладограмма UPGMA, полученная на основе сравнительного анализа 185 полиморфных амплифицированных RAPD-фрагментов образцов *L. sativus* (из разных эколого-географических групп) и *L. cicera*. («+» – естественные гибриды F₁ указанных образцов с образцами европейского подвида).

1 – средиземноморская группа – страны Средиземноморья; 2 – средневропейская – Средняя Европа и европейская часть России; 3 – кипрская – о-ва Кипр и Крит; 4 – анатолийская – Малая Азия, Закавказье, горная Кабилия; 5 – иранская – Афганистан, Иран, Сирия, Средняя Азия; 6 – абиссинская – Эфиопия, Египет; 7 – индийская – Индия.

типичные представители средневропейской и кипрской групп и естественные гибриды первого поколения индийских образцов (низкорослые, со стеблями средней толщины и крупными темными семенами). Кроме того, во вторую группу вошли сорта из Украины и Аргентины (среднерослые, со стеблями средней толщины и средними светлоокрашенными семенами), что по большинству черт характерно для растений из средневропейской группы, которые, очевидно, и послужили исходным материалом для данных сортов.

Также в одной из ветвей этой субклады объединились образцы анатолийской группы из Алжира и Малой Азии (высокорослые, со стеблями средней толщины и крупными темноокрашенными семенами).

Таким образом, RAPD-анализ выявил, во-первых, разделение изученных образцов на два подвида, один из которых представлен более примитивными азиатскими формами, а второй – более эволюционно продвинутыми европейскими, и, во-вторых, промежуточные черты анатолийской (псевдоазиатской) группы. Четкая дифференциация на два подвида выявилась и при анализе полиморфизма ITS1-5.8S-ITS2 рибосомного оперона *L. sativus*, предпринятом ранее с участием одного из наших авторов (Рыжова и

др., 2009). Отличное от ожидаемого положение некоторых образцов не является, на наш взгляд, артефактом, во-первых, в силу возможной гибридизации, а, во-вторых, в силу известного положения об отсутствии у некоторых экологических типов строгой приуроченности к определенным районам (рис. 2) (Залкинд, 1937) и согласуется с данными о наличии генетического сходства образцов из различных географических точек земного шара (Gutierrez-Marcos *et al.*, 2006). Имея ряд фенотипических отличий (окраска цветков и семян) от типичного для данного региона экотипа, такие образцы (экотипы) могут островками встречаться в регионах с соответствующими экологическими условиями. В целом при сопоставлении топологии кладограмм, полученных на основе RAPD-анализа, с совокупностью морфологических признаков, учитываемых при эколого-географической классификации, было отмечено, что большинство образцов распределено по группам, соответствующим географическим ветвям или экологическим типам. Исходя из этого можно утверждать, что RAPD-анализ может быть использован для выявления образцов со сходной экотипической организацией.

Для реконструкции эволюционных отношений между группами образцов нами было построено оптимальное дерево согласия, где в

качестве критерия оптимальности использовали максимальную парсимонию.

Образец из Индии к-22(1), произрастающий в районе предковых диких форм и имеющий наибольшее число плезиоморфных признаков, резко отличающих его от культурных форм: мелкие интенсивно-синие цветки, мелкие семена, сильно выраженная антоциановая окраска на всем растении, растрескивающиеся бобы и осыпающиеся семена – признаки «дикого» типа, взяли в качестве внешней группы. Доля гомоплазии от общего числа изменений признаков была равна $C_1 = 28$, число синапоморфий на кладограмме $R_1 = 48$ (рис. 6).

Полученная схема, на наш взгляд, отображает филогенетические отношения между изученными образцами. Наиболее близкими к укорененному каталогу оказались образцы из Памира (иранская группа) и к-772 (анатолийская группа). Близка к ним ветвь с образцами из Италии (средиземноморская группа), Алжира (анатолийская группа) и к-583 из Индии (естественный гибрид). Затем дерево образует две равноценные ветви. В одной из них группируются образцы из средиземноморской, кипрской и анатолийской групп, в другой – из Грузии (среднеевропейской группы) и Ирана. Вид

L. cicera оказался близок к образцам из Грузии. По Ф.Л. Залкинд (1937), вхождение в культуру чины посевной шло от индийских тонкостебельных темно- и мелкосемянных образцов, причем либо сразу в нескольких направлениях в сторону Закавказья, Средиземноморья и в Африку (к высокорослым растениям с темными семенами средних и крупных размеров), либо сначала только в средиземноморские страны, где в горных условиях растения остались тонкостебельными, темно- и мелкосемянными, а в равнинных районах в силу мутаций и окультуривания появились растения с толстыми стеблями и крупными светлоокрашенными семенами. В дальнейшем в результате естественных скрещиваний между индийскими (или горными эфиопскими) и средиземноморскими образцами возникли группы образцов Закавказья, Малой Азии, Африки, Европы. Характер кладограммы позволяет предположить, что более вероятным был первый вариант. Однако при этом прослеживается особая роль Кавказа как промежуточного этапа пути при расселении вида из Южной Азии в Средиземноморье. Об этом свидетельствует близость иранских и грузинских образцов, а также генетическое сходство последних с европейскими формами.

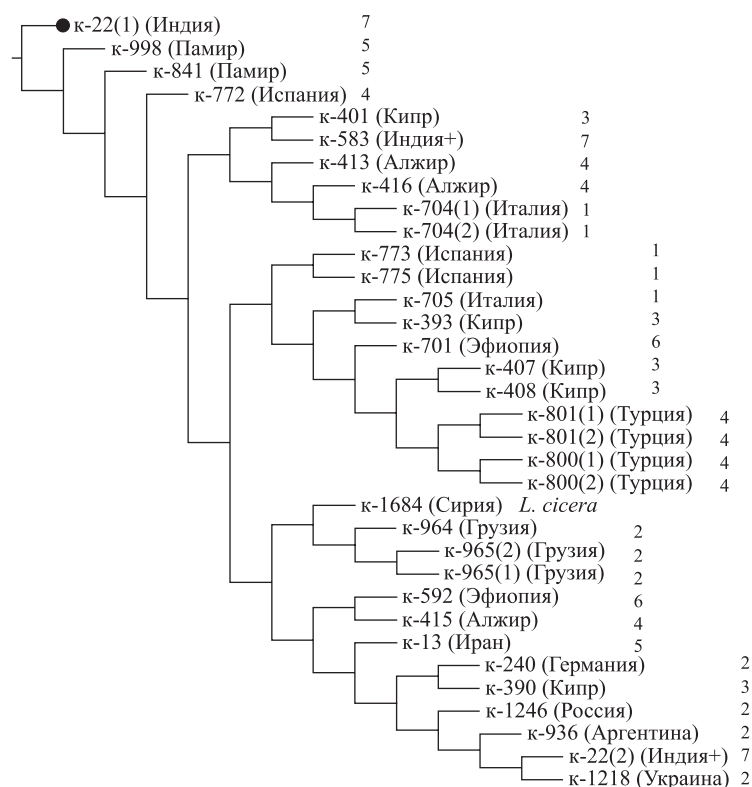


Рис. 6. Дерево согласия, построенное на основе сравнительного анализа 185 полиморфных амплифицированных RAPD-фрагментов образцов *L. sativus* (из разных эколого-географических групп) и *L. cicera*. Критерий оптимальности – максимальная парсимония.

Обозначения 1–7 см. на рис. 5.

Сходная закономерность, а именно примерно одинаковый уровень генетического родства образцов Кавказа с европейскими и азиатскими формами, отмечена и для пшеницы (Митрофанова и др., 2004). Авторы объясняют это промежуточным положением Кавказа при распространении пшеницы из Азии в Европу.

Для формирования коллекций и их рационального (эффективного) использования необходимо знание не только о генетическом сходстве образцов, но и о наличии у них редких и широко встречающихся аллелей. Данная классификация внутривидового полиморфизма по результатам молекулярного маркирования основана на принципе «взвешивания» признаков в зависимости от частоты их встречаемости (Смирнов, 1964). Этот метод был разработан Е.С. Смирновым (1964) для оценки родства таксонов во внутривидовых классификациях. Автор считал, что наиболее значимыми для таксономии являются редко встречающиеся признаки, наличие сходства по ним у родственных групп более информативно, чем по часто встречающимся характеристикам. Он предложил рассчитывать «коэффициент отношения» таксонов как усредненное значение весов всех признаков. Коэффициент отношения признаков тем выше, чем больше совпадающих редких признаков. На основе этого подхода был разработан метод расчета коэффициента генетической оригинальности образцов (КГО) коллекций генбанков, который был успешно применен для классификации коллекции вики посевной (*Vicia sativa* L.), проанализированной с применением AFLP-маркеров (Потокина, Александрова, 2008).

Для чины посевной данный метод использован нами впервые. Изученные образцы были «взвешены» исходя из частоты встречаемости RAPD-фрагментов у проанализированных нами представителей чины посевной. Матрица присутствия–отсутствия фрагментов была преобразована в матрицу с соответствующими «весовыми» значениями. Веса всех RAPD-фрагментов были суммированы для каждого образца (табл. 3). Сумма разделена на общее число изученных фрагментов. В итоге каждому образцу был присвоен индекс, соответствующий КГО. Рассчитанные значения КГО подчинялись логнормальному распределению. В соответствии со свойствами нормального распределения

значения КГО, которые группируются около средней арифметической, характерны для образцов с часто встречающимися аллелями, высокие значения КГО типичны для образцов с редкими аллелями. У образцов с небольшими значениями КГО редкие аллели не встречаются. С помощью параметров дисперсии наблюдений (минимум, максимум, 5-й, 25-й, 75-й, 95-й процентиля) выборка значений КГО на основании распределения их логарифмов была разделена на несколько интервалов, демонстрирующих увеличение доли редких аллелей в образцах. В первом интервале минимумом является 5-й перцентиль, второй интервал равен 5–25-му перцентилем, третий – 25–75-му перцентилем, четвертый – 75–95-му перцентилем и пятый – 95-му перцентилем – максимум. Абсолютные значения КГО были преобразованы в 5-балльную шкалу. По данной шкале образцы первого интервала не содержат редких аллелей и представлены типичными для культуры генотипами, а образцы, вошедшие в последний интервал, напротив, отличаются наибольшим числом редких аллелей.

В результате расчета КГО для выявленных полиморфных RAPD-фрагментов были обнаружены образцы с разным уровнем содержания редких аллелей и не имеющие их (см. табл. 3). Наименьшим количеством редких аллелей отличались образцы к-413 (Алжир) и к-1246 (Куйбышевская область), наибольшим – к-408 (остров Кипр) и к-415 (Алжир). Определение КГО позволило выявить уникальные образцы чины посевной, содержащие редко встречающиеся аллели (ОРА10₁₂₅₀, ОРК04₁₁₂₀, ОРК09₁₉₀₀ и др.). Кроме того, было выявлено, что частота встречаемости аллелей в разных растениях, относящихся к одному местному сорту, не всегда одинакова. Изучение образцов к-22 и к-704 показало существенную разницу по КГО между индивидуальными растениями. В результате дисперсионного анализа было установлено, что наличие редких аллелей у образцов не имеет связи с их принадлежностью к определенному экологическому типу.

Таким образом, наше исследование выявило значительный внутривидовой полиморфизм чины посевной как по фенотипу, так и по генотипам. Использование RAPD-анализа позволило классифицировать изученные образцы на внутривидовые группы *L. sativus*, соответ-

Таблица 3

Коэффициенты генетической оригинальности образцов чины посевной
разного эколого-географического происхождения из коллекции ВИР

Каталог ВИР	Происхождение образца	Σ ¹	КГО= Σ/n ²	Log КГО ³	КГО по шкале ⁴
704(1)	Италия	37,42	0,80	-0,33	3
704(2)	Италия	39,05	0,83	-0,27	3
705	Италия	42,54	0,91	-0,14	3
773	Испания	27,07	0,58	-0,80	2
775	Испания	39,05	0,83	-0,27	3
240	Германия	43,42	0,92	-0,11	3
390	Кипр	30,19	0,64	-0,64	2
393	Кипр	40,95	0,87	-0,20	3
401	Кипр	74,66	1,59	0,67	4
407	Кипр	20,46	0,44	-1,20	2
408	Кипр	76,29	1,62	0,70	5
772	Испания	37,44	0,80	-0,33	3
801	Малая Азия	18,59	0,40	-1,34	2
592	Эфиопия	26,53	0,56	-0,82	2
701	Эфиопия	44,95	0,96	-0,06	3
413	Алжир	17,85	0,38	-1,40	1
415	Алжир	127,62	2,72	1,44	5
416	Алжир	47,11	1,00	0,00	3
964	Германия	67,44	1,43	0,52	4
965	Грузия	54,15	1,15	0,20	3
1684	Сирия	71,77	1,53	0,61	4
13	Иран	46,04	0,98	-0,03	3
841	Памир	31,95	0,68	-0,56	2
998	Памир	53,66	1,14	0,19	3
22(1)	Индия	41,58	0,88	-0,18	3
22(2)	Индия	73,44	1,56	0,64	4
583	Индия	70,35	1,50	0,58	4
936	Аргентина	43,08	0,92	-0,13	3
1218	Украина	40,17	0,85	-0,23	3
1246	Россия	14,74	0,31	-1,67	1

¹ Взвешенные значения присутствия–отсутствия RAPD-фрагментов для каждого образца, рассчитанные на основе частоты их встречаемости в выборке; ² КГО – коэффициент генетической оригинальности; ³ Log КГО – логарифм КГО по основанию 2; ⁴ значения КГО по 5-балльной шкале.

ствующие эколого-географической дифференциации вида и его эволюции как культуры. На примере данной работы можно заключить, что RAPD-маркирование может быть полезным для выявления сходных экотипов.

Определение коэффициента генетической оригинальности образцов показало, что на-

ряду с наличием в коллекции генотипов со стандартным для культуры набором аллелей существуют образцы с редко встречающимися аллелями, которые могут оказаться полезными для селекции.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 06-04-488-а, 09-04-00574-а.

Литература

- Дорофеев В.Ф., Лаптев Ю.П., Чекалин Н.М. Цветение, опыление и гибридизация растений. М.: Агропромиздат, 1990.
- Залкинд Ф.Л. Чина. Культурная флора СССР. Т. 4. Л.: Сельхозгиз, 1937. С. 171–227.
- Залкинд Ф.Л. Чина. М.; Л.: Сельхозгиз, 1953. 144 с.
- Митрофанова О.П., Стрельченко П.П., Конарев А.В. Структура генетических взаимосвязей между местными сортами гексаплоидных пшениц по данным RAPD-, AFLP- и SSR-анализов // Аграрная Россия. 2004. № 6. С. 10–19.
- Потокина Е.К., Александрова Т.Г. Коэффициенты генетической оригинальности образцов коллекции вики посевной (*Vicia sativa* L.) по результатам молекулярного маркирования // Генетика. 2008. Т. 44. № 11. С. 1508–1516.
- Рыжова Н.Н., Мартиросян Е.В., Вишнякова М.А. Генетическое разнообразие чины посевной *L. sativus* и близкородственных видов рода *Lathyrus* на основе данных полиморфизма ITS1-5.8S-ITS2 рибосомного оперона // Сб. тез. V Съезда ВОГиС. М.: РГАУ-МСХ им. К.А. Тимирязева. 2009. С. 183.
- Смекалова Т.Н. Внутривидовые таксоны *Lathyrus sativus* L. // Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. 1991. Т. 139. С. 64–72.
- Смирнов Е.С. Таксономический анализ. М.: Наука, 1964. 356 с.
- Choudhury M.A., Slinkard A.E. Linkage of random amplified polymorphic DNA, isozyme and morphological markers in grasspea (*Lathyrus sativus*) // J. Agric. Sci. 1999. V. 133. P. 389–395.
- Costa R., Carita T., Pereira G., Tavares-de-Sousa M. Characterization of grass pea genotypes by RAPD markers // Book of Abstracts. 6th Europ. Conf. on grain legumes. Lisbon, Portugal, 2007. P. 131.
- Croft A.M., Pang E.C. K., Taylor P.W.J. Molecular analysis of *Lathyrus sativus* L. (grasspea) and related *Lathyrus* species // Euphytica. 1999. V. 107. P. 167–176.
- Edwards S.K., Johonstone C., Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analyses // Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. № 6. P. 1349.
- Gutierrez-Marcos J. F., Vaquero F., Sáenz de Miera L.E., Vences F.J. High genetic diversity in a world-wide collection of *Lathyrus sativus* L. revealed by isozymatic analysis // Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization. 2006. V. 4. P. 159–171.
- Hanbury C.D., Siddique K.H.M., Galwey N.W., Cocks P.S. Genotype–environment interaction for seed yield and ODAP concentration of *Lathyrus sativus* L. and *L. cicera* L. in Mediterranean-type environments // Euphytica. 2006. V. 110. № 1. P. 45–60.
- Polignato G.B., Uggenti P., Alba E. *et al.* Morpho-agronomic diversity in grass pea (*Lathyrus sativus* L.) // Plant Genet. Resour. 2005. № 3. P. 29–34.
- Przybylska J., Zimniak-Przybylska Z., Krajewski P. Diversity of seed albumins in the grasspea (*Lathyrus sativus* L.): an electrophoretic study // Genet. Resour. Crop Evol. 1998. V. 45. № 5. P. 423–430.
- Sammour R., Mustafa A-E., Badr S., Tahr W. Genetic variations in accessions of *Lathyrus sativus* L. // Acta Bot. Croat. 2007. V. 66. № 1. P. 1–13.
- Skiba B., Ford R., Pang E.C.K. Amplification and detection of polymorphic sequence-tagged sites in *Lathyrus sativus* // Plant Mol. Biol. Rep. 2003. V. 21. № 4. P. 391–404.
- Tadesse W., Bekele E. Phenotypic diversity of Ethiopian grass pea (*Lathyrus sativus* L.) in relation to geographical regions and altitudinal range // Genet. Resour. Crop Evol. 2003. V. 55. № 3. P. 497–505.
- Tavoletti S., Iommarini L. Molecular marker analysis of genetic variation characterizing a grasspea (*Lathyrus sativus*) collection from central Italy // Plant Breeding. 2007. V. 126. № 6. P. 607–611.

PHENOTYPIC AND GENOTYPIC DIVERSITY OF *LATHYRUS SATIVUS* L. (FABACEAE) FROM THE VAVILOV INSTITUTE COLLECTION

M.O. Burlyueva, M.A. Vishnyakova

N.I. Vavilov Research Institute of Plant Industry, Russian Academy of Agricultural Sciences,
St.-Petersburg, Russia, e-mail: m.burlyueva@vir.nw.ru

Summary

Lathyrus sativus accessions from VIR collection were studied with regard to a set of 30 morphological and phenological characters and RAPD markers. The results of the canonical and discriminant analysis revealed seven significant traits for classification of intraspecific diversity: the type of bush, color of seed coat, diameter and width of stem wings, seed thickness, and seed length. The complex of these traits correlated with the origin of the accessions. RAPD analysis reflected the existence of two subspecies and some ecotypes close to the ecogeographical classification developed hitherto. In general, the molecular data reflect the ecogeographical differentiation and phylogeny of the species. Consideration of the degree of genetic originality (allele prevalences) revealed accessions with unique alleles, promising for breeding.

Key words: *Lathyrus sativus*, chickling vetch, phenotypic and genetic diversity, RAPD analysis, genetic originality.