

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОДХОД К АНАЛИЗУ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ И ГЕОГРАФИЧЕСКОГО РАСПРОСТРАНЕНИЯ КУЛЬТУРНОГО ЯЧМЕНЯ

П.П. СТРЕЛЬЧЕНКО, О.Н. КОВАЛЕВА, К. ОКУНО

RAPD-методом оценивали полиморфизм репрезентативной выборки сортов ячменя из коллекции ВИР. Результаты обработки полученных данных методами главных компонент, кластерного и канонического дискриминантного анализов сопоставляли с географическим происхождением изучаемых сортов, а также ботанической и эколого-географической классификациями культурного ячменя.

Ячмень (*Hordeum vulgare* L.) — одна из древнейших и широко возделываемых на земном шаре зерновых культур. В результате распространения ячменя из первичного центра происхождения в другие регионы произошла его дифференциация и образовалось большое количество форм, адаптированных к разнообразным экологическим условиям. Особенно четко эта дифференциация проявляется среди местных сортов различного географического происхождения. Значительную часть коллекции ячменя во ВНИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова (ВИР) составляют местные сорта, которые представляют большую ценность для современной и будущей селекции ячменя как источники полезных свойств для улучшения современного элитного генофонда, достаточно узкого по генетической природе. При подборе исходного материала кроме сортов элитного генофонда селекционеры должны иметь полный набор образцов, генетически в разной степени отдаленных от улучшаемого объекта — от близкородственных сортов и местных популяций до более отдаленных эколого-географических рас, а также дикорастущих популяций ячменя. Однако подбор таких форм невозможен без детального описания генетической структуры коллекции, вычленения основных и минорных генетических групп. Подобная информация необходима также для создания так называемых стержневых коллекций (co-collections).

При рассмотрении внутривидовой классификации ячменя можно выделить два основных подхода: морфологический и эколого-географический.

Морфологический подход основан на использовании ряда морфологических признаков колоса и зерновки: двурядные и многорядные; пленчатые и голозерные и т.д. Эти признаки не являются нейтральными для селекции и контролируются лишь несколькими генами. Системы классификации, основанные на морфологических признаках и учитывающие мозаичный характер эволюции культурного ячменя в результате мутаций, доместикации и гибридизации между различными формами, представляются самим авторам полностью искусственными и могут рассматриваться лишь как способы группировки морфологически сходных форм (1).

В основе эколого-географического подхода лежат пионерские исследования Н.И. Вавилова. На основе многочисленных экспедиционных наблюдений и экспериментальных исследований обширного материала он впервые определил основные центры древнего земледелия и предположил, что эти центры (генцентры) исторически связаны с происхождением и дальнейшей эволюцией основных сельскохозяйственных культур (2). Среди этих центров Н.И. Вавилов определил два первичных (Переднеазиатский и Восточно-азиатский) и несколько вторичных древних центров воз-

делывания ячменя (3). Впоследствии было высказано предположение о независимом происхождении культурных форм ячменя в восточном (oriental) и западном (occidental) регионах Земли (4). Однако большинство исследователей считают, что культурный ячмень изначально возник из дикорастущего двурядного ячменя *H. vulgare* subsp. *spontaneum* на Ближнем Востоке, в одном из районов древнего земледелия (5). Несмотря на то, что в литературе существует большое количество данных о западно-восточной дифференциации культурного ячменя, действительная причина такой дифференциации до сих пор неизвестна (6). На основе этих идей и данных последующего изучения мирового генофонда ячменя в ВИР была предложена современная эколого-географическая классификация, которая включает семь мировых центров генетического разнообразия культурного ячменя (7). В последнее время эта классификация получила международное признание и была рекомендована в качестве основной для создания мировой стержневой коллекции ячменя (8). По нашему мнению, эколого-географическая классификация ячменя в будущем может послужить основой для разработки всеобъемлющей генетической классификации сортов, которая отражала бы экологическую дифференциацию этой культуры и позволяла бы гораздо точнее и быстрее подбирать исходный материал для селекции по заранее заданным параметрам адаптивности. В нашей работе мы учитывали ее при отборе материала для исследований и интерпретации полученных результатов.

Помимо морфологических признаков в оценке межвидовых взаимосвязей и внутривидового разнообразия форм культурных растений в настоящее время широко используют полиморфизм белковых систем, таких как изоферменты и запасные белки семян (9). В связи с развитием методов молекулярной генетики в последние годы появилась возможность изучения генетической дифференциации растений на геномном уровне, непосредственно по полиморфизму ДНК. Такие подходы, как анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов ДНК (ПДРФ-технология) и фрагментов ДНК, амплифицированных в полимеразной цепной реакции (ПЦР-технология), являются мощными инструментами в изучении генетического разнообразия культурных растений и маркировании конкретных генетических систем (10).

Недавно нами показана возможность использования ПДРФ-маркеров в изучении генетической дифференциации выборки образцов ячменя (11). Однако для оценки обширной коллекции растений, на наш взгляд, гораздо удобнее использовать методически более простой, но достаточно чувствительный метод анализа полиморфизма фрагментов ДНК, амплифицированных в полимеразной цепной реакции с произвольными праймерами (RAPD-метод) (12).

Целью настоящей работы было исследование полиморфизма ДНК и закономерностей его проявления в связи с общностью географического происхождения сортов ячменя и их принадлежностью к мировым центрам генетического разнообразия с применением ряда независимых методов многомерной статистики, наиболее часто используемых в классификационных построениях.

Методика. Объектом исследования служили 299 сортов культурного ячменя, из которых 289 морфологически различающихся сортов представляли все мировые центры (генцентры) генетического разнообразия ячменя и были отобраны из коллекции ВИР, а 10 сортов — современные японские сорта, полученные из генбанка Японии (Национальный институт агробиологических ресурсов — NIAR, Цукуба, Япония).

ДНК выделяли из 15-25 лиофильно высушенных 2-недельных проростков с использованием бромистого гексадецилтриметиламмония (13). Концентрацию и полимерность ДНК в препаратах определяли методом сравнительного электрофореза в 1 % агарозном геле, применяя в качестве стандартов ДНК фага λ с известной концентрацией. Для приготовления реакционных смесей образцы ДНК разбавляли до концентрации 20 нг/мкл. ПЦР проводили в термоциклере PTC-100 (MJ Research, США) с использованием 96-луночных микропланшетов. Реакционная смесь имела следующий состав: 10 мМ трис-HCl (pH 8,3); 50 мМ KCl; 2 мМ MgCl₂; по 0,2 мМ дАТФ, дЦТФ, дГТФ и дТТФ; 1 мМ праймера; 0,3 е.а. *AmpliTaq*-ДНК-полимеразы («Perkin Elmer») и 40 нг матричной ДНК. Конечный объем этой смеси составлял 10 мкл. Амплификацию проводили в течение 45 циклов по следующей программе: 1 мин при 93 °С, 2 мин при 36 °С и 3 мин при 72 °С. Для завершения синтеза ДНК перед охлаждением до 4 °С реакционную смесь инкубировали при 72 °С в течение 7 мин. Для анализа продуктов амплификации применяли электрофорез в пластинах 1,4 % агарозного геля в трис-ацетатном буфере (14) с последующим окрашиванием бромистым этидием и фиксацией изображения в проходящем ультрафиолетовом свете на фотопластинах Polaroid (Polaran 3200 В).

Для анализа RAPD-спектров каждому компоненту присваивали соответствующий порядковый номер, а затем данные переводили в бинарный вид, то есть присутствие или отсутствие компонента в спектре кодировали соответственно цифрами 1 или 0. В конечную матрицу данных включали только полиморфные и воспроизводимые в ряде независимых опытов компоненты. Дальнейшую оценку результатов осуществляли с применением трех методов многомерной статистики: главных компонент, кластерного анализа и канонического дискриминантного анализа (КДА). Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения Statistica 5.0 (15).

Метод главных компонент (Q-техника) применяли для прямой классификации изученных сортов по данным RAPD-анализа. Первоначальную матрицу данных транспонировали и использовали для расчета корреляционной матрицы, которая служила основой для определения факторных нагрузок у всех изученных сортов на каждую из выявленных главных компонент. Сорта, имеющие максимальные факторные нагрузки по соответствующей главной компоненте, объединяли в группы.

На основе матрицы данных рассчитывали матрицу коэффициентов генетического сходства по Nei и Li (16). Кластерный анализ проводили по методу Ward, в котором учитывается дисперсия показателей расстояний между кластерами (17).

Метод КДА был необходим для выявления компонентов RAPD-спектра (комбинаций праймер-фрагмент ДНК), которые вносят наибольший вклад в дифференциацию основных групп сортов. При этом использовали прямой пошаговый метод с оценкой результатов классификации (доля верных решений) на каждом этапе. Для каждой из основных групп сортов рассчитывали классификационные функции, по максимальной величине которых сорта ячменя могут быть отнесены к той или иной генетической группе (18).

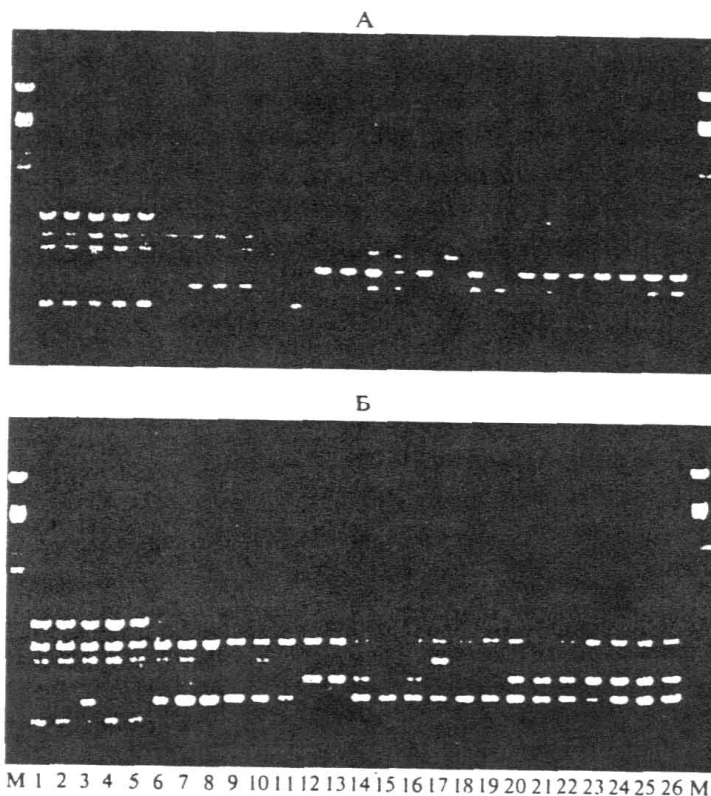
Результаты. С целью подбора праймеров, пригодных для выявления различий между образцами ячменя, проводили скрининг 149 произвольных декамерных праймеров на их способность обеспечить синтез в ПЦР полиморфных фрагментов ДНК с образцами ДНК 16 сортов ячменя.

1. Характеристика праймеров для RAPD-анализа и синтезированных с их использованием фрагментов ДНК сортов ячменя ($n = 299$)

№ праймера	Нуклеотидная последовательность	Число полиморфных фрагментов ДНК	Фрагменты ДНК, вошедшие в модель канонического дискриминантного анализа (КДА), тыс. п.н.*
1	GTCTGACGGT	7	0,90; 0,65
2	GGCGGACTGT	5	0,95
3	GCTGTGCAGC	6	1,80; 1,10; 0,60; 0,52
4	CGTAGCGCGA	7	1,40; 0,90; 0,85
5	TGGCCACTGA	9	—
6	TGGTCACAGA	5	0,65
7	CAAACGTCGG	8	1,50; 0,65
8	GTAGACCCGT	5	0,70
9	CCTTGACGCA	6	1,65; 1,10
10	CTCTCCGCCA	7	1,50; 1,40; 0,95
11	AGACGTCCAC	1	1,25
12	GGTGACGCAG	2	—
13	STATGCCGAC	3	0,90
14	CCTGCTCATC	5	1,30
15	CTGCGCTGGA	4	0,85
16	GAGGTCCACA	4	—
17	CAGGGGACGA	6	1,25

* Приведены в таблице 3.

Эта выборка сортов включала представителей всех центров разнообразия ячменя. В итоге удалось отобрать 17 праймеров, которые были использованы для проведения экспериментов (табл. 1). Электрофорез продуктов ПЦР в агарозных гелях показал, что каждый из этих праймеров



М 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 М

Рис. 1. Электрофоретические спектры фрагментов ДНК, амплифицированных с использованием праймера № 7 и ДНК следующих образцов: 1 — к-14923, 2 — к-3118, 3 — к-5279, 4 — к-8649, 5 — к-18398, 6 — к-10892, 7 — к-10887, 8 — к-9262, 9 — к-26859, 10 — к-20699, 11 — к-21496, 12 — Lasa-dji-cinke, 13 — W-702, 14 — к-21080, 15 — к-20718, 16 — к-6128, 17 — к-20707, 18 — к-10890, 19 — к-21495, 20 — к-9298, 21 — к-9305, 22 — к-10877, 23 — к-28265, 24 — к-18362, 25 — к-7998, 26 — Медикум 8955, М — *Pst* I-фрагменты ДНК фага λ . А и Б — фрагменты, амплифицированные в двух повторностях ПЦР-анализа.

инициировал синтез от 3 до 15 фрагментов ДНК, размеры которых варьировали от 0,3 до 3 тыс. п.н. RAPD-спектры, полученные для 26 сортов ячменя при использовании праймера 7 в двух независимых опытах, представлены на рисунке 1. В общей сложности 90 полиморфных RAPD-компонентов, полученных с использованием 17 праймеров на 299 сортах ячменя, были включены в матрицу данных. Следовательно, на каждый праймер в среднем было получено 5,3 полиморфных компонента или по 13 компонентов на каждую из семи хромосом гаплоидного набора хромосом ячменя. Из 299 оцененных по RAPD-спектрам сортов не различались между собой только три пары местных сортов: к-18844 и к-18853 из Эфиопии, к-14915 и

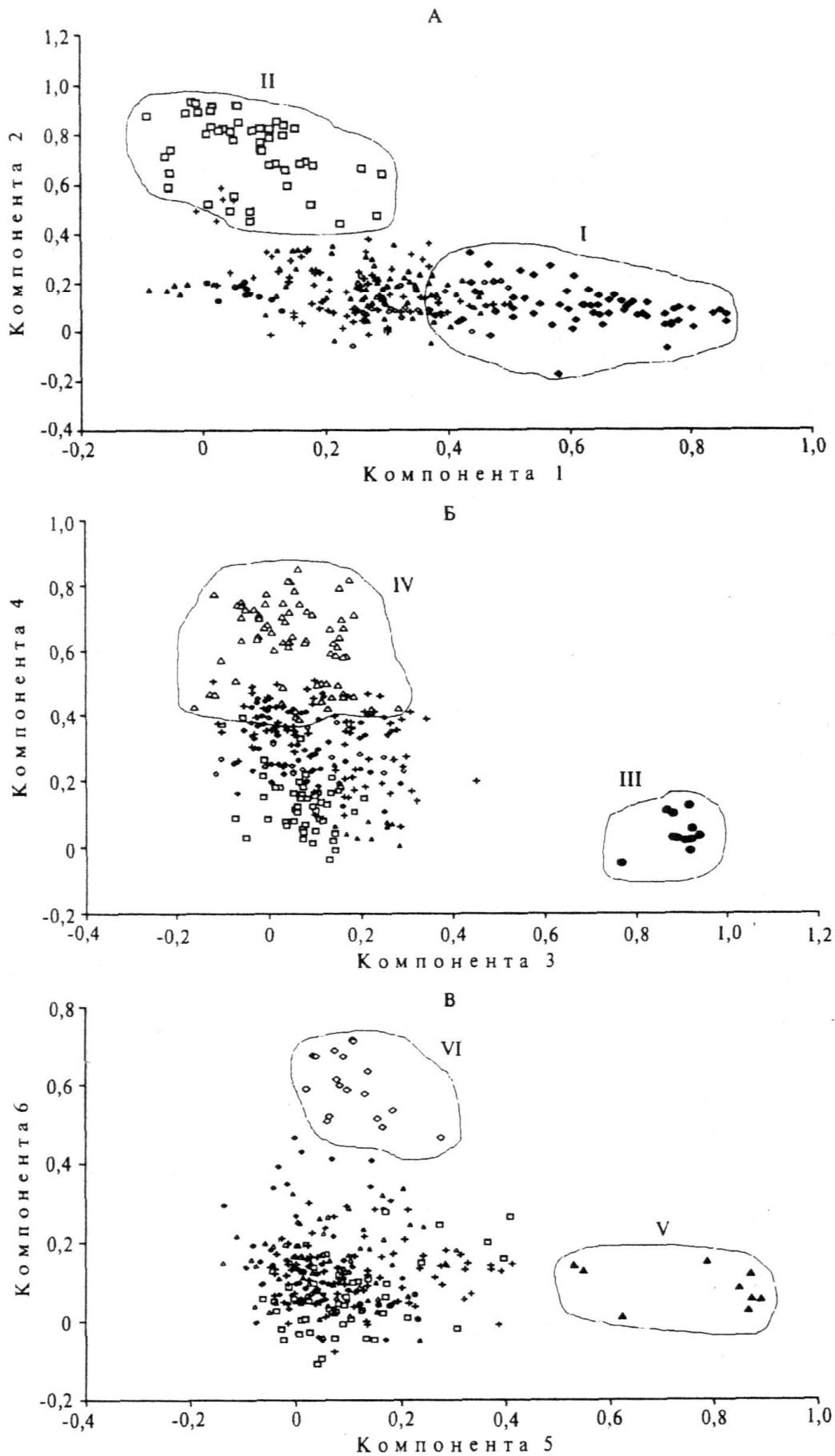


Рис. 2. Распределение 296 сортов ячменя по результатам обработки данных RAPD-анализа в пространстве главных компонент: 1 и 2 (А), 3 и 4 (Б), 5 и 6 (В); ◆, □, ●, Δ, ▲, ◇ и (+) — соответственно I, II, III, IV, V, VI и прочие генетические группы.

к-16637 из Таджикистана, к-6154 и к-16610 из Грузии (здесь и далее местные сорта обозначены по номерам каталога коллекции ячменя ВИР). По-видимому, эти образцы представляют собой три пары дублетных образцов, собранных в разное время в одних и тех же местных популяциях ячменя.

Результаты обработки данных RAPD-анализа методом главных компонент свидетельствуют о сложном характере генетической структуры выборки из 296 сортов ячменя. Из 25 групп, которые соответствовали 25 значимым главным компонентам, 13 групп, каждая из которых включала четыре и более сортов, были обозначены как основные генетические группы. На двухмерных графиках отражено распределение всех исследованных сортов ячменя в пространстве первых шести главных компонент (рис. 2). Границы полей каждой группы условно обозначены кривыми замкнутыми линиями. Выявленные группы занимают на графиках не перекрывающиеся между собой поля. В целом рисунок 2 иллюстрирует высокую разрешающую способность метода главных компонент для дифференциации изученной выборки сортов и отображает их взаимное расположение в пространстве.

Информация о количественном составе выявленных по RAPD-маркерам основных генетических групп ячменя и о распределении по этим группам сортов, представляющих разные мировые центры разнообразия, приведена в таблице 2. Анализ состава генцентров показал их генетическую неоднородность: Европейско-сибирский генцентр был представлен преимущественно сортами I, IV и VIII групп; Новосветский — I, IV и VI; Средиземноморский — I и VI; Абиссинский — I, IV и XI; Переднеазиатский — I, IV и IX; Среднеазиатский — I, II, III, V и VII; Восточноазиатский — I, II и IV групп. Распределение сортов ячменя по 13 основным генетическим группам на основе анализа главных компонент было подтверждено в модели КДА, рассчитанной с применением 25 полиморфных фрагментов ДНК (93,5 % верных решений). Рассчитанные классификационные функции и список комбинаций праймер-фрагмент ДНК можно рекомендовать как для тестирования различных форм ячменя, так и для разработки более стабильных STS-маркеров (табл. 3).

2. Распределение сортов ячменя ($n = 296$) из разных мировых центров разнообразия по генетическим группам, выявленным при обработке данных RAPD-анализа методом главных компонент

Генетическая группа	Центр разнообразия ячменя							Всего
	Европейско-сибирский	Новосветский	Средиземноморский	Абиссинский	Переднеазиатский	Среднеазиатский	Восточноазиатский	
I	15	11	9	4	13	6	5	63
II	—	—	1	1	—	15	32	49
III	2	—	—	—	4	5	—	11
IV	26	11	1	13	11	2	7	71
V	—	2	1	—	—	6	1	10
VI	—	6	11	—	—	—	1	18
VII	—	—	—	—	3	6	—	9
VIII	7	1	—	2	—	—	—	10
IX	1	—	—	1	11	1	—	14
X	—	—	—	—	—	4	—	4
XI	—	—	—	4	—	—	—	4
XII	1	—	2	—	3	—	—	6
XIII	—	—	3	—	3	—	—	6
Прочие	1	—	2	3	2	6	7	21
Всего	53	31	30	28	50	51	53	296

3. Комбинации праймер—фрагмент ДНК, вошедшие в модель канонического дискриминантного анализа, и коэффициенты классификационных функций фрагментов ДНК для основных генетических групп ячменя

№ прай- мера	Длина фраг- мента ДНК, тыс. п.н	Генетическая группа												
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
2	0,95	0,5	31,8	-17,8	-3,6	56,3	0,8	-3,1	-7,0	-10,6	37,0	-2,1	-8,0	-3,2
4	1,40	5,7	3,5	26,4	5,5	-32,4	-1,8	0,4	5,4	27,6	7,1	5,2	-3,0	-2,1
7	0,65	-5,4	0	34,1	-4,3	23,5	3,6	5,6	-4,2	1,7	2,4	-4,9	1,0	32,0
8	0,70	146,4	142,6	138,0	140,3	143,0	142,0	144,8	144,5	137,6	137,6	3,2	139,5	145,5
3	0,82	1,6	9,9	-0,2	13,8	11,3	10,4	18,9	14,4	1,4	3,5	10,3	11,6	10,4
1	0,65	1,3	-1,5	1,9	-1,4	-0,2	17,5	-3,0	-3,5	0,9	2,6	-4,8	-0,7	-0,4
3	1,10	14,7	2,5	17,6	16,5	-1,8	13,8	-5,0	14,9	7,8	-1,1	18,3	11,9	9,7
4	0,90	48,4	49,8	-2,1	48,5	61,9	49,4	50,0	42,2	46,9	59,8	51,2	38,0	47,4
3	1,80	37,6	38,4	-12,6	33,7	96,4	28,6	39,8	33,8	32,5	38,9	26,4	28,6	29,0
4	0,85	3,1	14,5	7,1	2,7	11,2	6,3	-0,8	1,8	5,1	0,9	0,8	26,0	18,4
7	1,50	-8,1	-9,4	-11,5	-5,1	-6,6	-7,3	-7,2	-10,5	4,7	-7,6	-6,7	3,3	-7,5
14	1,05	5,5	2,2	0,5	1,9	5,8	6,0	1,4	14,3	4,6	23,1	3,1	4,9	3,3
9	1,65	4,9	5,3	11,2	2,5	15,3	10,9	1,9	1,2	3,1	20,5	13,9	12,7	11,9
1	0,90	44,5	45,8	-1,3	40,3	49,1	43,0	45,0	42,4	39,5	45,4	33,5	42,8	45,7
15	0,85	18,3	20,3	14,3	16,1	15,3	15,4	8,9	19,9	18,5	10,6	15,9	10,9	18,5
3	0,60	7,3	4,4	4,8	0,4	9,5	4,1	8,9	5,8	2,0	2,9	-4,2	10,8	3,6
17	1,25	-1,3	9,3	10,1	-3,0	15,9	4,8	-1,0	-3,2	-5,0	-7,6	-4,8	4,4	11,0
10	1,50	0,4	-3,3	-0,3	-4,2	-8,0	-6,9	-5,2	7,1	-3,8	-4,2	5,6	3,4	-4,4
14	1,30	2,8	4,2	-4,3	3,7	6,3	8,7	11,7	1,1	1,4	5,4	1,5	-2,9	3,4
10	0,95	1,4	5,1	26,1	0,9	3,9	3,6	-1,6	0,2	14,9	10,7	4,7	6,8	-5,5
9	1,10	4,4	2,0	-7,9	3,5	-5,2	3,9	3,3	2,1	-5,7	10,9	3,9	-4,4	19,7
10	1,40	0,8	1,5	-4,3	-0,4	5,2	0,8	-2,5	-0,3	7,5	-4,2	-2,0	0,1	4,6
11	1,25	3,9	3,1	4,7	8,5	5,3	3,5	6,1	-0,9	8,1	1,3	4,8	7,9	6,5
6	0,65	4,0	8,7	10,5	7,2	8,0	7,9	5,1	11,2	7,6	2,3	13,4	10,0	2,7
13	0,90	19,7	4,5	12,3	19,8	-6,0	18,3	19,3	18,9	19,8	9,2	20,3	19,2	17,5
Постоянная		-153,2	-172,2	-147,7	-148,6	-233,7	-166,4	-157,2	-161,8	-163,8	-183,8	-93,6	-169,4	-193,7

Примечание. Комбинации праймер—фрагмент ДНК перечислены в порядке их вхождения в модель. Генетические группы представлены в таблице 2.

По результатам обработки данных RAPD-анализа методами главных компонент и КДА был составлен список из 180 сортов ячменя, распределенных по 13 генетическим группам (табл. 4). Перечисленные сорта наиболее полно соответствовали классификациям, полученным двумя этими методами (величина факторной нагрузки на соответствующую компоненту 0,5 и выше, отсутствие сопоставимых величин факторных нагрузок на разные компоненты и уровень вхождения в модель КДА). Сорта из приведенного списка могут быть использованы в любых оценочных исследованиях генофонда ячменя как с учетом их географического происхождения, так и величины факторной нагрузки.

С целью подтверждения объективного существования в изученной выборке сортов основных генетических групп, а также оценки характера взаимосвязей между ними мы применили метод кластерного анализа. Для этого была построена матрица коэффициентов генетического сходства по Nei и Li. Диапазон варьирования индексов в матрице находился в пределах от 0,200 (между к-6817 из Турции и к-16616 из России) до 0,984 (между к-21544 и к-21554 из Боливии). Для кластеризации были использованы данные RAPD-анализа, полученные для 180 сортов (см. табл. 4). В результате кластерного анализа, как и при оценке главных компонент, была обнаружена сложная структура взаимосвязей между сортами, причем наблюдался высокий уровень соответствия группировки методом главных компонент кластерам на фенограмме (рис. 3). Анализ фенограммы показал, что все сорта объединяются в 12 кластеров, каждый из которых (по составу входящих сортов) соответствует определенной генетической группе, выявленной при анализе главных компонент. Лишь X группа, состоящая из трех сортов, входила в состав кластера 1 в виде отдельного субкластера (на рисунке 3 обозначен стрелкой).

Рассмотрим иерархию взаимосвязей между отдельными кластерами на фенограмме. В первую очередь следует отметить, что все кластеры объединяются (на рисунке 3 отмечено пунктирной линией) в два семейства — А и Б, генетическое расстояние связывания между которыми составляет примерно 15, то есть почти в 15 раз больше, чем, например, между кластерами 7 и 8. Семейство кластеров А подразделяется на два подсемейства — А1 и А2 (величина расстояния ~7). К первому подсемейству относится только кластер 1, который включает два субкластера: а — 10 местных сортов из Центральной Азии; б — местные и селекционные сорта из Японии и Китая. Подсемейство А2 объединяет три кластера: кластер 2, который содержит двурядные голозерные (*var. nudum*), кластер 3 — многорядные голозерные (*var. coeleste*) сорта и кластер 4 — пять многорядных и двурядных пленчатых сортов из Закавказья и Средиземноморья. Семейство кластеров Б также подразделяется на два подсемейства — Б1 и Б2: первое включает кластеры 5-9, которые объединяют преимущественно двурядные местные и селекционные сорта различного происхождения; второе — кластеры 10-12, представленные многорядными местными и селекционными сортами также различного происхождения.

Оценка встречаемости компонентов RAPD-спектров у сортов, принадлежащих к различным генетическим группам, показала, что различия между группами проявляются как количественные по встречаемости довольно большого числа фрагментов ДНК. Ни один из 90 полиморфных компонентов в полной мере не был специфически связан с сортами какой-либо одной из выявленных генетических групп.

В нашем исследовании делению ячменя на восточные и западные формы соответствует распределение изученных сортов по кластерам соот-

ветственно 1 и 5-12. Эти данные, а также результаты проведенного нами с использованием RAPD-маркеров сравнительного анализа образцов культурного и дикорастущего ячменя свидетельствуют о том, что глубокие генетические различия между западными и восточными сортообразцами связаны не только с их географической изоляцией и последующей эволюцией в экологически различающихся условиях, но также и с вкладом различных дикорастущих форм в генофонд культурных форм ячменя в процессе вхождения в культуру в Западной и Восточной Азии (19). Мы предполагаем, что генетические различия между сортами кластеров семейств А и Б соответствуют различиям на подвидовом уровне. Следует заметить, что в настоящее время вид *H. vulgare* принято делить на подвиды культурного (subsp. *vulgare*) и дикого (subsp. *spontaneum*) ячменя (1). Большинство изученных в нашей работе сортов ячменя из Японии и Китая объединились в группу II (соответствует кластеру 1).

4. Характеристика различных сортов ячменя по их происхождению и принадлежности к генетическим группам, выявленным на основании обработки данных RAPD-анализа методами главных компонент и канонического дискриминантного анализа ($n = 180$)

№ по каталогу ВИР и генбанка Японии (NIAR)	Образец, сорт	Происхождение (страна, регион)	Величина факторной нагрузки	Характеристика сорта
Г р у п п а I				
715	Местный	Азербайджан	0,73	Многорядный, озимый
7507	Местный	Алжир	0,65	Многорядный
20710	Местный	Афганистан	0,65	Двурядный
19927	Vogelsanger Gold	Германия	0,70	Многорядный, озимый
27089	Maimmut	"	0,67	Многорядный, озимый
14947	Местный	Грузия	0,77	Двурядный
16613	"	"	0,76	Двурядный
8836	Местный	Италия	0,73	Многорядный
19304	Keystone	Канада	0,64	Многорядный
23989	Windzor	"	0,60	Многорядный
22400	La Mezita	Мексика	0,70	Многорядный
22404	Foluka 1	"	0,63	Многорядный
23305	CI 5313	Перу	0,76	Многорядный
11856	Паллидум 45	Россия, Саратовская обл.	0,80	Многорядный, двуручка
4568	Местный	Россия, Северная Осетия	0,78	Многорядный, озимый
15090	"	Россия, Северная Осетия	0,77	Многорядный
18122	Гиагинский 395	Россия, Краснодарский край	0,76	Многорядный, озимый
27649	Агул 2	"	0,69	Многорядный
4972	Местный	Россия, Омская обл.	0,65	Многорядный
27704	Силуэт	Россия, Ростовская обл.	0,63	Многорядный, озимый
11835	Irebi	США	0,81	Многорядный
14020	Местный	"	0,78	Многорядный
17838	Sol. 1667	"	0,60	Многорядный
21495	Местный	Таджикистан	0,72	Многорядный
10872	"	"	0,60	Многорядный, озимый
7725	Местный	Турция	0,86	Многорядный
760	"	"	0,84	Многорядный
22799	"	"	0,71	Двурядный
10890	Местный	Узбекистан	0,57	Многорядный
13036	Паллидум 4	Украина	0,86	Многорядный, озимый
27404	Росава	"	0,85	Многорядный, озимый
25302	Клепенинский	"	0,77	Многорядный, озимый
8544	Местный	Эфиопия	0,71	Многорядный
18843	"	"	0,62	Двурядный
10975	Miyogi Rokkaku	Япония	0,68	Многорядный, двуручка

№ по каталогу ВИР и генбанка Японии (NIAR)	Образец, сорт	Происхождение (страна, регион)	Величина факторной нагрузки	Характеристика сорта
Г р у п п а II				
20718	Местный	Афганистан	0,68	Многорядный
8061	Местный	Израиль	0,73	Многорядный, голозерный
5092	Местный	Казахстан	0,71	Многорядный
16342	Местный	Китай	0,92	Многорядный
16371	"	"	0,90	Многорядный, озимый
16236	"	"	0,85	Многорядный, озимый
18999	"	"	0,84	Многорядный
16203	"	"	0,82	Многорядный
6428	"	"	0,78	Многорядный
27206	Chinese CI 5091	"	0,74	Многорядный, голозерный
16201	Местный	"	0,69	Многорядный, озимый
18511	Сань-юэ-хуань	"	0,66	Многорядный, голозерный
10894	Местный	Таджикистан	0,74	Многорядный
21080	Местный	Туркменистан	0,82	Двурядный
9305	"	"	0,82	Многорядный
16468	"	"	0,81	Многорядный
6128	"	"	0,78	Многорядный
9298	"	"	0,77	Многорядный
16454	"	"	0,69	Многорядный
21089	Дисайдаря-Арпа	Узбекистан	0,65	Многорядный
28254	Местный	"	0,64	Двурядный
10892	"	"	0,59	Многорядный
8756	Местный	Эфиопия	0,83	Многорядный, голозерный
10980	Han Bozu	Япония	0,93	Многорядный, двуручка
8568	Kyugo	"	0,93	Многорядный
10988	Toganoo	"	0,92	Многорядный, озимый
21368	Kinaikatanoo	"	0,89	Многорядный, двуручка
11116	Choshiro	"	0,89	Многорядный, озимый
21370	Kamakura	"	0,88	Многорядный
10965	Kairyoo Omugi	"	0,85	Многорядный
11121	Shiromiyuki	"	0,82	Многорядный, голозерный
11013	Yabane	"	0,82	Многорядный, озимый
20351	Chugoku	"	0,82	Многорядный, озимый, голозерный
	Hadaka 2	"		
21367	Kanhadaka	"	0,82	Многорядный, озимый, голозерный
19349 (NIAR)	Kashima Mugi	"	0,80	Многорядный
84955 (NIAR)	Ichiban Boshi	"	0,80	Многорядный, голозерный
19509 (NIAR)	Natori Omugi	"	0,74	Многорядный
83893 (NIAR)	Masakado Mugi	"	0,68	Многорядный
7000	Местный	"	0,67	Многорядный, голозерный
42603 (NIAR)	Shan Rai	"	0,60	Многорядный
Г р у п п а III				
1063	Местный	Азербайджан	0,92	Двурядный
6553	Местный	Армения	0,92	Многорядный
6681	"	"	0,87	Многорядный, двурядный, голозерный
5279	Местный	Казахстан	0,92	Var. <i>nudum</i> , двурядный
2946	Местный	Россия, Красноярский край	0,88	Var. <i>nudum</i> , двурядный
11075	Местный	Россия, Сахалинская обл.	0,91	Многорядный, голозерный
14923	Местный	Таджикистан	0,94	Var. <i>nudum</i> , двурядный, озимый, голозерный
3118	"	"	0,88	Двурядный, голозерный
6817	Местный	Турция	0,77	Двурядный, голозерный
9262	Местный	Узбекистан	0,92	Var. <i>nudum</i> , двурядный
10887	"	"	0,89	Var. <i>nudum</i> , двурядный

№ по каталогу ВИР и генбанка Японии (NIAR)	Образец, сорт	Происхождение (страна, регион)	Величина факторной нагрузки	Характеристика сорта
Г р у п п а IV				
18307	Isaria	Австрия	0,70	Двурядный
19132	Местный	Азербайджан	0,77	Двурядный
19131	"	"	0,70	Двурядный
6611	Местный	Армения	0,74	Двурядный
17950	"	"	0,68	Двурядный
27372	Жодинский 5	Белоруссия	0,61	Двурядный
21546	Местный	Боливия	0,71	Двурядный
21527	"	"	0,64	Двурядный
28947	Arena	Германия	0,85	Двурядный
29578	Ursei	"	0,72	Двурядный
21875	Agamir	"	0,67	Двурядный
22696	Местный	Иран	0,59	Двурядный
15553	Duckbill 0.7	Канада	0,62	Двурядный
22405	Coja	Мексика	0,74	Двурядный
23301	Batua	Перу	0,73	Многорядный
16411	Местный	Россия, Архангельская обл.	0,72	Двурядный
27055	Приморский 89	Россия, Приморский край	0,79	Двурядный
4541	Местный	Россия, Вологодская обл.	0,67	Двурядный
26261	Таловский	Россия, Воронежская обл.	0,69	Двурядный
26823	Вятч	Россия, Кировская обл.	0,81	Двурядный
1030	Местный	Россия, Дагестан	0,63	Многорядный
9219	Местный	Россия, Удмуртия	0,66	Двурядный
27102	Красноярский 80	Россия, Красноярский край	0,74	Двурядный
26179	Омский 80	Россия, Омская обл.	0,51	Двурядный
28265	Местный	Узбекистан	0,71	Многорядный
18331	Донецкий 650	Украина	0,66	Двурядный
27373	Любимец 108	"	0,71	Двурядный
19934	Одесский 36	"	0,69	Двурядный
29578	Alexis	Франция	0,78	Двурядный
8691	Местный	Эфиопия	0,81	Двурядный
8724	"	"	0,81	Двурядный
8717	"	"	0,77	Двурядный
20031	Ahor 2544/63	"	0,75	Двурядный
8761	Местный	"	0,74	Двурядный
8759	"	"	0,73	Двурядный
18867	"	"	0,62	Двурядный
8526	"	"	0,58	Многорядный
18849	"	"	0,57	Двурядный
74188 (NIAR)	Miharu Gold	Япония	0,61	Двурядный
Г р у п п а V				
20699	Местный	Афганистан	0,89	Многорядный, голозерный
20703	"	"	0,87	Многорядный, голозерный
20714	"	"	0,79	Многорядный, голозерный
26859	Местный	Китай (Тибет)	0,62	Многорядный, голозерный
21496	Местный	Таджикистан	0,87	Многорядный, голозерный
21490	"	"	0,87	Многорядный, голозерный
8649	Местный	Узбекистан	0,85	Многорядный, голозерный
Г р у п п а VI				
8104	Местный	Алжир	0,58	Многорядный
7555	"	"	0,53	Многорядный
21536	Местный	Боливия	0,71	Многорядный
22293	"	"	0,67	Многорядный
21551	"	"	0,67	Многорядный
21528	"	"	0,61	Многорядный
8849	Местный	Египет	0,60	Многорядный
19264	Beecher	Израиль	0,67	Многорядный
8789	Местный	Италия (Сицилия)	0,69	Двурядный, многорядный
23300	Compuesto 21	Перу	0,71	Многорядный
15422	Club Mariout	США	0,52	Многорядный
11011	Tottomi-rokujuo	Япония	0,59	Многорядный, озимый
Г р у п п а VII				
20716	Местный	Афганистан	0,77	Двурядный
18362	Местный	Казахстан	0,68	Двурядный
21820	Местный	Россия, Дагестан	0,67	Двурядный
21081	Местный	Туркменистан	0,78	Двурядный
19177	Унумли-Арпа	Узбекистан	0,77	Двурядный
7998	Местный	"	0,69	Двурядный

№ по каталогу ВИР и генбанка Японии (NIAR)	Образец, сорт	Происхождение (страна, регион)	Величина факторной нагрузки	Характеристика сорта
Г р у п п а VIII				
15554	ОАС-21	Канада	0,61	Многорядный
16420	Местный	Россия, Кировская обл.	0,75	Многорядный
9423	"	Россия, Коми	0,74	Многорядный
16478	"	Россия, Иркутская обл.	0,71	Многорядный
9338	"	Россия, Архангельская обл.	0,68	Многорядный
Г р у п п а IX				
8164	Местный	Армения	0,76	Многорядный
6142	"	"	0,74	Двурядный, голозерный
6626	"	"	0,68	Двурядный
6557	"	"	0,63	Двурядный, голозерный
5034	Местный	Россия, Смоленская обл.	0,68	Двурядный
16475	Местный	Туркменистан	0,67	Двурядный
6885	Местный	Турция	0,69	Двурядный
8713	Местный	Эфиопия	0,67	Двурядный
Г р у п п а X				
14915	Местный	Таджикистан	0,73	Многорядный
14950	"	"	0,72	Многорядный
18146	Местный	Узбекистан	0,67	Многорядный
Г р у п п а XI				
18858	Местный	Эфиопия	0,61	Двурядный
20026	Аног 3535/63	"	0,61	Двурядный
18844	Местный	"	0,58	Многорядный
18830	"	"	0,56	Многорядный
Г р у п п а XII				
7519	Местный	Алжир	0,68	Многорядный
6617	Местный	Армения	0,64	Двурядный
16948	Краснодарский 2929	Россия, Краснодарский край	0,76	Многорядный, озимый
7626	Местный	Сирия	0,76	Двурядный
6816	Местный	Турция	0,74	Многорядный
Г р у п п а XIII				
14141	Местный	Азербайджан	0,53	Многорядный, озимый
17492	Местный	Грузия	0,64	Двурядный
8373	Местный	Кипр	0,56	Многорядный
7575	Местный	Марокко	0,47	Многорядный
3397	Местный	Турция	0,70	Двурядный

Очевидно, именно эта группа шестирядных сортов была представлена в нашем исследовании восточными (oriental) сортами. По данным Takahashi, восточные формы ячменя распространены в горном Непале, Восточном Китае, Корее и Японии (4). Однако мы обнаружили значительное количество сортов из Центральной Азии (субкластер *a* кластера 1), которые оказались генетически близки китайским и японским восточным сортам. Это обстоятельство свидетельствует о взаимосвязи между Восточно-азиатским и Среднеазиатским центрами генетического разнообразия ячменя. Возможно, эти центры образуют общую генетическую группу ячменя, которая в географическом плане представляет восточное направление в эволюции и распространении ячменя после его окультуривания.

Сорта подсемейства A2, которое включает кластеры 2, 3 и 4 (соответственно III, V и XIII группы), генетически значительно ближе к сортам кластера 1, чем к таковым подсемейства Б. Наличие этого изолированного подсемейства кластеров позволяет предполагать существование в генотипе ячменя групп сортов, связанных с возникновением и распространением в Закавказье и Центральной Азии двурядных голозерных (III группа) и многорядных голозерных (V группа) сортов. Поскольку последние возделывались в этих регионах еще в древнейшие времена, можно до-

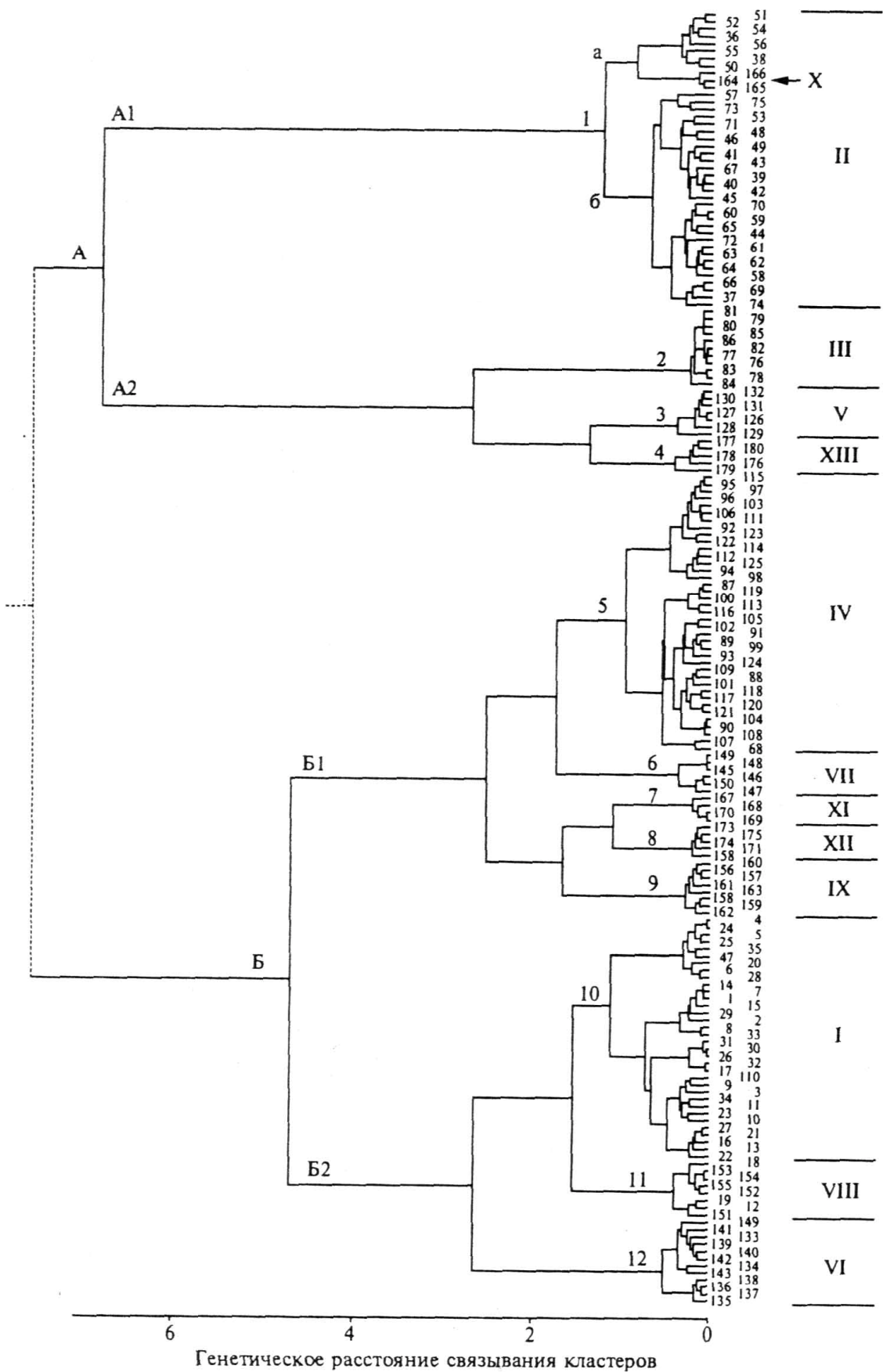


Рис. 3. Фенограмма распределения 180 сортов ячменя по кластерам и их семействам (см. табл. 4).

пустить возможность независимого происхождения перечисленных выше групп голозерных форм ячменя или, по крайней мере, признать наличие в прошлом процесса их длительной самостоятельной эволюции.

Семейство кластеров Б представлено сортами западного (occidental) направления; генетически оно более разнородно, чем семейство кластеров А, и образует восемь кластеров, которые объединяются в два достаточно четко изолированных подсемейства — Б1 и Б2. Подсемейство Б1 включает пять кластеров, причем наиболее многочисленный кластер 5, в который входят преимущественно сорта из России, стран Европы и Эфиопии, оказался расположен ближе к кластеру 6, содержащему сорта из стран Центральной Азии. В то же время в подсемействе Б1 объединились кластеры, соответствующие трем группам двурядных сортов из Эфиопии, стран Западной Азии и Закавказья, — соответственно кластеры 7, 8 и 9. В подсемейство Б2 входит три группы сортов. Наиболее многочисленный в этом подсемействе кластер 10 (преимущественно сорта из России, стран Европы и Нового Света) располагался ближе к кластеру 11, содержащему многорядные сорта североевропейской части России, Сибири и Канады. Последние, возможно, адаптированы к короткому периоду вегетации. Иерархически более удаленным от этих двух кластеров оказался кластер 12, включающий сорта из стран Средиземноморья и Нового Света. Четкое разделение двурядных и многорядных сортов ячменя, представляющих семейство кластеров Б, очевидно, отражает наличие двух основных тенденций в эволюции форм ячменя западного типа.

Глубокие генетические различия между двурядными и многорядными сортами североамериканских и западно-европейских образцов ячменя были обнаружены при RAPD-анализе (20, 21). Мы также выявили четкие различия между двурядными и многорядными сортами ячменя из стран СНГ на основании полиморфизма рестрикционных фрагментов ДНК (11). Здесь следует еще раз подчеркнуть факт наличия глубоких генетических различий между многорядными сортами ячменя западного (кластеры 10-12) и восточного (кластер 1) типа, что может свидетельствовать о связи с различными дикорастущими формами ячменя в процессе их происхождения и распространения. Генетическая дифференциация форм ячменя западного типа на двурядные и многорядные согласуется с делением культурных форм на два подвида — соответственно *subsp. distichum* L. и *subsp. vulgare* L. (по ботанической классификации Трофимовской) (22), или две основные группы разновидностей — *convar. distichon* и *convar. vulgare* (по классификации Bothmer) (1). По нашим данным, такое деление отражает не просто классификацию образцов, сходных по морфологии колоса, но, очевидно, соответствует наличию двух самостоятельных линий в эволюции культурных форм ячменя западного типа. Действительно, многочисленные археологические находки свидетельствуют о том, что двурядные и многорядные формы независимо возделывались в различных очагах древнего земледелия, начиная с первых этапов вхождения ячменя в культуру (23).

В заключение представляет интерес сопоставить выявленное в настоящей работе по результатам RAPD-анализа распределение сортов ячменя на генетические группы и экологическую дифференциацию, то есть деление на генцентры. Достаточно существенно различающиеся по своей генетической природе группы сортов (двурядные и многорядные — соответственно IV и I группы) получили широкое распространение на территории Европы и Сибири. В пределах этого генцентра выделяется группа сортов (VIII), адаптированных к северным широтам Евразии. Новосвет-

ский генцентр также представлен преимущественно двурядными и многорядными сортами — соответственно I и IV группы. Он включает также несколько многорядных сортов VI группы, более широко представленной в Средиземноморском генцентре. Учитывая наличие относительно небольшого временного промежутка формирования Новосветского генцентра, можно предположить, что его сортимент был сформирован преимущественно на основе сортов Европейско-сибирского и Средиземноморского генцентров. Средиземноморский генцентр в нашем исследовании представлен главным образом многорядными сортами I и VI группы; Абиссинский генцентр — двурядными сортами IV группы (только четыре сорта образуют специфичную для этого генцентра XI группу). Переднеазиатский генцентр оказался наиболее генетически разнородным — многорядные и двурядные сорта соответственно I и IV групп. Кроме этого, он содержит почти все двурядные сорта из IX группы и часть двурядных сортов из III, VII, XII и XIII групп. Эти данные подтверждают предположение ряда авторов о том, что Переднеазиатский генцентр мог быть первичным центром происхождения культурных форм ячменя, но только в отношении сортов западного типа (5). Как уже отмечалось, Среднеазиатский и Восточно-азиатский генцентры оказались генетически близкими — во II группу объединилась значительная часть сортов первого и большинство сортов второго генцентров; в Среднеазиатский генцентр вошли также двурядные сорта VII группы, голозерные двурядные (III группа) и шестирядные (V группа) сорта.

Таким образом, почти все генцентры, по нашим данным, оказались неоднородными в генетическом отношении и связанными между собой. Определенная специфичность наблюдалась по Средиземноморскому (многорядные сорта VI группы), Переднеазиатскому (двурядные сорта IX группы), Среднеазиатскому и Восточно-азиатскому (многорядные сорта II группы) генцентрам, а также по группам голозерных сортов. Описанный в нашей работе подход к анализу структуры генофонда ячменя с использованием ДНК-маркеров может быть рекомендован для генетической классификации этой культуры, а коллекция из 180 сортов, разделенная по данным RAPD-анализа на 13 генетических групп, более эффективно использована в селекции, а также при любых оценочных исследованиях генофонда ячменя.

ЛИТЕРАТУРА

1. Von Bothmer R., Jacobsen N., Baden C. e.a. An ecogeographical study of the genus *Hordeum*. Systematic and ecogeographic studies on crop gene pools. Italy, Rome, 1995, 7.
2. Вавилов Н.И. Центры происхождения культурных растений. Тр. по прикл. бот. и сел. Л., 1926, 16, 2: 1-138.
3. Вавилов Н.И. Мировые ресурсы сортов хлебных злаков, зерновых, бобовых, льна и их использование в селекции. М.-Л., 1957.
4. Takahashi R. The origin and evolution of cultivated barley. Adv. Genet., 1955, 7: 227-266.
5. Harlan J.R. Barley. In: Evolution of crop plants /Eds. N. Simmonds. London, N.Y., 1976: 93-98.
6. Takeda K. Inheritance of sensitivity to the insecticide diazinon in barley and the geographical distribution of sensitive varieties. Euphytica, 1996, 89: 297-304.
7. Лукьянова М.В., Трофимовская А.Я., Гудкова Г.Н. и др. Ячмень. Культурная флора СССР. Л., 1990, II, 2.
8. Knüpffer H., Van Hintum Th.J.L. The barley core collection: an international effort. In: Core collections of plant genetic resources. Italy, Rome, 1995: 171-178.

9. Ко на ре в В.Г., Га в ри лю к И.П., Гу ба ре ва Н.К. и др. Молекулярно-биологические аспекты прикладной ботаники, генетики и селекции. В сб.: Теоретические основы селекции /Под ред. В.Г. Конарева. М., 1993, 1.
10. Molecular genetic techniques for plant genetic resources /Eds. W.G. Ayad, T. Hodgkin, A. Jaradat e.a. Report of an IPGRI workshop, 9-11 October 1995, Rome, Italy. International Plant Genetic Resources Institute. Italy, Rome, 1997.
11. Strelchenko P.P., Gubareva N.K., Kovalyova O.N. e.a. Geographical and breeding trends within Eurasian cultivated barley germplasm revealed by molecular markers. In: Plant genetic resources: characterization and evaluation. New approaches for improved use of plant genetic resources. Japan, Ibaraki, 1998: 115-132.
12. Strelchenko P., Kovalyova O., Okuno K. Genetic differentiation and geographical distribution of barley germplasm based on RAPD markers. Gen. Res. Crop Evol., 1999, 46: 193-205.
13. Saghai-Maroof M.A., Soliman K.M., Jorgensen R.A. e.a. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984, 81: 8014-8018.
14. Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd edition /Eds. J. Sambrook., E.F. Fritsch, T. Maniatis. Cold Spring Harbor, USA, 1989.
15. StatSoft, Inc. Statistica for Windows (Computer program manual). Tulsa, OK, USA, 1995.
16. Nei M., Li W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76: 5269-5273.
17. Ward J.H.Jr. Hierarchical grouping to optimize an objective function. J. Am. Stat. Assoc., 1963, 58: 236-244. (Цит. по Дюран Б., Оделл П. Кластерный анализ. М., 1977.)
18. Jenrich R.I. Stepwise discriminant analysis. In: Statistical methods for digital computers. /Eds. K. Enslein, A. Ralston, H.S. Wilf. N.Y., 1977.
19. Strelchenko P., Kovalyova O., Okuno K. Comparative analysis of cultivated and wild barley genomes with using of RAPD markers. In: Abstr. 4th Gatersleben Research Conference «Plant genomics: structural, functional and applied aspects» (June 17-21, 1999, IPK, Gatersleben). Germany, 1999.
20. Tinker N.A., Fortin M.G., Mather D.E. Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationships in spring barley. Theor. Appl. Genet., 1993, 85: 976-984.
21. Noli E., Salvi S., Tuberosa R. Comparative analysis of genetic relationships in barley based on RFLP and RAPD markers. Genome, 1997, 40: 607-616.
22. Трофимовская А.Я. Ячмень. Эволюция, классификация, селекция. Л., 1972.
23. Синская Е.Н. Историческая география культурной флоры (на заре земледелия). Л., 1969.

*Всероссийский НИИ растениеводства
им. Н.И. Вавилова, 190000, С.-Петербург,
ул. Большая Морская, 42;
Национальный институт агробиологических
ресурсов, Япония, Цукуба*

*Поступила в редакцию
30 мая 2001 года*

MOLECULAR-GENETIC APPROACH TO ANALYSIS OF DIFFERENTIATION AND GEOGRAPHIC SPREADING OF CULTURAL BARLEY

P.P. Strel'chenko, O.N. Kovaleva, K. Okuno

S u m m a r y

By the RAPD procedure the authors studied polymorphism of 299 native and selectional barley varieties of different origin. The data matrix consists of 90 polymorphic fragments of amplified DNA. The method of major component and cluster analysis permit to divide studied varieties into genetic groups, which evidently reflect the main tendency of evolution and geographic spreading of cultural barley forms. For differentiation of the main genetic groups by the method of canonical discriminant analysis the DNA primer fragments was revealed. The article presents the list of 180 barley varieties belong to 13 main genetic groups, which may be used for any estimating investigations of barley genofond. It was shown, that DNA polymorphism might be applied for the study of genetic structure of collections of cultural plants genofond.