

RAPD АНАЛИЗ ВИДОВОГО ПОЛИМОРФИЗМА РОДА ЧИНА *LATHYRUS* L. СЕМЕЙСТВА FABACEAE LINDL.

М.А. Вишнякова, М.О. Бурляева, Н.В. Алпатьева, Ю.В. Чесноков

ГНУ ГНЦ РФ Всероссийский НИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург,
Россия, e-mail: m.vishnyakova@vir.nw.ru

Изучен молекулярный полиморфизм представителей родов *Lathyrus*, *Vicia*, *Lens*, *Pisum* семейства Fabaceae: трибы Viciaeae посредством RAPD анализа и определен уровень меж- и внутривидового полиморфизма. Основной акцент сделан на исследовании видов рода *Lathyrus*. Получены данные, позволяющие уточнить имеющиеся морфо-биологические системы рода *Lathyrus*, в частности, усомниться в отнесении видов секции *Cicerula* к типовой секции рода, объединении в один вид *Lathyrus articulatus* и *L. clymenum* и, напротив, получить аргументы в пользу объединения в один вид *L. japonicus* и *L. maritimus*. Впервые установлен различный уровень видовой изменчивости генома у видов: *L. sativus*, *L. cicera*, *L. inconspicuus*, *L. sphaericus*, *L. aphaca*, *L. pratensis*, *L. sylvestris*, *L. latifolius*, *L. tuberosus* и некоторых других. Показана возможность идентификации видов, а также выявления внутривидового и внутривидового полиморфизма *Lathyrus* RAPD анализом. В то же время вопросы о детальном статусе и объеме внутривидовых групп (секций) по-прежнему остаются наиболее спорными в систематике рода и не могут быть окончательно решены на основе полученных в настоящем исследовании данных.

Ключевые слова: чина, система рода, RAPD анализ, полиморфизм.

Введение

Род *Lathyrus* L. – один из представителей трибы Виковых (Viciaeae (Adans.) Bronn), сем. Fabaceae Lindl. В эволюционном плане триба считается наиболее специализированной в семействе. Лианоподобная травянистая форма роста, которой обладают виковые, – вторичное усложнение, возникшее из древних деревянистых тропических лиан в процессе их продвижения в умеренные области, считается вершиной эволюции (Серебряков, 1962). Кроме того, наличие усиков, характерное только для этой трибы бобовых, позволяет ее представителям лучше, чем другим лазящим растениям, приспособляться к самым разнообразным биотопам. Вместе с тем триба до сих пор имеет множество таксономических проблем, поскольку наличие общих морфологических признаков у видов трибы служит причиной разных мнений о количестве реальных родов в ней и таксономической принадлежности видов к родам. До настоящего времени вызывают сомнения границы родов

и видов, так как в них сочетаются черты прогрессивной эволюции и редукации с общими признаками предковых форм и четко выражен параллелизм. Триба дифференцирована слабо, имеет огромный ареал, несколько центров первичного и вторичного происхождения. Кроме того, многие крупные роды трибы не изучались в монографическом плане в мировом масштабе, а были предметом внимания флористов на ограниченных участках ареала.

Внутривидовая структура рода *Lathyrus*, его объем и филогения также являются предметом принципиальных разногласий. Существующие на современном этапе системы рода *Lathyrus*, основанные на географо-морфологическом и анатомическом методах, не решают основные противоречия в систематике рода, а именно: в определении объема рода и его секций. В классификации рода Р. Киріча (1983), впервые изучившей его в мировом масштабе на основе географо-морфологических и анатомических критериев, до настоящего времени остаются спорные утверждения. Принципиальное возра-

жение ряда современных исследователей вызывает объединение родов *Orobus* L. и *Lathyrus* в системе этого автора (Баранов, Бурляева, 1990; Станкевич, Репьев, 1999) и в исторической перспективе имеющих статус самостоятельных родов (Linnaeus, 1753; Adanson, 1763; Willdenow, 1802; Alefeld, 1861; Boissier, 1872 и др.).

Анализ биологического разнообразия, исследование взаимоотношений между и/или внутри различных видов, популяций, так же как и между отдельными генотипами (особями), создание систем для планомерного использования генофонда в фундаментальных исследованиях и селекции издавна являются одной из основных задач при работе с коллекцией ВИР. Пополнение методического арсенала решения этих задач методами маркирования генофонда посредством ПЦР амплификации ДНК прежде всего с произвольными (МААР-анализ) (Caetano-Anolles, 1994), а впоследствии и со специфичными праймерами (см. обзор Чесноков, 2005 и др.) открыло новые возможности для изучения структуры геномов, в том числе и для таксономических и филогенетических построений.

Ранее в ряде работ была проведена молекулярно-генетическая оценка систематики и биогеографии рода *Lathyrus*, основанная на использовании молекулярного полиморфизма внутренних транскрибируемых спейсеров генов рРНК и хлоропластной ДНК (Kenicer *et al.*, 2005), полиморфизма последовательности гена *matK* (Steele, Wojciechowski, 2003), а также данных AFLP (Badr *et al.*, 2002) и RAPD анализов (Croft *et al.*, 1999). Однако все эти работы давали противоречащие друг другу данные. Так, например, анализ хлоропластной ДНК выявил близость голарктических видов секции *Orobus* и видов секции *Notolathyrus* из Северной Америки, а также сходство видов монотипных секций *Orobon* и *Orobastrum* с видами секции *Lathyrus* (Asmussen, Liston, 1998). Авторы включили виды секции *Notolathyrus* в секцию *Orobus* и предложили либо разделить секцию *Lathyrus* на три небольшие секции *Orobon*, *Lathyrus*, *Orobastrum*, либо расширить эту секцию за счет включения в ее состав секций *Orobastrum* и *Orobon*. Кроме того, авторы признают самостоятельный статус секции *Cicerula* и указывают на близкое родство между видами

Lathyrus pratensis L. и *L. aphaca* L., которое предполагала Р. Курича (1983). AFLP анализ видов секции *Lathyrus* показал, что разделение этого таксона на ряд секций не правомерно, и все виды, входящие в нее, имеют монофилетическое происхождение (Badr *et al.*, 2002). Определенную групповую дифференциацию показал, однако, RAPD анализ 8 видов *Lathyrus*, которые сгруппировались в соответствии с принадлежностью к трем секциям: *Lathyrus*, *Clymenum* и *Linearicarpus* (Croft *et al.*, 1999). Однако набор изученных видов в этом исследовании слишком мал для того, чтобы судить о систематических разграничениях и филогенетических связях в роде *Lathyrus*. Таким образом, несмотря на накопленные факты, полученные посредством молекулярных методов, многие вопросы внутриродовой структуры рода, его объема и филогении по-прежнему требуют разрешения.

Цель данной работы состояла в уточнении имеющихся морфо-биологических систем рода *Lathyrus* посредством молекулярного RAPD анализа генома представителей рода из коллекции ГНУ ГНЦ РФ ВИР, а также их последующей молекулярно-генетической паспортизации.

Материалы и методы

Растительный материал. Материалом для исследования служила репрезентативная выборка из коллекции ВНИИР им. Н.И. Вавилова, состоящая из 250 образцов видов трибы *Vicieae* (49 видов), относящихся по системам F.K. Курича (1976, 1983) к 4 родам (*Lathyrus*, *Lens* Mill., *Vicia* L., *Pisum* L.), по классификации А.К. Станкевич – к 10 родам (*Orobus* L., *Bona Medik.*, *Faba* Mill., *Vicia*, *Ervum* L., *Lens*, *Ervilia* (L.) Link., *Pisum* L., *Lathyrus* L., *Clymenum* Mill.) и 7 секциям рода чина (*Aphaca* (Miller) Dumort., *Nissolia* (Miller) Dumort., *Eulathyrus* Ser., *Cicerula* (Medik.) Gren et Godr., *Orobastrum* Boiss., *Pratensis* Bässler, *Linearicarpus* Kupicha), а также проблематичного вида *Vicia unijuga* A. Вг. (*Orobus lathyroides* L.), принадлежащего, по разным классификациям, к различным таксонам (*Orobus* – *Vicia* – *Lathyrus*). Были изучены образцы с известными морфо-биологическими характеристиками из разных частей ареала рода (табл. 1).

Таблица 1

Список изученных видов трибы Viciae (Adans.) Bronn¹

№	Название вида	Число изученных образцов	Происхождение образца
Род <i>Lathyrus</i> L.			
Секция <i>Orobus</i> (L.) Gren et Godr. ²			
1	<i>Lathyrus gmelinii</i> Fritsch 2	1	Алтай
2	<i>Lathyrus japonicus</i> Willd. 2	1	Канада
3	<i>Lathyrus linifolius</i> (Reichard) Baessler ²	2	Германия, Норвегия
4	<i>Lathyrus maritimus</i> (L.) Bigel. ²	1	Карелия
5	<i>Lathyrus palustris</i> L. ²	1	Карелия
6	<i>Lathyrus pisiformis</i> L. ²	3	Алтай, Куйбышевская обл.
7	<i>Lathyrus vernus</i> (L.) Bernh. ²	3	Германия, Финляндия
Секция <i>Pratensis</i> Bassler			
8	<i>Lathyrus pratensis</i> L.	16	Канада, Франция, Италия, Финляндия, Карелия, Ленинградская обл., Казахстан, Тюменская обл., Омская обл., Екатеринбургская обл., Архангельская обл., Алтай, Закарпатье, Краснодарский край
Секция <i>Linearicarpus</i> Kupicha			
9	<i>Lathyrus angulatus</i> L.	2	Португалия
10	<i>Lathyrus inconspicuus</i> L.	11	Иран, Сирия, Туркмения, Узбекистан, Армения, Грузия, Чехословакия
11	<i>Lathyrus sphaericus</i> Retz.	7	Италия, Чехословакия, Турция
Секция <i>Lathyrus</i>			
12	<i>Lathyrus annuus</i> L. ⁴	6	Израиль, Палестина, Сирия, Турция, Иран, Германия
13	<i>Lathyrus cassius</i> Boiss. ⁴	3	Сирия, Ирак
14	<i>Lathyrus chloranthus</i> Boiss. ⁴	4	Иран, Армения, США
15	<i>Lathyrus chrysanthus</i> Boiss. ⁴	2	Сирия
16	<i>Lathyrus cicera</i> L. ⁴	8	Сирия, Алжир, Греция, Австралия
17	<i>Lathyrus ciliolatus</i> Rech. F. ⁴	2	Сирия
18	<i>Lathyrus gorgoni</i> Parl. ⁴	4	Сирия, Турция
19	<i>Lathyrus heterophyllus</i> L.	1	Франция
20	<i>Lathyrus hierosolymitanus</i> Boiss. ⁴	3	Сирия
21	<i>Lathyrus hirsutus</i> L. ⁴	6	Австралия, Чехословакия, Франция, Ставропольский кр., Азербайджан, Туркмения
22	<i>Lathyrus latifolius</i> L.	11	США, Германия, Швейцария, Италия, Венгрия, Краснодарский кр., Англия, Закарпатье
23	<i>Lathyrus mulkak</i> Lipsky	2	Таджикистан
24	<i>Lathyrus odoratus</i> L. ⁴	4	США, Голландия
25	<i>Lathyrus pseudo-cicera</i> Pampan. ⁴	2	Австралия, Иордания
26	<i>Lathyrus rotundifolius</i> Willd.	1	Германия
27	<i>Lathyrus sativus</i> L. ⁴	53	Италия, Испания, о. Кипр, Эфиопия, Алжир, Малая Азия, Сирия, Иран, Грузия, Памир, Индия, Куйбышевская обл., Украина, Германия, Аргентина

Окончание таблицы 1

№	Название вида	Число изученных образцов	Происхождение образца
28	<i>Lathyrus sylvestris</i> L.	14	Франция, Венгрия, Карпаты, Германия, Норвегия, Бельгия, Финляндия, Ленинградская обл., Псковская обл., Азербайджан, Корея
29	<i>Lathyrus tingitanus</i> L. ⁴	6	Австралия, Эквадор, Португалия, Польша, Чехословакия
30	<i>Lathyrus tuberosus</i> L.	6	Краснодарский кр., Армения, Грузия, Германия, Алтай, Новосибирская обл.
Секция <i>Orobastrum</i> Boiss.			
31	<i>Lathyrus setifolius</i> L.	1	Турция
Секция <i>Aphaca</i> (Miller) Dumort			
32	<i>Lathyrus aphaca</i> L.	15	Индия, Пакистан, Афганистан, Азербайджан, Краснодарский кр., Грузия, Армения, Туркмения, Израиль, Палестина, Швейцария, Англия, Бельгия, Уругвай
33	<i>Lathyrus stenolobus</i> Boiss.	1	Турция
Секция <i>Nissolia</i> (Miller) Dumort			
34	<i>Lathyrus nissolia</i> L.	5	Австралия, Португалия, Венгрия, Швейцария, Норвегия
Секция <i>Clymenum</i> (Miller) Dumort ²			
35	<i>Lathyrus articulatus</i> L. ²	5	Австралия, Венгрия, Португалия, о. Крит, Марокко
36	<i>Lathyrus clymenum</i> L. ²	7	Австралия, Германия, Чехословакия, Португалия, Греция, Болгария, о. Крит
37	<i>Lathyrus gloeospermus</i> Warb. et Eig. ²	2	Сирия
38	<i>Lathyrus ochrus</i> L. ²	5	Австралия, Португалия, Греция, Турция, Англия
Род <i>Pisum</i> L.			
39	<i>Pisum elatius</i> Steven ex M. Bieb.	1	–
40	<i>Pisum sativum</i> L.	6	Памир, Манчжурия, Африка, Дания, Египет, Армения
Род <i>Lens</i> Mill.			
41	<i>Lens culinaris</i> Medik.	2	Воронежская обл., Пензенская обл.
Род <i>Vicia</i> L.			
42	<i>Vicia peregrina</i> L.	1	Азербайджан
43	<i>Vicia sativa</i> L.	1	Московская обл.
44	<i>Vicia villosa</i> Roth	1	Тамбовская обл.
45	<i>Vicia narbonensis</i> L. ³	1	Алжир
46	<i>Vicia unijuga</i> A.Br. ³	1	Новосибирская обл.
47	<i>Vicia faba</i> L. ³	6	Украина, Финляндия, Россия
48	<i>Vicia hirsuta</i> (L.) Gray ³	1	Португалия
49	<i>Vicia ervilia</i> Willd. ³	1	Украина

¹ Виды представлены в соответствии с системой трибы Viciae F.K. Kupicha (1976, 1983) кроме *Lathyrus maritimus*, включенного данным автором в *Lathyrus japonicus*, и *Lathyrus articulatus*, отнесенного ею к *Lathyrus clymenum*. ² Виды секций *Orobos* (Miller) Dumort и *Clymenum* (L.) Gren et Godr. рода *Lathyrus* по классификации А.К. Станкевич (Станкевич, Репьев, 1999) относятся соответственно к роду *Orobos* L. и роду *Clymenum* Mill. ³ По классификации Станкевич (Станкевич, Репьев, 1999) *Vicia narbonensis* L. принадлежит к роду *Bona* Medik., *Vicia faba* к роду *Faba* Mill., *Vicia hirsuta* к роду *Ervum* L., *Vicia ervilia* к роду *Ervilia* (L.) Link., *Vicia unijuga* A. Br. к роду *Orobos*. ⁴ Виды секции *Cicercula* (Medik.) Gren et Godr. в системе F.K. Kupicha (1983), принадлежащие к секции *Lathyrus* (*Eulathyrus* Ser.).

Выделение ДНК. Выделение тотальной геномной ДНК проводили по описанной ранее методике (Edwards *et al.*, 1991) из 4–10-дневных проростков индивидуальных растений каждого образца, а также из смеси 5–10 проростков семян одного образца. Количество ДНК, экстрагируемой при использовании указанного метода, было не менее 0,5 мкг на образец. Чистота полученных препаратов составляла $OD_{260/280} = 1,6–1,9$. Все ПЦР реакции проводили в двукратной повторности. Кроме того, ДНК ряда образцов также экстрагировали двукратно (в нескольких повторностях). Всего было выделено и проанализировано 614 препаратов ДНК видов и популяций трибы Viciaeae.

RAPD анализ. Реакцию амплификации проводили в реакционной смеси объемом 15 мкл, содержащей 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM каждого dNTP; 0,5 мкМ праймера; 0,3 единицы Taq полимеразы («ДИАЛАТ ЛТД», Москва), 1x буфер из соответствующего набора, и 100 нг геномной ДНК в термоциклере «Teche» (США) в режиме: денатурация – 30 с. при 94 °С; отжиг праймера – 45 с. при 37 °С; синтез ДНК – 50 с. при 72 °С с числом циклов – 38 и предварительной денатурацией – 5 мин (94 °С). Заключительный цикл элонгации осуществляли при 72 °С – 10 мин.

Продукты реакции разделяли электрофорезом в 1,8 %-м агарозном геле в 1xTAE 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 (Нидерланды).

Статистический анализ данных. 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. Характер и степень RAPD изменчивости анализировали в отношении праймера и образца. На основании суммарной матрицы RAPD спектров с помощью компьютерного программного пакета NTSYSpc 2.02 были определены генетические дистанции между исследуемыми образцами. Для построения дендрограммы, демонстрирующей филогенетические отноше-

ния между изучаемыми образцами видов рода *Lathyrus* по результатам RAPD анализа, применили метод невзвешенного парно-группового кластерного анализа с арифметическим усреднением (UPGMA) с использованием программы NTSYSpc 2.02 и TREECON.

Результаты и обсуждение

Предварительная отработка условий RAPD анализа была проведена на наборе из 20 образцов – представителей 4 родов трибы Viciaeae (*Lathyrus*, *Vicia*, *Lens*, *Pisum*) и 7 секций рода *Lathyrus* (*Aphaca*, *Nissolia*, *Eulathyrus*, *Cicercula*, *Orobastrum*, *Pratensis*, *Linearicarpus*), включая проблематичный вид *Vicia unijuga* = *Orobolus lathyroides* L. Для анализа возможности детекции внутривидового полиморфизма были взяты по 4 представителя видов *L. sativus* и *Vicia faba*. Подбор RAPD праймеров, выявляющих как межвидовой, так и внутривидовой полиморфизм генома *Lathyrus*, проводился с использованием 22 стандартных 10-нуклеотидных праймеров серии OPA, OPD, OPE, OPH, OPK, OPN (Operon Technologies, USA), ранее отобранных как эффективно выявляющие геномный полиморфизм представителей Solanaceae, Lemnaceae и Poaceae (Кочиева и др., 2001; Кочиева и др., 2002; Kochieva *et al.*, 2004). Возможность использования данного набора праймеров для анализа представителей Fabaceae, как оказалось, весьма ограничена. Большинство праймеров не позволили идентифицировать генотипы всех представителей трибы Viciaeae. Лишь 9 из 22 праймеров могли выявить межвидовой полиморфизм *Lathyrus* и только 3 праймера были способны выявить внутривидовой полиморфизм генома у анализируемых представителей *L. sativus* и *Vicia faba*.

Подобранные праймеры OPA10, OPH2, OPH3, OPH6, OPH9, OPK4, OPK8, OPK9, OPK10 были использованы для оценки геномного полиморфизма 250 отобранных образцов. Большинство исследованных видов отличались значительным внутривидовым полиморфизмом. Основная зона разделения фрагментов находилась в пределах от 150 до 3000 п.н. (рис. 1).

В целом учитывалось 286 амплифицированных фрагментов. В результате для каждого из анализируемых образцов были идентифициро-

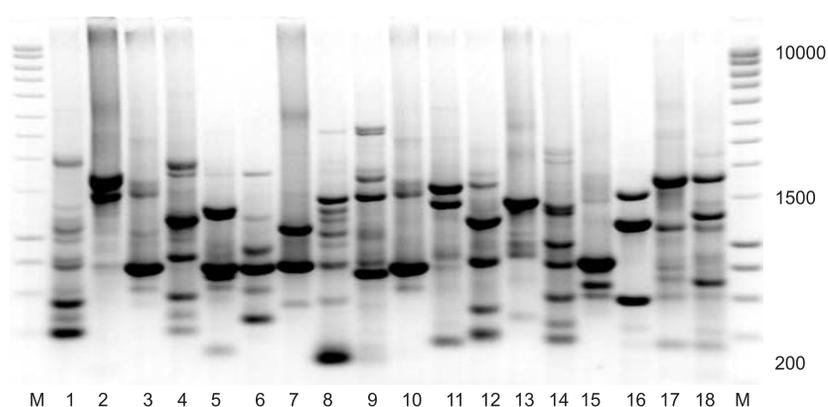


Рис. 1. Электрофоретические спектры RAPD фрагментов 16 видов трибы Viciae (праймер ОРК09).

М – маркер молекулярной массы SmartLader 1700-02 (Нидерланды). 1, 4 – *Vicia unijuga*; 2 – *Lathyrus japonicus*; 3 – *Pisum elatius*; 5 – *V. sativa*; 6 – *V. narbonensis*; 7 – *V. hirsuta*; 8 – *V. peregrina*; 9 – *V. villosa*; 10 – *P. sativum*; 11 – *Lens culinaris*; 12 – *V. ervilia*; 13 – *V. faba*; 14 – *L. sativus*; 15 – *L. sylvestris*; 16 – *L. ochrus*; 17 – *L. vernus*; 18 – *L. gmelinii*.

ваны индивидуальные RAPD спектры амплифицированных фрагментов ДНК.

Для геномов представителей трибы *Viciae* был определен мономорфный фрагмент с подвижностью 1000 пар оснований (ОРН6₁₀₀₀) (рис. 2, 3), который присутствовал в спектрах всех изученных видов, и один фрагмент с подвижностью 1800 пар оснований (ОРН6₁₈₀₀), характерный для видов *Lens*, *Pisum*, *Vicia* (рис. 2).

Воспроизводимость на уровне 300–2000 п.н. была практически 100 %, за исключением ряда минорных фрагментов, которые не учитывали при подсчете.

Также по итогам проведенного RAPD анализа были установлены фрагменты, специфичные для секций; *Lathyrus* – ОРА14₈₈₀, секции *Linearicarpus* – ОРА17₉₄₀, секции *Pratensis* – ОРА10₆₈₀, ОРА16₃₀₀, секции *Aphaca* – ОРА14₁₅₀₀, ОРА16₁₈₀₀, секции *Nissolia* – ОРА10₉₅₀, секции

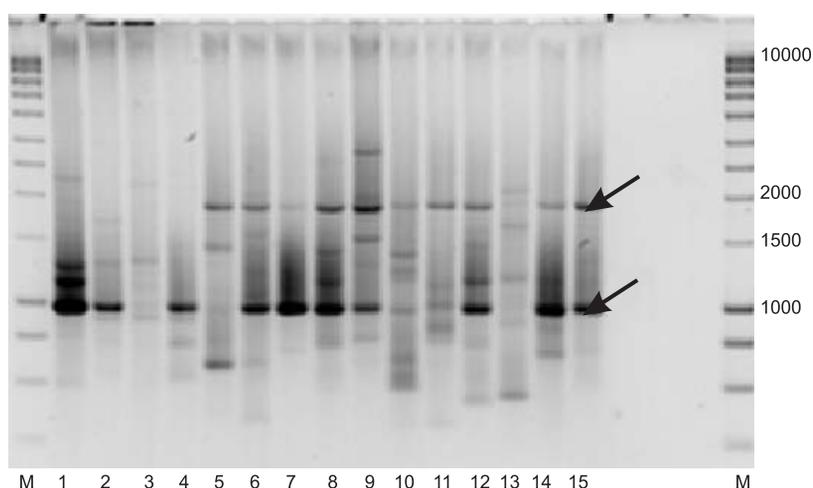


Рис. 2. Электрофоретические спектры RAPD фрагментов 15 видов трибы Viciae (праймер ОРН6).

М – маркер молекулярной массы SmartLader 1700-02 (Нидерланды). Нижней стрелкой обозначен мономорфный фрагмент, характерный для всех представителей трибы, верхней – фрагмент, выявленный у представителей родов *Lens*, *Pisum*, *Vicia*. 1 – *Lathyrus gloeospermus*, 2 – *L. ochrus*, 3 – *L. clymenum*, 4 – *L. articulatus*, 5 – *Vicia sativa*, 6 – *V. unijuga*, 7 – *V. narbonensis*, 8 – *Pisum elatius*, 9 – *V. villosa*, 10 – *V. hirsuta*, 11 – *V. peregrina*, 12 – *P. sativum*, 13 – *Lens culinaris*, 14 – *V. ervilia*, 15 – *V. faba*.

Clytemnum – ОРК₄₅₁₀, ОРК₉₁₂₅₀. Для секций *Orobis* и *Cicercula*, виды которых значительно отличались друг от друга по составу амплифицированных фрагментов ДНК, специфичные

фрагменты найдены не были. Для ряда видов чины были получены мономорфные видоспецифичные ампликоны, которые могут служить в качестве видоспецифичных маркеров (рис. 4).

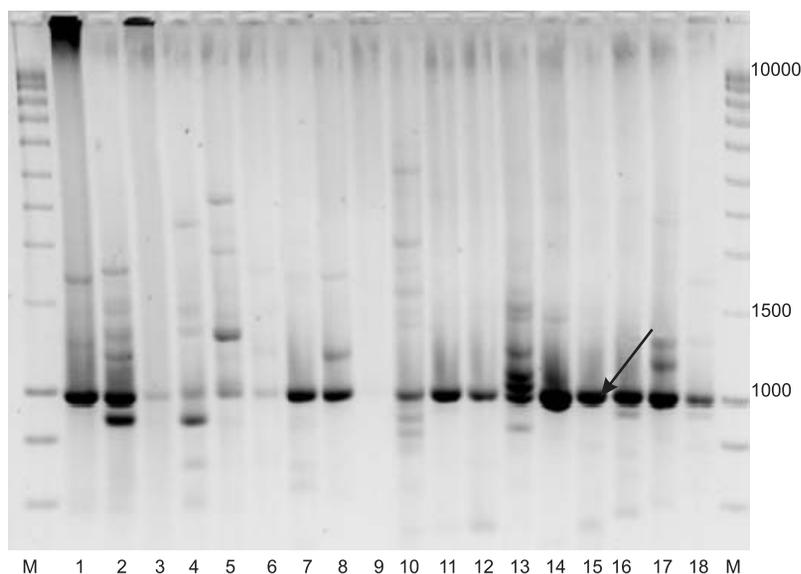


Рис. 3. Электрофоретические спектры RAPD фрагментов 18 видов рода *Lathyrus* (праймер ОРН6).

М – маркер молекулярной массы SmartLader 1700-02 (Нидерланды). Стрелкой обозначен компонент, мономорфный у всех представителей этих видов. 1 – *Lathyrus rotundifolius*, 2 – *L. tuberosus*, 3 – *L. cassius*, 4 – *L. odoratus*, 5 – *L. hirsutus*, 6 – *L. sphaericus*, 7 – *L. aphaca*, 8 – *L. inconspicuous*, 9 – *L. setifolius*, 10 – *L. nissolia*, 11 – *L. vernus*, 12 – *L. linifolius*, 13 – *L. japonicus*, 14 – *L. palustris*, 15 – *L. gmelinii*, 16 – *L. pisiformis*, 17 – *L. gloeospermus*, 18 – *L. ochrus*.

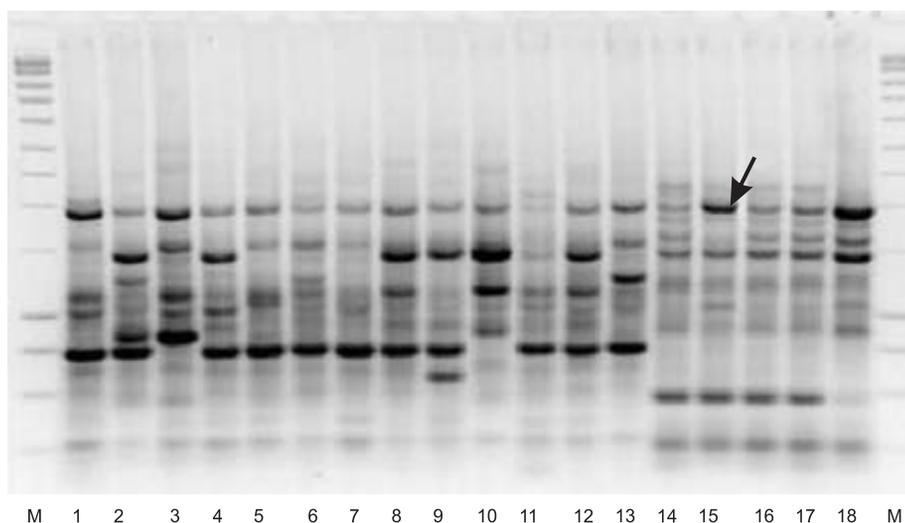


Рис. 4. Электрофоретические спектры RAPD фрагментов 13 образцов вида *L. sativus* (1–13) и 5 образцов *L. cicera* (14–18) разного происхождения, полученные с помощью праймера ОРА10.

Стрелкой обозначен компонент с молекулярной массой 1900 пар оснований, мономорфный у всех представителей этих видов. М – маркер молекулярной массы SmartLader 1700-02 (Нидерланды). 1 – к-704 (Италия); 2 – к-705 (Италия); 3 – к-240 (Германия); 4 – к-390 (о. Кипр); 5 – к-991 (Памир); 6 – к-772 (Испания); 7 – к-800 (Малая Азия); 8 – к-592 (Эфиопия); 9 – к-701 (Эфиопия); 10 – к-964 (Грузия); 11 – к-1684 (Сирия); 12 – к-13 (Иран); 13 – к-22 (Индия); 14 – к-100 (Германия); 15 – к-355 (Сирия); 16 – к-368 (Алжир); 17 – к-1418 (Австрия); 18 – к-1457 (Греция)¹.

¹ к – номер образца по каталогу ВИР. В скобках – происхождение образца.

Всего было получено 40 видоспецифичных фрагментов. Некоторые фрагменты были специфичны для группы видов из секции *Lathyrus*: для *L. sylvestris*, *L. latifolius*, *L. rotundifolius*, *L. heterophyllus* – ОРК9₈₀₀, для *L. sativus* и *L. cicera* – ОРА10₁₉₀₀.

Полученные мономорфные фрагменты могут считаться RAPD маркерами для представителей рода *Lathyrus*. При этом чем больше генетическая дистанция между исследуемыми видами, тем меньше у них общих продуктов амплификации. Выявляемые при электрофорезе мономорфные полосы у таксономически близких видов предполагают общность структурно-функциональной организации геномов этих видов. Каждый из видов в целом имел свой определенный спектр амплифицируемых RAPD продуктов, отличающийся от других количеством фрагментов, их размером и степенью выраженности. Некоторые праймеры, как указывалось выше, выявили присущие только одному конкретному виду ампликоны и, следовательно, являлись видоспецифичными.

Число суммарных зон, полученных при амплификации ДНК всех изученных видов рода *Lathyrus* с каждым из праймеров, варьировало от 5 до 25. Исследуемые образцы различались также по числу уникальных, характерных только для одного вида, ампликонов. Наибольшее их число присутствовало у *L. pratensis*, *L. tuberosus*, *L. latifolius*, *L. inconspicuus*, *L. aphaca*, *L. sylvestris*, *L. sativus*, *Vicia faba*. У *L. nissolia* и *L. gloeospermus* уникальных фрагментов не отмечалось (табл. 2).

Следует отметить, что наибольшим разнообразием по составу полиморфных фрагментов отличались виды *L. sativus*, *L. aphaca*, *L. pratensis*, *L. sylvestris*, *L. latifolius*. Наименьшее число полиморфных фрагментов наблюдалось у представителей видов: *L. gloeospermus*, *L. odoratus*, *L. chrysanthus*, *L. nissolia*. Полученные результаты указывают на значительный уровень межвидового и внутривидового полиморфизма (биоразнообразия) у представителей рода *Lathyrus*, выявляемого с помощью молекулярно-генетического анализа на уровне ДНК.

Для количественной оценки RAPD полиморфизма, выявляемого 4 RAPD праймерами (ОРА10, ОРК4, ОРК9, ОРН3), и определения уровня дивергенции между изученными видами

рода *Lathyrus*, а также другими родами трибы *Viciaeae*, была проанализирована ДНК 93 образцов представителей: 38 видов рода *Lathyrus*, 2 видов *Pisum*, 1 вида *Lens*, 8 видов *Vicia*. Полученные данные были представлены в виде матрицы состояний бинарных признаков, в которых наличие или отсутствие в RAPD спектрах одинаковых по размеру ампликонов рассматривалось как состояние 1 и 0 соответственно. На основе матрицы 226 полиморфных фрагментов ДНК построена единая обобщающая дендрограмма генетического подобия между изученными образцами видов рода *Lathyrus* (рис. 5).

На дендрограмме все роды трибы не образуют четких клад, однако ряд видов, в частности *Vicia faba* L., *Vicia ervilia* Willd. и др., формируют самостоятельные ветви, что говорит о возможности выделения их в самостоятельные таксоны (роды) и что имеет подтверждение в длительной истории их классификации. Из результатов нашего исследования очевидно, что триба Виковых представляет комплекс родственных видов, развитие которых шло параллельно, независимо друг от друга в зависимости от ареала и экологических условий. Это подтверждает мнение М.Г. Попова (1929) о высокой генетической однородности трибы Виковых, представляющей выдержанный комплекс форм, выделение родов из которого затруднительно и искусственно.

Кроме того, результаты сравнительного ПЦР анализа позволили сделать важные выводы о структуре секций рода. Так, представители секции *Cicerula* (Medik.) Gren et Godr. не образуют единый кластер и отдалены от видов типовой секции рода *Lathyrus*, что, по-видимому, свидетельствует о необоснованности их объединения в системе рода Kupicha (1983). Виды секции *Orobus* не образуют единой клады и представлены самостоятельными ветвями, что свидетельствует об их особом статусе и возможной неправомерности включения их в род *Lathyrus*. Кроме того, полученные данные выявили значительную разнородность оробоидных видов чин и вик, что ставит под сомнение точку зрения А.К. Станкевич (Станкевич, Репьев, 1999) и целого ряда ученых, объединяющих их в самостоятельный род *Orobus*.

Анализ генетического подобия подтвердил близость видов *L. articulatus* и *L. clymenum*,

Таблица 2

Дифференциация видов рода *Lathyrus*, выявленная посредством RAPD праймеров ОРА-10, ОРК-04, ОРК-09, ОРН-03

Название вида	Число изученных образцов	Аmplифицированные RAPD фрагменты		
		всего	мономорфные фрагменты	полиморфные фрагменты
<i>Lathyrus</i>				
<i>L. angulatus</i>	2	44	31	13
<i>L. annuus</i>	6	21	8	13
<i>L. aphaca</i>	15	55	4	51
<i>L. articulatus</i>	5	32	24	8
<i>L. cassius</i>	3	39	20	19
<i>L. chloranthus</i>	4	39	6	33
<i>L. chrysanthus</i>	2	13	12	1
<i>L. cicera</i>	8	26	15	11
<i>L. ciliolatus</i>	2	46	11	35
<i>L. clymenum</i>	7	32	13	19
<i>L. gloeospermus</i>	2	28	28	0
<i>L. gorgoni</i>	4	37	17	20
<i>L. hierosolymitanus</i>	3	31	17	14
<i>L. hirsutus</i>	6	28	15	13
<i>L. inconspicuus</i>	11	57	7	50
<i>L. latifolius</i>	11	62	6	56
<i>L. linifolius</i>	2	33	14	19
<i>L. nissolia</i>	5	36	36	0
<i>L. ochrus</i>	5	31	15	16
<i>L. odoratus</i>	4	34	30	4
<i>L. pisiformis L.</i>	3	38	34	10
<i>L. pratensis</i>	16	76	14	62
<i>L. pseudo-cicera</i>	2	18	6	12
<i>L. sativus</i>	53	63	15	48
<i>L. sphaericus</i>	7	50	30	20
<i>L. sylvestris</i>	14	55	6	49
<i>L. tingitanus</i>	6	30	3	27
<i>L. tuberosus</i>	6	62	12	50
<i>L. vernus</i>	3	43	30	13
<i>Pisum</i>				
<i>P. sativum</i>	6	45	28	17
<i>Lens</i>				
<i>L. culinaris</i>	2	46	36	8
<i>Vicia</i>				
<i>V. faba</i>	6	50	2	48

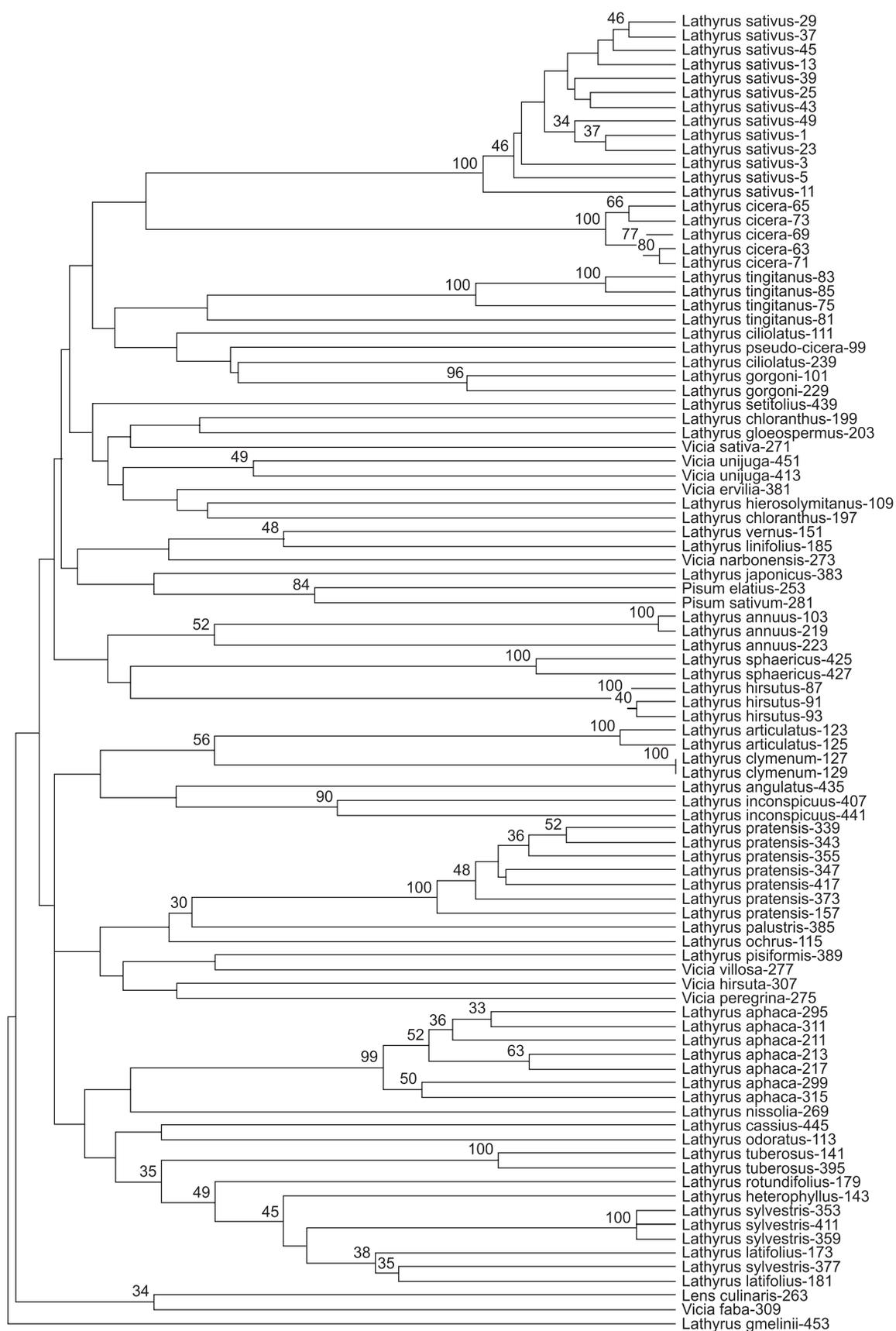


Рис. 5. Дендрограмма, полученная на основе сравнительного анализа 226 полиморфных амплифицированных RAPD фрагментов 93 представителей 38 видов рода *Lathyrus*, 2 видов *Pisum*, 1 вида *Lens*, 8 видов *Vicia*.

но позволил усомниться в их объединении (Kupicha, 1983) и встать на позиции авторов, признающих самостоятельность *L. articulatus* (Alefeld, 1861; Чефранова, 1987). Напротив, близость видов *L. japonicus* и *L. maritimus* подтверждает возможность их объединения в один вид *L. japonicus*, как это сделано в ряде классификаций (Kupicha, 1983; Чефранова, 1987 и др.) и подтверждено нами при изучении ITS-последовательностей генов рибосомной ДНК этих видов (Рыжова и др., 2007).

Виды *Pisum elatius* и *P. sativum* характеризовались бутстреп-поддержкой 84 %, что показывает их большое родство и ставит под сомнение правомерность возведения в ранг вида *P. elatius* разновидности посевного гороха *P. sativum* L. ssp. *elatius* (Bieb.) Aschers et Graebn.

Таким образом, в итоге проведенного исследования показана возможность дифференциации как отдельных образцов, так и видов чины с помощью RAPD анализа. У большинства видов межвидовые различия по компонентному составу RAPD фрагментов значительно превышали внутривидовое разнообразие. Исключение составляют только виды *L. sylvestris*, *L. latifolius*, *L. heterophyllus*, характеризующиеся самым большим разнообразием морфологических типов, имеющих обширный ареал и с давних пор используемых в культуре в качестве зерновых, кормовых и декоративных растений. Ряд образцов *L. sylvestris* по составу полиморфных фрагментов были ближе к *L. latifolius*, чем к другим образцам *L. sylvestris*. Часть образцов данных видов трудно распознать как по морфологическим, так и по молекулярным данным. Нечеткие границы этих двух видов, видимо, связаны с возможностью переопыления и возникновением гибридов.

Полиморфные RAPD праймеры пригодны для дифференциации образцов чины большинства видов и могут быть использованы при поиске дублетов в коллекциях растительных ресурсов. Мономорфные, специфические и воспроизводимые RAPD фрагменты представителей рода *Lathyrus* могут быть использованы в качестве маркеров некоторых видов и их секционной принадлежности, поскольку метод позволяет с определенной степенью точности выявить внутривидовую дифференциацию, приблизительно сходную с его делением на секции.

В нашем исследовании более или менее четко дифференцированными выявились группы, соответствующие секциям: *Cicerula*, *Clymenum*, *Lathyrus*, *Aphaca*, *Pratensis*, *Linearicarpus*, а также вполне дифференцированными оказались представители секций *Nissolia* (*L. nissolia*) и *Orobastrum* (*L. setifolius*). Эта дифференциация в целом соответствует используемой нами и наиболее принятой в мире системе Kupicha (1983) за исключением одного принципиально разногласия: необоснованности включения нутовидных чин *Cicerula* в секцию *Lathyrus* (Бурляева и др., 2007; Burlyaeva et al., 2007).

Сопоставление наших данных с полученными ранее фактами (Баранов, Бурляева, 1990) о строении семенной кожуры у видов рода *Lathyrus* выявило сходство в полученном авторами пространственном распределении видов и секций в системе двухфакторного анализа и в положении их в построенной нами дендрограмме. Это выразилось, в частности, в промежуточном положении секций *Nissolia* и *Clymenum* между секциями *Cicerula* и *Lathyrus*. Кроме того, в нашем исследовании со всей очевидностью также выявилась экотипическая дифференциация секций, отмеченная в цитируемой работе: мезофитные виды из рода *Lathyrus* локализованы на нижнем полюсе дендрограммы, а ксерофитные из секции *Cicerula* – на верхнем.

Выявленный нами различный уровень внутривидового разнообразия генома у видов *L. sativus*, *L. cicera*, *L. inconspicuus*, *L. sphaericus*, *L. aphaca*, *L. pratensis*, *L. sylvestris*, *L. latifolius*, *L. tuberosus* и некоторых других в сопоставлении с их фенотипическим разнообразием и агрономической ценностью может служить ценным ориентиром для использования коллекционных образцов в селекционном улучшении видов. Полученные данные о геномном полиморфизме образцов коллекции дополнили паспортные базы данных.

Следует отметить, что целый ряд вопросов о детальном статусе и объеме секций рода по-прежнему остается наиболее спорным в систематике рода *Lathyrus* и не может быть решен на основе полученных в настоящем исследовании данных.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 06-04-48869-а.

Литература

- Баранов М.П., Бурляева М.О. Анатомическое строение семенной кожуры видов рода *Lathyrus* L. // Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. 1990. Т. 135. С. 125–134.
- Бурляева М.О., Алпатъева Н.В., Рыжова Н.Н. и др. Молекулярные подходы к решению вопросов филогении и систематики рода *Lathyrus* L. // Матер. 4-й Междунар. науч. конф. «Биологическое разнообразие. Интродукция растений (5–8 июня 2007 г., С-Петербург), СПб., 2007. С. 25–26.
- Кочиева Е.З., Горюнова С.В., Поморцев А.А. Молекулярное маркирование геномов ячменей // Генетика. 2001. Т. 37. № 8. С. 1088–1094.
- Кочиева Е.З., Рыжова Н.Н., Храпалова И.А., Пухальский В.А. Использование метода RAPD анализа в определении генетического полиморфизма и филогенетических связей у представителей рода *Lycopersicon* (Tourn.) Mill. // Генетика. 2002. Т. 38. № 6. С. 874–880.
- Попов М.Г. Род *Cicer* и его виды. К проблеме происхождения средиземноморской флоры (Опыт морфологической и географической монографии) // Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. 1929. Т. 21. Вып. 1. 239 с.
- Рыжова Н.Н., Бурляева М.О., Кочиева Е.А., Вишнякова М.А. Использование ITS последовательностей для оценки таксономических отношений у представителей трибы *Vicieae* (Adans.) Bronn сем. *Fabaceae* Lindl. // Экол. генетика. 2007. Т. V. Вып. 3. С. 5–14.
- Серебряков И.Г. Экологическая морфология растений. Жизненные формы покрытосеменных и хвойных. М.: Высш. шк., 1962. 387 с.
- Станкевич А.К., Репьев С.И. Культурная флора. Вика. СПб.: ВИР, 1999. 490 с.
- Чесноков Ю.В. Молекулярные маркеры и управление генетическими ресурсами растений // Идентифицированный генофонд растений и селекция. СПб: ВИР, 2005. С. 240–250.
- Чефранова З.В. *Lathyrus* L. // Флора европейской части СССР. Л., 1987. Т. 6. С. 147–170.
- Adanson M. Familles des plantes. Paris, 1763. № 2. P. 331–332.
- Alefeld F. Genus *Vicia* L. Bonpandia. 1861. V. 9. P. 66–199.
- Asmussen C.B., Liston A. Chloroplast DNA characters, phylogeny, and classification of *Lathyrus* (Fabaceae) // Amer. J. Bot. 1998. V. 85. P. 387–401.
- Badr A., El Shazly H., El Rabey H., Watson L.E. Systematic relationships in *Lathyrus* sect. *Lathyrus* (Fabaceae) based on amplified fragment polymorphism (AFLP) data // Can. J. Bot. 2002. V. 80. P. 962–969.
- Boissier E. *Vicia* L., *Lathyrus* L. // Flora Orientalis. Geneve, 1872. V. 2. P. 565–622.
- Burlyayeva M.O., Alpatieva N.V., Vishnyakova M.A., Chesnokov Yu.V. Molecular-phylogenetic study of tribe *Vicieae* (Adans.) Bronn family *Fabaceae* Lindl. // 6th Europ. Conf. on Grain Legumes, Lisbon, Portugal. 2007. P. 249.
- Croft A.M., Pang E.C.K., Taylor P.W.J. Molecular analysis of *Lathyrus sativus* L. (grass pea) and related species // Euphytica. 1999. V. 107. P. 167–176.
- Caetano-Anolles G. MAAP: a versatile and universal tool for genome analysis // Plant Mol. Biol. 1994. V. 25. P. 1011–1026.
- Edwards S.K., Johnston 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.
- Kenicer G.J., Kajita T., Pennington R.T., Murata J. Systematics and biogeography of *Lathyrus* (Leguminosae) based on internal transcribed spacer and cpDNA sequence data // Am. J. Bot. 2005. V. 97. P. 1199–1209.
- Kochieva E.Z., Ryzhova N.N., van Dooijeweert W. et al. Assessment of genetic relationships in the genus *Capsicum* using different DNA marker systems // Eucarpia. 2004. P. 44–50.
- Kupicha F.K. The infrageneric structure of *Vicia* // Notes from the Royal Botanic Garden. Edinburg, 1976. V. 34. № 3. P. 287–326.
- Kupicha F.K. The infrageneric structure of *Lathyrus* // Notes R. Bot. Gard. Edinburg, 1983. V. 41. P. 209–244.
- Linnaeus C. Genera *Vicia*, *Orobis*, *Lathyrus*, *Ervum* // Species Plantarum. Holmae, 1753. P. 728–738.
- Steele K.P., Wojciechowski M.F. Phylogenetic analysis of tribes Trifolieae and *Vicieae*, based on sequences of the plastid gene *matK* (Papilionoideae: Leguminosae) // Advances in Legume Systematics / Eds K. Klitgaard, A. Bruneau. Part 10, High Level Systematics. Royal Botanic Garden, Kew. 2003. P. 355–370.
- Willdenow K.L. Linne Species Plantarum. Berlin, 1802. Bd. 3. № 2. S. 113, 1072–1109.

**RAPD-ANALYSIS OF INTRAGENERIC
POLYMORPHISM IN *LATHYRUS* L. FROM FABACEAE LINDL.**

M.A. Vishnyakova, M.O. Burlyaeva, N.V. Alpatieva, Yu.V. Chesnokov

State Scientific Centre N.I. Vavilov All-Russian Research Institute of Plant Industry of RAAS,
St. Petersburg, Russia, e-mail: m.vishnyakova@vir.nw.ru

Molecular polymorphism of the main genera of tribe Viciae (Fabaceae): *Lathyrus*, *Vicia*, *Lens*, *Pisum* has been studied by means of RAPD-analysis, and the level of inter- and intrageneric polymorphism has been determined. The main accent has been made on the investigation of *Lathyrus* species. The new data have been received, allowing to analyze different systems of the genus and to judge about the status of some disputable taxons, particularly, about the illegitimacy of reckoning the section *Cicercula* in the section *Lathyrus*, conjunction as one species *L. articulatus* and *L. clymenum*, and *vice versa*, possibility to consider as one species *L. japonicus* and *L. maritimus*. For the first time different level of specific genome diversity had been determined in the representatives of the species: *L. sativus*, *L. cicera*, *L. inconspicuous*, *L. sphaericus*, *L. aphaca*, *L. pratensis*, *L. sylvestris*, *L. latifolius*, *L. tuberosus* and some others. The applicability of RAPD-analysis either for species identification and for intra- and interspecific polymorphism discovery has been established. The possibility to reveal the groups of closely related species has been shown also. Nevertheless, some questions about detailed status and size of intrageneric groups of the genus are still disputable as before and can not be resolved on the basis of our data.