

Промышленная экология и биотехнологии. Экология (по отраслям)

УДК 575.22

ГРНТИ 34.23

DOI 10.24412/2409-3203-2022-30-413-419

МЕЖДУНАРОДНЫЙ ОПЫТ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ОВСА (АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР)

Кочнева Дарья Алексеевна

младший научный сотрудник

Таутекенова Азия Кайсаровна

младший научный сотрудник

лаборатория геномных исследований в растениеводстве

Федеральный исследовательский центр Тюменский научный центр Сибирского отделения

Российской академии наук

Россия, г. Тюмень

Аннотация: Овес (*Avena sativa* L.) считается одной из важнейших сельскохозяйственных культур в мире. Российская Федерация является крупнейшим производителем овса в мире, также имеется собственная коллекция сортов овса, созданная Всероссийским институтом генетических ресурсов имени Н. И. Вавилова. Для поддержания производства овса необходимо постоянное генетическое улучшение. Для этого в настоящее время отдаются предпочтения современным методам генетического анализа - генотипированию овса с молекулярными маркерами. Целью данной работы служит объединение информации о имеющихся международных коллекциях образцов овса, а также рассмотрение работ по его генотипированию.

Ключевые слова: Овес, генотипирование, генетические ресурсы растений, молекулярные маркеры, секвенирование, SNP.

INTERNATIONAL EXPERIENCE OF OAT GENOTYPING (ANALYTICAL REVIEW)

Kochneva Darya Alekseevna

Junior Researcher

Tautekenova Aziya Kaisarovna

Junior Researcher

Laboratory of Genomic Research in Crop Production

Federal Research Center Tyumen Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian

Academy of Science

Russia, Tyumen

Abstract: Oats (*Avena sativa* L.) is considered one of the most important agricultural crops in the world. The Russian Federation is the largest producer of oats in the world, and there is also its own collection of oat varieties created by the N. I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources. Continuous genetic improvement is necessary to maintain oat production. For this purpose, preferences are currently given to modern methods of genetic analysis - genotyping of oats with molecular markers. The purpose of this work is to combine information about the

existing international collections of oat samples, as well as to review the work on its genotyping.

Keywords: Oats, genotyping, plant genetic resources, molecular markers, sequencing, SNP.

Введение. Овес (*Avena sativa* L.) – является аллогексаплоидной ($2n=6x=42$) зерновой культурой, которая занимает седьмое место в мировом производстве зерновых после пшеницы, кукурузы, риса, ячменя, сорго и проса [1, 2]. Зерно овса используется в сельскохозяйственных нуждах как корм для животных, также используется как источник питательных веществ для человека. Также в зернах содержатся растительные белки, жиры, витамины (B, B2, PP, E), пищевые волокна и различные минеральные вещества. Поэтому из овса получают крупы, толокно и муку, которые можно использовать, как и в детском питании, так и при диетическом питании [3].

Для производства овса нужен прохладный и влажный климат, поэтому в странах с умеренным климатом выгодно выращивать овес. Также овес адаптирован к различным типам почв. Основными странами по производству овса являются Россия, Канада, Соединенные Штаты, Финляндия и Польша. К самым крупным производителям овса относят Нидерланды, Швейцарию, Западной Германию, Соединенные Королевства, Ирландию, Швецию и Францию [1].

Овес (*Avena sativa* L.) является сельскохозяйственной культурой, которая требует постоянного генетического улучшения для сельскохозяйственных потребностей и промышленного производства. Для решения подобной задачи подходит генотипирование. Но с этим имеются некоторые проблемы. Генотипирование затруднено из-за присутствия гомеологичных субгеномов, которые возникают в результате полиплоидии во время клеточного цикла. При полиплоидии организм может иметь более одной пары гомологичных наборов хромосом. Для этого перед генетиками ставится задача в поисках нужных маркеров овса. Маркеры необходимо отфильтровать, для того чтобы исключить те варианты маркеров, которые смешиваются с несколькими локусами [2]. Геномные исследования овса также усложняются из-за размеров и сложности гексаплоидного генома и различных хромосомных перестроек. Все эти нюансы сказываются на скорости изучения генома по сравнению с другими культурами [4].

Генотипирование — это методологический процесс определения аллельного содержания локусов в данном геноме, так называемый генотип, который помогает выявить различия между двумя особями или аллельным частотам среди особей популяции. В большинстве случаев генотипирование образовано на сравнительном анализе последовательностей ДНК определенного субъекта с применением имеющихся технологий молекулярных маркеров. Генотипирование — это важнейший шаг на пути к генетическим анализам, к анализам молекулярной селекции сельскохозяйственных культур, а также штрихкодированию уникальных биологических биоматериалов [5].

Начало изучения генетики и генотипирования овса началось в XX веке и было связано с вопросами систематики и филогении рода *Avena*. Сначала изучали наследование морфологических признаков генеративных органов: окраска и опушение цветковых чешуй. Позже был исследован и идентифицирован целый ряд генов, отвечающий за устойчивость и восприимчивость к различным болезням и вредителям [6].

Изучением овса занимались ученые из разных стран. Для создания мировой коллекции овса они обменивались друг с другом образцами, при объединении коллекций не было определенной систематизации, а также встречалось дублирование сортов. В исследовании Diederichsen A. по оценке дублирования Канадской коллекции овса (*Avena sativa* L.) из 339 образцов коллекции, 243 были отнесены к Швеции, 68 из Финляндии, 30 из Дании и 7 из Норвегии [7]. В 1966 г. была разработана стандартизированная система номенклатуры генов овса [8]. На основании новой номенклатуры генов уже в 1978 г. был

опубликован список генов овса. Это был первый документ, который собрал все определенные гены овса [9]. В 1992 г. список был дополнен [10].

На сегодняшний день к методам генотипирования, которые применимы к злаковым культурам, можно отнести следующие группы методов:

1. содержащие рестрикцию и электрофорез;
2. основанные на амплификации переменных локусов;
3. основанные на гибридизации;
4. основанные на секвенировании.

В последнее время чаще всего для изучения генетики и полиморфизма овса разрабатывают методы такие как полимеразная цепная реакция (ПЦР) с последующим электрофорезом или секвенированием.

Среди методов ПЦР для зерновых культур получил распространение анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов полимеразной цепной реакции (PCR-RFLP). Суть данного метода заключается в расщеплении копий ДНК специальными рестрикционными ферментами, в результате чего получаются отдельные полиморфные фрагменты, которые будут использоваться в последующем как маркеры [11]. Дальше маркеры будут использоваться для маркирования генома и участков локусов на электрофореграмме [6]. Полученные электрограммы можно будет расшифровать при помощи биоинформатических программ.

Существуют и другие методы: случайная амплификация полиморфной ДНК (RAPD), полиморфизм длины амплифицированного фрагмента (AFLP), полиморфизм микросателлитных участков ДНК, рибосомальных ДНК и т. д. [6].

Как говорилось выше, генотипирование возможно и еще одним методом - секвенирование частичных представлений генома. Такое генотипирование принято называть генотипирование путем секвенирования (GBS - genotyping-by-sequence). Суть GBS заключается в том, что сначала геном необходимо расщепить на более мелкие фрагменты при помощи одного и нескольких рестрикционных ферментов, затем полученные фрагменты будут секвенированы параллельными высокопроизводительными методами. Основываясь на данных полученных после секвенирования, вызов платформы для генотипирования SNP может быть выполнено благодаря различным пайплайнам биоинформатики [2].

Эти методы могут использоваться как в системе, так и отдельно каждый. Все зависит от целей исследователей [12, 13]. Особое место занимает электрофорез запасных белков, который имеет особую практическую значимость для сельского хозяйства [14, 15]. SNP - (single-nucleotide polymorphism) маркеры однонуклеотидного полиморфизма. В клетках точечные мутации возникают в результате изменений в одном нуклеотиде, поэтому техника проведения анализа с использованием данного маркера заключается в определении полиморфизма по одному нуклеотиду [16]. Данный вид ДНК-маркеров в настоящее время активно используется в генетике и селекции сельскохозяйственных культур. А сам GBS, по сути, это платформа для генотипирования SNP, основанная на секвенировании следующего поколения (NGS) [17].

Благодаря GBS в целях для сельского хозяйства уже были проведены следующие работы: насыщение уже имеющихся генетических карт сельскохозяйственных культур, проведена геномная селекция пшеницы, проведено генетическая упорядоченность черновой последовательности генома ячменя, а также описана характеристика генома пшеницы и ячменя и разнообразия зародышевой плазмы кукурузы и проса [2].

За последнее время методы генотипирования испытали существенные изменения, увеличился уровень машинного производства, разработаны новые современные методы биоинформатики. Базы данных, содержащих последовательности ДНК и методы генотипирования, постоянно увеличивают рост, тем самым ускоряя и упрощая работу. На

данный момент нет идеального метода генотипирования, в каждом есть свои преимущества и недостатки [18]. Поэтому методы генотипирования могут различаться в зависимости от поставленной задачи и даже в зависимости от вида зерновых культур. Возможна такая ситуация, что метод генотипирования, пригодный для пшеницы, может не подходить для овса. И как раз задачей для генетиков и биоинформатиков является нахождение таких методов, которые подходили для той или иной зерновой культуры. А так как среди зерновых культур овес с генетической точки зрения изучен довольно мало, в настоящее время отдается предпочтение изучению именно этого вида. Также идет подбор и изучение современных методов генетического анализа - генотипирование овса при помощи молекулярных маркеров.

Объекты и методы исследований.

В мировом генетическом банке хранится около 220 000 образцов овса рода *Avena* [19]. Самой большой коллекцией овса, содержащий 27 000 образцов является Канадский национальный генетический банк семян (Plant Gene Resources of Canada) [7]. Из которых 10 105 образцов приходится на гексаплоидный культивируемый овес *Avena sativa* L. [20].

Польская коллекция образцов овса, хранится в Национальном центре генетических ресурсов растений и составляет 2 500 образцов, из которых более 80% относятся к виду *Avena sativa* [19].

Изучением генетики овса в России занимается Всероссийский институт генетических ресурсов имени Н. И. Вавилова (ВИР). В основу создания генетической коллекции были положены списки генов, опубликованных в 1978 г. и 1992 г. Коллекция постоянно пополняется данными со всего мира об образцах с идентифицированными генами. В 1997 г. уже была опубликована коллекция образцов с данными о сортах, образцах культурных и дикорастущих видов, где были выявлены один или несколько идентифицированных генов. Описанные гены контролируют морфологические, агробиологические и биохимические признаки овса. Так как изучение генетики овса в основном было направлено на устойчивость к различным патогенам, поэтому больше всего представлено образцов с гена устойчивости к головне, мучнистой росе, стеблевой и корончатой ржавчине. В коллекции овса ВИР находится более 600 образцов культурных и дикорастущих видов с более чем 200 идентифицированных генов [6].

Результаты исследований.

Как известно, в селекции растений можно использовать ДНК-маркеры, например RFLP-маркеры (*restriction fragment length polymorphism-маркеры*), но для овса существует не так уж и много маркеров. Имеются отчеты об успешном применении на овсе маркерах, основанных на микросателлитных повторах (SSR) и маркерах ПЦР на основе интронов. Основная проблема – найти праймеры, которые будут полиморфными для овса. Эту задачу решают генетики по всему миру.

Jannink J.-L., Gardner S. W. из университета штата Айова решили заняться проблемой подбора ПЦР маркеров для работ с овсом. Для *Avena sativa* они создали дизайн для 32 маркеров, которые были сконструированы из последовательностей представленных в GenBank на четырех инбредных линиях овса. Практически все маркеры, кроме двух, показали хорошие результаты и смогли произвести амплификацию участков ДНК. Данные маркеры являются вида SSR [21].

Генотипированием мировой коллекции овса занимаются специалисты Института биологии и биотехнологий растений (г. Алматы) и Казахского национального университет им. аль-Фараби (г. Алматы). В данной работе представлено изучение генетического разнообразия овса с помощью ДНК-маркеров - SSR-маркеры (Simple Sequence Repeats). Ашимова А. Н. с соавторами прогенотипировали коллекцию овса из 163 сортов и линий *Avena sativa* L. и *Avena byzantine* s. Koch. Основная часть образцов была получена из мировой коллекции овса ВИР, представленная сортами из России, Украины, Беларуси,

Канады, США, стран Южной Америки и Европы. Остальная часть коллекции была представлена образцами казахстанской селекции.

Был проведен метод ПЦР анализа с использованием 29 пар SSR-праймеров, но только 19 оказались полиморфными для изучаемых коллекций: AM1, AM3, AM14, AM22, AM25, AM31, AM56, AM87, AM102, AM112, MAMA1, MAMA2, MAMA3, MAMA4, MAMA5, MAMA 6, MAMA11, MAMA12, HVM67.

В результате анализа был выявлен высокий уровень генетического разнообразия между отечественными образцами и образцами из других регионов мира. Больше всего генетическое разнообразие наблюдается в коллекциях сортов Казахстана и Восточной Европы [22].

Канадские ученые в соавторстве с учеными из США и Австралии провели проверку работу по применению метода GBS для исследования овса. Задача заключалась в создание массива SNP и создания базы последовательностей, по которой можно было бы делать прогнозы SNP. Материалом для работы служили ткани корней, побегов, структуры пестика и зрелых зародышей. Всего было отобрано 20 сортов овса для создания геномной библиотеки кДНК (комплементарная ДНК). Работа проводилась на проверку преимуществ массива SNP, основанный на последовательностях кДНК. Также были представлены подробные биоинформатические пайплайны и как проводилась фильтрация SNP.

Эффективность полученных новых массивов SNP проверялась на генотипирование 595 сортов овса и селекционных линий международных коллекций. Результаты показали, что применение SNP для генотипирования овса допустимо, но только для получения более точных результатов необходимо постоянно расширять массив и оптимизировать количество успешных SNP. Суть метода генотипирования путем секвенирования будет заключаться в преобразовании локусов GBS в массив SNP. А массивы SNP необходимы для обнаружения полиморфизмов сортов [23].

Применение высокоэффективного секвенирования для генотипирования сельскохозяйственных культур и новые методы биоинформатики в последнее десятилетие привело к образованию новых программ, способных генотипировать десятки тысяч геномных ДНК маркеров. В связи со снижением затрат на секвенирование дает возможность проводить ускоренное и высокоточное генотипирование сельскохозяйственных культур, что способствует ускорению улучшения урожая. Прогрессом в генотипировании являются методы генотипирования с помощью секвенирования (GBS) [24]. Такой прогресс в генотипировании прогнозирует более весомые достижения в будущем.

Среди российских ученых также присутствует многолетний опыт с использованием молекулярных маркеров. Молекулярные маркеры наиболее успешно используют для идентификации генетических ресурсов растений и генетической дифференциации. Для идентификации генетического разнообразия сортов овса из коллекции ВИР, объектом исследования были взяты семена 32 оригинальных образцов культурного овса хранящихся в коллекции ВИР еще с 20-х годов прошлого столетия и их репродукцией, которая была получена путем многократных пересевов в течение 80 лет на опытных станциях ВИР, в общей сложности было проанализировано 150 образцов, в которых было обнаружено и зарегистрировано 423 типа спектров авенина. Наличие образцов с идентичными или близкими по составу спектрами авенина, указывает на их возможную дублетную природу или генетическую близость [25].

Выводы

Изучением овса занимаются ученые из разных стран. Существует несколько крупных коллекций овса. Самой большой коллекцией считается Канадский национальный генбанк семян. Также коллекция овса имеется в Польше в Национальном центре генетических ресурсов растений. В России коллекция находится во Всероссийском

институте генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова.

Овес генетической точки зрения изучен не так детально, как пшеница, идентифицировано всего около 300 генов. В настоящее время ведутся работы по изучению полиморфизма овса, с целью получения новой информации о генах. Каждая страна пытается улучшить методы генотипирования овса, включая использования методов ПЦР с последующим электрофорезом и секвенирование нового поколения (NGS).

Увеличение коллекции идентифицированных генов даст возможность селекционерам подбирать соответствующие материалы для селекции овса, а для генетиков появится возможность для геномного редактирования растений.

Благодарности

Работа выполнена по госзаданию №122011300103–0 и при поддержке Западно-Сибирского межрегионального научно-образовательного центра мирового уровня.

Библиографический список:

1. Transformation of oats and its application to improving osmotic stress tolerance / Maqbool S.B, Zhong H., Oraby H.F, Sticklen M.B // *Methods Mol Biol.* – 2009. – №478. – P. 149-168
2. Using Genotyping-By-Sequencing (GBS) for genomic discovery in cultivated oats / Huang Y. F., Poland J. A., Wight C. P., [et al.]// *PLOS ONE.* – 2014. - №9(7): e102448.– DOI: 10.1371/journal.pone.0102448
3. Буданова А. Д., Белкин Р. И. Овес - ценная продовольственная культура (обзор) // *Мир инноваций.* – 2021. – №1. – С. 3–7
4. Fu Y. B., Yang M.-H. Genotyping-by-sequencing and its application to Oat genomic research // *Oat: Methods and protocols.* – 2017. – №1536. – P. 169–187
5. Hristov P. Genotyping// *Intech Open*, 2018. – DOI :10.5772/intechopen.71242
6. Лоскутов И. Г. Овёс (*Avena L.*). Распространение, систематика, эволюция и селекционная ценность. – СПб: ГНЦ РФ ВИР, 2007. – 336 с.
7. Diederichsen A. Duplication assessments in Nordic *Avena sativa* accessions at the Canadian national genebank // *Genet Resour Crop Evol.* – 2009. – №56. – P. 587–597.
8. Simons M. D., Zillinsky F. J., Jensen N. F A standardized system of nomenclature for genes governing characters of oats. – U.S.A: U.S. Department of Agriculture, Crops Research, 1966. – 22 p.
9. Oats: A standardized system of nomenclature for genes and chromosomes and catalog of genes governing characters // Simons M. D., Martens J. M., McKenzie R. I., [et al.]// 1978. USDA. Agric. Handb. №509.
10. Marshall H. G., Shaner G. E. Genetic and Inheritance in oat // *Oat Science and Technology*. Ed. by H. G. Marshall and M. E. Sorrels. U.S.A: Agronomy №33, 1992. – P. 509–571.
11. Kim Y., Choi S. J., Choi C. An efficient PCR-RFLP method for the rapid identification of korean pyropia species // *Molecules*, 2017. – №22(12):2182
12. Analysis of the genetic diversity of Russian common oat varieties using alleles of avenin-coding loci / A. V. Lyubimova, D. I. Eremin, I. G. Loskutov [et al.] // *BIO Web of Conferences: International Scientific and Practical Conference*, Tyumen, 19–20 июля 2021 года. – Tyumen: EDP Sciences, 2021. – P. 01015. – DOI 10.1051/bioconf/20213601015. – EDN JJSAAE.
13. Ostapenko, A. V. Polymorphism of avenin species *A. sativa* L., *A. byzantina* C. Koch. and *A. strigosa* Schreb / A. V. Ostapenko, G. V. Tobolova // *Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics and Biotechnology : The 3rd International Conference. Abstract book*, Novosibirsk, 17–21 июня 2015 года. – Novosibirsk: Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, 2015. – P. 39. – EDN OKHNLC.

14. Любимова А. В. Изучение характера наследования компонентов авенина у гибридов F₂ от скрещивания сортов овса посевного сибирской селекции / А. В. Любимова // Аграрный вестник Урала. – 2022. – № 2(217). – С. 48–59. – EDN VZQOKE.
15. Анализ генотипов селекционных линий овса посевного по аллелям авенин-кодирующих локусов / Ю. П. Прядун, А. В. Любимова, Г. В. Тоболова, Д. И. Еремин // Вестник КрасГАУ. – 2020. – № 11(164). – С. 106–113. – DOI 10.36718/1819-4036-2020-11-106-113. – EDN NSTJRW.
16. Омашева М. Е., Аубакирова К. П., Рябушкина Н. А. Молекулярные маркеры. Причины и последствия ошибок генотипирования // Биотехнология. Теория и практика. 2013. – №4. – С. 20–28
17. Development and Application of a Target Capture Sequencing SNP-Genotyping Platform in Rice/ Lee, C., Cheon, K.S., Shin, Y., Oh H., Jeong Y. M., Jang H., Park Y.C., Kim, K.Y., Cho H. C., Won Y.J., [et al.]// Genes, 2022. – 13(5). – 794. – <https://doi.org/10.3390/genes13050794>
18. Современные подходы к генотипированию возбудителей особо опасных инфекций / Бондарева О. С., Савченко С. С., Ткаченко Г. А., Абуева А.И., Муратова Ю.А., Антонов В.А. // Эпидемиология и инфекционные болезни, 2014. –С. 34–45.
19. Boczkowska M., Tarczyk E. Genetic diversity among Polish landraces of common oat (*Avena sativa* L.) // Genetic Resources and Crop Evolution, 2013. – №60. – P. 2157–2169
20. Diederichsen A. Assessments of genetic diversity within a world collection of cultivated hexaploid oat (*Avena sativa* L.) based on qualitative morphological characters// Genet Resour Crop Evol, 2008. – 55:419–440.
21. Jannik J.K., Gardner S. W. Expanding the pool of PCR-based markers for oat // Genomics, Molecular genetics & Biotechnology, 2005. – №45(6). – P. 2383–2387
22. Генотипирование мировой коллекции овса с использованием микросателлитных маркеров / Ашимова А. Н., Ермекбаева К. А., Турусбеков Е. К., Аbugалиева С. И. // Вестник КазНУ. Серия биология, 2016. –Т. 66. – №1. – С. 134–143
23. A SNP genotyping array for hexaploid oat / Tinker N. A., Chao S., Lazo G. R. [et al.] // The plant genome, 2014. – №7(3). –P. 1–8
24. Revolution in Genotyping Platforms for Crop Improvement. Scheben A, Batley J, Edwards D.// Adv Biochem Eng Biotechnol, 2018. –164:37-52. –DOI: 10.1007/10_2017_47. – PMID: 29356847.7
25. Лоскутов, И. Г. Роль молекулярно-биологических исследований в познании генофонда овса и его эффективном использовании в селекции // Аграрная Россия, 2008. – № 3. – С. 14–19.

