

СРАВНЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ RAPD-, AFLP- И SSR-МАРКЕРОВ ДЛЯ РАЗЛИЧЕНИЯ МЕСТНЫХ СОРТОВ ГЕКСАПЛОИДНЫХ ПШЕНИЦ

П. П. Стрельченко, О. П. Митрофанова, А. В. Кошарев

В молекулярной генетике разработан целый ряд подходов, позволяющих с высокой точностью выявлять полиморфизм ДНК у растений. В настоящей работе сравнили возможности наиболее широко распространенных маркерных систем (RAPD, AFLP и SSR) для различения местных сортов гексаплоидных пшениц. Показано, что все три использованных типа ДНК-маркеров обладают приблизительно равными возможностями для решения этой задачи. Из трех методов RAPD является наиболее простым в исполнении, однако характеризуется гораздо меньшей воспроизводимостью. Из AFLP- и SSR-методов первый — более трудоемкий и дорогостоящий. Сложность получаемых в AFLP-анализе спектров зачастую вызывает затруднения при их интерпретации. SSR-анализ методически более прост в исполнении и эффективен в различении местных сортов пшеницы. Как мультиаллельные маркеры микросателлиты оказались также наиболее эффективными в выявлении генотипов с редкими и уникальными генетическими изменениями. В частности, SSR-маркеры, которые обладают высокой скоростью мутирования, могут быть использованы для оценки степени и характера генетических изменений, происходящих в процессе многократной репродукции образцов коллекции.

Введение

Информация о генетическом разнообразии культурных растений имеет первостепенное значение как для совершенствования стратегии их эффективного сохранения *ex situ* и целенаправленного расширения генетической изменчивости в коллекциях, так и для определения путей использования коллекций в селекции.

В оценке генетического разнообразия культурных растений широко применяется анализ родословных сортов, изучение комплексов морфологических и хозяйственно ценных признаков, а также полиморфных белковых систем. В молекулярной генетике разработан целый ряд подходов, позволяющих с высокой точностью выявлять полиморфизм ДНК у растений. Условно можно определить три основных группы задач, для решения которых выявляемые в экспериментах фрагменты ДНК успешно используются как генетические маркеры [2, 17, 44]. Это, во-первых, создание подробных (насыщенных) генетических и физических карт хромосом различных видов культурных растений. Во-вторых, маркирование отдельных генов, контролирующих качественные признаки, и групп генов, детерминирующих количественные признаки (QTL). Следует отметить, что ДНК-маркеры не подвержены влиянию среды, поэтому могут быть включены в анализ на любой фазе развития растения. Третья группа задач связана с оценкой генофонда различных видов растений, характеристикой генетически модифицированных растений и гибридных форм, изучением организации геномов, филогенетическим, популяционным анализами и другими направлениями исследований.

ДНК-маркеры условно могут быть разделены на три типа, соответственно основанные на: 1) применении блот-гибридизации ДНК — RFLP-маркеры; 2) использовании полимеразной цепной реакции (ПЦР); 3) применении технологии ДНК-чипов и информации о нуклеотидных последовательностях обширных участков

генома — SNP-маркеры [1]. Последние в будущем, возможно, окажутся наиболее эффективными для решения перечисленных выше задач [26]. В настоящее время SNP-маркеры растений находятся лишь в начальной стадии разработки, которая будет существенно затруднена для крупных геномов, таких как геном мягкой пшеницы. Он содержит $1,7 \times 10^{10}$ п.н., включает в себя три родственных между собой генома А, В и D и более чем на 80% состоит из повторяющихся последовательностей ДНК [18]. Эти обстоятельства в значительной степени осложняют его изучение и разработку так называемых “локус-специфических” ДНК-маркеров [17]. Поэтому в анализе полиморфизма ДНК пшеницы, как и многих других культурных растений, наиболее широко используются методы, основанные на ПЦР, а именно: RAPD, AFLP и SSR [17]. Эти методы подробно описаны в обзорах [1, 2, 16, 17].

Если в RAPD-анализе выявляемый полиморфизм ДНК обусловлен главным образом различиями в сайтах связывания с праймерами, то в AFLP-анализе он определяется нуклеотидными различиями в сайтах рестрикции и фланкирующих их сайтах. При этом в обоих случаях полиморфизм регистрируется по наличию или отсутствию амплифицированного в ПЦР фрагмента ДНК определенного размера. Показано, что при использовании RAPD- и AFLP-маркеров могут амплифицироваться как уникальные, так и повторяющиеся последовательности ДНК. Оба типа этих маркеров широко распространены в геноме и могут быть картированы в любой из хромосом пшеницы [17, 20, 22].

В SSR-анализе полиморфизм выявляется в основном благодаря различиям амплифицированных фрагментов ДНК по их размеру. Изучаемые в этом анализе микросателлитные нуклеотидные последовательности, состоящие из коротких (1–6 п.н.) tandemных повторов, характеризуются высокой скоростью мутирования. Преимущественно из-за ошибок в процессе репли-

кации ДНК и неравного кроссинговера образуются варианты последовательностей, отличающиеся от исходной одним или несколькими повторами [13, 28]. При этом различающиеся по длине микросателлиты, относящиеся к одному исследуемому участку ДНК (локусу), обычно рассматриваются как аллели этого локуса. SSR-локусы также широко распространены в геномах растений. В настоящее время для мягкой пшеницы идентифицировано и картировано в хромосомах более 1000 SSR-маркеров [18].

Главной целью настоящей работы было сравнение возможностей RAPD-, AFLP- и SSR-маркеров для оценки генетического разнообразия местных сортов гексаплоидных пшениц.

Были поставлены следующие задачи:

1) Отобрать из коммерческих наборов произвольных RAPD- и AFLP-праймеров те из них, которые выявляют полиморфизм ДНК у местных сортов гексаплоидных пшениц.

2) Сравнить возможности RAPD-, AFLP- и SSR-маркеров для различения местных сортов гексаплоидных пшениц различного географического происхождения.

Методы исследования

Материалом для исследования послужил набор из 78 местных сортов из коллекции ВИР, относящихся к семи видам гексаплоидных пшениц с геномным составом AABBDD.

Методика RAPD-анализа, а также список использованных произвольных праймеров даны в работе [3]. В RAPD-анализе исследовали суммарную ДНК, выделенную из 15 – 25 проростков каждого сорта. В AFLP- и SSR-анализах ДНК выделяли из растений, выращенных из зерновок одного и того же колоса.

AFLP-анализ проводили по методике [43]. Для этого сначала геномную ДНК каждого сорта обрабатывали смесью ферментов рестрикции *Pst*I и *Mse*I, затем рестриктонные фрагменты ДНК сшивали с *Pst*I- и *Mse*I-адаптерами. Процедуру амплификации полученных таким путем фрагментов ДНК проводили в две стадии: сначала с праймерами без селективных нуклеотидов (*Pst*I-праймер: 5'-GACTGCGTACATGCAG-3'; *Mse*I-праймер: 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'), затем с *Pst*I- и *Mse*I-праймерами, которые содержали по три дополнительных селективных нуклеотида на 3'-концах. Продукты амплификации разделяли в 6% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях и окрашивали нитратом серебра [6]. Для определения размеров амплифицированных фрагментов ДНК в качестве стандартов использовали набор фрагментов, отличающихся друг от друга на 50 п.н. Окрашенные гели сканировали, а полученные изображения анализировали. При создании матрицы исходных данных присутствие или отсутствие в спектрах компонентов определенного размера кодировали соответственно цифрами 1 и 0.

В SSR-анализе амплификацию проводили по следующей схеме. Сначала ДНК денатурировали в течение

3 мин при 94°C, затем осуществляли 35 циклов амплификации (30 с при 94°C, 30 с при 45 – 60°C в зависимости от праймера, 30 с при 72°C) и наконец заключительный синтез продуктов проводили в течение 5 мин при 72°C [34]. Для дальнейшего анализа готовили смеси, состоящие из продуктов амплификации, полученных с двумя или тремя парами праймеров, меченных разными флюоресцентными красителями. Смеси анализировали в автоматическом секвенаторе ABI Prism 3100. Размеры фрагментов ДНК определяли с использованием программного обеспечения GeneScan v.3.7 NT. Наличие или отсутствие каждого аллеля (включая нулевые) изученных SSR-локусов при составлении исходной матрицы данных также кодировали цифрами 1 или 0.

Результаты и обсуждение

Первичный скрининг и отбор праймеров, позволяющих выявлять полиморфизм ДНК у исследуемой выборки сортов, а также дающих воспроизводимые результаты, является важным этапом работы с ДНК-маркерами. Его результаты в значительной степени определяют возможности решения поставленных задач. В RAPD-анализе проведенный первичный скрининг позволил

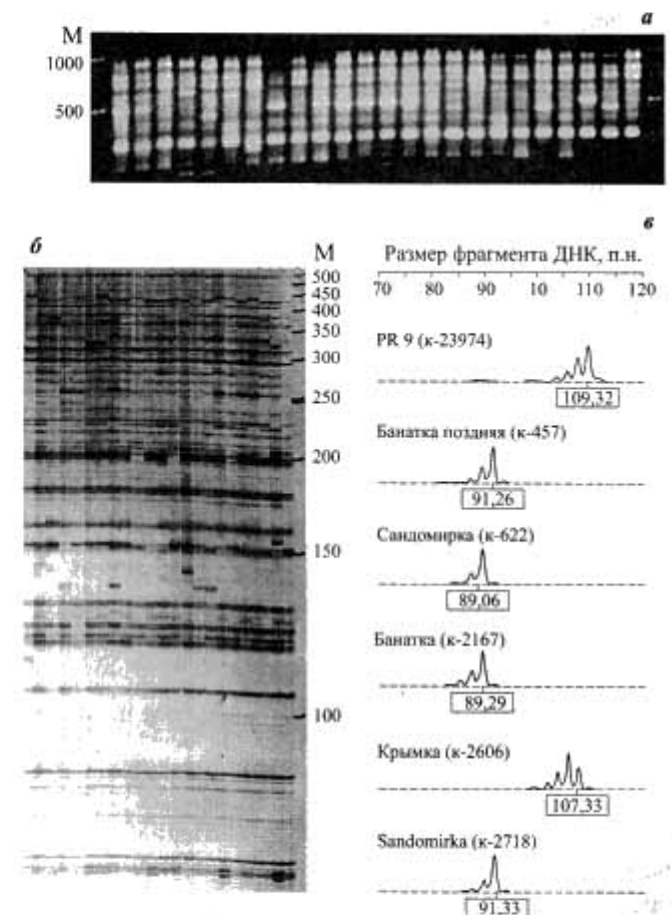


Рис. 1. Электрофоретические спектры продуктов амплификации ДНК местных сортов мягкой пшеницы, полученные с RAPD-праймером OP-F19 (а) и комбинацией праймеров *Pst*I-ACC/*Mse*I-AGC в AFLP-анализе (б), а также профили элюции фрагментов ДНК, амплифицированных для шести местных сортов мягкой пшеницы с участием праймеров SSR-локуса *Xgwm413* (в); М – стандарт-маркеры ДНК

Таблица 1. Комбинации AFLP-праймеров и число компонентов в спектрах, полученных с их участием в анализе 78 местных сортов пшеницы

Комбинация праймеров	Число компонентов в спектрах				
	общее	полиморфных			
		всего	% от общего числа	взято в анализ	% от общего числа
<i>PstI</i> -ACC/ <i>MseI</i> -CAC	100	41	41	24	24
<i>PstI</i> -ACC/ <i>MseI</i> -CCT	93	31	33	15	16
<i>PstI</i> -GGC/ <i>MseI</i> -ACC	81	25	31	13	16
<i>PstI</i> -GGG/ <i>MseI</i> -GAA	94	35	37	16	17
<i>PstI</i> -ACC/ <i>MseI</i> -AGC	109	48	44	22	20
Сумма	477	180	38	90	19

выявить из 708 олигонуклеотидных праймеров 28, которые оказались наиболее эффективными для оценки полиморфизма ДНК пшеницы [3]. На рис. 1а приведены спектры продуктов амплификации, полученные для 24 местных сортов мягкой пшеницы с использованием праймера OP-F19. Всего в исходную матрицу данных была включена информация о 125 полиморфных компонентах RAPD-спектров, что составило в среднем по 4,5 компонента на каждый праймер. Эти результаты согласуются с имеющимися в литературе данными ряда исследователей, выявивших в анализе генетического разнообразия гексаплоидных пшениц в среднем от 2,6 до 7,0 полиморфных RAPD-фрагментов на каждый из использованных праймеров [9, 10, 39, 40].

В AFLP-анализе для первичного скрининга использовали 30 произвольных комбинаций праймеров, которые ранее были отобраны для анализа эгилопсов [37]. Пять из них оказались наиболее эффективными для различения сортов гексаплоидных пшениц (табл. 1). AFLP-спектры содержали от 81 до 109 четко идентифицируемых компонентов, которые имели размеры от 50 до 600 п.н. На рис. 1б приведены спектры продуктов амплификации, полученные для 23 местных сортов мягкой пшеницы с использованием комбинации праймеров *PstI*-ACC/*MseI*-AGC. Из 477 компонентов, выявленных в анализе со всеми комбинациями праймеров, 180 компонентов (38% от их общего числа) были полиморфными. В исходную матрицу данных была включена информация только о 90 наиболее четко идентифицируемых полиморфных компонентах, что в среднем составило 18 компонентов на каждую комбинацию праймеров. Данный показатель, а также процент полиморфных AFLP-фрагментов оказались выше в настоящем исследовании, чем в ряде других работ, описывающих результаты изучения сортового разнообразия мягкой пшеницы [5, 12, 14, 21, 27]. Это можно объяснить наличием в нашей работе генетически более разнородной выборки сортов.

В SSR-анализе был изучен полиморфизм той же выборки сортов по 20 микросателлитным локусам, которые расположены в разных хромосомах пшеницы (табл. 2). При выборе праймеров учитывали результаты французских исследователей по изучению полиморфизма мягкой пшеницы [36]. Каждый праймер позволял исследовать один локус [34], лишь одна пара праймеров — два независимых локуса (*Xcfd71: 4a* и *4d*) [19]. На рис. 1в приведены профили элюции, полученные в результате электрофоретического разделения фрагментов ДНК шести местных сортов мягкой пшеницы, амплифицированных с участием праймеров SSR-локуса *Xgwm413*. Число аллелей на локус (различающихся по размеру фрагментов ДНК) у 78 изученных сортов варьировало от четырех для *Xgwm415* до 21 для *Xgwm312*. В общей сложности для всех 20 локусов идентифицировали 271 аллель. Нулевые аллели были выявлены только для *Xgwm135* (у одного сорта), *Xgwm234* и *Xcfd71-4a* (у трех сортов в каждом локусе). В среднем на каждый из 20 локусов было выявлено по 13,5 аллелей. В большинстве известных нам работ, выполненных с привлечением сортов гексаплоидных пшениц, число аллелей на локус изменялось в пределах от 3 до 10 [4, 7, 8, 11, 25, 31–33, 35, 38, 45]. Однако известны работы, в которых этот показатель был выше. Так, при анализе 998 сортов гексаплоидных пшениц из генбанка г. Гатерслебена (Германия) было идентифицировано в среднем 18,1 аллеля на каждый из 24 изученных SSR-локусов [23], а при изучении 559 местных и селекционных сортов мягкой пшеницы из Франции авторы выявили в среднем 14,5 аллелей на каждый из 42 проанализированных SSR-локусов [36].

Таким образом, обнаруженный в нашей работе уровень полиморфизма ДНК вполне сопоставим с тем, что описан другими исследователями. При этом в AFLP- и SSR-анализах в среднем каждая из использованных пар праймеров выявляла большее число полиморфных маркеров, чем в среднем каждый праймер в RAPD-анализе.

Сравнительный анализ полиморфизма ДНК позволил обнаружить существенные отличия SSR- от RAPD- и AFLP-маркеров по характеру их распределения у 78 сортов изученной выборки. Наглядно это иллюстрируют построенные гистограммы их распределения (рис. 2). В SSR-анализе пределы варьирования встречаемости отдельных аллелей были уже (0,01 – 0,69), а доля аллелей, выявляемых с частотой менее 0,05 (условно мы рассматриваем их как редкие), — преобладающей, хотя по каждому локусу было обнаружено от одного до пяти аллелей с частотой более 0,10. Однако из них лишь шесть имели частоту выше 0,35. Поэтому средняя величина встречаемости отдельного аллеля в SSR-анализе была в несколько раз меньше, чем фрагментов ДНК в RAPD- и AFLP-анализах (табл. 3). Среди редко встречающихся ДНК-маркеров (фрагментов ДНК, компонентов в спектре или аллелей) мы также условно выделили группу уникальных маркеров, присутствующих только у одного сорта. Наличие у сорта какого-либо редкого или уникального ДНК-маркера свидетельст-

Таблица 2. Список изученных микросателлитных локусов, их хромосомная локализация и последовательности (5' → 3') использованных в анализе праймеров, а также число аллелей локусов у 78 генотипов пшеницы и пределы варьирования размеров амплифицированных фрагментов ДНК

Название локуса*	Хромосомная локализация*	Структура SSR-локуса у сорта мягкой пшеницы Chinese Spring	Размеры фрагментов ДНК	Число аллелей (n = 271)	Последовательность праймера*, левый/правый
<i>Xgwm135</i>	1A	(GA)20	131 – 194	16	TGCAACATCGTTTTGAAAAGG/ ACACTGTCAACCTGGCAATG
<i>Xgwm413</i>	1B	(GA)18	82 – 112	14	TGCTTGTCTAGATTGCTTGGG/ GATCGTCTCGTCTTGGCA
<i>Xgwm337</i>	1D	(CT)5(CACT)6(CA)43	173 – 207	15	CCTCTTCTCCCTCACTTAGC/ TGCTAACTGGCCTTTGCC
<i>Xgwm312</i>	2A	(GA)37	186 – 262	21	ATCGCATGATGCACGTAGAG/ ACATGCATGCCTACCTAATGG
<i>Xgwm257</i>	2B	(GT)30	187 – 201	6	AGAGTGCATGGTGGGACG/ CCAAGACGATGCTGAAGTCA
<i>Xgwm261</i>	2D	(CT)21	165 – 215	15	CTCCCTGTACGCTAAGGC/ CTCGCGCTACTAGCCATTG
<i>Xgwm2</i>	3A	(CA)18	114 – 144	9	CTGCAAGCCTGTGATCAACT/ CATCTCAAATGATCGAACA
<i>Xgwm566</i>	3B	(CA)21(GA)2(TA)8	116 – 132	9	TCTGTCTACCCATGGGATTTG/ CTGGCTTCGAGGTAAGCAAC
<i>Xgwm341</i>	3D	(CT)26	122 – 178	17	TTCAGTGGTAGCGGTTCGAG/ CCGACATCTCATGGATCCAC
<i>Xcfd71 – 4a</i>	4A	(CA)10(GA)30	150 – 182	8	CAATAAGTAGGCCGGGACAA/ TGTGCCAGTTGAGTTTGCTC
<i>Xcfd71 – 4d</i>	4D	Тот же	186 – 212	14	Такие же
<i>Xgwm251</i>	4B	(CA)28	79 – 123	18	CAACTGGTTGCTACACAAGCA/ GGGATGTCTGTTCCATCTTAG
<i>Xgwm415</i>	5A	(GA)25imp	125 – 133	4	GATCTCCCATGTCCGCC/ CGACAGTCGTCACCTTGCCCTA
<i>Xgwm234</i>	5B	(CT)16(CA)20	225 – 253	15	GAGTCCTGATGTGAAGCTGTTG/ CTCATTGGGGTGTGTACGTG
<i>Xgwm190</i>	5D	(CT)22	198 – 220	11	GTGCTTGCTGAGCTATGAGTC/ GTGCCACGTGGTACCTTTG
<i>Xgwm427</i>	6A	(CA)31(CA)22	189 – 228	18	AAACTTAGAACTGTAATTCAGA/ AGTGTGTTTCATTTGACAGTT
<i>Xgwm626</i>	6B	(CT)5(GT)13	102 – 135	8	GATCTAAAATGTTATTTTCTCTC/ TGACTATCAGCTAAAACGTGT
<i>Xgwm260</i>	7A	(GA)20	148 – 186	19	GCCCCCTTGCACAAATC/ CGCAGCTACAGGAGGCC
<i>Xgwm46</i>	7B	(GA)2GC(GA)33	144 – 192	19	GCACGTGAATGGATTGGAC/ TGACCCAATAGTGGTGGTCA
<i>Xgwm44</i>	7D	(GA)28	150 – 194	15	GTTGAGCTTTTCAGTTCCGGC/ ACTGGCATCCACTGAGCTG

* По данным [19, 34].

вует о наличии, соответственно, редкой или уникальной мутации в геноме. В SSR-анализе такие мутации приводят к появлению редких и уникальных аллелей. В RAPD- и AFLP-анализах в спектрах отдельных сортов они приводят либо к появлению новых компонентов (встречаемость таких маркеров составляла менее 0,05), либо к исчезновению компонентов (их встречаемость превышала 0,95). Последние были условно обозначены как очень частые ДНК-маркеры.

Результаты, представленные в табл. 3, показывают, что большинство редких (146 из 177) и уникальных (80 из 100) генетических изменений было идентифицировано именно в SSR-анализе. Такие результаты можно объяснить особенностями структурной организации микросателлитных локусов и высокой скоростью

их мутирования, на что мы уже указывали выше. Важно отметить, что уникальные мутации SSR-локусов неравномерно распределялись среди изученных сортов. Из 48 сортов, у которых они были обнаружены, 19 (24% от всей выборки сортов) содержали 49 таких мутаций (63% от их общего числа), причем у каждого из этих сортов их было выявлено от 2 до 4.

В табл. 4 приведен список местных сортов пшеницы различного географического происхождения с тремя и более уникальными ДНК-маркерами. Из приведенных данных следует, что вероятность маркирования уникальных изменений в геноме гексаплоидных пшениц значительно выше в SSR-анализе, чем в RAPD- или AFLP-анализах. Из 40 ДНК-маркеров, перечисленных в табл. 4, 32 получены в SSR-, 5 — в RAPD- и 3 — в

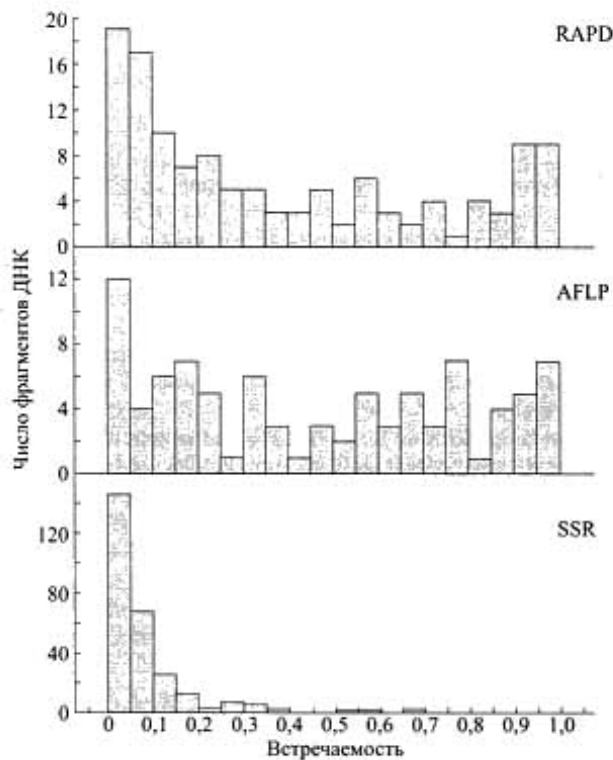


Рис. 2. Гистограммы распределения ДНК-маркеров по их встречаемости у 78 местных сортов гексаплоидных пшениц

AFLP-анализах. В целом анализ полиморфизма лишь 20 SSR-локусов у исследуемой выборки сортов позволил выявить примерно на порядок большее число редких мутаций, чем при изучении 125 RAPD- или 90 AFLP-фрагментов (табл. 3).

Известно, что микросателлитные последовательности ДНК выполняют важные и разнообразные функции. Результаты многочисленных экспериментов, проведенных на различных видах растений и животных, показывают, что такие последовательности могут участвовать в организации структуры хромосом, регуляции процессов репликации и рекомбинации ДНК, а также в регуляции активности генов [28]. Имеются также свидетельства того, что мутационные процессы, происходящие в SSR-локусах, могут находиться под влияни-

Таблица 3. Число ДНК-маркеров различного типа, включенных в анализ, их встречаемость у 78 сортов пшеницы

Тип	Общее число	Встречаемость		Редкие (< 0,05)		Очень частые (> 0,95)	
		пределы	средняя	всего*	% от общего числа	всего*	% от общего числа
RAPD	125	0,01 – 0,99	0,39	19 (8)	15,2	9 (5)	7,2
AFLP	90	0,01 – 0,99	0,46	12 (6)	13,3	7 (1)	7,8
SSR	271	0,01 – 0,69	0,07	146 (80)	53,9	0	0
Все	486	0,01 – 0,99	0,23	177 (94)	36,4	16 (6)	3,3

* В скобках приведено число маркеров, присутствующих или отсутствующих у одного сорта.

ем стрессовых факторов окружающей среды, то есть участвовать в механизмах адаптации растений [29]. В ряде работ показано, что редкие и уникальные генетические изменения могут накапливаться в тех SSR-локусах, которые имеют высокую скорость мутирования, уже в течение нескольких репродукций [41, 42]. Эволюционное значение таких мутационных изменений пока не ясно, однако, выявляющие их ДНК-маркеры могут быть использованы для оценки степени генетической стабильности генома в процессе многократной репродукции семян.

Обратимся к проблеме различия сортов. Выявлено, что каждый из 78 изученных сортов пшеницы имел оригинальный набор компонентов ДНК в RAPD-, AFLP- и SSR-анализах. Число компонентов для каждого сорта в этих анализах находилось в пределах 40 – 60, 36 – 49 и 19 – 20, соответственно. Все 78 сортов различались в RAPD-анализе с использованием трех праймеров, в AFLP-анализе — трех комбинаций праймеров, а в SSR-анализе — пяти пар праймеров (табл. 5). Преобладающее число сортов можно было различить с использованием двух комбинаций AFLP-праймеров или трех пар SSR-праймеров. Однако, для различия генетически близких сортов эндемичных видов *T. macha*,

Таблица 4. Сорта гексаплоидных пшениц, у которых выявлено три и более уникальных мутаций

Вид	Сорт	№ по каталогу ВИР	Страна происхождения	ДНК-маркеры
<i>T. aestivum</i>	Krasnaya	3902	Канада	<i>Xgwm135</i> ₁₉₀ , <i>Xgwm260</i> ₁₇₄ , <i>Xgwm341</i> ₁₇₈
<i>T. aestivum</i>	Candéal	18340	Испания	<i>OP-B13</i> ₄₇₀ , <i>Xcfd71-4d</i> ₁₉₀ , <i>Xgwm46</i> ₁₅₆ , <i>Xgwm312</i> ₁₈₆ , <i>Xgwm337</i> ₁₇₇
<i>T. aestivum</i>	Степнячка	21841	Украина	<i>Xgwm44</i> ₁₆₂ , <i>Xgwm135</i> ₁₃₁ , <i>Xgwm626</i> ₁₁₀
<i>T. aestivum</i>	Punjab Type 15	23811	Индия	<i>Xgwm251</i> ₉₉ , <i>Xgwm260</i> ₁₈₆ , <i>Xgwm261</i> ₁₇₃
<i>T. aestivum</i>	PR 9	23974	Индия	<i>Xgwm46</i> ₁₉₀ , <i>Xgwm135</i> ₁₄₉ , <i>Xgwm251</i> ₁₂₁ , <i>Xgwm413</i> ₁₁₂
<i>T. aestivum</i>	Гюльгери	40182	Россия	<i>UBC386</i> ₃₆₀ , <i>PstI-GGG/MseI-GAA</i> ₁₀₀ , <i>Xgwm44</i> ₁₉₂ , <i>Xgwm251</i> ₇₉
<i>T. compactum</i>	Lo-to-mai	44098	Китай	<i>OP-V</i> ₄₂₀ , <i>Xgwm234</i> ₂₂₅ , <i>Xgwm312</i> ₂₅₄
<i>T. compactum</i>	Местный	48997	Афганистан	<i>OP-A16</i> ₄₇₀ , <i>OP-T17</i> ₂₀₀ , <i>Xgwm251</i> ₁₀₅ , <i>Xgwm337</i> ₁₉₁ , <i>Xgwm427</i> ₂₀₂ , <i>Xgwm626</i> ₁₂₁
<i>T. spelta</i>	Местный	20626	Испания	<i>PstI-GGC/MseI-ACC</i> ₂₂₇ , <i>Xgwm312</i> ₂₁₆ , <i>Xgwm626</i> ₁₁₉
<i>T. spelta</i>	Местный	45819	Иран	<i>Xgwm135</i> ₁₃₃ , <i>Xgwm427</i> ₂₂₆ , <i>Xgwm566</i> ₁₁₆
<i>T. petropavlovskiy</i>	Майк	43376	Китай	<i>OP-O1</i> ₅₈₀ , <i>PstI-ACC/MseI-CAC</i> ₁₃₇ , <i>Xgwm44</i> ₁₅₀ , <i>Xgwm190</i> ₂₀₂ , <i>Xgwm312</i> ₂₄₀

Таблица 5. Минимальные наборы RAPD-, AFLP- и SSR-праймеров, обеспечивающие различение 78 местных сортов гексаплоидных пшениц

Тип ДНК-маркера	Наименование праймера, пары праймеров или SSR-локуса	Число компонентов	
		общее	у отдельных сортов
RAPD	OP-A16, OP-V9 и UBC 386	30	6 – 14
AFLP	<i>Pst</i> I-ACC/ <i>Mse</i> I-CAC, <i>Pst</i> I-GGG/ <i>Mse</i> I-GAA и <i>Pst</i> I-ACC/ <i>Mse</i> I-AGC	62	21 – 34
SSR	<i>Xgwm</i> 190, 234, 337, 341 и 566	67	4 – 5

T. vavilovii и *T. sphaerococcum* необходимо было использовать дополнительные ДНК-маркеры.

Общее число выявленных ДНК-маркеров составило 486 (см. табл. 3). Анализ их распределения по 78 сортам не показал наличия каких-либо существенных связей как между маркерами в пределах одной группы (например SSR), так и между маркерами, принадлежащими к разным группам (SSR и RAPD и т.п.). Таким образом, анализируемые участки (локусы) были случайно распределены по геному пшеницы. Были обнаружены только группы из 2 – 5 редких и/или очень частых маркеров, что свидетельствовало о накоплении редких мутаций у определенных сортов (см. табл. 4).

Таким образом, результаты нашей работы демонстрируют, что все три использованных типа ДНК-маркеров обладают приблизительно равными возможностями для различения местных сортов гексаплоидных пшениц. Хотя из трех примененных методов RAPD и является наиболее простым, по данным многих авторов он характеризуется гораздо меньшей воспроизводимостью результатов по сравнению с AFLP- и SSR-методами. Например, при сравнении этих методов в различных лабораториях на одних и тех же образцах томатов [24], воспроизводимость результатов RAPD-анализа составила лишь 75%. В то же время результаты AFLP- и SSR-анализов воспроизводились почти полностью. Эти методы были рекомендованы как в большей степени пригодные для стандартизации. Сравнивая возможности AFLP- и SSR-методов следует отметить, что первый из них более трудоемкий и дорогостоящий. Он требует обработки геномной ДНК рестриктазами, лигирования фрагментов ДНК с адаптерами и двухэтапной процедуры амплификации. Более того, сложность получаемых в AFLP-анализе спектров зачастую вызывает затруднения при их интерпретации. SSR-анализ методически более прост в исполнении и столь же эффективен в различении местных сортов пшеницы. Как мультиаллельные маркеры микросателлиты оказались также наиболее эффективными ДНК-маркерами в выявлении генотипов с редкими и уникальными генетическими изменениями. В частности, SSR-маркеры, которые обладают высокой скоростью мутирования, можно будет использовать для оценки степени и характера генетических изменений, происходящих в процессе многократной репродукции образцов коллекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алтухов Ю. П., Салменкова Е. А. Полиморфизм ДНК в популяционной генетике // Генетика. — 2002. — Т. 38, № 9. — С. 1173 – 1195.
2. Гречко В. В. Молекулярные маркеры ДНК в изучении филологии и систематики // Генетика. — 2002. — Т. 38, № 8. — С. 1013 – 1033.
3. Стрельченко П. П., Митрофанова О. П., Малышев Л. Л. и др. Генетическая дифференциация евразийского подвида мягкой пшеницы по данным RAPD-анализа // Аграрная Россия. — 2002. — № 3. — С. 11 – 23.
4. Ahmad M. Assessment of genomic diversity among wheat genotypes as determined by simple sequence repeats // Genome. — 2002. — V. 45. — P. 646 – 651.
5. Barrett B. A., Kidwell K. K. AFLP-based genetic diversity assessment among wheat cultivars from the Pacific Northwest // Crop Sci. — 1998. — V. 38. — P. 1261 – 1271.
6. Bassam B. J., Caetano-Anolles G., Gresshoff P. M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels // Anal. Biochem. — 1991. — V. 196. — P. 80 – 83.
7. Ben Amer I. M., Bömer A., Röder M. S. Detection of genetic diversity in Lybian wheat genotypes using wheat microsatellite markers // Gen. Res. Crop Evol. — 2001. — V. 48. — P. 579 – 585.
8. Bertin P., Grégoire D., Massart S., et al. Genetic diversity among European cultivated spelt revealed by microsatellites // Theor. Appl. Genet. — 2001. — V. 102. — P. 148 – 156.
9. Cao W., Hucl P., Scoles G., et al. Genetic diversity within spelta and macha wheats based on RAPD analysis // Euphytica. — 1998. — V. 104. — P. 181 – 189.
10. Cao W., Scoles-G., Hucl P., et al. Phylogenetic relationships of five morphological groups of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell.) based on RAPD analysis // Genome. — 2000. — V. 43. — P. 724 – 727.
11. Christiansen M. J., Andersen S. B., Ortiz R. Diversity changes in an intensively bred wheat germplasm during the 20th century // Mol. Breed. — 2002. — V. 9. — P. 1 – 11.
12. Donini P., Law J. R., Koebner R. M. D., et al. Temporal trends in the diversity of UK wheat // Theor. Appl. Genet. — 2000. — V. 100. — P. 912 – 917.
13. Ellegren H. Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference // Trends Genet. — 2000. — V. 16. — P. 551 – 558.
14. Grünberg A. M., Costa J. M., Kratochvil R. J. Amplified fragment length polymorphism in a selected sample of soft red winter wheat // Cereal Res. Commun. — 2001. — V. 29. — P. 251 – 258.
15. Guadagnuolo R., Savova Bianchi D., Felber F. Specific genetic markers for wheat, spelt, and four wild relatives: comparison of isozymes, RAPDs, and wheat microsatellites // Genome. — 2001. — V. 44. — P. 610 – 621.
16. Gupta P. K., Varshney R. K. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat // Euphytica. — 2000. — V. 113. — P. 163 – 185.
17. Gupta P. K., Varshney R. K., Sharma P. C., et al. Molecular markers and their applications in wheat breeding // Plant Breed. — 1999. — V. 118. — P. 369 – 390.
18. Gupta P. K., Balyan H. S., Edwards K. J., et al. Genetic mapping of 66 new microsatellite (SSR) loci in bread wheat // Theor. Appl. Genet. — 2002. — V. 105. — P. 413 – 422.
19. Guyomarc'h H., Sourdille P., Charmet G., et al. Characterization of polymorphic markers from *T. tauschii* and transferability to the D-genome of bread wheat // Theor. Appl. Genet. — 2002. — V. 104. — P. 1164 – 1172.
20. Hazen S. P., Leroy P., Ward R. W. AFLP in *Triticum aestivum* L.: patterns of genetic diversity and genome distribution // Euphytica. — 2002. — V. 125. — P. 89 – 102.
21. Hazen S. P., Zhu L., Kim H.-S., et al. Genetic diversity of winter wheat in Shaanxi province, China, and other common wheat

- germplasm pools // *Gen. Res. Crop Evol.* — 2002. — V. 49. — P. 439 – 448.
22. Huang X., Zeller F. J., Hsam S. L. K., et al. Chromosomal location of AFLP markers in common wheat utilizing nulli-tetrasomic stocks // *Genome.* — 2000. — V. 43. — P. 298 – 305.
 23. Huang X. Q., Börner A., Röder M. S., et al. Assessing genetic diversity of wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm using microsatellite markers // *Theor. Appl. Genet.* — 2002. — V. 105. — P. 699 – 707.
 24. Jones C. J., Edwards K. J., Castaglione S., et al. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories // *Mol. Breed.* — 1997. — V. 3. — P. 381 – 390.
 25. Kobiljski B., Quarrie S., Denčić S., et al. Genetic diversity of the Novi Sad wheat core collection revealed by microsatellites // *Cell. Mol. Biol. Lett.* — 2002. — V. 7. — P. 685 – 694.
 26. Koebner R. M. D., Summers R. W. 21st century wheat breeding: plot selection or plate detection? // *Trends Biotechnol.* — 2003. — V. 21. — P. 59 – 63.
 27. Law J. R., Donini P., Koebner R. M. D., et al. DNA profiling and plant variety registration. III: The statistical assessment of distinctness in wheat using amplified fragment length polymorphisms // *Euphytica.* — 1998. — V. 102. — P. 335 – 342.
 28. Li Y.-C., Korol A. B., Fahima T., et al. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review // *Mol. Ecol.* — 2002. — V. 11. — P. 2453 – 2465.
 29. Li Y.-C., Fahima T., Röder M. S., et al. Genetic effects on microsatellite diversity in wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*) at the Yehudiya microsite, Israel // *Heredity.* — 2003. — V. 90. — P. 150 – 156.
 30. Liu K., Goodman M., Muse S., et al. Genetic structure and diversity among maize inbred lines as inferred from DNA microsatellites // *Genetics.* — 2003. — V. 165. — P. 2117 – 2128.
 31. Manifesto M. M., Schlatter A. R., Hopp H. E., et al. Quantitative evaluation of genetic diversity in wheat germplasm using molecular markers // *Crop Sci.* — 2001. — V. 41. — P. 682 – 690.
 32. Plaschke J., Ganai M. W., Röder M. S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers // *Theor. Appl. Genet.* — 1995. — V. 91. — P. 1001 – 1007.
 33. Prasad M., Varshney R. K., Roy J. K., et al. The use of microsatellites for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat // *Theor. Appl. Genet.* — 2000. — V. 100. — P. 584 – 592.
 34. Röder M. S., Korzun V., Wendehake K., et al. A microsatellite map of wheat // *Genetics.* — 1998. — V. 149. — P. 2007 – 2023.
 35. Röder M. S., Wendehake K., Korzun V., et al. Construction and analysis of a microsatellite-based database of European wheat varieties // *Theor. Appl. Genet.* — 2002. — V. 106. — P. 67 – 73.
 36. Roussel V., Koenig J., Beckert M., et al. Molecular diversity in French bread wheat accessions related to temporal trends and breeding programmes // *Theor. Appl. Genet.* — 2004. — V. 108. — P. 920 – 930.
 37. Sasanuma T., Chabanc K., Endo T. R., et al. Characterization of genetic variation in and phylogenetic relationships among diploid *Aegilops* species by AFLP: incongruity of chloroplast and nuclear data // *Theor. Appl. Genet.* — 2004. — V. 108. — P. 612 – 618.
 38. Stachel M., Lelley T., Grausgruber H., et al. Application of microsatellites in wheat (*Triticum aestivum* L.) for studying genetic differentiation caused by selection for adaptation and use // *Theor. Appl. Genet.* — 2000. — V. 100. — P. 242 – 248.
 39. Sun Q., Ni Z., Gao J., Huang T. Genetic relationships and diversity among Tibetan wheat, common wheat and European spelt wheat revealed by RAPD markers // *Euphytica.* — 1998. — V. 99. — P. 205 – 211.
 40. Sun G., Bond M., Nass H., et al. RAPD polymorphisms in spring wheat cultivars and lines with different level of Fusarium resistance // *Theor. Appl. Genet.* — 2003. — V. 106. — P. 1059 – 1067.
 41. Thuillet A.-C., Bru D., David J., et al. Direct estimation of mutation rate for 10 microsatellite loci in durum wheat, *Triticum turgidum* (L.) Thell. ssp. *durum* Desf. // *Mol. Biol. Evol.* — 2002. — V. 19. — P. 122 – 125.
 42. Vigouroux Y., Jaqueth J. S., Matsuoka Y., et al. Rate and pattern of mutation at microsatellite loci in maize // *Mol. Biol. Evol.* — 2002. — V. 19. — P. 1251 – 1260.
 43. Vos P., Hogers R., Bleeker M., et al. AFLP a new technique for DNA fingerprinting // *Nucl. Acids Res.* — 1995. — V. 23. — P. 4407 – 4414.
 44. Weising K., Nybom H., Wolff K., Meyer W. DNA fingerprinting in plants and fungi // CRC Press. 1995. — 322 p.
 45. Zhang X. Y., Li C. W., Wang L. F., et al. An estimation of the minimum number of SSR alleles needed to reveal genetic relationships in wheat varieties. I. Information from large-scale planted varieties and cornerstone breeding parents in Chinese wheat improvement and production // *Theor. Appl. Genet.* — 2002. — V. 106. — P. 112 – 117.

Стрельченко П. П., канд. биол. наук;

Митрофинова О. П., докт. биол. наук;

Конарев А. В., докт. биол. наук, профессор;

Государственный научный центр (ГНЦ) РФ

Всероссийского НИИ растениеводства им. Н. И. Вавилова