

СТРУКТУРА ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВЗАИМОСВЯЗЕЙ МЕЖДУ МЕСТНЫМИ СОРТАМИ ГЕКСАПЛОИДНЫХ ПШЕНИЦ ПО ДАННЫМ RAPD-, AFLP- И SSR-АНАЛИЗОВ

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

Рассмотрены разные типы ДНК-маркеров, которые могут быть использованы для выяснения структуры генетических взаимосвязей между местными сортами пшеницы. Однако классификация, построенная на основе анализа суммарного набора маркеров с применением разных методов многомерной статистики, точнее раскрывает генетическую дифференциацию комплекса гексаплоидных пшениц, обусловленную их географическим распространением в ходе эволюции. Выявлена на основе изучения полиморфизма ДНК структура взаимосвязей между местными сортами гексаплоидных пшениц с геномной формулой $A^uA^vB^1B^2D^aD^{st}$, существенно отличающаяся от таковой в существующих ботанических классификациях.

Введение

Изучение полиморфизма ДНК открывает новые возможности в анализе внутривидовой генетической дифференциации культурных растений, поскольку ДНК-маркеры позволяют непосредственно характеризовать геном по большому числу локусов.

Комплекс гексаплоидных пшениц ($2n = 6x = 42$) рода *Triticum* L. с геномным составом $A^uA^vB^1B^2D^aD^{st}$ представлен огромным числом местных и селекционных сортов различного географического происхождения [8]. Формирование разнообразия местных сортов происходило в течение тысячелетий за счет мутационной изменчивости, дрейфа генов, связанного с миграцией человека, а также естественного и искусственного отборов. Последний проводился многими поколениями людей еще в доисторических относительно изолированных друг от друга очагах земледелия [4]. Многообразие в этих очагах почвенных, климатических и биотических условий обусловило формирование местных сортов, адаптированных к определенным комплексам факторов внешней среды и характеризующихся невысокой, но стабильной урожайностью при относительно низком уровне земледелия [13]. Благодаря этим особенностям формирования местные сорта гексаплоидных пшениц обладают значительным запасом полезных аллелей генов, контролирующих реакцию растений на стрессовые факторы. Однако лишь небольшая часть их генофонда была включена в селекцию.

Анализ полиморфизма местных сортов гексаплоидных пшениц различного географического происхождения и выяснение структуры их генетических взаимосвязей имеют большое значение не только для понимания эволюции пшеницы, но и повышения эффективности использования местных сортов как исходного материала в селекции. На основе систематизации и анализа результатов полевых наблюдений предпринимались попытки построения классификаций гексаплоидных пшениц с учетом их эколого-географических характеристик [5–7, 9, 11, 13]. С разработкой новых молекулярных подходов к анализу генетического разнообразия растений по характеру полиморфизма их

белков и ДНК проблема изучения генетической дифференциации пшеницы, связанной с ее адаптацией, получила дальнейшее развитие [8, 14, 21]. В частности в литературе имеются сведения, полученные с использованием разных типов ДНК-маркеров, об уровне генетического разнообразия и характере взаимосвязей преимущественно селекционных сортов мягкой пшеницы. Эти работы процитированы в другой нашей статье, опубликованной в этом номере журнала.

Целью настоящего исследования было изучение структуры генетических взаимосвязей между местными сортами гексаплоидных пшениц различного географического происхождения с использованием RAPD-, AFLP- и SSR-маркеров, а также сравнение возможностей данных маркеров для построения генетической классификации этих пшениц.

Методы исследования

Для проведения исследований из коллекции ВИР было отобрано 78 местных сортов, относящихся к различным видам гексаплоидной пшеницы с геномной формулой $A^uA^vB^1B^2D^aD^{st}$. При подборе сортов придерживались классификации, предложенной Н. И. Вавиловым [6], которая по сравнению с другими классификациями полнее отражает эколого-географическую дифференциацию пшеницы. В соответствии с этой классификацией разнообразие гексаплоидных пшениц объединено в шесть видов: *T. macha* Dek. et Men., *T. spelta* L., *T. Vavilovianum* Jakubz. = *T. vavilovii* (Thum.) Jakubz., *T. compactum* Host, *T. sphaerococcum* Perc. и *T. vulgare* Host. Среди них мягкая пшеница (*T. vulgare* = *T. aestivum* L.) включает пять подвидов (*irano-turkestanicum* Vav., *indicum* Vav., *sinicum* Vav., *eurasiaticum* Vav. и *abys-sinicum* Vav.), а карликовая пшеница (*T. compactum*) — три (*armeno-turkestanicum* Vav., *eurasiaticum* Vav. и *sinicum* Vav.). Принадлежность отобранных для анализа местных сортов к видам и подвидам по классификации Н. И. Вавилова дана в табл. 1. В работу не были включены сорта абиссинского подвида мягкой пшеницы. Сорта азиатской спельты *T. spelta* ssp. *kuckuckianum* Gokg. и пшеницы Петропавловского *T. petropavlovskyi*

Таблица 1. Принадлежность отобранных для анализа местных сортов гексаплоидных пшениц к видам и подвидам по Н. И. Вавилову [6]

Код сорта	Вид, подвид пшеницы	Страна происхождения изученных сортов
MA 1, MA 2	<i>T. macha</i> — маха	Грузия
SP 1 – SP 4	<i>T. spelta</i> — спельта <i>ssp. spelta</i> — европейский	Испания, Швейцария
SK 1 – SK 4	<i>ssp. kuckuckianum*</i> — азиатский	Азербайджан, Иран, Таджикистан, Узбекистан
VA 1, VA 2	<i>T. Vavilovianum</i> = <i>T. vavilovii</i> – Вавилова	Армения
CA 1 – CA 4	<i>T. compactum</i> — карликовая <i>ssp. armeno-turkestanicum</i> — армяно-туркетанский	Афганистан, Таджикистан, Узбекистан
CE 1 – CE 3	<i>ssp. eurasiaticum</i> — евразийский	Китай, Монголия, Россия
CS 1 – CS 3	<i>ssp. sinicum</i> — китайский	Китай
IT 1 – IT 7	<i>T. vulgare</i> = <i>T. aestivum</i> — мягкая пшеница <i>ssp. irano-turkestanicum</i> — ирано-туркестанский	Азербайджан, Китай, Таджикистан, Туркменистан, Узбекистан
IN 1 – IN 9	<i>ssp. indicum</i> — индийский	Индия, Пакистан
SI 1 – SI 5	<i>ssp. sinicum</i> — китайский	Китай, Япония
EU 1 – EU 31	<i>ssp. eurasiaticum</i> — евразийский	Армения, Азербайджан, Белоруссия, Канада, Грузия, Молдова, Польша, Россия, Испания, Швейцария, Турция, Украина
SH 1 – SH 3	<i>T. sphaerococcum</i> — шарозерная	Индия, Пакистан
PT 1	<i>T. petropavlovskiyi*</i> — Петропавловского	Китай

* Вид *T. spelta* разделен на два подвида, а *T. petropavlovskiyi* обозначен как отдельный вид в соответствии с классификацией [7].

Udacz. et Migusvh. обнаружены относительно недавно. Их систематическое положение приведено в соответствии с номенклатурой [7]. Полный список изученных сортов представлен в табл. 2. Сорта происходили из 22 стран Азии и Европы.

Методы анализа и характеристика ДНК-маркеров подробно описаны в другой нашей статье (см. настоящий номер журнала, статья Стрельченко и др.). Всего исходные матрицы данных RAPD-, AFLP- и SSR-анализов содержали информацию о 125, 90 и 271 маркере, соответственно, а матрица суммарных данных — о 486 маркерах. В целом было изучено 235 участков (или локусов) генома, поскольку 271 SSR-маркер характеризовал изменчивость 20 из них.

Для классификации сортов по результатам анализа полиморфизма ДНК, выявляемого по RAPD-, AFLP- и

SSR-маркерам, и по суммарному набору маркеров применяли анализ главных компонент (АГК) и кластерный анализ (КА). Возможности этих методов для классификации культурных растений подробно рассмотрены в обзоре [18]. Использование двух разных методов классификации позволяло с большей статистической достоверностью сделать выводы об объективном существовании выделенных групп сортов в изученной выборке. Все расчеты и графические построения проводили с использованием пакета программ STATISTICA 6.0 [23].

В АГК применяли Q-технику. При этом для выделения главных компонент использовали транспонированные (обращенные на 90°) матрицы исходных данных. По каждой главной компоненте проводили сортировку сортов по величине их факторных нагрузок. Отнесение сорта к определенной группе (главному компоненту) осуществляли по максимальному значению этого показателя.

На основе исходных матриц данных по трем типам маркеров и по суммарному набору ДНК-маркеров рассчитывали матрицы коэффициентов сходства сортов по Нею и Ли [19]. Корреляцию между этими матрицами оценивали по Мантелю [16] с использованием программного обеспечения NTSYS version 2.02f [22]. В КА применяли алгоритм Ворда [21], который основан на принципе минимизации внутрикластерной дисперсии.

Результаты и обсуждение

Данные, полученные в результате анализа полиморфизма ДНК, показали, что каждый из изученных 78 сортов был уникальным как по наборам RAPD-, AFLP- и SSR-маркеров, так и по их суммарному составу. Сравнение сортов по ДНК-маркерам позволило оценить степень их сходства, выявить группы генетически более близких между собой сортов и показать взаимосвязи этих групп.

Классификация местных сортов по данным АГК

В зависимости от метода анализа полиморфизма ДНК вся исследованная совокупность сортов по степени их сходства разделилась на разное число групп. В табл. 2 приведен список изученных сортов с указанием принадлежности каждого из них к той или иной группе, выявленной в АГК, а также даны значения максимальных величин факторных нагрузок. Четко прослеживалась следующая закономерность в изменении числа групп сортов: суммарный набор маркеров — 10 групп, RAPD — 12, AFLP — 16 и SSR — 24. Одна из причин таких различий заключается в том, что ряд групп, идентифицированных в AFLP- и SSR-анализах, объединились в одну группу при классификации сортов по данным RAPD-анализа и суммарным данным. Например, AFLP-группы 6, 9, 10 и с 12 по 16 и SSR-группы 13, 16, 19 и 24 полностью или большинством входящих в них сортов объединились в более крупные группы, выявленные по суммарным данным. Наиболь-

Таблица 2. Список местных сортов гексаплоидных пшениц, их принадлежность к группам и факторные нагрузки (в скобках) по результатам АГК данных, полученных разными методами анализа полиморфизма ДНК

Код сорта	№ по каталогу ВНР	Сорт	Страна происхождения	Суммарный набор маркеров	Тип маркеров		
					RAPD	AFLP	SSR
EU 6	8547	Украинка	Украина	1 (0,79)	1 (0,70)	1 (0,79)	1 (0,70)
EU 26	35921	Долис Пури	Грузия	1 (0,79)	1 (0,80)	1 (0,85)	1 (0,78)
EU 7	9834	Банатка	Украина	1 (0,72)	1 (0,79)	1 (0,68)	16 (0,47)
EU 3	2606	Крымка	—	1 (0,69)	1 (0,70)	1 (0,73)	15 (0,68)
EU 1	457	Банатка поздняя	Беларусь	1 (0,66)	1 (0,75)	1 (0,69)	24 (0,63)
EU 2	1906	Полтавка	Украина	1 (0,66)	1 (0,57)	1 (0,79)	14 (0,54)
EU 17	21841	Степнячка	—	1 (0,66)	1 (0,70)	1 (0,68)	12 (0,73)
EU 27	35922	Долис Пури	Грузия	1 (0,65)	1 (0,66)	1 (0,76)	1 (0,72)
EU 11	14977	Sandomirka	Польша	1 (0,65)	1 (0,71)	1 (0,73)	10 (0,46)
EU 5	6234	Лютесценс 329	Россия	1 (0,65)	1 (0,65)	1 (0,73)	11 (0,62)
EU 24	35736	Сандомирка	Украина	1 (0,63)	1 (0,71)	1 (0,69)	19 (0,67)
EU 18	22236	Мильтурум 321	Россия	1 (0,63)	1 (0,61)	1 (0,52)	14 (0,55)
EU 21	25085	Croisement 268	Швейцария	1 (0,62)	1 (0,71)	1 (0,55)	15 (0,37)
EU 30	41002	Банатка	Молдова	1 (0,61)	1 (0,69)	1 (0,57)	14 (0,45)
EU 29	40182	Гюльгери	Россия, Дагестан	1 (0,55)	1 (0,65)	1 (0,50)	16 (0,76)
EU 12	15306	Сары-бугда	Азербайджан	1 (0,55)	1 (0,67)	13 (0,60)	18 (0,55)
EU 4	3902	Красная	Канада	1 (0,55)	1 (0,71)	16 (0,47)	13 (0,41)
EU 28	40001	Местный	Россия, Осетия	1 (0,55)	1 (0,59)	9 (0,63)	10 (0,55)
EU 16	18340	Sandea	Испания	1 (0,55)	1 (0,62)	6 (0,61)	19 (0,41)
EU 31	46283	Местный	Грузия	1 (0,53)	1 (0,60)	6 (0,53)	7 (0,42)
EU 9	13703	—	Армения	1 (0,47)	3 (0,39)	13 (0,42)	14 (0,86)
IT 8	52506	—	Таджикистан	1 (0,46)	1 (0,55)	1 (0,44)	22 (0,47)
VA 2	30085	—	Армения	1 (0,46)	9 (0,41)	6 (0,66)	20 (0,91)
IT 3	18711	—	Азербайджан	1 (0,43)	9 (0,48)	1 (0,45)	13 (0,62)
EU 20	23922	Сары-бугда	Россия, Дагестан	1 (0,42)	1 (0,60)	6 (0,40)	17 (0,38)
EU 19	23900	—	—	1 (0,39)	4 (0,39)	1 (0,42)	15 (0,60)
IN 5	23974	PR 9	Индия, Кашмир	1 (0,38)	5 (0,44)	1 (0,54)	24 (0,47)
EU 15	16430	Местный	Марокко	1 (0,36)	5 (0,59)	6 (0,43)	12 (0,29)
SH 3	23890	—	Пакистан	2 (0,79)	2 (0,81)	2 (0,89)	2 (0,73)
IN 2	23800	Punjab Type 18	Индия	2 (0,79)	2 (0,80)	2 (0,82)	2 (0,80)
IN 7	24385	Pusa 12	—	2 (0,79)	2 (0,83)	2 (0,84)	2 (0,64)
SH 2	23790	Местный	—	2 (0,77)	2 (0,71)	2 (0,85)	2 (0,75)
IN 9	30665	Thori, 223-var.3/33	Пакистан	2 (0,75)	2 (0,67)	2 (0,89)	2 (0,76)
SH 1	13177	Местный	Индия	2 (0,69)	2 (0,64)	2 (0,78)	2 (0,62)
IN 1	23773	Punjab Type 8	—	2 (0,64)	2 (0,62)	2 (0,65)	8 (0,51)
IN 4	23818	Punjab Type 11	—	2 (0,64)	2 (0,61)	2 (0,65)	8 (0,53)
IN 3	23811	Punjab Type 15	—	2 (0,61)	2 (0,69)	2 (0,62)	2 (0,45)
IN 8	30645	Thori, 213-var.8/5	Пакистан	2 (0,57)	2 (0,53)	2 (0,65)	22 (0,44)
CA 4	62952	Местный	Таджикистан	2 (0,41)	2 (0,52)	11 (0,47)	24 (0,38)
CE 1	13376	—	Россия, Якутск	3 (0,68)	3 (0,70)	3 (0,78)	3 (0,90)
CE 2	15616	—	Монголия	3 (0,67)	3 (0,72)	3 (0,80)	3 (0,90)
CS 1	43663	—	Китай, Гуандонг	3 (0,61)	3 (0,67)	3 (0,63)	17 (0,62)
IT 1	13616	Бухара-бугдай	Туркменистан	3 (0,57)	3 (0,46)	3 (0,52)	22 (0,76)
IT 7	31858	Местный	Таджикистан	3 (0,57)	7 (0,70)	14 (0,68)	24 (0,64)
IT 2	14632	Бугдай	Узбекистан	3 (0,56)	3 (0,54)	3 (0,61)	22 (0,67)
IT 6	31786	Местный	Таджикистан	3 (0,54)	3 (0,49)	14 (0,76)	24 (0,72)
CE 3	44061	—	Китай, Синьцзян	3 (0,54)	3 (0,69)	3 (0,50)	17 (0,59)
SK 2	45819	—	Иран	3 (0,52)	3 (0,64)	14 (0,41)	20 (0,47)
VA 1	29533	Местный	Армения	3 (0,51)	7 (0,51)	6 (0,66)	20 (0,91)
IT 4	26055	—	Китай, Синьцзян	3 (0,50)	3 (0,58)	1 (0,39)	11 (0,49)
CA 3	52634	—	Узбекистан	3 (0,49)	3 (0,62)	6 (0,39)	18 (0,58)
CA 1	42937	Кила местная	Таджикистан	3 (0,45)	6 (0,75)	11 (0,40)	15 (0,40)
SI 3	43570	Nourin 10	Япония	3 (0,40)	1 (0,43)	16 (0,42)	23 (0,44)
CA 2	48997	Местный	Афганистан	3 (0,39)	3 (0,57)	2 (0,39)	21 (0,63)
PT 1	43376	Майк	Китай, Синьцзян	3 (0,39)	12 (0,5)	15 (0,68)	23 (0,46)
MA 1	28171	Местный	Грузия	4 (0,75)	4 (0,77)	4 (0,82)	4 (0,89)
MA 2	31689	—	—	4 (0,72)	4 (0,73)	4 (0,81)	4 (0,90)
SP 4	24709	Leistaler Rotkorn	Швейцария	5 (0,67)	5 (0,70)	5 (0,78)	5 (0,77)
SP 3	24706	Oberkulmer Rotkorn	—	5 (0,65)	5 (0,75)	5 (0,70)	5 (0,68)
SP 1	20625	Местный	Испания	5 (0,54)	5 (0,61)	12 (0,75)	23 (0,65)

Код сорта	№ по каталогу ВНР	Сорт	Страна происхождения	Суммарный набор маркеров	Тип маркеров		
					RAPD	AFLP	SSR
SP 2	20626	Местный	Испания	5 (0,51)	5 (0,56)	12 (0,70)	23 (0,61)
SK 1	45364	—"	Азербайджан	5 (0,48)	5 (0,52)	5 (0,52)	12 (0,46)
IN 6	23982	W 18	Индия, Кашмир	6 (0,42)	1 (0,46)	11 (0,65)	6 (0,78)
EU 25	35803	Галгалос	Армения	7 (0,61)	11 (0,48)	7 (0,80)	7 (0,81)
EU 8	13694	Местный	—"	7 (0,54)	1 (0,50)	7 (0,74)	7 (0,76)
EU 23	32499	—"	Россия, Дагестан	7 (0,53)	1 (0,36)	9 (0,60)	7 (0,50)
IT 5	31134	Аразбугдасы	Азербайджан	7 (0,50)	9 (0,54)	13 (0,62)	18 (0,73)
EU 10	14590	Местный	Турция	7 (0,48)	1 (0,52)	9 (0,53)	17 (0,39)
EU 14	16018	—"	—"	7 (0,44)	1 (0,46)	9 (0,53)	21 (0,48)
EU 22	32467	—"	Россия, Дагестан	7 (0,44)	10 (0,63)	10 (0,47)	10 (0,78)
SK 4	52461	—"	Таджикистан	8 (0,75)	8 (0,70)	8 (0,85)	8 (0,82)
SK 3	52436	—"	Узбекистан	8 (0,69)	8 (0,56)	8 (0,85)	8 (0,83)
SI 4	44113	У-Ман-Сяо-Май	Китай, Цзянси	9 (0,59)	9 (0,67)	1 (0,45)	9 (0,56)
CS 2	44098	Ло-то-май	Китай, Хубэй	9 (0,54)	9 (0,50)	1 (0,45)	17 (0,61)
SI 2	42966	Лин-си-ан-си-це-ме	Китай, Хунань	9 (0,52)	9 (0,65)	3 (0,44)	9 (0,72)
SI 1	28681	О 6С	Китай, Сычуань	9 (0,52)	9 (0,69)	1 (0,43)	9 (0,69)
SI 5	45146	Nourin 62	Япония	9 (0,40)	9 (0,52)	5 (0,46)	5 (0,39)
EU 13	15705	Местный	Армения	10 (0,57)	1 (0,50)	13 (0,43)	14 (0,83)

шее сходство между всеми классификациями наблюдалось по группам 2, 4 и 8.

Как отмечено выше, всего в работе изучено 235 локусов: 125, 90 и 20 в RAPD-, AFLP- и SSR-анализах, соответственно. Мы считаем, что классификация сортов, построенная на основе суммарного набора маркеров, объективнее показывает реально существующие взаимосвязи между сортами, поскольку она основана на большем числе сравниваемых между собой участков генома. Следует отметить, что она также в большей степени отражает распределение сортов в соответствии с их географическим происхождением. Поэтому именно эта классификация нами ниже будет рассмотрена более детально.

Из десяти выявленных по данной классификации групп шесть содержали пять и более сортов (табл. 2). Условно эти группы обозначены как основные (группы 1 – 3, 5, 7 и 9). Остальные (минорные) группы содержали по одному или по два сорта. Группа 1 включила 27 сортов мягкой пшеницы из России, Украины, Беларуси, Молдовы, Польши, Испании, Швейцарии и стран Закавказья (Армения, Азербайджан и Грузия), а также один сорт пшеницы Вавилова. Сорта мягкой пшеницы относились преимущественно к евразийскому подвиду. Группа 2 объединила 11 сортов. Среди них было семь сортов мягкой пшеницы индийского подвида, три сорта шарозерной пшеницы и один сорт карликовой пшеницы, происходившей из Таджикистана. Группа 3, включившая 16 сортов, оказалась наиболее сложной по видовому составу. Она содержала семь сортов карликовой и шесть мягкой пшеницы (в основном ирано-туркестанского подвида) из стран Центральной Азии и граничащих с ней регионов, а также по одному сорту пшеницы спельты из Ирана, пшеницы Вавилова и Петропавловского. В группу 5 вошли все изученные сорта европейской спельты из Испании и Швейцарии. К ним присоединился сорт спельты из Азербайджана. Груп-

па 7 объединила семь сортов мягкой пшеницы из регионов Кавказа и Турции, а группа 9 — четыре сорта китайского подвида мягкой пшеницы и один сорт китайского подвида карликовой пшеницы. Все сорта происходили из Японии и восточных провинций Китая. Из минорных группа 4 состояла из двух взятых в изучение сортов пшеницы маха, а группа 8 — из двух сортов азиатской спельты из Таджикистана и Узбекистана. Группы 6 и 10 содержали только по одному сорту мягкой пшеницы.

Характеристика основных генетических групп, выявленных в АГК

Для выяснения характера различий между группами было изучено распределение ДНК-маркеров среди сортов основных групп. Результаты исследования показали, что различия между этими группами выявлялись главным образом по встречаемости большого числа маркеров и носили количественный характер. Табл. 3 иллюстрирует эти различия на примере некоторых RAPD-, AFLP- и SSR-маркеров.

Чтобы оценить степень сходства сортов в пределах основных генетических групп были рассчитаны коэффициенты сходства по Нею и Ли [19] между всеми возможными парами сортов, входящих в каждую из этих групп. Пределы варьирования коэффициентов по группам и их средние показаны на рис. 1. Как видно из данных, наиболее широким размахом варьирования коэффициента характеризовались образцы группы 3. Достоверно различались между собой средние значения групп 1, 2 и 3, групп 3 и 9, а также группы 2 с группами 5 и 7. Выявленные различия указывают на то, что в группе 2 объединились более сходные между собой образцы, а в группе 3 — более разнообразные.

Тот же самый коэффициент применяли для характеристики всей изученной выборки и сравнения результатов оценок сходства сортов, полученных с использова-

Таблица 3. Встречаемость некоторых маркеров в шести основных группах сортов, выявленных в АГК суммарного набора данных (в %)

Маркер	Группа сортов						Все сорта (n = 78)
	1 (n = 28)	2 (n = 11)	3 (n = 16)	5 (n = 5)	7 (n = 7)	9 (n = 5)	
<i>RAPD</i>							
OP-A6 ₁₀₀₀	75	0	0	20	43	20	35
OP-A6 ₃₅₀	100	18	94	100	86	100	85
OP-B13 ₃₈₀	93	9	88	0	100	100	71
OP-D12 ₂₀₀	79	9	0	80	14	100	45
OP-F19 ₂₃₀	89	9	0	80	29	0	46
OP-M11 ₃₆₀	82	0	50	100	71	60	60
OP-V6 ₃₈₀	11	91	13	0	29	80	31
OP-V6 ₃₆₀	89	18	81	60	57	0	64
UBC535 ₂₀₀	25	100	25	100	0	0	38
UBC386 ₁₈₀	82	27	13	60	57	20	49
<i>AFLP</i>							
1 ₁₇₅	96	18	6	100	57	40	56
1 ₁₆₅	86	91	6	60	100	80	65
1 ₁₂₃	4	73	56	40	0	20	27
1 ₁₁₄	79	9	69	40	57	80	63
1 ₆₀	21	0	81	40	29	20	33
2 ₂₀₀	89	0	38	0	100	40	53
2 ₅₁	61	0	0	100	29	0	31
3 ₃₀₀	11	91	25	0	29	0	24
5 ₃₃₅	96	18	56	60	100	100	76
5 ₃₂₀	0	82	44	0	0	0	21
<i>SSR</i>							
Xgwm44 ₁₈₂	4	64	13	0	14	0	14
Xgwm190 ₂₁₂	54	27	19	20	0	60	37
Xgwm257 ₁₉₅	32	0	6	20	57	100	27
Xgwm257 ₁₉₃	11	100	75	20	14	0	38
Xgwm312 ₁₉₂	25	91	25	0	43	20	35
Xgwm413 ₁₀₈	7	46	0	20	0	0	12
Xgwm413 ₉₂	50	0	25	0	57	20	29
Xgwm566 ₁₂₂	50	18	25	20	14	0	31
Xgwm626 ₁₃₃	57	0	13	20	29	0	28
Xgwm626 ₁₀₄	29	100	81	40	43	80	59

* Число сортов.



Рис. 1. Пределы варьирования и средние величины коэффициентов сходства сортов по Нею и Ли в основных группах, выявленных в АГК суммарного набора данных

нием разных типов ДНК-маркеров. Пределы варьирования (0,43 – 0,93 и 0,43 – 0,98) и средние значения (0,67 и 0,69) коэффициентов были примерно одинаково-

выми при использовании RAPD- и AFLP- маркеров (они даны соответственно). В сравнении с ними в SSR-анализе эти показатели были другими (0,00 – 0,95 и 0,19).

С использованием каждого из трех типов ДНК-маркеров наибольшее сходство было выявлено между двумя сортами пшеницы маха. Наименьшее сходство было обнаружено по RAPD-маркерам между сортом мягкой пшеницы О 6С (к-28681) из Китая и местным сортом спельты (к-52461) из Таджикистана, а по AFLP-маркерам между тем же самым образцом спельты и местным сортом также спельты (к-45364) из Азербайджана. В SSR-анализе коэффициент сходства для 36 пар сортов был равен нулю, то есть эти сорта имели только разные SSR-аллели. Чаще всего такие пары включали по одному сорту мягкой пшеницы и пшеницы спельты. По суммарному набору маркеров максимальное сходство также было выявлено между двумя сортами пшеницы маха, а минимальное — между сортом Полтавка (к-1906) из Украины и образцом пшеницы Петропавловского.

Чтобы определить, насколько отличаются результаты оценки степени сходства между парами сортов, полученные с использованием разных типов маркеров, проанализировали корреляции матриц коэффициентов сходства по Мантелю [16]. Матрицы, рассчитанные на основе результатов анализа трех типов ДНК-маркеров, слабо коррелировали друг с другом ($r = 0,23 - 0,31$). Наибольшее совпадение ($r = 0,81$) по оценкам сходства между парами сортов получили при сравнении матриц, построенных по результатам RAPD-анализа и суммарным данным. При сравнении последней с матрицами, построенными по данным SSR- и AFLP-анализов, корреляция была несколько меньшей ($r = 0,56$ и $r = 0,71$, соответственно).

Классификация местных сортов по данным КА

Матрицы коэффициентов сходства, рассчитанные по данным анализа трех типов ДНК-маркеров, использовали для построения дендрограмм. Сравнение дендрограмм показало, что они различаются как по числу идентифицированных кластеров, так и по составу, входящих в них сортов. Четко прослеживался следующий порядок в увеличении числа кластеров: по RAPD-данным — 8, AFLP — 10 и SSR — 18 (рис. 2). Однако во всех трех случаях выявлены тенденции к независимому объединению сортов, происходящих из Азии (кластеры 1 – 4, 1 – 6 и 1 – 13 в RAPD-, AFLP- и SSR-анализах, соответственно) и Европы (остальные кластеры). На рис. 2 совокупности кластеров обозначены как Азиатская и Европейская пшеницы. Кроме того, сорта мягкой и шарозерной пшеницы Индии и Пакистана формировали отдельный кластер. Пшеницы спельты и маха, как правило, образовывали самостоятельные кластеры.

Дендрограмма, построенная на основе суммарного набора данных, включала восемь кластеров (рис. 3) и по сравнению с дендрограммами, полученными с использованием разных типов маркеров, более четко от-

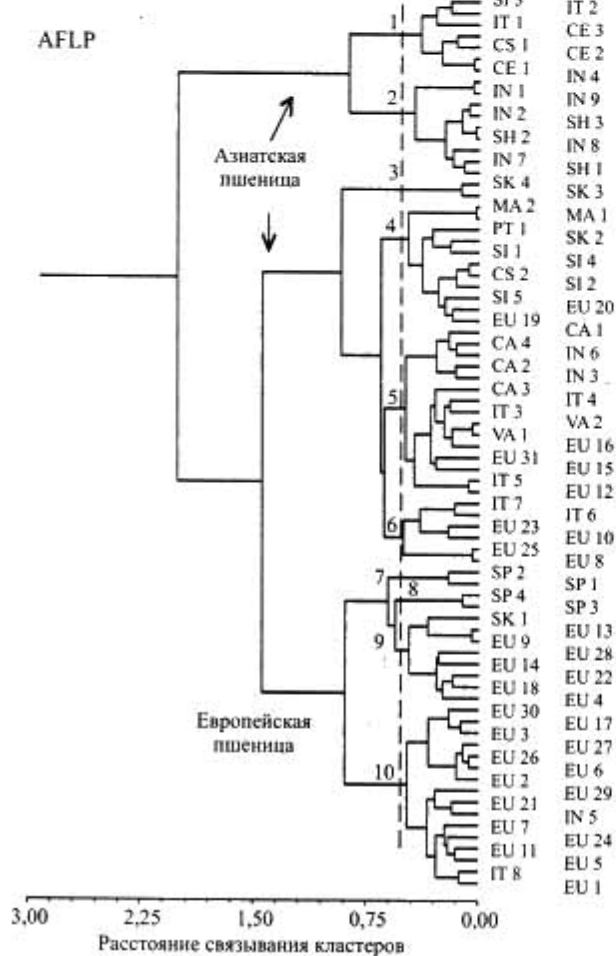
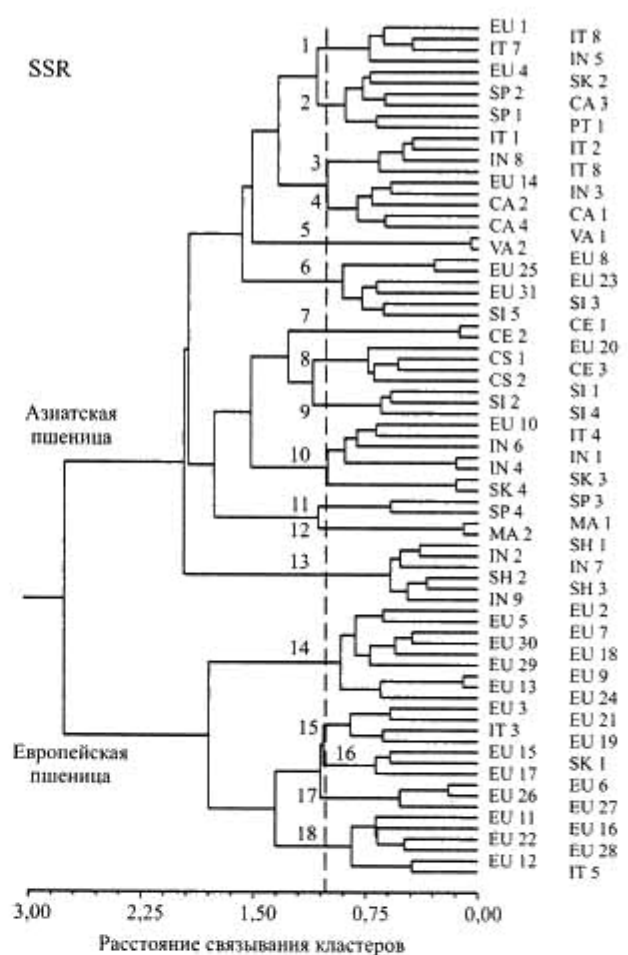
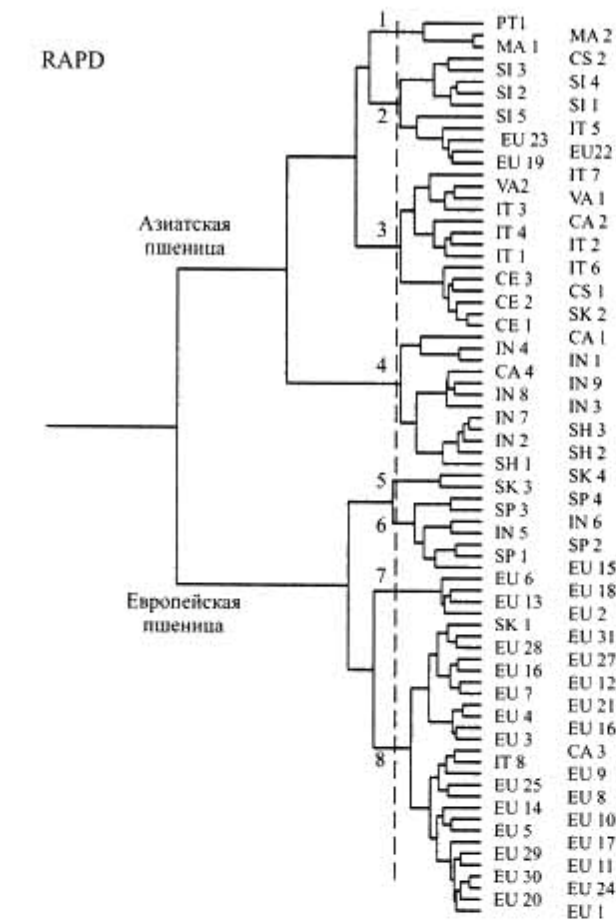


Рис. 2. Распределение 78 местных сортов гексаплоидных пшениц на дендрограммах, построенных по результатам RAPD-, AFLP- и SSR-анализов

ражала распределение сортов по их географическому происхождению. К тому же выделившиеся кластеры по составу включенных в них сортов в большей степени соответствовали группам, выявленным в АГК.

Кластеры 1 – 6 объединили сорта, преимущественно происходящие из стран Азии. Эти сорта представляли все изученные виды гексаплоидных пшениц. При этом кластер 1 включил два сорта азиатской спельты, кластер 2 — оба сорта пшеницы маха, а кластер 3 — все четыре изученных сорта европейской спельты. Кластер 4 объединил четыре сорта китайского подвида мягкой пшеницы, а также один сорт китайского подвида карликовой пшеницы. Все они происходили из восточных провинций Китая и Японии. По видовому составу включенных сортов наиболее разнородным оказался кластер 5. Из 20 сортов этого кластера восемь принадлежали к ирано-туркестанскому, индийскому и китайскому подвидам мягкой пшеницы. Здесь также объединились семь из восьми изученных сортов пшеницы карликовой, один сорт азиатской спельты из Ирана, а также сорта пшеницы Вавилова и Петропавловского. Большинство сортов, вошедших в кластер 5, происходили из стран Центральной Азии, западных провинций Китая (Синьцзян и Гуандонг) и Северной Индии (штат Кашмир). Кластер 6 объединил десять сортов из Индии и

Пакистана, среди которых было семь сортов индийского подвида мягкой пшеницы и все три изученных сорта шарозерной пшеницы.

Европейская пшеница (кластеры 7 и 8) объединила все 31 изученный сорт евразийского подвида мягкой пшеницы, три сорта ее ирано-туркестанского подвида (они происходили из Азербайджана и Таджикистана), а также сорт спельты из Азербайджана. Из 35 сортов, вошедших в кластеры 7 и 8, 34 происходили из стран Европы и Закавказья, а также Турции.

Данные, приведенные на рис. 3, также показывают, что при анализе суммарного набора данных кластеры 3–8, содержащие четыре и более сортов, по составу сортов соответствуют основным группам, полученным в АГК, а именно: кластер 1 — восьмой, 2 — четвертой, 3 — пятой, 4 — девятой, 5 — третьей, 6 — второй группам. Кластер 8 преимущественно объединил сорта, принадлежащие первой группе. Однако часть сортов этой группы, имевшие минимальные факторные нагрузки и происходящие главным образом из регионов Кавказа, объединились в кластере 7 вместе с сортами седьмой группы, также происходящими из этих регионов.

Построение классификации пшеницы, которая объективно отражала бы ее генетическую дифференциацию, обусловленную длительным процессом распространения и адаптации пшеницы к определенным почвенно-климатическим условиям, представляет сложную задачу. В нашей работе, чтобы получить более достоверные представления о генетических взаимосвязях 78 сортов гексаплоидных пшениц различного географического происхождения, мы провели сравнение классификаций, полученных с использованием, как разных типов ДНК-маркеров, так и разных методов многомерной статистики.

Как отмечено в нашей другой статье (см. этот же номер журнала), все три использованных типа ДНК-маркеров обладали приблизительно равными возможностями для различения местных сортов гексаплоидных пшениц. Однако классификации местных сортов, построенные на основе анализа каждого типа маркеров, а также на их суммарном наборе, оказались в определенной степени сходными, но не идентичными. Различия классификаций могут быть обусловлены рядом причин.

Во-первых, в нашей работе каждая из классификаций отражала взаимосвязи сортов по разным наборам локусов генома. Эти наборы различались как по числу локусов, так и по их составу, поскольку все изученные локусы оказались не сцепленными между собой. О различиях оценок сходства между парами сортов свидетельствовал также низкий уровень корреляций между матрицами коэффициентов сходства сортов, рассчитанными по результатам изучения разных типов ДНК-маркеров. Следует отметить, что низкий уровень корреляций между матрицами отчасти может быть связан также с тем, что мы изучали разнородную выборку сортов. На примере инбредных линий кукурузы было показано, что при изучении генетически более однородной

выборки корреляции матриц, полученных на основе разных типов маркеров, выше, чем при изучении более разнородной выборки [20].

Во-вторых, в изученной выборке присутствовали сорта, характеризующиеся нечеткой принадлежностью к группам, например, имеющие невысокие и сопоставимые величины факторных нагрузок с разными главными компонентами (данные не приведены). Именно эти сорта, по-разному классифицировались при использовании разных методов статистической обработки (см. рис. 3).

В-третьих, при проведении RAPD-анализа использовали суммарную ДНК, экстрагированную из 15–25 проростков, а в анализе двух других типов маркеров — ДНК отдельных проростков. Это, возможно, не существенно при низком полиморфизме сортов, однако при анализе высоко полиморфных сортов, случайно может быть изучен какой-нибудь редко встречающийся генотип, отличающийся от типичного для этого сорта.

При всех различиях полученных классификаций местных сортов пшеницы, для них были характерны некоторые общие черты, которые свидетельствовали о существовании определенных закономерностей во взаимосвязях сортов изученной выборки, которые были выявлены в настоящей работе.

В КА на самом высоком иерархическом уровне все местные сорта сформировали две большие группы, каждая из которых преимущественно, включала сорта или европейского, или азиатского происхождения. Такое деление имеет аналогию с разделением мягкой пшеницы на “группы рас”, которые предложил Н. И. Вавилов [2], или на подвиды *ssp. hapalopyrum* (нежного типа) и *ssp. hadropyrum* (грубого типа), которое сделал К. А. Флягсбергер [10]. По данным этих авторов выделенные группы рас или подвиды были приурочены либо к Европе и Сибири, либо к центральной и юго-западной Азии. По сути, такое деление мягкой пшеницы на подвиды было сохранено и в более поздней ботанической классификации этой культуры, разработанной Н. Н. Цвелевым [12] и воспроизведено в “Культурной флоре СССР” [7]. На наш взгляд, деление местных сортов на две большие группы отражает два основных пути эволюции не только мягкой, но и всего комплекса гексаплоидных пшениц с геномной формулой $A^uA^vB^vD^sD^s$ в ходе их распространения по двум континентам.

Как было показано в данной работе, в зависимости от типа использованных маркеров сорта спельты, а также ряд сортов мягкой пшеницы, главным образом из регионов Кавказа, объединялись то с европейской, то с азиатской пшеницей. Основные различия в разделении изученной выборки на Европейскую и Азиатскую пшеницу при использовании разных типов маркеров были связаны с различиями в распределении именно этих сортов. Вероятно, данный факт свидетельствует о том, что изученные местные пшеницы Кавказа обнаруживают примерно одинаковый уровень генетического родства как с Европейской, так и с Азиатской пшеницами.

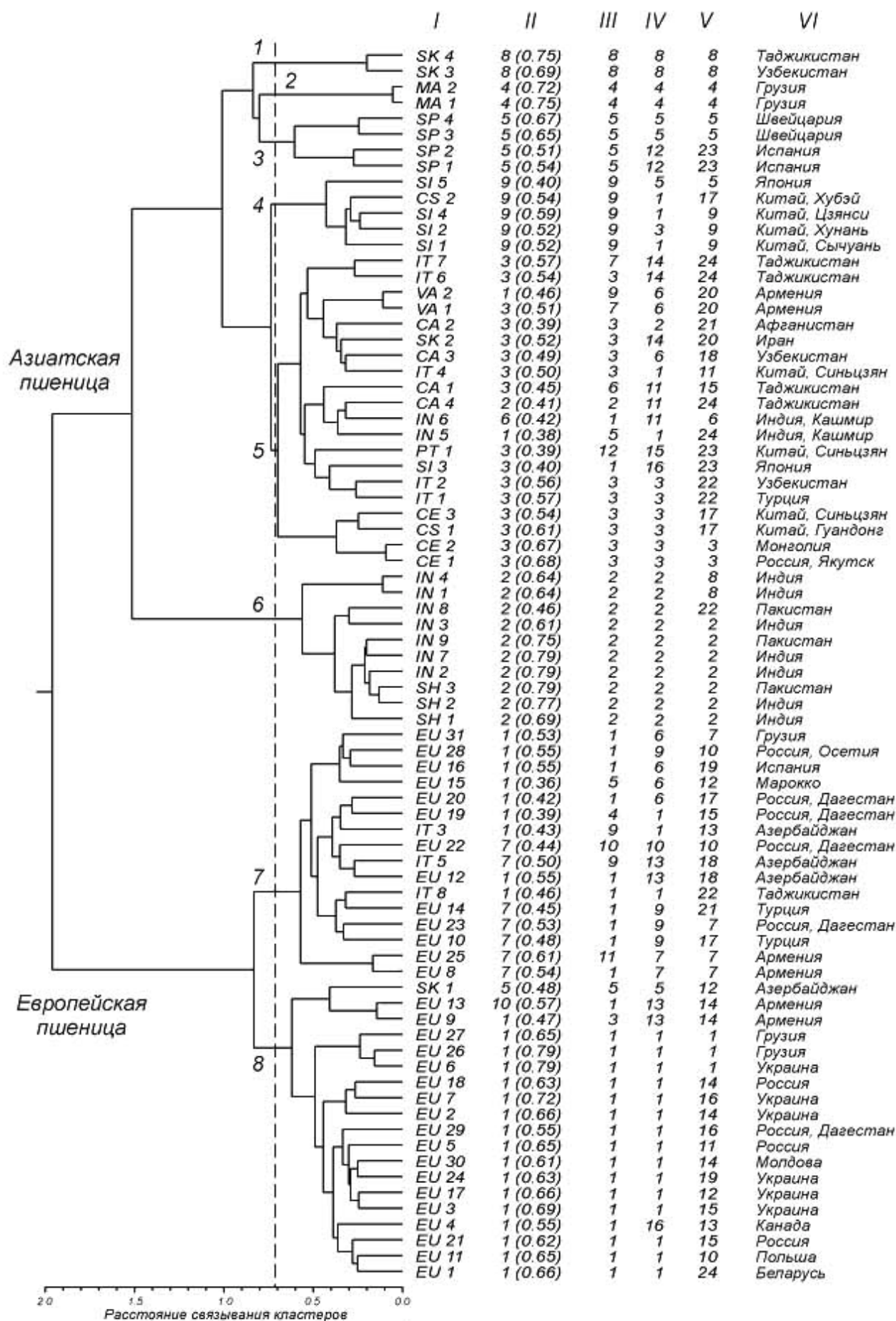


Рис. 3. Распределение 78 местных сортов гексаплоидных пшениц на дендрограмме, построенной по результатам суммарного набора данных: I — коды сортов; II — принадлежность сорта к группе и факторные нагрузки (в скобках) по результатам АГК суммарного набора данных; III – V — принадлежность сорта к группе по результатам АГК данных RAPD-, AFLP- и SSR-анализов; VI — страна происхождения сорта

Если, следуя Н. И. Вавилову [3] предположить, что гексаплоидная пшеница произошла в каком-то из регионов юго-западной Азии, то выявленные особенности местных сортов могут быть связаны с распространением этой пшеницы из Азии в Европу и промежуточным положением Кавказа на этом пути.

Важной отличительной чертой всех классификаций было объединение в группы вместе с сортами мягкой пшеницы сортов, относящихся к другим видам гексаплоидной пшеницы, но происходящих из одних и тех же регионов. Так среди азиатской пшеницы во всех классификациях присутствовали все сорта карликовой пшеницы (за исключением образца к-52634, который в КА данных RAPD объединился с сортами из Европы), пшениц маха, Вавилова и Петропавловского, а также выделялась группа или кластер, включающие сорта мягкой и шарозерной пшеницы из Индии и Пакистана.

Достоверность оценки сходства между любой парой генотипов как правило повышается по мере увеличения числа анализируемых участков генома. Поэтому, на наш взгляд, классификации, полученные в КА и АГК на основе суммарного набора данных, в большей степени отражают реально существующую генетическую дифференциацию гексаплоидной пшеницы. Как показало сравнение этих классификаций, они почти полностью совпадали. В целом в пределах Европейской и Азиатской гексаплоидной пшеницы можно выделить шесть основных групп генетически сходных между собой сортов: местные пшеницы восточной Европы и Грузии (кластер 8), пшеницы регионов Кавказа (кластер 7), Индии и Пакистана (кластер 6), Центральной Азии (кластер 5), Китая и Японии (кластер 4) и европейской спельты (кластер 3). Среди них в генетическом отношении наиболее разнородной оказалась группа местных сортов из Центральной Азии. Следует отметить, что регионы происхождения образцов, объединившихся в названные группы, совпадают с регионами, в которых, по мнению Н. И. Вавилова [4] возникли и развивались древние земледельческие цивилизации в Европе и Азии. Эти шесть групп, по-видимому, сформировались в результате длительного возделывания гексаплоидной пшеницы во времена существования этих цивилизаций. Учитывая географическую разобщенность выявленных групп, а также характер и степень их различий, можно заключить, что они представляют собою своеобразные географические расы в современном понимании [1]. В совокупности они формируют две более крупные группы — Европейскую и Азиатскую гексаплоидную пшеницу.

Приведенная выше классификация местных сортов гексаплоидных пшениц, основанная на анализе полиморфизма ДНК, отличается от известных ботанических классификаций этих пшениц [7, 15, 17]. В значительной степени она совпадает с делением Н. И. Вавиловым [6] мягкой пшеницы на подвиды на основе эколого-географического подхода. Основное отличие состоит в том, что она охватывает и другие гексаплоидные пшеницы. По нашему мнению, классификация сортов,

полученная на основе изучения полиморфизма ДНК, по-видимому, точнее отражает генетическую дифференциацию гексаплоидной пшеницы, поскольку она основана на результатах анализа большого числа исследованных локусов генома. Существующие ботанические классификации этих пшениц базируются, как правило, на анализе ограниченного числа морфологических признаков, контролируемых небольшим числом генов.

Таким образом, для выяснения структуры генетических взаимосвязей между местными сортами пшеницы могут быть использованы разные типы ДНК-маркеров. Однако классификация, построенная на основе анализа суммарного набора маркеров с применением разных методов многомерной статистики, точнее раскрывает генетическую дифференциацию комплекса гексаплоидных пшениц, обусловленную их географическим распространением в ходе эволюции. Выявленная на основе изучения полиморфизма ДНК структура взаимосвязей между местными сортами гексаплоидных пшениц с геномной формулой $A^uA^vB^lD^sD^{st}$ существенно отличается от таковой в существующих ботанических классификациях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика. — М.: Мир, 1987. — Т. 3. — 331 с.
2. Вавилов Н. И. К познанию мягких пшениц // Тр. по прикл. бот и сел., Гос. ин-т опытной агрономии. — Петроград, 1922–1923. — Т. 13. — С. 149–215.
3. Вавилов Н. И. Центры происхождения культурных растений. Тр. по прикл. бот. и сел. — Л., 1926. — Т. 16. — С. 1–138.
4. Вавилов Н. И. Проблема происхождения земледелия в свете современных исследований (1931) / Происхождение и география культурных растений. — Л.: Наука, 1987. — С. 161–170.
5. Вавилов Н. И. Научные основы селекции пшеницы. — М.-Л.: Сельхозгиз, 1935. — 244 с.
6. Вавилов Н. И. Мировые ресурсы сортов хлебных злаков, зерновых бобовых, льна и их использование в селекции. Пшеница. — М.-Л.: Наука, 1964. — 122 с.
7. Дорофеев В. Ф., Филатенко А. А., Мигушова Э. Ф. и др. Культурная флора СССР. Пшеница. — Л.: Колос, 1979. Т. I. — 347 с.
8. Молекулярно-биологические аспекты прикладной ботаники, генетики и селекции. Теоретические основы селекции // Под ред. В. Г. Конарева. Т. I. — М.: Колос, 1993. — 447 с.
9. Пальмова Е. Ф. Введение в экологию пшениц. — Л.-М.: Огиз. Сельхозгиз, 1935. — 74 с.
10. Флягсбергер К. А. Об искусственной и естественной классификации пшениц // Известия Гос. ин-та опытной агрономии. — 1928. — Т. VI, № 2. — С. 36–51.
11. Флягсбергер К. А. Культурная флора I. Хлебные злаки. Пшеница. — М.-Л.: Гос. изд-во совхозной и колхозной лит-ры, 1935. — 434 с.
12. Цвелев Н. Н. Злаки СССР. — Л.: Наука, 1976. — 788 с.
13. Якубинер М. М. История культуры. Ботаническая характеристика пшеницы // Пшеница в СССР / Под ред. П. М. Жуковского. — М.-Л.: Гос. изд-во с.-х. лит-ры, 1957. — С. 53–122.
14. Allard R. W. Genetic basis of the evolution of the adaptedness in plants // Adaptation in plant breeding / Ed. P. M. A. Tigerstedt. — 1997. — P. 1–12.
15. MacKey J. Species relationships in *Triticum* // Hereditas (Suppl.). — 1966. — V. 2. — P. 237–276.

16. Mantel N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach // *Cancer Res.* — 1967. — V. 27. — P. 209 – 220.
17. Miller T. E. Systematics and evolution // In: *Wheat breeding, its scientific basis / Lupton FGH (ed.)*. — Chapman and Hall, London & New York. — 1987. — P. 1 – 30.
18. Mohammadi S. A., Prasanna B. M. Analysis of genetic diversity in crop plants — salient statistical tools and considerations // *Crop Sci.* — 2003. — V. 43. — P. 1235 – 1248.
19. Nei M., Li W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1979. — V. 76. — P. 5269 – 5273.
20. Pejic I., Ajmone-Marsan P., Morgante M., et al. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs // *Theor. Appl. Genet.* — 1998. — V. 97. — P. 1248 – 1255.
21. Perez de la Vega. Plant genetic adaptedness to climatic and edaphic environment. // *Adaptation in plant Breeding / Ed. P. M. A. Tigerstedt.* — 1997. — P. 27 – 38.
22. Rohlf F. J. NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.02f. — Exeter Software, Setauket, New York, 1998.
23. StatSoft, Inc. STATISTICA (data analysis software system), version 6. — 2001. — www.statsoft.com.
24. Ward J. H. Jr. Hierarchical grouping to optimize an objective function // *J. Am. Stat. Assoc.* — 1963. — V. 58. — P. 236 – 244.

Митрофанова О. П., докт. биол. наук; Стрельченко П. П., канд. биол. наук;
 Конярев А. В., докт. биол. наук, профессор; Государственный научный центр (ГНЦ) РФ
 Всероссийского НИИ растениеводства им. Н. И. Вавилова

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ СОРТОВ КАРТОФЕЛЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ SSR-МАРКЕРОВ

О. Ю. Антонова, Н. А. Швачко, Л. И. Костина,
 Л. Л. Малышев, Т. А. Гавриленко

С использованием микросателлитных маркеров изучали генетическую дифференциацию 58 сортов картофеля различного уровня генетического родства, как отечественной так и зарубежной селекции. 10 пар праймеров позволили дифференцировать изученные сорта по 171 микросателлитному фрагменту. Кластерный анализ, проведенный с использованием системы STATISTICA 6.0 по алгоритмам Ворда и UPGMA, разделил изученные сорта на 4 кластера, каждый из которых включал по два субкластера. Выявленные связи между сортами достаточно хорошо соотносились с их родословными, хотя полного соответствия обнаружено не было. Отобранные SSR-маркеры будут использованы в дальнейших исследованиях по разработке системы идентификации и паспортизации сортов картофеля, определения генетической однородности сорта, а также для анализа генетической стабильности образцов картофеля, сохраняемых в условиях *in vitro*.

Введение

Коллекция видов и сортов картофеля ВИР содержит около 9000 образцов, из них примерно 2000 составляют сорта отечественной и зарубежной селекции. В ВИРе сорта картофеля поддерживаются в живом виде в полевых условиях и частично — в культуре *in vitro*, что позволяет избежать потери образцов из-за накопления инфекций или действия неблагоприятных факторов среды. При хранении больших коллекций возникает проблема контроля, идентификации и документации сохраняемого генофонда. Эта проблема особенно актуальна для *in vitro* коллекций, поскольку у пробирочных растений невозможно определить весь комплекс свойственных каждому сорту морфологических и хозяйственно-ценных признаков.

В последнее десятилетие в целях оценки генетического разнообразия коллекционных образцов, оценки внутривидовых связей и для идентификации сортов картофеля все шире применяются молекулярные методы, основанные на использовании изоферментных [9], RAPD- [4, 7, 8, 19], SSR- [6, 10, 13 – 16], RFLP- [5] и

AFLP-маркеров [11, 12]. Поскольку недостатком RAPD анализа является невысокая воспроизводимость результатов, а последние два метода — относительно дорогостоящи и требуют более сложного лабораторного оборудования, то в последнее время предпочтение отдается SSR-маркерам, успешно сочетающим высокий уровень полиморфизма и хорошую воспроизводимость результатов [12].

Микросателлитные или SSR-последовательности — это участки генома, состоящие из очень коротких (1–6 пар нуклеотидов), tandemно повторяющихся последовательностей. Фрагменты ДНК, содержащие SSR-последовательности, могут быть амплифицированы с использованием специфичных праймеров. При этом последовательности SSR-праймеров выбирают в уникальных участках, фланкирующих район tandemного повтора. Относительно большой размер таких праймеров (по сравнению с RAPD-праймерами) снижает риск их неспецифичного связывания и тем самым обеспечивает высокую воспроизводимость результатов. Кроме того, многие микросателлиты могут быть сцеп-