

3. Кобылянский В.Д. и др. Культурная флора СССР. II. Рожь. Под ред. В.Д. Кобылянского. Л., Агропромиздат. 1989. 368 с.

4. Furman B.J., Qualset C.O., Skovmand B. et al. Characterization and analysis of North American triticale genetic resources. Crop Science. 1997. Vol. 37, № 6. P. 1951-1959.

5. Horlein A.J., Valentine J. Triticale (x Triticosecale). In: Cereals and Pseudocereals. J.T. Williams (Ed.). Chapman and Hall, London. 1995. P. 187-221.

6. McIntosh, R.A., G.E. Hart and M.D. Gale (1993): Catalogue of gene symbols for wheat. In: Proceedings of the 8th International Wheat Genetic Symposium. Beijing. P. 1333-1500.

7. Merezhko A.F. (1998): In situ and ex situ conservation of plant genetic diversity are links of a common back-up system. In: Zencirci N. at al. (Eds.): The Proceedings of International Symposium on in situ Conservation of Plant Genetic Diversity. Published by CRIFC, Turkey. 1998. P. 49-53.

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВЗАИМОСВЯЗЕЙ СОРТОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ ПО ДАННЫМ ИХ ГЕНЕАЛОГИИ И RAPD-АНАЛИЗА

О.П. Митрофанова, С.П. Мартынов, П.П. Стрельченко

Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства
им. Н.И. Вавилова, г. С-Петербург, Россия

Введение

Анализ генетических взаимосвязей сортов пшеницы имеет большое значение для выяснения структуры генофонда этой культуры, повышения эффективности отбора нужного исходного материала для селекции и проведения работ по целенаправленному расширению генетического разнообразия, сохраняемого *ex situ* в коллекции. Оценка генетических взаимосвязей сортов основана на определении сходства с использованием косвенных или прямых методов. К первым относится генеалогический анализ, а среди вторых наиболее эффективными оказались ДНК-маркеры.

В анализе родословных сходство всех возможных пар сортов исследуемой совокупности оценивается степенью взаимосвязи их родительских форм и измеряется коэффициентом родства, показывающим вероятность, с которой родительский сорт и его потомок или совокупности сортов идентичны по аллелям какого-либо гена или генов. Для вычисления коэффициентов родства требуются подробные родословные всех сортов и соблюдение следующих правил: (1) любой сорт, полученный от скрещивания двух родительских форм, содержит по половине аллелей генов каждого из родителей; (2) коэффициент родства любого сорта с самим собой равен единице ($R=1$), а между сортами, не имеющими общих предков, – нулю ($R=0$); (3) оригинальные предки (например, местные сорта) не родственны; (4) все предки и сорта

гомозиготны и гомогенны; (5) если сорт выведен путем отбора или в результате индуцированного мутагенеза, трансформации, то коэффициент родства между производной линией и исходным сортом равен 0,75, а между двумя отборами из одного и того же сорта $R=0,75^2=0,56$ (Murphy et al., 1986).

Из молекулярных подходов наиболее широко используются RFLP-, RAPD-, AFLP- и SSR-методы анализа полиморфизма ДНК (Алтухов, Салменкова, 2002; Gupta et al., 1999). Среди них анализ фрагментов ДНК, амплифицированных в полимеразной цепной реакции с произвольными праймерами (RAPD), – относительно простой, но достаточно чувствительный метод.

В настоящей работе мы применили этот метод для оценки степени сходства 124 селекционных и местных сортов мягкой пшеницы и сравнили классификации сортов, полученные по данным RAPD и в генеалогическом анализе.

Материал и методы

Материалом для проведения исследований послужили 124 селекционных и местных сорта мягкой пшеницы различного географического происхождения. Семена были получены из коллекции ВИР и двух учреждений Японии. Выделение и амплификацию ДНК, а также статистическую обработку результатов RAPD анализа проводили по методам, описанным ранее (Стрельченко и др., 2002). В той же самой работе приведен и список использованных праймеров. Для оценки сходства сортов по RAPD спектрам применяли Simple Matching (SM) коэффициент и алгоритм Уорда.

Анализ родословных и вычисление коэффициентов родства для всех пар сортов сделан с помощью информационно-аналитической системы генетических ресурсов GRIS 3.5 (Мартынов, Добротворская, 2000). Вычисленную матрицу коэффициентов родства обрабатывали кластерным анализом с использованием иерархического агломерационного алгоритма средней связи (UPGMA).

Результаты кластерного анализа матрицы коэффициентов родства и матрицы мер сходства по фрагментам ДНК сравнивали двумя способами. Один заключался в подсчете коэффициента корреляции между двумя матрицами. В связи с возможной аномальностью распределения элементов этих матриц проводили Z-преобразование. Другой способ состоял в оценке совпадения по составу сортов групп, выявленных двумя методами, с помощью теста χ^2 .

Результаты и обсуждение

Кластерный анализ матрицы коэффициентов родства позволил идентифицировать 14 кластеров (A-N), или групп родственных между собой сортов. В эти кластеры были сгруппированы 107 сортов (86% от общего числа), а 17 сортов (14%) не вошли ни в один из кластеров. Величина средневзвешенного внутрикластерного коэффициента родства составляла 0,230.

В родословных всех сортов кластера A (Альбидум 604, к-10255; Куту-

лукская, к-54213; Ленинградка, к-47882; Лютесценс 62, к-15183; Омская 20, к-61189; Полтавка, к-10968; Саратовская 29, к-40599; Саррубра, к-28310; Симбирка, к-56928) большой вклад имеет местный сорт Саратовской области Полтавка.

Все сорта **кластера В** (Безостая 1, к-42790; Богарная 56, к-48761; Иволга, к-60975; Исток, к-56421; Краснодарская 39, к-45879; Московская 35, к-48762; Одесская 51, к-46620; Одесская 66, к-49255; Спартанка, к-58801) происходят от Безостой 1.

Из 11 сортов **кластера С** (Ахтырчанка, к-53653; Волгоградская 84, к-57653; Дон 85, к-58516; Заря, к-49916; Кинельская 4, к-53678; Колос 80, к-55182; Мироновская 808, к-43920; Мироновская Яровая, к-49882; Немчиновская 52, к-59269; Олимпия, к-55185; Московская 2411, к-8518) десять являются производными Мироновской 808.

В **кластер D** вошли Тарасовская 29, к-53808 и отборы из Банатки – Степнячка, к-21841, Московская 2411, к-8518 и Украинка, к-8547, которая имеет большой вклад в родословную Тамбовицы, к-51737.

Кластер E (Кооператорка, к-11389; Крымка, к-2606; Akasabi shirazu, к-25520* Hokuеi; Iohardi, к-43072; Minhardi, к-5294, Nourin 8; Nourin 10, к-22479*; Turkey Red, к-6176) объединил производные сортов Turkey или Turkey Red. Здесь и далее звездочкой отмечены номера старо давних японских сортов по каталогу генбанка MAFF (Япония). Современные японские селекционные сорта, полученные от д-ра Т. Kuwabaга из Хоккайдской опытной станции, приведены без номера каталога. Часть таких сортов (Ака кавака, Chihoku Komugi, Hokkai 240, Horoshiri Komugi, Nourin 62) содержал **кластер F**. Доминирующим предком сортов **кластера H** (Akakomugi, к-22872*; Kitakami Komugi, к-22496*; Novaro, к-42747; San Giorgio, к-40297) был Akakomugi.

В **кластере I** (Cappelle-Desprez, к-41571; Chiddam d'Automne Aeri Blanc к-33344; Japhet, к-6025; Vilmorin 27, к-21479; Vilmorin 29, к-40074; Vilmorin 53, к-41574; Virgilio, к-41722) объединены сорт Capelle Desprez и его производные. За исключением Igachikugo Oregon сорта **кластера J** (Diana, к-43060; Igachikugo Oregon, к-22890*; Thule 2, к-31723; Nourin 27, к-22483*; Virtus, к-38481) происходят от общего предка – шведского сорта Sammet, а присутствие Igachikugo Oregon объясняется тем, что он является родителем Nourin 27.

Кластер K (Дальневосточная 10, к-53986; Comeback, к-3686; Fife, к-6161; Florence, к-3704; Gabo, к-38574; Haruhikari; Haruyutaka; Harvest Queen, к-5813; Kitchener, к-8092; Manitoba, к-7108; Marquis, к-5026; Nourin 7, к-23007*; Prelude, к-15594; Red Bobs, к-22132; Red Fife, к-29394; Reward, к-29609; Shiro Chabo, к-23276*; Kounosu 25, к-23107*) составили потомки сорта Red Fife. Два японских сорта из этого кластера – Haruyutaka и Haruhikari имеют родство с сортом Red Fife через североамериканский материал, использованный при их создании.

Кластер M (Akadaruma, к-22865*; Haruminori; Nourin 3; Nourin 42, к-23012*; Nourin 35; Nourin 29; Shiro Daruma, к-22981*) включает отборы из этого местного сорта – Akadaruma и Shirodaruma и их производные.

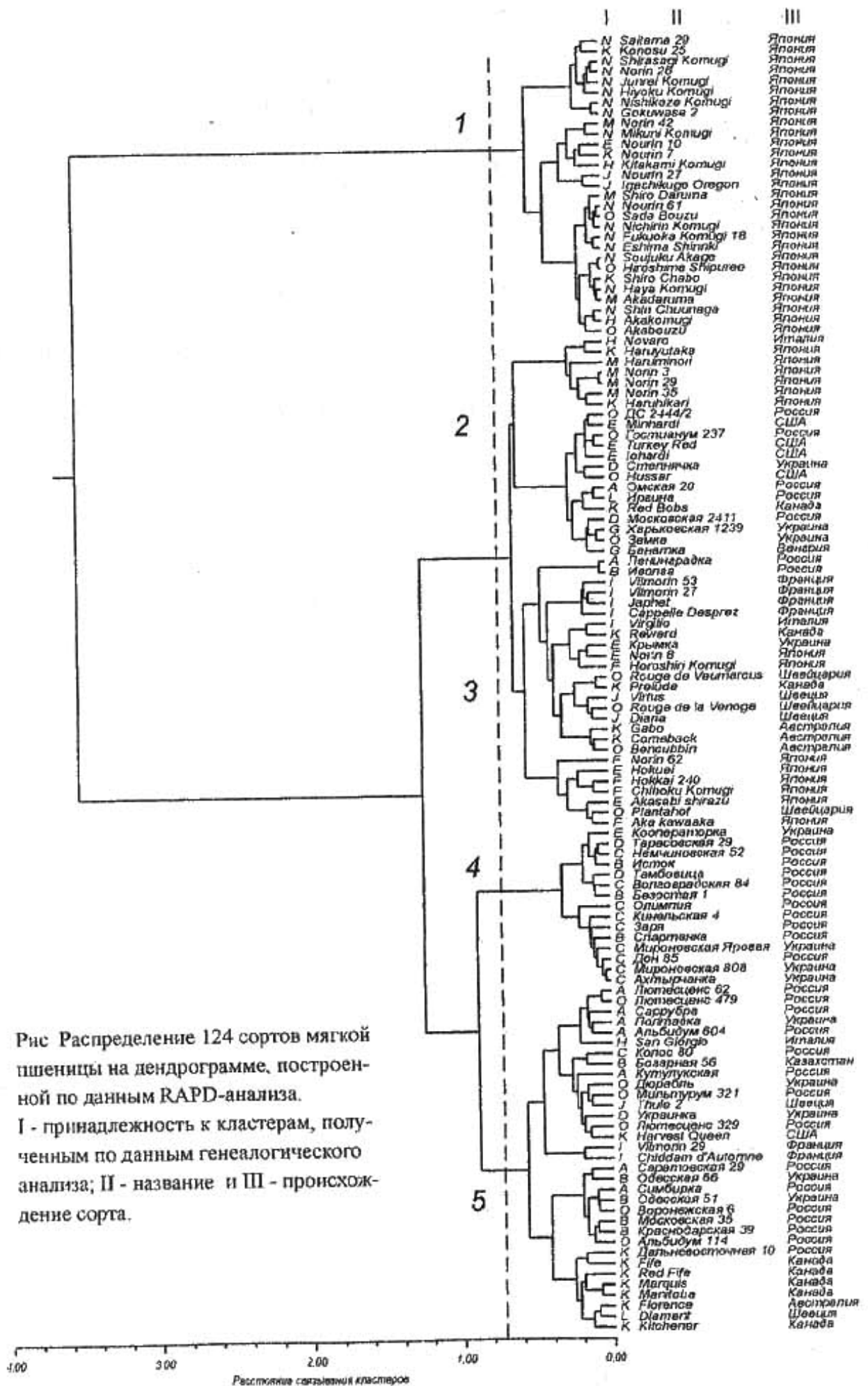
Кластер N (Eshima Shinriki, k-23526*; Fukuoka Komugi 18, k-23527*; Gokuwase 2, k-23592*; Haya Komugi, k-23531*; Hiyoku Komugi, k-23571*; Junrei Komugi, k-23355*; Mikuni Komugi, k-23024*; Nichirin Komugi, k-23570*; Nishikaze Komugi, k-23714*; Nourin 26, k-23283*; Nourin 61, k-23579*; Saitama 29, k-22968*; Shin Chuunaga, k-23274*; Shirasagi Komugi, k-23389*; Soujuku Akage, k-23566*) объединяет потомков местных японских сортов Shinchunaga и Eshima.

Самыми малочисленными были **кластеры G и L**, которые включали по два сорта Харьковская 1239, к-29924; Banatka, к-10912 и Иргина, к-60074; Diamant, к-25019, соответственно.

Из семнадцати сортов, не вошедших ни в какие кластеры и обозначенных буквой **O** (Альбидум 114, к-46731; Воронежская 6, к-57114; Гостианум 237, к-10245; ДС 2444/2, к-31919; Дюрабль, к-10174; Земка, к-10359; Лютесценс 329, к-6234; Лютесценс 479, к-15188; Мильтурум 321, к-22236; Akabouzu, к-22862*; Bencubbin, к-35653; Hiroshima Shipuree, к-23368*; Hussar, к-5907; Plantahof, к-24681; Rouge de la Venoge, к-25071; Rouge de Vaumarcus, к-25064), четырнадцать являются местными сортами или отборами из таких сортов, а три – стародавними сортами. Генеалогический анализ местных сортов невозможен из-за отсутствия сведений об их родословной (за исключением тех случаев, когда эти сорта являются предками сортов гибридного происхождения).

Усредненные внутрикластерные коэффициенты родства варьировали от 0,17 до 0,56 и были в несколько раз выше межкластерных (0,00 – 0,10), поэтому данную кластеризацию следует считать статистически обоснованной.

В общей сложности в матрицу данных для 124 сортов пшеницы были включены 124 полиморфных амплифицированных фрагментов ДНК (компонентов RAPD-спектров), полученных с участием 28 праймеров. По данным RAPD-анализа, каждый сорт мягкой пшеницы оказался уникальным по составу компонентов. В кластерном анализе было получено несколько иное деление исследуемой выборки сортов на группы: кластеры были более крупными и включали сорта из разных генеалогических групп (рисунок). Так генетически наиболее отдаленный **кластер 1** включал 29 преимущественно стародавних сортов из Японии. В **кластере 2** объединился 21 сорт, в том числе некоторые из современных японских селекционных сортов ярового типа развития, а также сорта из России, Украины, США и других стран. В **кластере 3** представлены 26 сортов из ряда европейских стран, Австралии и современные озимые сорта мягкой пшеницы из Японии. В этот же кластер вошли два российских сорта. Основная масса российских и украинских сортов образовала **кластеры 4 и 5**. При этом в первом из названных кластеров присутствовали сорта Мироновская 808 и Безостая 1, и другие сорта, полученные с их участием (всего 15 сортов). Во втором случае наряду с сортами из России и Украины находились сорта из Канады, Франции и Швеции (всего 33 сорта).



На дендрограмме видно, что в ряде случаев генеалогически близкие сорта, то есть вошедшие в один кластер при анализе родословных (см. рис.), имели тенденцию к совместной кластеризации по данным RAPD анализа.

Интересно было сравнить классификации сортов, полученные на основе анализа родословных и с использованием RAPD-маркеров. Величина коэффициента корреляции между матрицами коэффициентов родства и коэффициентов SM была низкой ($r=0,42$). Для сравнения результатов кластеризации была построена двумерная таблица распределения сортов по кластерам при обоих методах. Тест $\chi^2=153,0 > \chi^2_{0,9999}=63,16$ для числа степеней свободы $df=27$ показал значимую сопряженность классификаций (гипотеза о независимости отвергается на уровне вероятности $P > 0,9999$). Величина коэффициента взаимной сопряженности по А.А. Чупрову $K=0,56$ указывала на среднюю степень взаимосвязи между распределениями сортов по кластерам при совершенно разных подходах.

Таким образом, генеалогический и RAPD анализы позволили оценить 124 селекционных сорта мягкой пшеницы по степени их генотипического сходства. Однако характер объединения сортов при обоих подходах лишь частично совпал. Это может быть связано с тем, что при использовании любых прямых способов оценки сортов пшеницы всегда можно выявить тот или иной уровень их сходства.

В RAPD анализе обнаружены генетические взаимосвязи всех изученных сортов, в том числе и не имеющих общих предков. В матрицах мер сходства коэффициент SM находился в пределах от 0,60 до 0,98, и в среднем составил 0,80, в то время как коэффициент родства изменялся от 0,0 до 0,75 и в среднем был на порядок меньше (0,08). По-видимому, RAPD-маркеры, случайно распределяющиеся по всему геному пшеницы, точнее определили степень различий сортов, чем генеалогический анализ. В генеалогическом анализе недооценивается сходство сортов, не связанных по родословным. Это касается не только местных, но и селекционных сортов. Более того, вклад родительских форм в создаваемый сорт может оказаться различным благодаря отбору, проводимому селекционером. Другими словами, допущения, принятые в генеалогическом анализе для расчета коэффициента родства, далеко не всегда отражают реальную степень генотипических различий и сходств между сортами. Несмотря на то, что метод анализа родословных не может дать точной количественной оценки генотипического сходства сортов, использование этого метода эффективно для отбора родительских пар для скрещиваний, выявления источников ценных признаков, которые контролируются различными генетическими системами, мониторинга изменения генетического разнообразия селекционных сортов. По-видимому, оба рассматриваемых подхода будут дополнять друг друга при оценке генетических взаимосвязей сортов.

Литература

1. Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А. Полиморфизм ДНК в популяционной генетике. Генетика. 2002, Т. 38, № 9, 1173-1195.

2. Мартынов С.П., Добротворская Т.В. Анализ генетического разнообразия пшеницы с помощью Информационно-аналитической системы генетических ресурсов GRIS. Генетика, 2000, Т. 36, № 2, 195-202.
3. Стрельченко П.П., Митрофанова О.П., Малышев Л.Л., Конарев А.В., Терами Ф. Генетическая дифференциация евразийского подвида мягкой пшеницы. Аграрная Россия, 2002, № 3, 11-23.
4. Gupta P.K., Varshney R.K., Sharma P.C., Ramesh B. Molecular markers and their applications in wheat breeding. Plant Breed., 1999, V. 118, 369-399.
5. Murphy J.P., Cox T.S., Rodgers D.M. Cluster analysis of red winter wheat cultivars based upon coefficients of parentage. Crop Sci., 1986, V. 26, 672-676.