

УДК 633.111:575.22:57.065

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ГЕКСАПЛОИДНОЙ ПШЕНИЦЫ ПО ДАННЫМ АНАЛИЗА МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ

© 2009 г. О. П. Митрофанова¹, П. П. Стрельченко¹, А. В. Конарев¹, Ф. Балфорьер²

¹Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства им. Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург 190000;

e-mail: o.mitrofanova@vir.nw.ru

²Экспериментальная станция по генетике и селекции Государственного института сельскохозяйственных исследований (INRA), Клермонн-Ферран 63100, Франция

Поступила в редакцию 11.12.2008 г.

Местные сорта пшеницы – важный потенциальный источник расширения генетической основы селекционных сортов. С использованием сформированного набора из 38 пар олигонуклеотидных праймеров проведено изучение микросателлитов и охарактеризован полиморфизм репрезентативной выборки из 347 генотипов, представляющих местные и селекционные сорта. Каждый генотип имел уникальную комбинацию аллелей по 39 изученным микросателлитным локусам. Для классификации генотипов по степени их сходства был применен компьютерный метод кластерного анализа. Полученные результаты свидетельствуют о генетической дифференциации гексаплоидной пшеницы. Выявлены группы сортов, формирование которых, по-видимому, было связано с основными древними очагами ее возделывания в Европе и Азии. Основу каждой из групп составили местные сорта мягкой пшеницы. Различия между выявленными группами сопряжены с множественными изменениями в геноме пшеницы и проявлялись как количественные различия по встречаемости разных аллелей микросателлитных локусов. Полученные данные представляют интерес для понимания структуры генетического разнообразия пшеницы и выяснения путей эволюции этой культуры.

В решении проблемы расширения генетической основы современных селекционных сортов пшеницы особая роль принадлежит генофонду местных сортов. Он является одним из важных источников комбинаций аллелей генов и полигенных систем, контролирующей способность растений противостоять различным неблагоприятным факторам внешней среды. Процесс формирования местных сортов практически начался с момента использования пшеницы человеком еще в доисторическое время. Благодаря разнообразию почвенно-климатических условий, в которых возделывалась пшеница, спонтанному возникновению мутаций, дрейфу генов, связанному с распространением пшеницы в ходе расселения человека, действию бессознательного искусственного и естественного отборов (давление последнего в условиях примитивного земледелия было весьма существенным) пшеница стала исключительно гетерогенной и полиморфной. В настоящее время местные сорта практически исчезли из посевов во всем мире и все их разнообразие сохраняется главным образом в коллекциях семян культурных растений.

В коллекции Государственного научного центра РФ Всероссийского научно-исследовательского института растениеводства им. Н.И. Вавилова

Россельхозакадемии (ВИР) поддерживается в живом виде свыше 14 тыс. местных сортов пшеницы из разных стран мира. Проведена огромная работа по выяснению селекционной ценности этого материала, систематизации его фенотипического и агроэкологического разнообразия [1–6]. Однако завершённой системы представлений о характере генетической дифференциации всего этого сортового материала пока еще нет. С разработкой в молекулярной биологии целого ряда методологий для быстрого и эффективного анализа полиморфизма растений на уровне ДНК и с появлением доступных компьютерных программ для классификации больших выборок объектов с применением многомерной статистики появились новые возможности в решении этой проблемы.

Различные типы ДНК-маркеров были использованы в оценке генетического разнообразия разных видов гексаплоидной пшеницы и классификации местных и селекционных сортов мягкой пшеницы, происходящих из разных стран [7–11]. Предприняты попытки связать генетическое разнообразие пшеницы с ее географическим распространением [12–14]. Тем не менее мы все еще далеки от понимания общей структуры этого разнообразия, особенно сопряженного с действием

неблагоприятных почвенно-климатических условий возделывания.

Главная цель настоящей работы – на основе сравнительного анализа микросателлитных последовательностей, или простых повторяющихся последовательностей ДНК (Simple Sequence Repeats, SSRs), выявить генетическую дифференциацию гексаплоидной пшеницы ($2n = 6x = 42$, геномная формула AABBDD).

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1) из коллекции ВИР отобрать выборку местных и стародавних селекционных сортов, которая наиболее полно отражала бы эколого-географическое разнообразие гексаплоидной пшеницы;

2) сформировать набор SSR-маркеров (полиморфных и картированных в геноме микросателлитных последовательностей ДНК, или микросателлитов), охватывающих все хромосомы гексаплоидной пшеницы;

3) с использованием SSR-маркеров методом кластерного анализа охарактеризовать структуру генетического разнообразия гексаплоидной пшеницы и сравнить ее с другими известными классификациями.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для проведения исследований послужили 319 типичных растений (генотипов), отобранных из местных и стародавних селекционных сортов различных видов гексаплоидной пшеницы. По нашему мнению, данная выборка генотипов репрезентативно отражает спектр генетических изменений этой пшеницы в ходе ее распространения и приспособления к локальным почвенно-климатическим условиям, поскольку при формировании выборки мы придерживались агроэкологической классификации пшеницы, разработанной Н.И. Вавиловым [2, 3]. В основу этой классификации положено деление всей обширной территории, на которой возделывается пшеница, на различающиеся по размерам агроэкологические области и районы. При этом каждая область или район характеризовались значительным единством почвенно-климатических условий и определенным агроэкологическим типом сортов, обозначенным как агроэкологическая группа. Агроэкологические группы объединены в подвиды и виды. Размеры агроэкологических групп различны, что обусловлено историей развития и распространения пшеницы. Поскольку существенная часть сортового материала пшеницы, на основе изучения которого Н.И. Вавилов построил агроэкологическую классификацию, сохранена в коллекции ВИР, мы имели возможность взять в изучение сорта, упомянутые Н.И. Вавиловым в его классификации. В исследу-

емую выборку вошли также другие местные и стародавние селекционные сорта, поступившие в коллекцию преимущественно в период с 1908-го по 1940-е годы. Их происхождение географически совпало с агроэкологическими областями и районами, описанными Н.И. Вавиловым для агроэкологических групп. В целом отобранные нами сорта относились к 45 агроэкологическим группам шести видов пшеницы (*Triticum macha* Dek. et Men., *T. spelta* L., *T. Vavilovianum* Jakubz. = *T. vavilovii* (Thum.) Jakubz., *T. compactum* Host, *T. sphaerococcum* Perc., *T. vulgare* Host = *T. aestivum* L.). Из них мягкая пшеница *T. aestivum* была представлена пятью подвидами (ssp. *irano-turkestanicum* Vav., ssp. *indicum* Vav., ssp. *sinicum* Vav., ssp. *eurasiaticum* Vav., *abyssinicum* Vav.), а карликовая пшеница *T. compactum* – тремя (ssp. *armeno-turkestanicum* Vav., ssp. *eurasiaticum* Vav., ssp. *sinicum* Vav.). Каждая из агроэкологических групп содержала от 2 до 25 сортов. В изучение также были включены генотипы, представляющие азиатский подвид пшеницы спельта *T. spelta* L. ssp. *kuckuckianum* Gokg. и вид *T. petropavlovskyi* Udacz. et Migusch. Эти формы пшеницы были найдены относительно недавно [6]. Для выявления связи современных селекционных сортов с местными и стародавними селекционными сортами пшеницы дополнительно исследовали 28 генотипов селекционных сортов из России и стран СНГ. В итоге изученные 347 генотипов представляли сорта из 44 стран (см. табл. 2).

Анализ микросателлитов. Для выделения ДНК использовали отдельные двух-трехнедельные проростки каждого сорта пшеницы. ДНК выделяли микрометодом с добавлением бромистого гексадецилтриметиламмония [15]. Фрагменты листьев растений (0,2–0,3 г) помещали в 96-луночные глубокие планшеты, замораживали в жидком азоте и гомогенизировали встряхиванием на качалке с использованием циркониевых шариков. К образцам добавляли по 0,6 мл экстракционного буфера, содержащего 100 мМ трис-HCl, pH 8,0, 50 мМ ЭДТА, 500 мМ NaCl и 20 мМ метабисульфитнатрия. Смеси инкубировали при 95°C в течение 45 мин, а затем центрифугировали при 4000 об/мин при 4°C в течение 10 мин. Надосадочную жидкость (200 мкл) переносили в чистые планшеты, добавляли 200 мкл изопропанола и 12 мкл 7,5 М ацетата аммония. Смеси инкубировали при –20°C в течение ночи и центрифугировали как описано выше. Осадки ДНК промывали в 400 мкл 70%-ного этанола, центрифугировали, подсушивали и растворяли в 50 мкл деионизированной воды.

ПЦР проводили в термоциклере PTC 225 фирмы MJ Research 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

Таблица 1. Характеристика изученных микросателлитных локусов

№	Название локуса*	Локализация*	Общее число аллелей	Число редких (уникальных) аллелей	Индекс полиморфизма (PIC)
1	<i>Xgwm99</i>	1A	18	13(8)	0.801
2	<i>Xgwm135</i>	1A	25	20(4)	0.784
3	<i>Xgwm312</i>	2A	34	31(7)	0.889
4	<i>Xgwm372</i>	2A	33	28(3)	0.949
5	<i>Xgwm2</i>	3A	11	7(2)	0.786
6	<i>Xgwm480</i>	3A	14	10(0)	0.665
7	<i>Xcfd17h8a</i>	4A	12	8(4)	0.447
8	<i>Xgwm610</i>	4A	15	11(5)	0.720
9	<i>Xgwm186</i>	5A	23	16(4)	0.870
10	<i>Xgwm415</i>	5A	6	4(1)	0.531
11	<i>Xgwm427</i>	6A	22	16(3)	0.883
12	<i>Xgwm260</i>	7A	20	11(0)	0.915
13	<i>Xgwm11</i>	1B	18	13(4)	0.844
14	<i>Xgwm413</i>	1B	16	10(1)	0.853
15	<i>Xgwm120</i>	2B	17	11(3)	0.874
16	<i>Xgwm257</i>	2B	7	3(2)	0.727
17	<i>Xgwm285</i>	3B	33	28(10)	0.890
18	<i>Xgwm566</i>	3B	12	7(2)	0.807
19	<i>Xgwm149</i>	4B	12	8(3)	0.702
20	<i>Xgwm251</i>	4B	21	17(4)	0.836
21	<i>Xgwm234</i>	5B	19	10(3)	0.907
22	<i>Xgwm408</i>	5B	21	15(5)	0.880
23	<i>Xgwm219</i>	6B	21	15(2)	0.898
24	<i>Xgwm626</i>	6B	10	8(1)	0.583
25	<i>Xgwm46</i>	7B	24	18(2)	0.896
26	<i>Xgwm400</i>	7B	17	11(2)	0.868
27	<i>Xgwm337</i>	1D	21	14(3)	0.893
28	<i>Xgwm642</i>	1D	10	6(1)	0.644
29	<i>Xgwm261</i>	2D	21	18(4)	0.750
30	<i>Xgwm539</i>	2D	40	33(8)	0.944
31	<i>Xgwm341</i>	3D	25	17(8)	0.920
32	<i>Xgwm664</i>	3D	4	2(0)	0.294
33	<i>Xcfd17h8d</i>	4D	17	8(2)	0.913
34	<i>Xgwm190</i>	5D	17	11(4)	0.806
35	<i>Xgwm272</i>	5D	11	7(3)	0.695
36	<i>Xgwm325</i>	6D	13	8(2)	0.814
37	<i>Xgwm469</i>	6D	15	9(2)	0.847
38	<i>Xgwm44</i>	7D	17	9(2)	0.891
39	<i>Xgwm437</i>	7D	20	12(2)	0.921
Всего			712	503(126)	0.799

* По данным [16, 20].

Таблица 2. Распределение 347 генотипов гексаплоидной пшеницы по 10 группам, выявленным в результате анализа 39 микросателлитных локусов, в зависимости от происхождения сорта, из которого отобран генотип

(Регион число генотипов)	Субрегион	Страна, территория	Группы генотипов												
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
Африка (12)		Алжир Марокко Тунис Эфиопия				1				2 1 8					
Азия (164)	Центральная (66)	Афганистан			3					2					
		Западный Китай		2	3				3	5					
		Индия, Кашмир			5										
		Иран				4				1					
		Казахстан										2			
		Монголия		2	2										
	Восточная (36)	Таджикистан			8	7			3	3					
		Туркмения			2	2				1					
		Узбекистан			5	1									
		Восточный Китай		14	2	1				6					
		Япония		5						6			2		
		Северная (8)	Россия			1				4			2	1	
		Южная (28)	Индия	5		7	1				1				
			Пакистан	4		7	1				2				
Западная (26)	Израиль			1	1				5			1			
	Ирак								1						
	Сирия								3						
	Турция			2	7	1			4						
Кавказ (46)	Азербайджан				7				4			1			
	Армения				1	3			2			2	1		
	Грузия			2	5				3	2					
	Россия				8				2			3			
Европа (104)	Западная (47)	Великобритания							2						
		Германия						4	1			1			
		Греция							1						
		Испания							6						
		Италия			1	1			3						
		Нидерланды							2						
		Португалия							3						
	Восточная (57)	Франция							5						
		Швеция							7						
		Швейцария							4	4		2			
		Албания							1						
		Белоруссия							1						
		Венгрия										1			
		Молдавия										1			
Новый Свет (21)	Польша								1		4				
	Россия								6	12	8	6			
	Украина								4	5	3	3			
	Югославия										1				
	Австралия								4						
	Аргентина										1				
	Канада								2	1	6				
	США				1				2	2	2				

праймера, 30 с при 72°C) и, наконец, заключительный синтез продуктов проводили в течение 5 мин при 72°C [16]. Для дальнейшего анализа готовили смеси, состоящие из продуктов амплификации, полученных с двумя или тремя парами праймеров, меченных разными флуоресцентными красителями. Эти смеси анализировали в автоматическом секвенаторе ABI Prism 3100. Размеры фрагментов ДНК определяли с использованием программного обеспечения GeneScan v. 3.7 NT.

Статистическая обработка результатов. Различающиеся по длине микросателлиты, относящиеся к одному исследуемому участку ДНК с известной локализацией в геноме (SSR-локусу), учитывали как аллели этого локуса. При составлении бинарной матрицы исходных данных их кодировали цифрами 1 или 0, что обозначало наличие или отсутствие каждого аллеля у данного SSR-локуса.

На основе исходной матрицы данных строили матрицу коэффициентов сходства генотипов по Нею и Ли [17], которую использовали для кластеризации сортов методом Уорда [18], основанным на принципе минимизации внутрикластерной дисперсии. Все расчеты и графические построения проводили с использованием пакетов программ MVSP 3.1 и STATISTICA 6.0. Значения PIC-индекса (Polymorphism information content) при условии гомозиготности генотипов рассчитывали по [19].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика SSR-маркеров

Для исследования микросателлитных локусов в работе использовали 37 пар олигонуклеотидных праймеров, предложенных в работе М. Редер с соавт. [16]. Каждая из этих пар позволяла исследовать один локус (*Xgwm*-локусы, табл. 1). Еще одна пара праймеров обеспечила анализ сразу двух независимых локусов (*Xcfd17h8a* и *Xcfd17h8d*) [20]. Таким образом, в хромосомах 6A, 7A и 4D было изучено по одному локусу, в остальных 18 хромосомах гаплоидного набора – по два локуса, а всего у 347 генотипов гексаплоидной пшеницы исследовано 39 локусов.

Число выявленных аллелей на один локус варьировало от четырех у *Xgwm664* до 40 у *Xgwm539*, при этом в среднем на каждый локус приходилось по 18.3 аллеля. Всего для изученных 39 локусов идентифицировано 712 аллелей. Встречаемость аллелей в изученной выборке генотипов варьировала от 0.3% до 83.2%, при этом средняя встречаемость аллелей была равна 5.5%. Из всех идентифицированных аллелей 503 аллеля (70.6% от общего их числа) обнаружены менее чем у 5% генотипов, и такие аллели рассматривались нами как редкие. Среди них 126 аллелей ока-

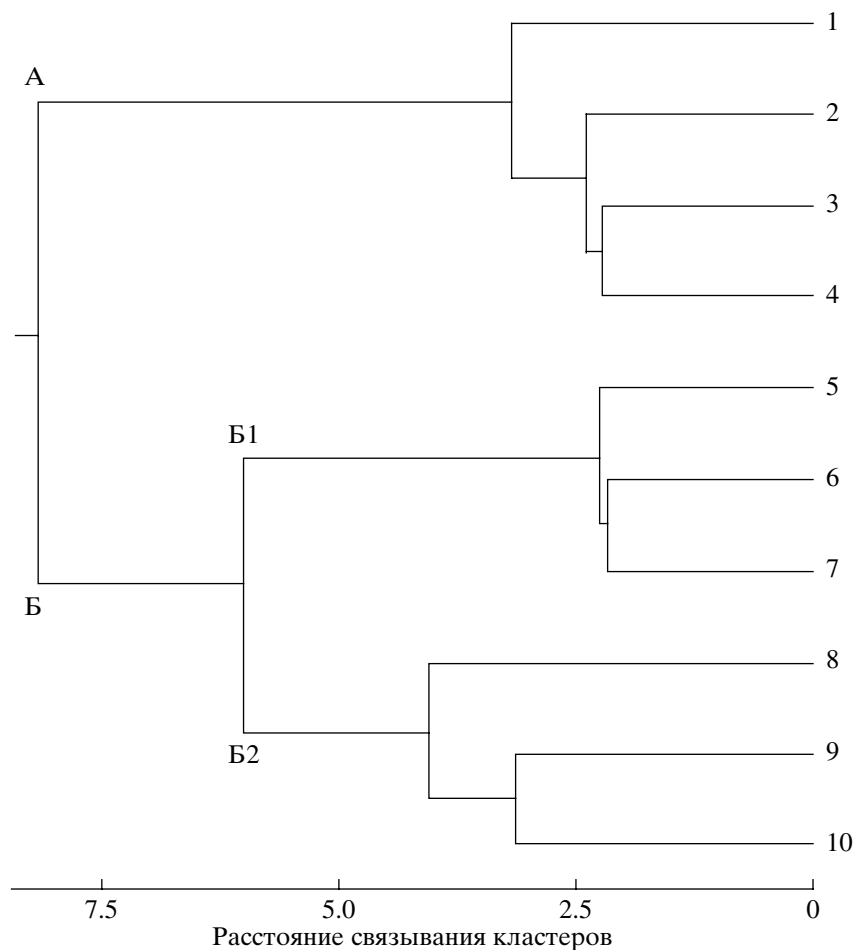
зались уникальными, т.е. каждый из них присутствовал только в одном генотипе. Распределение таких аллелей по локусам было неравномерным. Чаще они были обнаружены в локусах *Xgwm285* (хромосома 3B 10 аллелей), *Xgwm99* (хромосома 1A 8 аллелей) и *Xgwm539* (хромосома 2D 8 аллелей) и не выявлены в локусе *Xgwm260* (хромосома 7A). Различия по встречаемости уникальных аллелей в разных локусах, возможно, обусловлены разной скоростью их мутирования. При преобладании редких аллелей по каждому локусу было обнаружено от одного до пяти аллелей с встречаемостью более чем 10%. Общее число таких аллелей составило 112.

Среди 347 изученных генотипов в каждом геноме гексаплоидной пшеницы было выявлено приблизительно равное число аллелей, в том числе редких. Величина PIC-индекса для геномов A, B и D составила 0.77, 0.82 и 0.80 соответственно. Среди гомеологичных групп хромосом наиболее высокий PIC-индекс (0.90) был выявлен для седьмой группы, а наиболее низкий (0.72) – для четвертой группы. По отдельным микросателлитным локусам индекс полиморфизма варьировал от 0.29 до 0.95 и в среднем составил 0.80 (табл. 1). Следует также отметить, что уникальные аллели имели тенденцию к возникновению определенных генотипах. Так, из 126 выявленных уникальных аллелей 44 (35.2%) были обнаружены у 20 генотипов, причем каждый из них содержал от двух до четырех уникальных аллелей. В этом списке оказались пять из 26 изученных генотипов пшеницы спельта. Хотя функциональное значение мутаций микросателлитных локусов пока неизвестно, сохранению в коллекции сортов, из которых были отобраны генотипы, несущие по две и больше уникальных мутаций, следует уделять особое внимание.

В целом сравнение 347 генотипов по 39 микросателлитным локусам показало, что каждый из них имел специфичный набор аллелей. Однако для различения всех изученных генотипов достаточно изучить следующие семь локусов: *Xgwm* 120, 234, 260, 372, 413, 437 и 539.

Кластерный анализ

Значения коэффициентов сходства для всех возможных 60031 пар генотипов варьировали от 0.00 до 0.95, среднее составило 0.20. При этом только 27 пар, которые включили 32 генотипа разных видов гексаплоидных пшениц из России, Китая и других стран, были полностью несходными (коэффициент сходства равен 0.00) и имели разные аллели по всем изученным микросателлитным локусам. Три пары генотипов (*T. aestivum* из Индии: к-23798 и к-23807; *T. compactum* из Армении: к-13477 и к-13695; *T. vavilovii* из Турции: к-29533 и к-30085) оказались наиболее близкими



Распределение групп генотипов на дендрограмме, построенной по результатам анализа 39 микросателлитных локусов у 347 генотипов гексаплоидной пшеницы. А и Б – кластеры, Б1 и Б2 – субкластеры, 1–10 – группы генотипов.

(коэффициент сходства – 0.95) и имели разные аллели всего у четырех локусов.

Кластерный анализ позволил выявить сложную структуру взаимосвязей между изученными генотипами пшеницы. Все генотипы объединились в два крупных кластера А и Б (рисунок). Кластер А включал в себя 132 генотипа, которые сформировали группы 1–4, представляющие местные сорта главным образом из различных стран Азии. В составе кластера Б, содержащего 215 генотипов преимущественно из стран Европы, выявлено два субкластера Б1 и Б2, каждый из которых представлен тремя группами генотипов (5–7 и 8–10, соответственно). Для удобства анализа дендрограммы в табл. 2 и 3 дано суммарное распределение генотипов, объединившихся в разных группах, по странам и географическим регионам происхождения, а также по их принадлежности к различным таксонам гексаплоидной пшеницы согласно классификации Н.И. Вавилова [3], дополненной недавно описанными видами. Как видно из данных табл. 2 и 3, в кластере А группа 1 содержа-

ла семь генотипов мягкой и два генотипа шарозерной пшеницы *T. sphaerococcum*. Все они происходили из Индии и Пакистана. Из 23 генотипов, образовавших вторую группу, 19 принадлежали подвиду китайской мягкой пшеницы (subsp. *sinicum*) и четыре – подвиду китайской карликовой пшеницы (subsp. *sinicum*). Большинство генотипов этой группы происходило из Восточного Китая и Японии, а четыре – из Западного Китая и Монголии. Группа 3 была представлена 51 генотипом разных видов и подвидов гексаплоидной пшеницы: 34 – *T. aestivum*, преимущественно подвиды *indicum* и *irano-turkestanicum*; 14 – *T. compactum* subsp. *armeno-turkestanicum* и subsp. *eurasiaticum*; 2 – *T. spelta* subsp. *kuckuckianum*; 1 – *T. sphaerococcum*. Большинство этих генотипов происходили из стран Центральной Азии и соседних с ней районов Индии и Пакистана. Из 49 генотипов, сформировавших четвертый кластер, 36 относились к *T. aestivum* subsp. *eurasiaticum* и subsp. *irano-turkestanicum*, 1 – *T. compactum*, 2 – *T. macha* и 2 – *T. vavilovii*. Сорта, из которых были отобраны эти генотипы, происходили главным образом из районов Кавказа и Турции. К этим генотипам так-

Таблица 3. Распределение 347 генотипов, принадлежащих к разным видам и подвидам гесаплоидной пшеницы, по 10 группам, выявленным в результате анализа 39 микросателлитных локусов

Вид, подвид	Группа генотипов в кластерном анализе									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>T. aestivum</i> , в том числе ^а :	7	19	34	36	4	3	99	24	41	11
subsp. <i>irano-turkestanicum</i>		1	11	10		3	14			
subsp. <i>indicum</i>	7		18	2			3			
subsp. <i>sinicum</i>		16	1	1			13		2	
subsp. <i>eurasiaticum</i>		2	4	23	4		53	9	37	7
subsp. <i>abyssinicum</i>							8			
современные сорта							8	15	1	4
<i>T. compactum</i> , в том числе ^а :		4	14	1		1	13			
subsp. <i>armeno-turkestanicum</i>			9	1			8			
subsp. <i>eurasiaticum</i>		1	5			1	5			
subsp. <i>sinicum</i>		3								
<i>T. spelta</i> , в том числе ^б :			2	8		7	8		1	
subsp. <i>spelta</i>						7	5			
subsp. <i>kuckuckianum</i>			2	8			3		1	
<i>T. macha</i>				2			1			
<i>T. vavilovii</i>				2						
<i>T. sphaerococcum</i>	2		1							
<i>T. petropavlovskyi</i> ^б						3				

^а Подвиды *T. aestivum* и *T. compactum* приведены по Н.И. Вавилову [3]. ^б Подвиды *T. spelta* и вид *T. petropavlovskyi* даны по Дорфееву и др. [6].

же присоединились восемь генотипов азиатского подвида *T. spelta* из Ирана, Таджикистана и Турции.

В субкластере Б1 число генотипов в группах варьировало от четырех до 121. Самая малочисленная группа 5 содержала генотипы евразийского подвида мягкой пшеницы из Армении и Турции. Группа 6 объединила семь генотипов спельты европейского подвида из Швейцарии и Германии, три генотипа мягкой пшеницы из Таджикистана, относящихся к группе полбовидной ирано-туркестанской мягкой пшеницы, а также все три изученных генотипа *T. petropavlovskyi* и один генотип пшеницы карликовой из Германии. Группа 7 оказалась самой большой по размеру: она содержала 121 генотип. Количественно в ней преобладали генотипы мягкой пшеницы трех подвигов (*eurasiaticum*, *sinicum* и *irano-turkestanicum*) из стран Западной Европы и Западной Азии, в ней также присутствовали 13 генотипов подвигов китайской и европейской карликовой пшеницы из разных стран, 7 генотипов европейского подвида пшеницы спельта из Испании и Азербайджана и по одному генотипу шарозерной пшеницы из Индии и пшеницы маха из Грузии. Геноти-

пы пшеницы спельта имели тенденцию к совместному группированию.

В субкластере Б2 в основном объединились генотипы евразийской мягкой пшеницы (subsp. *eurasiaticum*). Группа 8 включила генотипы, отобранные из местных озимых восточноевропейских сортов мягкой пшеницы типа Банаток, а также производных от них селекционных сортов Безостая 1, Мироновская 808 и их потомков. По данным Н.И. Вавилова ([2], с. 302; [3], с. 83), до начала прошлого века Банатки были наиболее распространенной в мире пшеницей, экологически приуроченной к степным и лесостепным областям и районам и ведущей свое начало из горного района южной Венгрии Баната. Подробно структура группы 8 рассмотрена нами в отдельной публикации [21]. Группа 9 объединила 41 генотип, из которых большинство представляло также местные озимые европейские сорта типа Банаток и Сандомирок и производные этих сортов. Местные сорта типа Сандомирок относят к экологической группе североевропейской лесной безостой мягкой пшеницы, занимавшей когда-то обширный ареал в нечерноземной и лесной зонах и распространившейся дальше в степь ([3], с. 90–92). Последняя группа 10 объединила генотипы, ото-

бранные из яровых восточноевропейских сортов типа Полтавок и производных от них селекционных сортов. Местные сорта типа Полтавок – одна из наиболее пластичных (универсальных) групп степной пшеницы, распространенных во многих районах степной, лесостепной и лесной зон ([3], с. 89–90).

В сравнении с местными сортами генетическое разнообразие изученных селекционных сортов из России и стран СНГ было узким: все генотипы вошли в разные группы кластера Б.

Следует отметить, что генотипы, относящиеся к выделенному Н.И. Вавиловым [3] подвиду абиссинской мягкой пшеницы (subsp. *abyssinicum*), возделываемой в Эфиопии и горной Эритрее, не сформировали отдельной группы, а вошли в состав самой крупной группы 7, включавшей преимущественно местные и селекционные сорта Европы.

Чтобы определить характер различий между отдельными группами генотипов, мы оценили встречаемость аллелей микросателлитных локусов во всей изученной выборке и в каждой группе. Полученные данные показали, что группы генотипов различаются количественно по встречаемости большого числа аллелей, причем как тех, что имеют высокую частоту в суммарной выборке, так и редких аллелей.

ОБСУЖДЕНИЕ

Выявленный в нашей работе уровень аллельного разнообразия микросателлитных локусов (в среднем 18.3 аллеля на locus) соответствует опубликованным данным. Так, при анализе 998 образцов мягкой пшеницы из коллекции Института генетики и селекции растений (Гатерслебен, Германия) было идентифицировано в среднем 18.1 аллеля в каждом из 26 изученных SSR-локусов [14]. В недавнем исследовании 3942 образцов пшеницы из коллекции INRA (Франция) по 38 микросателлитным локусам авторы обнаружили в среднем 23.9 аллеля на locus [10]. Выборка генотипов в нашей работе была значительно меньше, чем в описанных выше исследованиях, поэтому примерно одинаковый уровень аллельного разнообразия локусов свидетельствовал о высокой гетерогенности изученного материала. На это также указывала средняя величина индекса полиморфизма PIC, рассчитанная для всей выборки генотипов: в нашей работе она составила 0.80, а в исследованиях немецких ученых 0.77 [14].

Суммируя результаты настоящей работы, можно также заключить, что в пределах ареала гексаплоидная пшеница дифференцирована по составу аллелей SSR-локусов. Наиболее глубокие генетические различия обнаружены между группами генотипов, отобранных из местных сор-

тов, формирование которых происходило на двух разных континентах – в Азии или Европе (рисунок). У мягкой пшеницы растения (генотипы), представляющие сорта этих крупных групп, различались также по степени жесткости (грубости) колосьев и трудности обмолота, а именно: растения из первой группы были грубо жесткими с трудным обмолотом, а из второй – нежного типа с легким обмолотом. Эти различия указывали на принадлежность растений (генотипов) к разным “группам рас” по Н.И. Вавилову [22] или ботаническим подвидам, а именно к азиатскому – subsp. *hadropyrum* (Flaks.) Tzvel. и европейскому – subsp. *aestivum*, согласно классификациям Фляксбергера [4], Цвелева [23], Дорофеева и др. [6]. На более низком уровне различий каждая из крупных групп генотипов распалась на более мелкие группы, характеризующиеся разной встречаемостью аллелей микросателлитных локусов. Эти более мелкие группы по географическому происхождению объединившихся в них генотипов можно соотносить с древними земледельческими очагами, описанными Н.И. Вавиловым [24]. Рассматривая историю развития мирового земледелия, Н.И. Вавилов считал, что первые земледельческие культуры, в том числе культуры Южной Азии, в которую он включал Закавказье, Малую и Центральную Азию, а также собственно Индии, Восточного и Центрального горного Китая и другие, возникли “автономно, одновременно или разновременно.... Им свойственны весьма различные этнические и лингвистические группы народов ... и ... разные типы сельскохозяйственных орудий и домашних животных”. По археологическим данным, гексаплоидную пшеницу выращивали в Европе уже в IV тысячелетии до н.э. [25, 26], а в Азии даже значительно раньше – в VIII тысячелетии до н.э. [27]. В процессе длительного возделывания пшеницы на изолированных территориях земледельческих очагов, по-видимому, сформировались сорта, различающиеся по комплексам морфологических и физиологических признаков и адаптированные к соответствующим локальным почвенно-климатическим условиям и условиям культуры земледелия. Для становления выявленных нами групп местных сортов можно предположить существование следующих земледельческих очагов: для группы 1 – Южно-Азиатского, группы 2 – Восточно-Азиатского, группы 3 – Центрально-Азиатского, группы 4 – Кавказского, субкластера Б1 – Западно-Европейского и субкластера Б2 – Восточно-Европейского.

Полученная в настоящей работе классификация имеет большое сходство с классификацией гексаплоидной пшеницы, построенной нами ранее на основе анализа RAPD-маркеров [28, 29]. В общих чертах она совпадает с агроэкологической классификацией мягкой пшеницы, предложенной Н.И. Вавиловым [2, 3], но кардинально отличает-

ся от известных ботанических классификаций, базирующихся на анализе различий гексаплоидной пшеницы по морфологическим признакам, контролируемым небольшим числом генов с широкими плейотропными эффектами [6, 30–32].

По результатам изучения микросателлитов из всей гексаплоидной пшеницы мягкая пшеница наиболее дифференцирована и состоит, по меньшей мере, из 10 групп сортов. В то же время ни генотипы, представляющие эндемичные виды *T. sphaerococcum*, *T. vavilovii*, *T. macha* или *T. petropavlovskiy*, ни генотипы, отобранные из местных сортов ранее относительно широко возделываемых видов *T. compactum* и *T. spelta*, не сформировали ни одной отдельной группы, а объединились вместе с мягкой пшеницей. Другими словами, они имели с ней большее сходство, чем между собой. Генотипы карликовой пшеницы и пшеницы спельты вошли не только в разные группы, но и в оба кластера А и Б. Такое распределение генотипов можно рассматривать как доказательство в пользу коэволюции этих пшениц и мягкой пшеницы. О близком родстве мягкой пшеницы и пшеницы спельты свидетельствуют также результаты изучения рисунков дифференциального окрашивания хромосом [33], причем для подвида европейской спельты (subsp. *spelta*) подтверждается правомерность деления на эколого-географические группы, что имеет место и в нашем исследовании. Так, генотипы спельты, относящиеся к иберийской группе, объединились вместе и вошли в состав группы б, в которой преобладала мягкая пшеница из Европы, а относящиеся к баварской – сформировали свою группу вместе с сортами мягкой пшеницы из юго-западной Азии, которые по признакам колоса очень похожи на спельту. В различных классификациях эту полбовидную мягкую пшеницу выделяют в группу *speltiforme* [3, 4]. Согласно полученным нами данным, такое фенотипическое сходство, по-видимому, обусловлено их генотипическим родством.

Таким образом, применение современных ДНК-технологий, позволяющих изучать полиморфизм местных сортов пшеницы по большому числу участков генома, делает возможным построение генетической классификации этой культуры, отражающей исторический путь ее эволюции и распространения.

Работа выполнена при поддержке Государственного института сельскохозяйственных исследований (INRA), Франция.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Вавилов Н.И.* Научные основы селекции пшеницы. М.; Л.: Сельхозгиз, 1935. 244 с.
2. *Вавилов Н.И.* Мировые ресурсы зерновых культур и льна. Опыт агроэкологического обзора важнейших полевых культур. М.; Л.: АН СССР, 1957. 462 с.
3. *Вавилов Н.И.* Мировые ресурсы сортов хлебных злаков, зерновых бобовых, льна и их использование в селекции. Пшеница. М.; Л.: Наука, 1964. 122 с.
4. *Флягсбергер К.А.* Культурная флора. I. Хлебные злаки. Пшеница. М.; Л.: Гос. изд-во совхозной и колхозной лит-ры, 1935. 434 с.
5. *Пальмова Е.Ф.* Введение в экологию пшениц. Л.; М.: Огиз. Сельхозгиз, 1935. 74 с.
6. *Дорофеев В.Ф., Филащенко А.А., Мигушова Э.Ф. и др.* Культурная флора СССР. Том I. Пшеница. Л.: Колос, 1979. 347 с.
7. *Стрельченко П.П., Митрофанова О.П., Конарев А.В.* Сравнение возможностей RAPD-, AFLP- и SSR-маркеров для различения местных сортов гексаплоидных пшениц // *Аграрная Россия*. 2004. № 6. С. 3–9.
8. *Cao W., Scoles G., Hucl P., Chibbar R.N.* 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.
9. *Parker G.D., Fox P.N., Langridge P. et al.* Genetic diversity within Australian wheat breeding programs based on molecular and pedigree data // *Euphytica*. 2002. V. 124. P. 293–306.
10. *Balfourier F., Roussel V., Strelchenko P. et al.* A worldwide bread wheat core collection arrayed in a 384-well plate // *Theor. Appl. Genet.* 2007. V. 114. P. 1265–1275.
11. *Strelchenko P., Street K., Mitrofanova O. et al.* Comparative assessment of wheat landraces from AWCC, ICARDA and VIR germplasm collections based on the analysis of SSR markers // 11th Intern. wheat genetic symp., 24–29 August 2008, Brisbane, QLD, Australia.
12. *Митрофанова О.П., Стрельченко П.П., Конарев А.В.* Структура генетических взаимосвязей между местными сортами гексаплоидных пшениц по данным RAPD-, AFLP- и SSR-анализов // *Аграрная Россия*. 2004. № 6. С. 10–19.
13. *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. 437–445.
14. *Huang X.Q., Börner A., Röder M.S., Ganai M.W.* Assessing genetic diversity of wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm using microsatellite markers // *Theor. Appl. Genet* 2002. V. 105. P. 699–707.
15. *Saghai-Marooif M.A., Soliman K.M., Jorgensen R.A., Allard R.W.* Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1984. V. 81. P. 8014–8018.
16. *Röder M.S., Korzun V., Wendehake K. et al.* A microsatellite map of wheat // *Genetics*. 1998. V. 149. P. 2007–2023.
17. *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.
18. *Ward J.H.Jr.* Hierarchical grouping to optimize an objective function // *J. Am. Stat. Assoc.* 1963. V. 58.

- Р. 236–244. (цит. по Дюран Б., Оддел П. Кластерный анализ. М.: Статистика, 1977. 128 с.).
19. Botstein D., Raymond L., White L. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms // *Am. J. Hum. Genet.* 1980. V. 32. P. 314–331.
 20. Guyomarc'h H., Sourdille P., Charmet G. et al. Characterisation of polymorphic markers from *T. tauschii* and transferability to the D-genome of bread wheat // *Theor. Appl. Genet.* 2002. V. 104. P. 1164–1172.
 21. Митрофанова О.П., Стрельченко П.П., Балфорьер Ф. Характеристика сорта Безостая 1 и генетически близких ей сортов по данным анализа микросателлитных локусов // Безостая 1 – 50 лет триумфа: Сб. материалов междунар. конф., посвященной 50-летию создания сорта озимой мягкой пшеницы Безостой 1. Краснодар, 2005. С. 196–204.
 22. Вавилов Н.И. К познанию мягких пшениц // Тр. по прикл. бот. и сел., Петроград: Гос. ин-т опытной агрономии, 1922–1923. Т. 13. С. 149–215.
 23. Цвелев Н.Н. Злаки СССР. Л.: Наука, 1976. 788 с.
 24. Вавилов Н.И. Проблема происхождения земледелия в свете современных исследований (1931) // Происхождение и география культурных растений. Л.: Наука, 1987. С. 161–170.
 25. Якубцинер 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.
 26. Schlumbaum A., Neuhaus J.-M., Jacomet S. Coexistence of tetraploid and hexaploid naked wheat in a Neolithic lake dwelling of Central Europe: evidence from morphology and ancient DNA // *J. Archaeol. Sci.* 1998. V. 25. P. 1111–1118.
 27. Nesbitt M. Wheat evolution: integrating archaeological and biological evidence // *The Linnean*, special issue. 2001. № 3. P. 37–59.
 28. Strelchenko P., Mitrofanova O., Terami F. Phylogeography of hexaploid wheat complex based on RAPD data // *Genetic Resources and Biotechnology* / Eds: Thangadurai D., Pullaiah T., Pinheiro de Carvalho M.A. New Delhi: Regency Publ. 2005. V. 1. P. 49–73.
 29. Стрельченко П.П., Митрофанова О.П., Мальшев Л.Л. и др. Генетическая дифференциация евразийского подвида мягкой пшеницы по данным RAPD-анализа // *Аграрная Россия.* 2002. № 3. С. 11–23.
 30. Miller T.E. Systematics and evolution // *Wheat Breeding, its Scientific Basis.* Lupton F.G.H. London & New York: Chapman and Hall, 1987. P. 1–30.
 31. Mac Key J. Species relationships in *Triticum* // *Hereditas* [Suppl.]. 1966. V. 2. P. 237–276.
 32. Bowden W.M. The taxonomy and nomenclature of the wheats, barleys, and ryes and their wild relatives // *Can. J. Bot.* 1959. V. 37. P. 657–684.
 33. Дедкова О.С., Бадаева Е.Д., Митрофанова О.П. и др. Анализ внутривидовой дивергенции гексаплоидной пшеницы *Triticum spelta* L. с помощью метода дифференциального окрашивания хромосом // *Генетика.* 2004. Т. 40. №10. С. 1352–1369.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ГЕКСАПЛОИДНОЙ ПШЕНИЦЫ ПО ДАННЫМ АНАЛИЗА МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ

© 2009 г. О. П. Митрофанова¹, П. П. Стрельченко¹, А. В. Конарев¹, Ф. Балфорьер²

¹Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства им. Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург 190000;

e-mail: o.mitrofanova@vir.nw.ru

²Экспериментальная станция по генетике и селекции Государственного института сельскохозяйственных исследований (INRA), Клермонн-Ферран 63100, Франция

Поступила в редакцию 11.12.2008 г.

Местные сорта пшеницы – важный потенциальный источник расширения генетической основы селекционных сортов. С использованием сформированного набора из 38 пар олигонуклеотидных праймеров проведено изучение микросателлитов и охарактеризован полиморфизм репрезентативной выборки из 347 генотипов, представляющих местные и селекционные сорта. Каждый генотип имел уникальную комбинацию аллелей по 39 изученным микросателлитным локусам. Для классификации генотипов по степени их сходства был применен компьютерный метод кластерного анализа. Полученные результаты свидетельствуют о генетической дифференциации гексаплоидной пшеницы. Выявлены группы сортов, формирование которых, по-видимому, было связано с основными древними очагами ее возделывания в Европе и Азии. Основу каждой из групп составили местные сорта мягкой пшеницы. Различия между выявленными группами сопряжены с множественными изменениями в геноме пшеницы и проявлялись как количественные различия по встречаемости разных аллелей микросателлитных локусов. Полученные данные представляют интерес для понимания структуры генетического разнообразия пшеницы и выяснения путей эволюции этой культуры.