

48. 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.
49. Rieger R., Michaelis A., Green M. M. Glossary of Genetics. // Class. Molec. — Springer-Verlag, 1991. — 553 p.
50. Scribner K. T., Amtzen J. W., Burke T. Comparative analysis on intra- and interpopulation genetic diversity on *Bufo bufo* using allozyme, single locus microsatellite, minisatellite and multilocus minisatellite data. // Mol. Biol. Evol. — 1994. — № 11. — P. 737 – 748.
51. Schulze A., Steiner A., and Ruckebauer P. Variability of an Austro-Hungarian landrace of barley (*Hordeum vulgare* L.) Electrophoretic analysis of the hordeins of the Vienna sample of 1877 // Plant Variet. Seeds. — 1994. — № 7. — P. 193 – 197.
52. Strelchenko P., Kovaleva O., Okuno K. Genetic differentiation and geographical distribution of barley germplasm based on RAPD markers // Gen. Resour. Crop Evol. — 1999. — V. 46. — P. 193 – 205.
53. Strelchenko P., Gubareva N., Kovaleva O., Graner A. Geographical and breeding trends within Eurasian cultivated barley germplasm revealed by molecular markers // Plant Genet. Resour. Character. Evaluat. — NIAR, Tsukuba, Japan, 1998. — P. 115 – 133.
54. Vvedenskaja I. O., Alpatyeva N. V., Gubareva N. K., and Konarev A. V. Erhaltung and nutzung pflanzengenetischer ressourcen — eine internationale aufgabe für naturschützer, genbanken und pflanzenzüchter // Vorträge für pflanzenzücht. — 1993. — V. 25. — P. 187 – 201.
55. Weising K., Nybom H., Wolff K., and Meyer W. DNA fingerprinting in plants and fungi // CRC Press, 1995. — 322 p.
56. Wrigley C. W., Batey I. L. Methods for establishing: distinctness of cereal-grain genotype in cultivar registration // Plant Variet. Seeds. — 1999. — № 12. — P. 169 – 179.

Конарев А. В., докт. биол. наук, профессор;  
Всероссийский НИИ растениеводства им. Н. И. Вавилова (ВИР)

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ЕВРАЗИЙСКОГО ПОДВИДА МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ ПО ДАННЫМ RAPD-АНАЛИЗА

П. П. Стрельченко, О. П. Митрофанова, Л. Л. Малышев,  
А. В. Конарев, Ф. Терами

### ВВЕДЕНИЕ

Для селекционного улучшения мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) по способности противостоять различным стрессам важное значение имеют сорта народной селекции (местные сорта) как потенциальные источники комплексов коадаптированных генов, обуславливающих приспособленность сортов к определенным условиям внешней среды. Процесс формирования геномов местных сортов происходил в течение не одного тысячелетия под действием не только искусственного, но в значительной степени естественного отбора, давление которого в условиях относительно невысокого уровня земледелия, характерного для древних производящих хозяйств, было весьма существенным. При этом большое разнообразие почвенно-климатических условий обусловило выведение многими поколениями земледельцев большого количества специализированных для определенных условий сортов [11].

В коллекции пшениц Всероссийского НИИ растениеводства (ВИР) им. Н. И. Вавилова поддерживается в живом виде более 14 тыс. местных сортов различных видов пшениц из разных стран мира. Проблема изучения их генетического разнообразия имеет первостепенное значение как для уточнения стратегии эффективного сохранения и целенаправленного расширения генетической изменчивости в *ex situ* коллекциях этих культур, так и для определения путей использования местных сортов в современной и будущей селекции.

На основе систематизации наблюдений над посевами мировой коллекции пшеницы ВИР в различных климатических зонах были предприняты попытки построения экологической классификации местных сор-

тов [2 – 4, 6, 9, 11]. К сожалению, эти исследования не получили дальнейшего развития ни в России, ни за рубежом и, как результат этого, до сих пор не выработаны четкие генетические критерии для разделения пшениц, в том числе мягкой пшеницы, на экологические типы.

В настоящее время разработаны новые подходы для успешного решения этой проблемы. В молекулярной биологии предложен целый ряд различных методологий для быстрого и эффективного анализа полиморфизма растений на уровне ДНК и показаны возможности использования RFLP-, RAPD-, AFLP- и микросателлитных маркеров для идентификации сортов и оценки степени генетической дифференциации мягкой пшеницы [7, 12, 15, 18, 19, 21 – 23, 25, 28, 30, 33]. Кроме того, появились доступные компьютерные программы для классификации больших выборок объектов с использованием различных методов многомерной статистики.

В нашей работе впервые с использованием современных методов изучены генетические различия местных и стародавних селекционных сортов мягкой пшеницы с учетом всего их эколого-географического разнообразия. При формировании репрезентативной выборки сортов, отражающей исторически сложившуюся генетическую дифференциацию этой культуры, мы придерживались классификации, разработанной Н. И. Вавиловым [3]. Она охватывает все мировое разнообразие пшениц и, на наш взгляд, является наиболее полной в плане характеристики агро-экологических особенностей местных и стародавних селекционных сортов и их географического распространения. Согласно данной классификации сорта объединяются в агро-экологические группы, а те, в свою очередь, — в более

крупные образования, которым присвоены ранги подвидов. В целом многообразие мягкой пшеницы (по Н. И. Вавилову, *T. vulgare* Host) представлено 39 агро-экологическими группами, входящими в состав следующих пяти подвидов: ирано-туркестанского (subsp. *irano-turkestanicum* Vav.), индийского (subsp. *indicum* Vav.), китайского (subsp. *sinicum* Vav.), евразийского (subsp. *eurasiaticum* Vav.) и абиссинского (subsp. *abys-sinicum* Vav.). В данной статье речь пойдет только о результатах изучения сортов евразийского подвида мягкой пшеницы.

По Н. И. Вавилову [3], пшеницы евразийского подвида наиболее распространены на земном шаре, приурочены к умеренному климату и характеризуются огромной амплитудой наследственной изменчивости по морфологическим и физиологическим признакам, которая свидетельствует о высокой пластичности подвида, содержащего 19 агро-экологических групп. Сорта, относящиеся к различным агро-экологическим группам, отличаются друг от друга по целому комплексу биологических, морфологических и хозяйственных признаков. До 40-х гг. прошлого столетия сорта евразийского подвида широко возделывались и использовались в селекции. Некоторые из них послужили исходным материалом для создания многих ценных сортов мягкой пшеницы в мире, однако генофонд местных сортов, на наш взгляд, остался недостаточно изученным и использованным.

Главная цель настоящей работы — с помощью RAPD-маркеров охарактеризовать полиморфизм репрезентативной выборки местных и стародавних селекционных сортов евразийского подвида мягкой пшеницы и выяснить закономерности его проявления в связи с общностью географического происхождения сортов и принадлежностью их к определенным агро-экологическим группам.

Для этого были поставлены следующие задачи:

1) На основе мировой коллекции ВИР сформировать репрезентативную выборку местных и стародавних селекционных сортов, наиболее полно отражающую описанное эколого-географическое разнообразие сортов евразийского подвида мягкой пшеницы.

2) Путем скрининга из коммерческих наборов случайных праймеров отобрать из них те, которые выявляют различия между сортами пшеницы.

3) На основе анализа RAPD-спектров с использованием различных методов многомерной статистики охарактеризовать сорта евразийского подвида мягкой пшеницы, выделить среди них генетически сходные сорта и сравнить возможности статистических методов для классификации изученной выборки пшениц.

4) Установить соответствие между выявленными группами генетически сходных сортов, географическим происхождением сортов и принадлежностью их к определенному экологическому типу.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали 148 местных и стародавних селекционных сортов яровой и озимой мягкой пшеницы, при-

надлежащих евразийскому подвиду (табл. 1). Входящие в их число селекционные сорта были получены преимущественно отбором из местных сортов или гибридизацией между ними. При формировании репрезентативной выборки сортов в нее включали сорта, которые были перечислены в работе Н. И. Вавилова [3], а также другие местные сорта, поступившие в коллекцию ВИР преимущественно в период с 1908 по 1940 гг., географическое происхождение которых совпадало с регионами возделывания сортов определенных агро-экологических групп, описанных Н. И. Вавиловым. Отобранные сорта представляли все 19 агро-экологических групп евразийского подвида мягкой пшеницы. Названия групп и количество сортов в каждой из них приведены в табл. 2.

Для выделения ДНК использовали 15–25 двух-трехнедельных проростков каждого сорта пшеницы. ДНК для RAPD-анализа выделяли микрометодом из лиофилизированного материала с использованием бромистого гексадецилтриметиламмония [24]. Концентрацию ДНК определяли на спектрофотометре 7400 фирмы Beckman. Смеси для полимеразной цепной реакции (ПЦР) готовили с использованием наборов для амплификации фирмы Wako, Япония. В расчете на 10 мкл конечного объема они содержали: 10 мМ Tris-HCl, pH 8,3; 50 мМ KCl, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>; 0,2 мМ каждого из dATФ, dCTФ, dGTФ и dTTФ; 1 мМ праймер; 40 нг ДНК пшеницы и 0,3 единицы ДНК-полимеразы Gene Taq. ПЦР проводили в 96-луночных микропланшетах в термоциклере Perkin Elmer 9600 в течение 45 циклов (94°C — 30 с, 42°C — 30 с, 72°C — 1 мин). После добавления 3 мкл красителя, содержащего 0,1 % бромфенолового синего; 0,1 % ксиленианола FF и 15 % фикола, по 10 мкл смеси наносили в пластины 2 % агарозного геля. Гели были 24 см длиной, 12 см шириной и имели четыре ряда лунок (по 26 в каждом ряду). В качестве стандартов для определения размеров амплифицированных фрагментов ДНК использовали набор фрагментов ДНК, отличающихся друг от друга на 100 п.н. (GibcoBRL, США). Совместно с продуктами амплификации их разделяли электрофорезом в ячейке Sunrise фирмы GibcoBRL с использованием трис-боратного буфера при 5 в/см в течение 1,5 ч до прохождения красителя (бромфенолового синего) от старта примерно на 5 см. После окрашивания бромистым этидием гели документировали в системе регистрации изображений UV FA 1100 фирмы AL-C (Япония).

Обработку RAPD-спектров проводили следующим образом. Сначала каждому компоненту в спектре присваивали соответствующий порядковый номер. Затем присутствие или отсутствие компонента в спектре кодировали соответственно цифрами 1 или 0. В конечную матрицу данных включали только полиморфные и воспроизводимые в ряде опытов компоненты. Дальнейшую обработку результатов проводили тремя независимыми методами многомерной статистики, такими как анализ главных компонент (АГК), кластерный анализ (КА) и канонический дискриминантный анализ

**Таблица 1.** Список сортов свразийского подвида мягкой пшеницы и их принадлежность к генетическим группам, выявленным по результатам обработки данных RAPD-анализа методом главных компонент

№ п/п	№ по каталогу ВИР	Название сорта	Страна происхождения, регион	Агро-экологическая группа <sup>1</sup>	Факторные нагрузки	Классификатор по Ворду	Тип раз- вития <sup>2</sup>
<b>Группа I</b>							
1	3686	Comeback	Австралия	15	0,52	Б	1
2	3704	Florence	—	15	0,49	А	1
3	38574	Gabo	—	15	0,49	Б	1
4	35653	Bencubbin	—	15	0,43	Б	1
5	41778	Barleta Benvenuto	Аргентина	16	0,62	Б	1
6	29769	San Martin	—	16	0,47	А	1
7	13703	Местный	Армения	2	0,56	Б	1
8	35803	Галгалос	—	2	0,56	Б	1
9	34576	Местный	—	2	0,53	Б	1
10	46317	—	—	2	0,52	Б	1
11	457	Банатка поздняя	Белоруссия	6	0,63	Б	5
12	10912	Банатка	Венгрия	6	0,66	Б	5
13	31235	Heines Kolben	Германия	13	0,69	Б	1
14	21693	Kokki-postaro	Греция	17	0,45	Б	1
15	35921	Долис Пури	Грузия	3	0,59	Б	5
16	35922	—	—	3	0,57	Б	5
17	18340	Candeal	Испания	11	0,54	Б	1
18	18513	Rieti (Razza 11)	Италия	17	0,50	А	5
19	42747	Novaro	—	10	0,47	Б	5
20	22132	Red Bobs	Канада	14	0,71	Б	1
21	15594	Prelude	—	14	0,70	Б	1
22	29609	Reward	—	14	0,55	Б	1
23	3902	Красная	—	6	0,52	Б	5
24	41002	Банатка	Молдова	6	0,79	Б	5
25	9701	Sandomirka	Польша	8	0,84	Б	5
26	9815	—	—	8	0,80	Б	5
27	14977	—	—	8	0,69	Б	5
28	26550	Banatka	—	6	0,67	Б	5
29	9463	Sandomirka	—	8	0,65	Б	5
30	26582	Banatka Daleszowska	—	6	0,57	А	5
31	22418	Сандомирка	Россия, Орловская	8	0,85	Б	5
32	31919	ДС 2444/2	Россия, Ленинградская	6	0,82	Б	5
33	36515	Местный	Россия, Костромская	8	0,80	Б	5
34	10245	Гостианум 237	Россия, Саратовская	6	0,76	Б	5
35	9204	Банатка	Россия, Краснодарский	6	0,76	Б	5
36	2167	—	Россия, Тверская	6	0,72	Б	5
37	40182	Гюльгери	Россия, Дагестан	3	0,71	Б	5

Продолжение табл. 1

№ п/п	№ по каталогу ВИР	Название сорта	Страна происхождения, регион	Агро-экологическая группа <sup>1</sup>	Факторные нагрузки	Классификатор по Ворду	Тип раз- вития <sup>2</sup>
38	8518	Московская 2411	Россия, Московская	6	0,68	Б	5
39	23922	Сары-бугда	Россия, Дагестан	5	0,66	Б	5
40	15188	Лютесценс 479	Россия, Омская	7	0,65	А	1
41	37481	Сандомирка	Россия, Ярославская	8	0,62	А	5
42	6234	Лютесценс 329	Россия, Саратовская	8	0,55	А	5
43	40001	Местный	Россия, Осетия	4	0,52	А	1
44	6176	Turkey Red	США	6	0,75	Б	5
45	5294	Minhardi	—	6	0,69	Б	5
46	43072	Iohardi	—	6	0,66	Б	5
47	5907	Hussar	—	8	0,66	Б	5
48	21923	Местный	Турция	2	0,59	Б	9
49	21932	—	—	2	0,55	Б	9
50	14562	—	—	1	0,51	В	1
51	14590	—	—	1	0,49	В	1
52	16018	—	—	1	0,48	Б	1
53	14381	—	—	1	0,43	В	1
54	29924	Ферругенеум 1239	Украина	6	0,85	Б	5
55	35736	Сандомирка	—	8	0,80	Б	5
56	21841	Степячка	—	6	0,77	Б	5
57	10107	Банатка	—	6	0,77	Б	5
58	10359	Земка	—	6	0,75	Б	5
59	11389	Кооператорка	—	6	0,66	Б	5
60	2606	Крымка	—	6	0,62	Б	5
61	9834	Банатка	—	6	0,60	Б	5
62	6025	Japhet	Франция	13	0,59	Б	1
63	25115	Wagenburger	Швейцария	12	0,78	Б	1
64	25064	Rouge de Vaumarcus	—	12	0,66	Б	5
65	25085	Croisement 268	—	12	0,54	А	5
66	24681	Plantahof	—	12	0,54	Б	5
67	25071	Rouge de la Venoge	—	12	0,44	А	5
68	5188	Sammetweizen	Швеция	13	0,76	Б	5
69	38481	Virtus	—	19	0,60	А	5
70	14179	Sammetweizen	—	13	0,47	А	5
71	39008	Банатка	Югославия	6	0,68	Б	5
<b>Группа II</b>							
72	43827	Бол-бугда	Азербайджан	5	0,50	А	5
73	15306	Сары-бугда	—	5	0,48	А	5
74	15705	Местный	Армения	2	0,62	А	1
75	13694	—	—	2	0,45	А	1

Продолжение табл. 1

№ п/п	№ по каталогу ВИР	Название сорта	Страна происхождения, регион	Агро-экологическая группа <sup>1</sup>	Факторные нагрузки	Классификатор по Борду	Тип разветвления <sup>2</sup>
76	6260	Blausamli-ger Kolben	Германия	13	0,49	A	5
77	40297	San Giorgio	Италия	17	0,40	A	3
78	6161	Fife	Канада	14	0,52	A	1
79	8092	Kitchener	—	14	0,51	A	1
80	29394	Red Fife	—	14	0,39	A	1
81	25162	Wilhelmina	Нидерланды	13	0,63	A	5
82	25151	Mansholt Witte Dickkopf III	—	13	0,56	A	5
83	21817	Mocho de Espiga Branca	Португалия	11	0,48	A	1
84	20691	Amarelo de Barba Branca	—	11	0,48	A	1
85	23348	Местный	Россия, Бурятия	9	0,78	A	1
86	22236	Мильтурум 321	Россия, Омская	7	0,69	A	1
87	15183	Лютесценс 62	Россия, Саратовская	7	0,68	A	1
88	30932	Тулунка	Россия, Иркутская	9	0,61	A	1
89	28310	Саррубра	Россия, Саратовская	7	0,60	A	1
90	622	Сандомирка	Россия, Орловская	8	0,54	A	5
91	10255	Альбидум 604	Россия, Саратовская	7	0,47	A	1
92	14920	Ceres	США	7	0,60	A	1
93	5226	Reliable	—	6	0,58	A	5
94	5813	Harvest Queen	—	8	0,49	A	5
95	14524	Местный	Турция	1	0,51	A	1
96	1906	Полтавка	Украина	7	0,79	A	1
97	10968	—	—	7	0,72	A	1
98	8547	Украинка	—	6	0,63	A	5
99	10174	Дюрэбль	—	6	0,57	A	5
100	9828	Полтавка	—	7	0,48	A	1
101	40074	Vilmorin 29	Франция	18	0,54	A	3
102	25091	Bourgeois	Швейцария	12	0,57	A	1
103	31723	Thule 2	Швеция	19	0,57	A	5
104	25019	Diamant	—	13	0,50	A	1
<b>Группа III</b>							
105	34178	Бугда	Азербайджан	5	0,62	B	5
106	15330	Сары-бугда	—	5	0,60	B	5
107	9296	—	—	5	0,42	B	3
108	27878	Дика	Грузия	3	0,64	B	5
109	32559	Местный	—	3	0,49	B	5
110	32524	—	—	4	0,49	B	1
111	39794	Мулах	—	4	0,42	B	1
112	21216	Местный	Италия	10	0,57	B	9

Продолжение табл. 1

№ п/п	№ по каталогу ВИР	Название сорта	Страна происхождения, регион	Агро-экологическая группа <sup>1</sup>	Факторные нагрузки	Классификатор по Борду	Тип разветвления <sup>2</sup>
113	23924	Гюльгери	Россия, Дагестан	3	0,78	B	5
114	32467	Местный	То же	4	0,74	B	1
115	23900	Сары-бугда, Гюльгери	—	5	0,68	B	5
116	41161	Тау-бугда	—	5	0,65	B	5
117	37379	Гюльгери	—	3	0,64	B	3
118	32499	Местный	—	4	0,63	B	1
119	23903	Гюльгери	—	3	0,62	B	5
120	26897	Линия 5407	—	4	0,61	B	1
121	26926	Линия 221	—	4	0,53	B	1
122	40003	Местный	Россия, Осетия	4	0,46	B	1
123	14507	—	Турция	1	0,69	B	1
124	14597	—	—	1	0,50	B	1
125	46283	Местный	Грузия	4	0,55	B	1
<b>Минорные группы IV – XV<sup>3</sup></b>							
126	41722	Virgilio	Италия	10	0,47	B	5
127	21479	Vilmorin 27	Франция	18	0,66	B	5
128	41571	Cappelle-Desprez	—	18	0,66	B	5
129	41574	Vilmorin 53	—	18	0,48	B	5
130	39511	Местный	Албания	17	0,52	B	1
131	16167	Mahon	Алжир	11	0,39	A	1
132	16430	Местный	Марокко	11	0,73	B	1
133	18941	Belem	Португалия	11	0,47	B	1
134	7108	Manitoba	Канада	14	0,55	A	1
135	5026	Marquis	—	14	0,52	A	1
136	16558	Medeheba 226	Тунис	11	0,49	B	1
137	11009	Махмуди Белокоска	Алжир	11	0,65	B	1
138	40072	Square-head's Master B/4	Англия	13	0,34	A	5
139	33344	Chiddam d'Automne Aeri Blanc	Франция	18	0,63	A	5
140	38162	Местный	Грузия	4	0,74	B	1
141	42517	—	Монголия	9	0,72	B	1
142	43060	Diana	Швеция	19	0,49	A	5
143	11856	Местный	Армения	2	0,55	B	1
144	7954	—	Монголия	9	0,54	B	1
145	38312	—	Россия, Бурятия	9	0,64	B	1
146	2718	Sandomirka	Польша	8	0,56	A	5
147	38398	Долис Пури 35-4	Грузия	3	0,50	B	5
148	14388	Местный	Турция	1	0,47	B	1

<sup>1</sup> Порядковый номер группы соответствует номеру агро-экологической группы, который приведен в табл. 2.

<sup>2</sup> 1 — яровой, 3 — полуозимый, 5 — озимый, 9 — двуручка.

<sup>3</sup> IV — №№ 125 – 129, V — №№ 130 – 133, VI — №№ 134 – 136, VII — № 137, VIII — №№ 138 – 139, IX – XII — соответственно №№ 140 – 143, XIII — №№ 144 – 145, XIV — № 146 и XV — №№ 147 – 148.

**Таблица 2.** Распределение 148 сортов евразийского подвида мягкой пшеницы, принадлежащих различным агро-экологическим группам, по генетическим группам, выявленным при обработке данных RAPD-анализа методом главных компонент

№ п/п	Агро-экологическая группа (proles)	Генетические группы				Всего сортов
		I	II	III	другие	
1	Внутреннеанатолийская ( <i>anatolicum</i> )	4 (3 <sub>5</sub> )*	1	2	1	8
2	Армянская ксерофильная ( <i>armeno-xerophytum</i> )	6 (4 <sub>2</sub> )	2	-	1	9
3	Озимая горная кавказская ( <i>hiemale-montano-caucasicum</i> )	3	-	5 (4 <sub>4</sub> )	1	9
4	Яровая горная кавказская ( <i>estivo-montano-caucasicum</i> )	1	-	7 (4 <sub>1</sub> )	2	10
5	Предгорная азербайджано-дагестанская ( <i>caspicum</i> )	1	2	5 (3 <sub>5</sub> )	-	8
6	Степная озимая ( <i>hiemale-stepposum</i> )	22 (9 <sub>6</sub> +6 <sub>1</sub> )	3	-	-	25
7	Степная яровая ( <i>aestivo-stepposum</i> )	1	8 (5 <sub>2</sub> )	-	-	9
8	Северо-европейская лесная безостая ( <i>hiemale-boreale</i> )	10 (9 <sub>1</sub> )	2	-	1	13
9	Восточносибирская ( <i>orientale-sibiricum</i> )	-	2	-	3	5
10	Южноевропейская крупно-зерная ( <i>meridionale-europaeum</i> )	1	-	1	1	3
11	Внутренняя испанская ( <i>ibericum</i> )	1	2	-	5	8
12	Альпийская ( <i>alpinum</i> )	5 (4 <sub>9</sub> )	1	-	-	6
13	Западноевропейская ( <i>occidentale-europaeum</i> )	4	4	-	1	9
14	Канадская гибридная ( <i>hybrido-kanadense</i> )	3	3	-	2	8
15	Австралийская гибридная ( <i>hybrido-australiense</i> )	4 (4 <sub>4</sub> )	-	-	-	4
16	Южноамериканская гибридная ( <i>hybrido-argentinum</i> )	2	-	-	-	2
17	Итальянская гибридная ( <i>hybrido-italicum</i> )	2	1	-	1	4
18	Вильмореновские гибриды ( <i>Vilmorenianum</i> )	-	1	-	4	5
19	Гибриды банаток и западноевропейских скверхедов ( <i>hybrido-stepposum</i> )	1	1	-	1	3
<b>ВСЕГО СОРТОВ</b>		<b>71</b>	<b>33</b>	<b>20</b>	<b>24</b>	<b>148</b>

\* В скобках приведено количество сортов в подгруппах соответствующей группы. Нижний индекс — номер подгруппы.

(КДА). Статистическую обработку осуществляли в пакетах программ STATISTICA 5.5 A [29] и SYSTAT 8.0 [27].

АГК был применен как метод прямой классификации (Q-техника) изученных сортов по данным RAPD-анализа. Вычисление величин факторных нагрузок для всех сортов по каждой из выявленных главных компонент проводили на транспонированной (обращенной на 90°) матрице исходных данных. Выделенные в ана-

лизе главные компоненты (при заданном пороговом значении *euginevalue*  $\geq 1,0$ ) рассматривались нами как группы, а решение о принадлежности сорта к той или иной группе принималось по максимальной величине факторной нагрузки на соответствующую главную компоненту.

Для КА на основе исходной матрицы данных рассчитывали матрицу коэффициентов сходства сортов по Нею и Ли [20], обработку которой проводили методом UPGMA, предложенным Снитом и Сокзлом [26], и методом Ворда [32], который в отличие от UPGMA-метода не просто оперирует с матрицей коэффициентов, а учитывает дисперсию величин расстояний на каждом шаге объединения кластеров.

КДА был использован для решения двух задач: во-первых, для определения качества классификаций, полученных по результатам АГК и КА, которое оценивали по проценту верных решений о принадлежности сорта к той или иной группе на основе выведенных классификационных функций, и, во-вторых, для выявления комбинаций праймер-фрагментов ДНК, которые наилучшим образом дифференцируют изученную выборку сортов. Анализ проводили, используя прямой пошаговый метод с оценкой результатов классификации (процента верных решений) на каждом шаге построения классификационных функций. В итоге для каждой из основных групп сортов были рассчитаны классификационные функции, по максимальной величине которых другие сорта евразийского подвида мягкой пшеницы могут быть отнесены к той или иной генетической группе [17].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Характеристика системы RAPD-маркеров.** Для первичного скрининга с четырьмя сортами пшеницы были использованы 708 произвольных 10- и 12-членных олигонуклеотидных праймеров из коммерческих наборов фирм Operon Technology Inc. (OP-X), University of British Columbia (UBC) и Wako (E-W). Большинство из проанализированных праймеров (77,1 % от их общего числа) инициировало синтез фрагментов ДНК, которые при электрофоретическом разделении давали непалиморфные или чрезмерно многокомпонентные и сливающиеся RAPD-спектры. При использовании 73 праймеров (10,3 %) не было выявлено продуктов амплификации. Четкие электрофоретические спектры с относительно небольшим числом полиморфных компонент были получены с использованием небольшого числа праймеров (12,6 %). Из них только 28 праймеров (4,0 %) стабильно воспроизводили RAPD-спектры тестируемых сортов пшеницы в ряде опытов. Именно они были применены в дальнейшем анализе 148 сортов евразийского подвида мягкой пшеницы (табл. 3). Эти праймеры, по-видимому, маркировали участки генома пшеницы, содержащие малокопийные и быстро эволюционирующие последовательности ДНК.

Анализ продуктов ПЦР 148 сортов евразийской пшеницы показал, что каждый из праймеров инициировал синтез от 1 до 11 фрагментов ДНК размером от

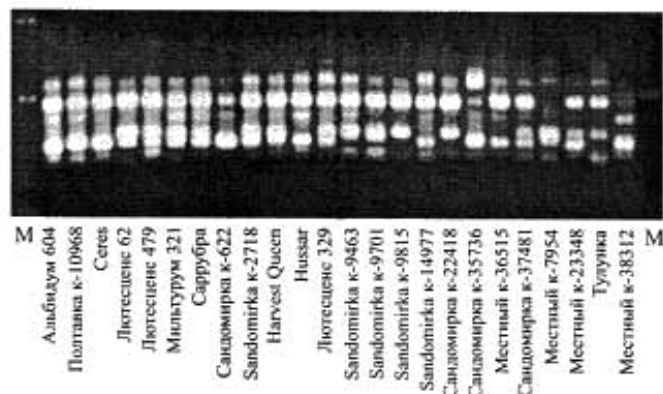
**Таблица 3.** Характеристика отобранных для анализа праймеров и синтезированных с их использованием фрагментов ДНК

№ п/п	Название праймера	Последовательность	Число полиморфных фрагментов ДНК	Фрагменты ДНК, вошедшие в модель КДА, п.н.
1	OP-A6	GGTCCCTGAC	5	1000, 480
2	OP-A16	AGCCAGCGAA	11	400
3	OP-A19	CAAACGTCGG	4	250
4	OP-A20	GTTGCGATCC	3	350
5	OP-B13	TTCCCCCGCT	7	750
6	OP-D12	CACCGTATCC	5	250, 200
7	OP-F19	CCTCTAGACC	9	400, 130
8	OP-E12	TTATCGCCCC	2	330
9	OP-M9	GTCTTGCGGA	3	500
10	OP-M11	GTCCACTGTG	4	230
11	OP-O1	GGCACGTAAG	7	300
12	OP-P3	CTGATACGCC	1	
13	OP-P4	GTGTCTCAGG	4	
14	OP-P10	TCCCGCCTAC	5	550
15	OP-T17	CCAACGTCGT	3	450
16	OP-U8	GGCGAAGGTT	2	400
17	OP-V6	ACGCCAGGT	4	
18	OP-V9	TGTACCCGTC	9	850, 650
19	OP-Z11	CTCAGTCGCA	1	
20	OP-AA8	TCCGCAGTAG	6	400, 350
21	OP-AB5	CCCGAAGCGA	5	
22	OP-AD15	TTTGCCCCGT	3	
23	OP-AF16	TCCCGGTGAG	1	350
24	UBC386	TGTAAGCTCG	9	420, 330, 280
25	UBC535	CCACCAACAG	6	420, 240
26	UBC580	GCGATAGTCC	2	
27	E-W5	AAGATCTTACTG	2	
28	E-W29	GTTATGCAAGGG	2	300, 240

130 до 1000 п.н. На рис. 1 приведены спектры продуктов амплификации, полученные для 24 сортов с использованием праймера E-W5.

В общей сложности в матрицу данных для 148 сортов пшеницы были включены 125 полиморфных компонентов RAPD-спектров (амплифицированных фрагментов ДНК), полученных с участием 28 праймеров. В среднем на каждый праймер было получено 4,5 полиморфных компонента. Анализ RAPD-спектров выявил, что каждый сорт мягкой пшеницы был уникальным по составу компонентов.

**Анализ главных компонентов.** По результатам АГК вся исследованная совокупность сортов по степени сходства RAPD-спектров разделилась на 15 групп, соответствующих 15 значимым ГК (табл. 1). Эти группы генетически сходных сортов далее в работе для краткости обозначены как генетические группы. Из них три группы, состоящие из 71, 33 и 20 сортов, были отнесены к основным. Остальные группы содержали от одного до пяти сортов и были условно названы минорными группами. На рис. 2 на двухмерных плотах показано распределение всех изученных сортов пшеницы в пространстве первых шести главных компонентов



**Рис. 1.** Электрофоретические спектры продуктов амплификации ДНК 24 сортов евразийского подвида мягкой пшеницы. Продукты получены с использованием праймера E-W5. М — маркеры ДНК

(компоненты 1 – 6). Границы полей каждой группы условно обозначены кривыми замкнутыми линиями. Как видно, выявленные группы занимают на графиках не перекрывающиеся между собой поля. Рис. 2 иллюстрирует высокую разрешающую способность АГК для дифференциации изученной выборки сортов и показывает взаиморасположение сортов в пространстве.

Информация о составе выявленных генетических групп и происхождении сортов содержится в табл. 1. В табл. 2 показано распределение сортов, представляющих различные агро-экологические группы, по выявленным генетическим группам. Данные, представленные в этих таблицах, характеризуют генетические группы следующим образом.

Наиболее многочисленная группа I содержала 71 сорт. В нее входили сорта почти всех агро-экологических групп. В количественном отношении в группе I преобладали сорта из России, Украины, Польши, Армении, Турции и Швейцарии. Основу группы сформировали местные озимые пшеницы, известные под названием Банатка (табл. 1, №№ 11, 12, 24, 28, 30, 35, 36, 57, 61, 71) и Сандомирка (№№ 25 – 27, 29, 31, 41, 55), а также другие сорта, отнесенные Н. И. Вавиловым [3] к степным озимым (№№ 23, 32, 34, 38, 44 – 46, 54, 56, 58 – 60, *proles hiemale-stepposum*) и северо-европейским лесным (№№ 33, 42, 47, *proles hiemale-boreale*) мягким пшеницам, т.е. к тем же агро-экологическим группам, которым принадлежали названные выше сорта. В сумме они составили 45,1 % от всех сортов группы I. В эту же группу вошли местные сорта, принадлежащие армянской ксерофильной (№№ 7 – 10, 48, 49, *proles armeno-xerophytum*) и альпийской (№№ 63 – 67, *proles alpinum*) группам, а также часть гибридных сортов Канады (№№ 20 – 22, *proles hybrido-kanadense*) и все изученные сорта Австралии (№№ 1 – 4, *proles hybrido-australiense*). Таким образом, в выявленной по RAPD-маркерам группе I, объединились сорта, принадлежащие разным агро-экологическим группам, хотя в количественном отношении в ней преобладают степные озимые и северо-европейские лесные мягкие пшеницы.

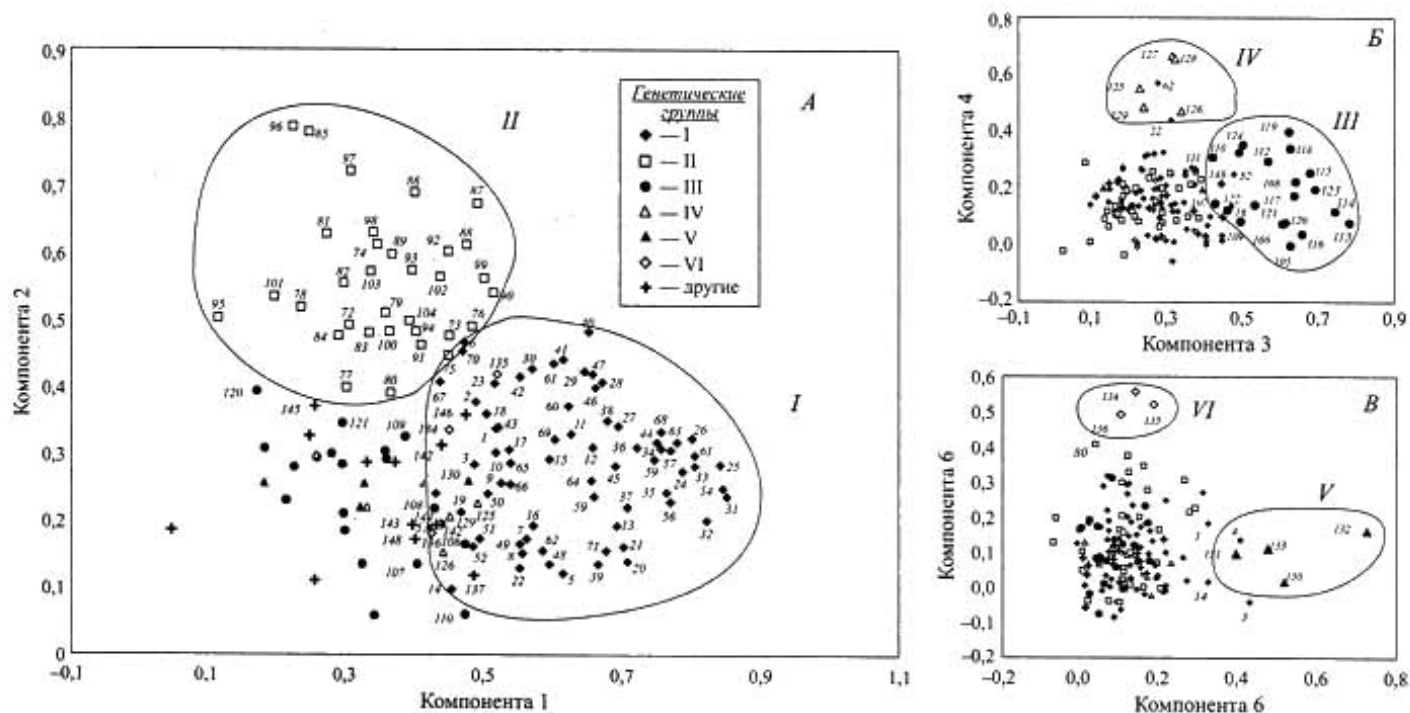


Рис. 2. Распределение 148 сортов евразийского подвида мягкой пшеницы в пространствах: А — 1 и 2, Б — 3 и 4, В — 5 и 6 компонентом. Данные RAPD-анализа обработаны методом главных компонент

Группа II была не столь многочисленна и содержала 33 сорта. Ее основу образовали сорта из России, Украины, Западной Европы и Канады. Одна треть сортов относилась к степной яровой (№№ 86, 87, 89, 91, 92, 96, 97, 100, *proles aestivo-stepposum*) и западноевропейской (№№ 76, 81, 82, 104, *proles occidentale-euro-raeum*) агро-экологическим группам мягкой пшеницы. В их число входили местные сорта под названием Полтавка (№№ 96, 97, 100), а также сорта, полученные в результате отбора из него (№№ 87, 91) или гибридизацией с ними (№ 89). Остальные сорта группы II представляли разные агро-экологические группы.

Группа III включала 20 сортов из России (Дагестана), Грузии, Азербайджана и Турции и состояла в основном из местных сортов озимой (№№ 108, 109, 113, 117, 119, *proles hiemale-montano-caucasicum*) и яровой (№№ 110, 111, 114, 118, 120 – 122, *proles estivo-montano-caucasicum*) горных кавказских групп, а также предгорной азербайджано-дагестанской группы (№№ 105 – 107, 115, 116, *proles caspicum*). Среди них местные сорта Гюльгери, Дика и Сары-бутда.

Группы IV – XV были минорными. Группа IV, содержащая пять сортов (№№ 125 – 129), включала три вильмореновских гибрида (*proles Vilmorenianum*), а группа V, которая была представлена четырьмя сортами (№№ 130 – 133), — три сорта, относящихся к внутренней испанской агро-экологической группе (*proles ibericum*).

Созданная на основе АГК классификация, представленная 15 группами, охватывала 78,6% суммарной изменчивости образцов по компонентному составу RAPD-спектров.

Учитывая неслучайный характер распределения сортов, представляющих разные агро-экологические

группы, по выявленным генетическим группам I – III, мы провели изучение RAPD-спектров сортов каждой из этих групп методом ГК. Результаты анализа показали, что в каждой группе сорта объединились в подгруппы (в табл. 2 они указаны в скобках), из которых наиболее представительные содержали от 5 до 22 сортов. В подгруппах преобладали, как правило, сорта, относящиеся к одной или двум агро-экологическим группам. Так, в группе I было выявлено десять подгрупп. Из них подгруппы 2, 4, 5 и 9 содержали в основном сорта армянской ксерофильной, австралийской гибридной, внутренней анатолийской и альпийской агро-экологических групп соответственно (табл. 2). Самостоятельную подгруппу 6 образовали девять сортов степной озимой группы. Другие шесть сортов этой группы объединились в подгруппе 1 с девятью сортами северо-европейских лесных пшениц. Таким образом, сорта типа Банаток оказались генетически неоднородными, при этом часть из них показала более тесное родство с пшеницами типа Сандомирск.

В группе II выделились пять подгрупп, из которых подгруппа 2 объединила степные яровые пшеницы. Группа III также разделилась на пять подгрупп. Среди них были идентифицированы подгруппы 1, 4 и 5, включающие сорта озимой и яровой горных кавказских и предгорной азербайджано-дагестанской групп, соответственно. Таким образом, внутри выявленных групп I-III четко прослеживалась тенденция объединения сортов в соответствии с их принадлежностью к определенным агро-экологическим группам.

**Кластерный анализ.** При анализе матрицы коэффициентов сходства, учитывающей все возможные пары сравнений для 148 сортов, было выявлено, что диапазон варьирования коэффициентов находился в преде-

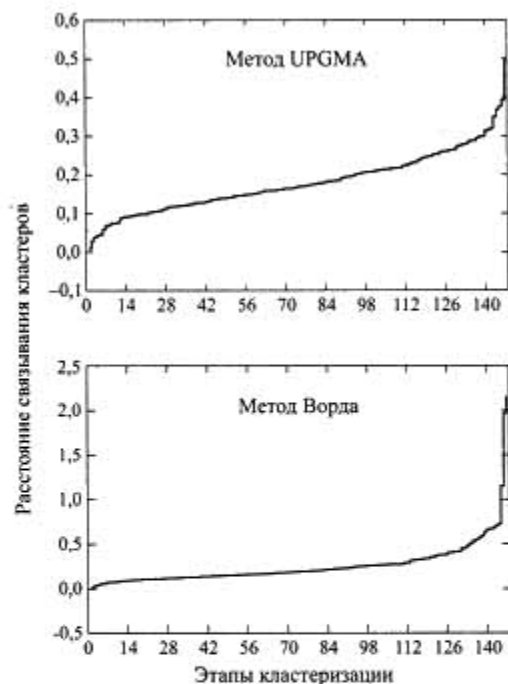


Рис. 3. Зависимость величины расстояния связывания кластеров от числа этапов кластеризации 148 сортов евразийского подвида мягкой пшеницы при использовании алгоритмов UPGMA и Ворда. В обоих случаях кластеризация проведена на основе матрицы коэффициентов по Нею и Ли, рассчитанных по данным RAPD-анализа

лах от 0,405 (между местным сортом к-38162 из Грузии и сортами Heines Kolben из Германии или Squarehead's Master B/4 из Англии) до 0,990 (между местными сортами Сандомирка к-36515 и к-35736, соответственно, из России и Украины).

В КА была обнаружена сложная структура взаимосвязей между сортами, однако характер взаиморасположения сортов и распределение отдельных кластеров на фенограммах, полученных с использованием двух разных алгоритмов кластеризации (UPGMA и Ворда), существенно различались.

При анализе графов слияния кластеров (увеличения величины расстояния связывания кластеров по мере возрастания числа этапов кластеризации) было показано, что расстояние связывания при использовании алгоритма UPGMA нарастает плавно, без резких перегибов кривой до величины 0,3 на 144-м шаге кластеризации, а при использовании алгоритма Ворда — до величины 0,8 на 145-м шаге (рис. 3). Затем в обоих случаях расстояние объединения кластеров резко возрастает, однако при использовании алгоритма UPGMA нарастание происходит на порядок медленнее, чем при использовании алгоритма Ворда. Графически это проявляется в том, что кластерная структура фенограммы, полученной с помощью UPGMA-метода, выражена слабо. Значительная часть сортов объединяется в кластеры при расстоянии, меньшем чем 0,3 (рис. 4). Сама фенограмма сложна для интерпретации, а низкий уровень различий расстояний связывания предполагаемых кластеров свидетельствует о том, что вычленение большинства из них будет недостаточно корректным.

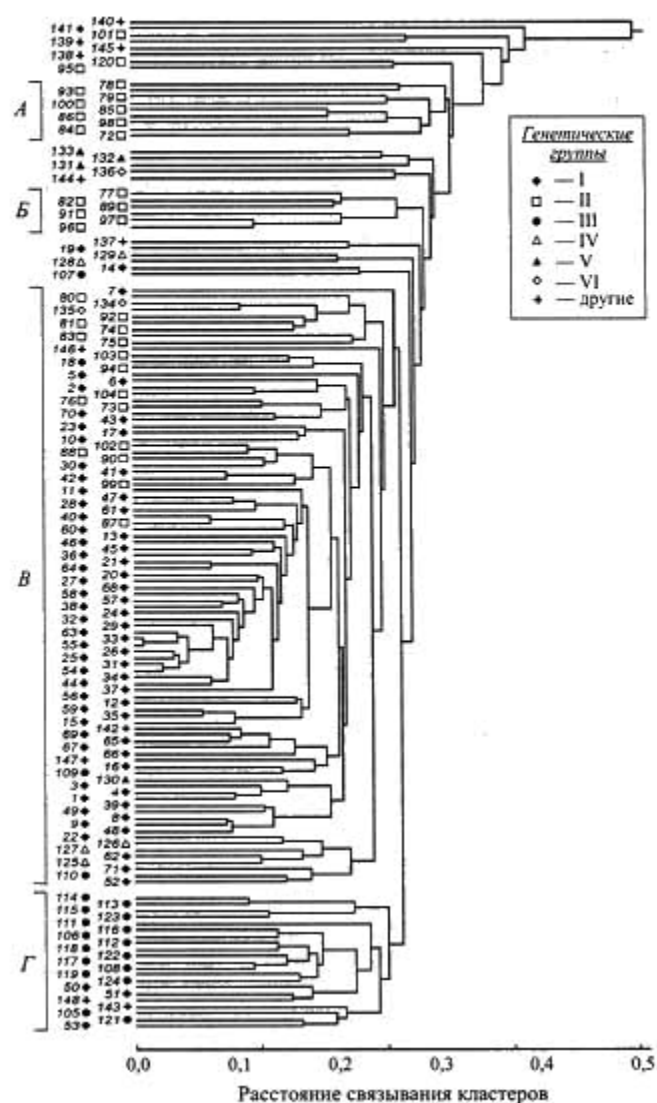


Рис. 4. Распределение 148 сортов евразийского подвида мягкой пшеницы на фенограмме, построенной по результатам кластерного анализа UPGMA-методом. Разными символами обозначена принадлежность сортов к генетическим группам, которые были выявлены методом главных компонент. А – Г — основные кластеры

Напротив, анализ фенограммы, полученной методом Ворда, показал, что все изученные сорта объединяются в четыре кластера при расстоянии их связывания, приблизительно равном 0,8 (рис. 5). При этом расстояние связывания отдельных кластеров было, по крайней мере, в 1,5 раза выше, чем расстояние связывания сортов в пределах каждого кластера.

Распределение на фенограмме, полученной методом UPGMA, сортов, принадлежащих к различным генетическим группам, приведено на рис. 4. Если образцы групп I и III объединились преимущественно в кластеры B и Г, соответственно, то образцы группы II более или менее равномерно распределились по трем предполагаемым кластерам — А, Б и В.

При КА методом Ворда наблюдали более высокую степень соответствия основных генетических групп, выявленных в АГК, кластерам на фенограмме (рис. 5). Если кластеры B1 и B2 принять за субкластеры едино-



го кластера *B*, то можно выделить три кластера: *A*, *B* и *B*, содержащие 52, 68 и 28 сортов, соответственно. Кластеры *A*, *B* и *B* по составу входящих в них сортов в основном совпали с выделенными АГК группами II, I и III, соответственно. Так, самый многочисленный кластер *B* был сформирован 68 сортами и разделился на два субкластера *B1* и *B2*. Субкластер *B1* содержал 32 сорта группы I. Субкластер *B2* включал 36 сортов. В это число вошли: 24 сорта группы I, все сорта группы IV и 7 сортов из групп III, V и VII. В соподчиненном к кластеру *B* положению находился кластер *B*. Он включал 17 из 20 сортов группы III и 11 сортов преимущественно из минорных групп. Из группы I в него вошли 3 местных сорта из Турции. Иерархически более дистанцированным по отношению к рассмотренным кластерам был кластер *A*. Он объединял все 33 сорта группы II, 12 сортов из группы I и 7 сортов из минорных групп. Следует отметить, что из 12 сортов группы I 3 сорта (№№ 6, 40, 70, табл. 1) и при АГК обнаруживали существенную связь с группой II. Сорта минорных групп не формировали самостоятельных кластеров, хотя некоторые из них — сорта групп IV – VI — имели тенденцию к объединению. Аналогичную тенденцию к совместной кластеризации проявляли также сорта, принадлежащие одной и той же агро-экологической группе.

Таким образом, сравнение фенограмм показало, что метод Ворда дает более четкую дифференциацию анализируемой выборки сортов. Полученная этим методом классификация сортов в большей степени соответствует их распределению, полученному в анализе ГК. Поэтому именно результаты КА по Ворду были использованы для оценки классификаций в КДА.

**Дискриминантный анализ.** Для оценки качества классификаций, полученных в АГК или КА по Ворду, а также определения компонентов RAPD-спектра (фрагментов амплифицированной ДНК), вносящих наиболее существенный вклад в выявление генетической дифференциации групп, нами был применен метод КДА. Построенные две модели КДА с включением, соответственно, 29 фрагментов ДНК для групп I – III, выявленных АГК, и 21 фрагмента ДНК для кластеров *A*, *B* и *B*, показали высокое качество обеих классификаций, т.е. высокий процент (100 и 96 % соответственно) верных решений в обеих моделях КДА. Этот факт повышает достоверность сделанного нами ранее вывода о том, что результаты АГК и КА по методу Ворда в значительной мере совпадают. Между классификациями, полученными двумя указанными методами, нет существенных противоречий, однако метод ГК оказался более корректным. Во-первых, он дифференцировал совокупность сортов с выделением минорных групп. Существование всех минорных групп с IV по XV было подтверждено КДА. Напротив, в КА сорта минорных групп не образовали самостоятельных кластеров, хотя, как отмечалось выше, сорта групп IV – VI и сорта, относящиеся к одной и той же агро-экологической группе, имели тенденцию к совместной кластеризации.

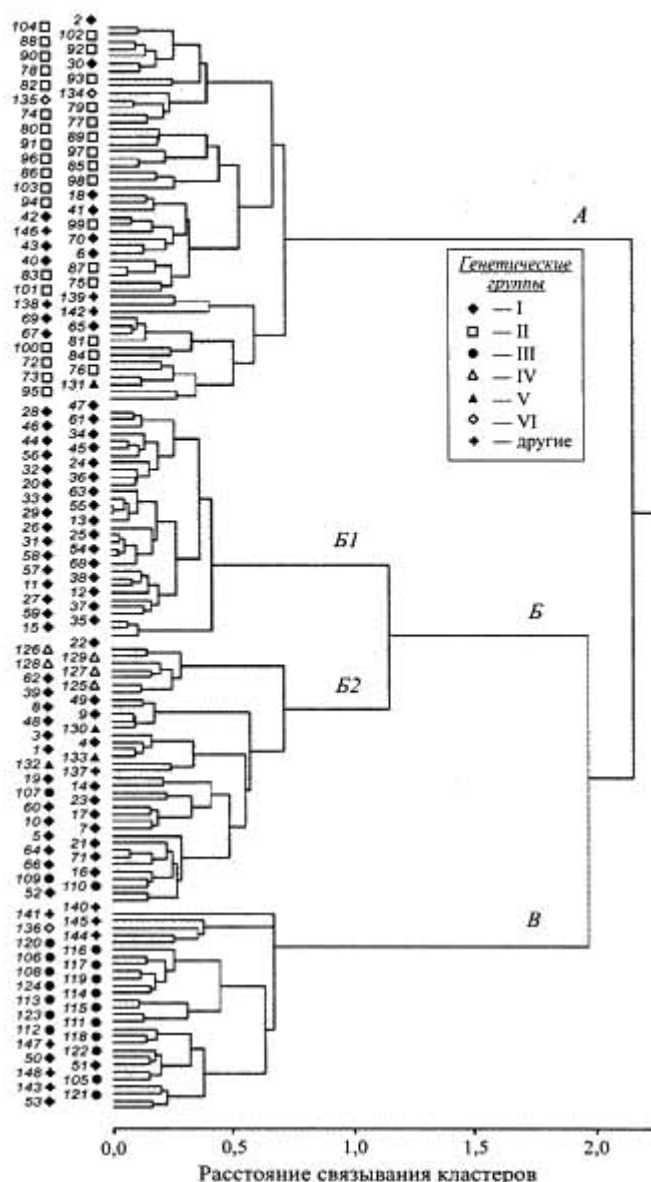


Рис. 5. Распределение 148 сортов евразийского подвида мягкой пшеницы на фенограмме, построенной по результатам кластерного анализа методом Ворда. Разными символами обозначена принадлежность сортов к генетическим группам, которые были выявлены методом главных компонент. *A* – *B* — кластеры

зации. Во-вторых, КА не точно классифицировал некоторые сорта основных групп.

Список фрагментов ДНК и их коэффициенты в классификационных функциях, выведенных для дискриминации групп I – III, выявленных АГК, показаны в табл. 4. При классификации сортов этих групп с использованием только 8 фрагментов ДНК средний процент верных решений в модели КДА по отношению к классификации, полученной АГК, был уже довольно высоким (94 %). По мере включения в модель других фрагментов ДНК уровень соответствия классификаций повышался вплоть до полного их совпадения, которое было выявлено при включении в модель 29 фрагментов. Другими словами, из всех 125 фрагментов ДНК было отобрано 29, которые оказались наиболее важными для классификации изученных сортов всех основных генетических групп. Они, в частности, обес-

Таблица 4. Фрагменты ДНК, вошедшие в модель КДА

№ п/п	Праймер/фрагмент ДНК, п.н.	Верные решения, %	Коэффициент классификационных функций генетических групп		
			I	II	III
1	OP-A6/1000		2,90	-8,91	-6,45
2	OP-AF16/350		-0,13	-1,35	-1,18
3	OP-A16/400		4,90	0,06	8,98
4	OP-AA8/400		33,46	18,85	35,22
5	UBC386/330		31,67	24,09	38,01
6	OP-V9/650		10,88	4,22	8,51
7	OP-M9 / 500		38,81	29,57	42,32
8	OP-F19/130		6,92	2,67	-2,22
		94			
9	OP-A20/350		-1,59	-1,41	5,23
10	UBC386/420		50,26	38,81	56,69
11	UBC535/420		-25,95	-6,12	-33,27
12	OP-T17/450		-5,29	-5,56	15,57
13	OP-B13/750		30,04	27,61	18,45
		97			
14	UBC386/280		36,16	24,71	34,03
15	OP-A19/250		3,46	14,10	5,38
16	OP-A6/480		21,39	7,29	12,76
17	OP-D12/200		0,25	2,34	-5,96
18	OP-V9/850		-2,30	-2,25	-11,59
19	OP-E12/330		12,12	8,02	16,95
20	OP-U8/400		-2,62	1,84	-1,49
		99			
21	E-W29/300		2,59	14,26	6,20
22	OP-AA8/350		11,11	10,30	18,08
23	OP-O1/300		18,79	13,47	24,16
24	OP-M11/230		-11,40	-11,27	-17,93
25	OP-F19/400		-1,36	3,18	-5,81
26	UBC535/240		33,73	25,08	41,99
27	E-W29/370		9,77	14,39	1,93
28	OP-D12 / 250		43,51	47,36	32,02
29	OP-P10/550		0,48	-3,04	1,32
		100			
	Постоянная		-155,83	-113,15	-155,32

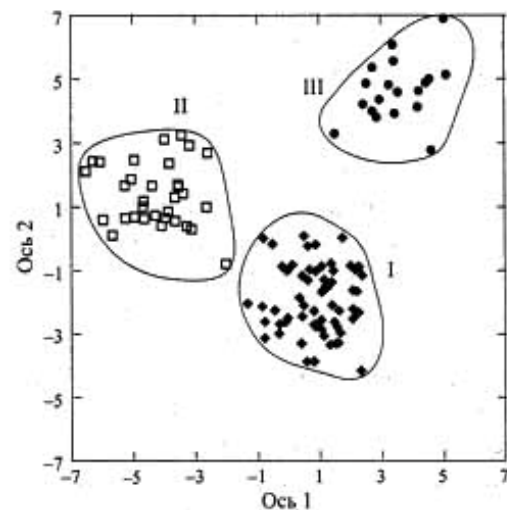


Рис. 6. Распределение сортов основных генетических групп евразийского подвида мягкой пшеницы в пространстве двух канонических осей. Распределение получено в модели канонического дискриминантного анализа с применением 29 компонентов RAPD-спектра, перечисленных в табл. 4

печивают четкое разделение сортов в пространстве двух канонических осей, построенных в созданной модели КДА (рис. 6).

Характер различий групп I-III и их подгрупп по составу и встречаемости компонентов RAPD-спектра. Из 125 компонентов, оказавшихся полиморфными при анализе 148 сортов, 119 компонентов определяли полиморфизм 124 сортов групп I - III, 5 компонентов были выявлены только у сортов, принадлежащих минорным группам, и только компонент OP-AD15/470 оказался общим для сортов групп I - III, но отсутствовал у сортов ряда минорных групп. В свою очередь, изменчивость каждой из групп I - III была связана со 101, 97 и 68 полиморфными компонентами соответственно. Из них 53 присутствовали у части сортов всех трех групп, остальные были обнаружены в RAPD-спектрах сортов только одной или двух групп. Измен-

чивость сортов, формирующих отдельные подгруппы в пределах каждой из групп, определялась разными комбинациями 13 - 72 полиморфных компонентов.

Чтобы определить характер генетических различий между группами и между подгруппами сортов, мы оценили встречаемость в группах, подгруппах и у подвида отдельных фрагментов ДНК, вошедших как в описанную выше модель КДА, так и в модели КДА, построенные для подгрупп каждой группы (данные по подгруппам не приведены). Встречаемость (в %) рассчитывали как умноженное на 100 отношение числа сортов, имеющих данный фрагмент ДНК, к суммарному числу сортов в подгруппе, группе или в подвиде.

Полученные данные показали, что различия между группами определялись изменчивостью по частоте выявления фрагментов ДНК, полиморфизм по которым в подвиде составлял от 3 до 95 % (табл. 5). Между группами были обнаружены четкие количественные различия по 28 фрагментам ДНК. По отдельным компонентам различия колебались от 1 до 81 % и в среднем выражались величиной 27,3 %. Только для фрагмента OP-A6/480 было выявлено что-то похожее на качественное различие.

Для различения подгрупп внутри группы I наиболее значимыми оказались 16 фрагментов ДНК, внутри группы II - 9, а внутри группы III - 8. Во всех случаях наборы этих фрагментов различались по составу и не включали фрагменты, приведенные в табл. 4. Различия между подгруппами проявлялись как количественные различия по встречаемости большого числа фрагментов ДНК.

По нашим данным, яровым и озимым сортам евразийского подвида не соответствуют какие-либо самостоятельные генетические группы. Этот факт свидетельствует о том, что на уровне генетических групп генотипические различия сортов по типу развития не явля-

**Таблица 5.** Встречаемость (в %) компонентов RAPD-спектров, вошедших в модель КДА, в основных генетических группах сортов свразийского подвида мягкой пшеницы

№ п/п	Компонент (праймер/фрагмент ДНК, п.н.)	Генетическая группа			Подвид в целом (n = 148)
		I (n = 71)	II (n = 33)	III (n = 20)	
1	OP-A6/1000	86	9	5	53
2	OP-AF16/350	75	18	100	64
3	OP-A16/400	3	0	45	7
4	OP-AA8/400	100	58	95	89
5	UBC386/330	10	12	55	20
6	OP-V9/650	79	30	50	61
7	OP-M9/500	99	58	100	90
8	OP-F19/130	93	79	25	76
9	OP-A20/350	8	3	55	15
10	UBC386/420	100	79	100	92
11	UBC535/420	1	12	0	5
12	OP-T17/450	1	3	40	9
13	OP-B13/750	100	85	70	91
14	UBC386/280	86	73	40	72
15	OP-A19/250	3	42	0	12
16	OP-A6/480	4	0	0	3
17	OP-D12/200	83	85	15	70
18	OP-V9/850	27	9	10	21
19	OP-E12/330	45	21	95	49
20	OP-U8/400	56	61	95	61
21	E-W29/300	100	85	90	94
22	OP-AA8/350	10	52	15	20
23	OP-O1/300	82	73	100	82
24	OP-M11/230	13	12	0	14
25	OP-F19/400	7	27	5	14
26	UBC535/240	96	91	100	95
27	E-W29/370	89	91	55	80
28	OP-D12/250	99	100	75	95
29	OP-P10/550	73	18	45	55

\* n — количество сортов.

ются определяющими в выявленной по RAPD-спектрам дифференциации мягкой пшеницы.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Полиморфные фрагменты ДНК, амплифицированные с определенных участков генома, можно рассматривать как один из типов генетических маркеров (RAPD-маркеры), которые выявляют локальные изменения в первичной структуре ДНК [31]. Например, если у какого-либо сорта точковые мутации, инсерции, дупликации, делеции изменяют последовательности, гомологичные праймерам, или приводят к их исчезновению, то амплификация фрагмента ДНК не происходит. В RAPD-спектре такого сорта соответствующий компонент будет отсутствовать. Такого же типа изменения могут приводить к образованию последовательностей, гомологичных праймерам, и вызывать появление компонентов в спектрах.

Имеющиеся в литературе данные о локализации RAPD-маркеров в хромосомах культурных растений

свидетельствуют о том, что маркеры распределяются по всем хромосомам генома, при этом они или равномерно размещаются по всей длине хромосом, или образуют кластеры в их определенных участках [13, 14, 16]. Если предположить, что амплифицированные с помощью отобранных нами праймеров 125 фрагментов ДНК маркировали каждую из 21 хромосом гаплоидного генома мягкой пшеницы, то на одну хромосому в среднем приходилось около шести RAPD-маркеров. Это дает основание считать, что в сравнительном анализе сортов была охвачена существенная часть генома этой культуры.

Анализ полученных RAPD-спектров показал, что все 148 сортов различались между собой. По степени выявленного сходства сорта объединились в три основные четко дифференцированные группы. При дальнейшем анализе внутри каждой группы генетически сходных сортов были обнаружены подгруппы. Некоторые из них по составу входящих сортов соответствовали определенным агро-экологическим группам. Различия как между группами, так и между подгруппами были обусловлены множественными изменениями в геноме, при этом каждая группа и подгруппа характеризовались определенной совокупностью этих изменений.

Множественные преобразования генома мягкой пшеницы, которые определяют межгрупповые различия сортов, по-видимому, были накоплены в ходе эволюции мягкой пшеницы, начиная с первых этапов ее дифференциации в первичном очаге происхождения. Как показывают результаты наших исследований, мягкие пшеницы Кавказа, на территории которого обнаружена одна из древнейших земледельческих культур [1, 8, 10], генетически разнородны. Их представители присутствовали в трех основных и четырех минорных группах. В далекие времена человек мог перенести предков этих сортов из древнейшего очага земледелия на новые территории. Они стали родоначальниками новых местных сортов, а те, при последующем переносе на другие территории, — основателями следующих поколений местных сортов. В ходе такого постепенного распространения мягкой пшеницы по ареалу каждый раз на основе перенесенного запаса генетической изменчивости должно было происходить усложнение комплекса адаптивных свойств у потомков исходных растений. Изолированность древних земледельческих очагов друг от друга [10] способствовала сохранению, с одной стороны, генотипических особенностей растений — основателей новых местных сортов, а с другой — накапливающихся различий в геноме.

Обнаруженные нами различия между группами сортов, по-видимому, отражают те генотипические изменения, которые имели место на первых этапах распространения мягкой пшеницы. Дальнейшая ее дифференциация, в результате которой сформировались агро-экологические группы, происходила уже на основе, по меньшей мере, трех разных генетических групп сортов. При этом она затрагивала иные участки генома, хотя также была связана с его множественными пе-

рестройками. Генетические процессы, которые приводят к дифференциации изолированных популяций, детально рассмотрены Майром [5]. Изменения в геноме мягкой пшеницы обусловили изменения самых разных признаков и свойств растений. В качестве примера дифференциации евразийского подвида мягкой пшеницы можно рассмотреть особенности географического распространения и биологические характеристики местных сортов степной озимой и степной яровой групп.

Как уже отмечалось, в группе I преобладали местные сорта степной озимой группы пшениц, в то время как отличительной особенностью группы II было наличие сортов, принадлежащих степной яровой группе. По данным Н. И. Вавилова [2] и Е. Ф. Пальмовой [6], мягкие пшеницы типа степных озимых занимали юго-западные степные области европейской части бывшего СССР. Они характеризовались быстрыми темпами развития до стадии колошения, в то время как стадия созревания у них протекала медленно, что позволяло хорошо налиться зерну. В сравнении с пшеницами, например, северо-запада России, произрастающими в условиях влажного климата, они были более зимостойкими и устойчивыми к засухе. Из характеристик, составленных теми же авторами для мягких пшениц типа степных яровых, часто называемых "русскими пшеницами", следует, что эти пшеницы были высокопластичными. Географически они вышли за пределы собственно степной области, продвинулись далеко на север, северо-восток и восток и заняли господствующее положение в Сибири, внедрившись постепенно вместе с русскими переселенцами во всю северную полосу Центральной Азии. В Западной Европе пшеницы такого типа были обнаружены в центральной Испании, Португалии и Румынии. Они были также широко распространены на севере США, особенно в Северной и Южной Дакоте. Особенности данного типа пшениц наиболее ярко проявляются у сортов горного плато Закавказья, Армении, Грузии и Малой Азии. Пшеницы несут явные черты ксерофильности, их ценнейшие свойства — способность противостоять весенним засухам и заморозкам, резкой смене суточных температур.

Сравнение выявленного деления евразийского подвида на генетические группы и подгруппы с предложенной Н. И. Вавиловым [3] классификацией этого подвида показало, что полного соответствия между ними нет. В нашей работе была обнаружена политипичность подвида на двух уровнях: групп и подгрупп, которые, очевидно, отражают разные этапы дифференциации мягкой пшеницы. Н. И. Вавилов объединял сорта только на уровне агро-экологических групп, которым, по нашим данным, в большей степени соответствовали подгруппы основных генетических групп и некоторые минорные группы. Как мы уже отмечали, сорта групп I и II имели широкое распространение, в то время как сорта группы III сохранились лишь в предгорных и горных районах Северного Кавказа, Азербайджана и Грузии. Судя по расположению кластеров на фенограмме, можно утверждать, что сорта

группы III характеризуются более тесным родством с сортами группы I, чем с сортами группы II.

Реальность существования трех основных генетических групп сортов евразийского подвида подтверждается также полученными нами результатами сравнительного RAPD-анализа этого подвида как с другими подвидами мягкой пшеницы, так и с другими видами гексаплоидных пшениц.

Таким образом, применение современных технологий, позволяющих изучать полиморфизм ДНК больших наборов сортов и по большому числу участков генома сравнивать сорта по степени их сходства, делает возможным построение генетической классификации мягкой пшеницы, отражающей исторический путь ее адаптации.

## ВЫВОДЫ

На примере изучения местных и стародавних селекционных сортов евразийского подвида мягкой пшеницы показано, что для выявления генетической дифференциации этой культуры необходимы:

1) формирование репрезентативной выборки сортов (образцов), отражающей их эколого-географическое разнообразие;

2) выбор системы множественных ДНК-маркеров, охватывающих существенную часть генома;

3) применение ряда независимых методов многомерной статистики для классификационных построений.

RAPD-маркеры оказались пригодными для характеристики полиморфизма мягкой пшеницы и выяснения путей постепенной дивергенции этой культуры в ходе распространения по ареалу. Выявленные на основе сходства RAPD-спектров группы и подгруппы сортов свидетельствуют о сложной политипической структуре евразийского подвида мягкой пшеницы. Различия как между группами, так и между подгруппами по встречаемости RAPD-маркеров имеют количественный характер и связаны с множественными изменениями в геноме. Для выяснения генетической структуры генофонда всей мягкой пшеницы представляет большой интерес провести сравнение выявленных нами генетических групп и подгрупп евразийского подвида с местными сортами других подвидов этой культуры.

*Авторы выражают благодарность А. А. Сербину за помощь в подборе материала и Ю. В. Погромскому за разработку ряда вспомогательных компьютерных программ, способствовавших выполнению этой работы.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Вавилов Н. И. Центры происхождения культурных растений // Тр. по прикл. бот. и сел. — Л., 1926. — Т. 16, № 2. — С. 1–138.
2. Вавилов Н. И. Научные основы селекции пшеницы. — М.-Л.: Сельхозгиз, 1935. — 244 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. Дорофеев В. Ф., Филатенко А. А., Мигушова Э. Ф. и др. Культурная флора СССР. Пшеница. — Л.: Колос, 1979. Т. I. — 347 с.
5. Майр Э. Зоологический вид и эволюция. — М.: Мир, 1968. — 597 с.
6. Пальмова Е. Ф. Введение в экологию пшениц. — Л.-М.: Огиз, Сельхозгиз, 1935. — 74 с.
7. Сиволап Ю. М., Чеботарь С. В., Топчиева Е. А. и др. Исследование молекулярно-генетического полиморфизма сортов *Triticum aestivum* L. с помощью RAPD- и SSRP-анализа // Генетика. — 1999. — Т. 35. — С. 1665–1673.
8. Синская Е. Н. Историческая география культурной флоры (на заре земледелия). — Л.: Колос, 1969. — 480 с.
9. Флягсбергер К. А. Культурная флора I. Хлебные злаки. Пшеница. — М.-Л.: Гос. изд-во совхозной и колхозной лит-ры, 1935. — 434 с.
10. Шнирельман В. А. Идеи Н. И. Вавилова и современные данные о формировании ранних очагов производящего хозяйства // Вавиловское наследие в современной биологии. — М.: Наука, 1989. — С. 299–317.
11. 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.
12. Chen H. B., Martin J. M., Lavin M., Talbert L. E. Genetic diversity in hard red spring wheat based on sequence-tagged-site PCR markers // Crop Sci. — 1994. — V. 34. — P. 1628–1632.
13. Dahleen L. S., Hoffman D. L., Dohrmann J., et al. Use of a subset of doubled-haploid lines for RAPD interval mapping in barley // Genome. — 1997. — V. 46. — P. 626–632.
14. Devos K. M., Gale M. D. The use of random amplified DNA markers in wheat // Theor. Appl. Genet. — 1992. — V. 84. — P. 567–572.
15. Dvorak J., Luo M.-C., Yang Z.-L., Zhang H.-B. The structure of the *Aegilops tauschii* gene pool and the evolution of hexaploid wheat // Theor. Appl. Genet. — 1998. — V. 97. — P. 657–670.
16. Ferreira A. R., Foutz K. R., Keim P. Soybean genetic map of RAPD markers assigned to an existing scaffold RFLP map // J. Heredity. — 2000. — V. 91. — P. 392–396.
17. Jennrich R. I. Stepwise discriminant analysis / K. Enslein, A. Ralston, and H. S. Wilf (eds.) // Statistical methods for digital computers. — New York: Wiley, 1977.
18. Kim H. S., Ward R. W. Patterns of RFLP-based genetic diversity in germplasm pools of common wheat with different geographical or breeding program origins // Euphytica. — 2000. — V. 115. — P. 197–208.
19. Ma Z.-Q., Lapitan N. L. V. A comparison of amplified and restriction fragment length polymorphism in wheat // Cereal Res. Commun. — 1998. — V. 26. — P. 7–13.
20. 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.
21. Okuno K., Ebana K., Noov B., Yoshida H. Genetic diversity of Central Asian and north Caucasian *Aegilops* species as revealed by RAPD markers // Gen. Res. Crop Evol. — 1998. — V. 45. — P. 389–394.
22. Paull J. G., Chalmers K. J., Karakousis A., et al. Genetic diversity in Australian wheat varieties and breeding material based on RFLP data // Theor. Appl. Genet. — 1998. — V. 96. — P. 435–446.
23. Prasad M., Varshney R. K., Roy J. K., et al. The use of microsatellites for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat // Theor. Appl. Genet. — 2000. — V. 100. — P. 584–592.
24. 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.
25. Shah M. M., Yen Y., Gill K. S., Baenziger P. S. Comparisons of RFLP and PCR-based markers to detect polymorphism between wheat cultivars // Euphytica. — 2000. — V. 114. — P. 135–142.
26. Sneath P. H. A., Sokal R. P. Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. — San Francisco: W. H. Freeman and Co., 1973.
27. SPSS Inc. SYSTAT 8.0 for Windows. Unparalleled research quality statistics and graphics. — Chicago, IL, USA, 1998.
28. Stachel M., Lelley T., Grausgruber H., Vollmann J. Application of microsatellites in wheat (*Triticum aestivum* L.) for studying genetic differentiation caused by selection for adaptation and use // Theor. Appl. Genet. — 2000. — V. 100. — P. 242–248.
29. StatSoft, Inc. STATISTICA for Windows (Computer program manual). — Tulsa, OK, USA, 1999.
30. Sun Q., Ni Z., Liu Z., Gao J., Huang T. Genetic relationships and diversity among Tibetan wheat, common wheat and European spelt wheat revealed by RAPD markers // Euphytica. — 1998. — V. 99. — P. 205–211.
31. Vogt T., Mathieu-Daude F., Kullmann F., et al. Fingerprinting of DNA and RNA using arbitrarily primed PCR // DNA markers: protocols, applications, and overviews / G. Caetano-Anolles, P. M. Gresshoff (eds.). — New York: Wiley-VCH, 1997. — 364 p.
32. Ward J. H. Jr. Hierarchical grouping to optimize an objective function // J. Am. Stat. Assoc. — 1963. — V. 58. — P. 236–244. (цит. по Дюрэн Б., Одедл П. Кластерный анализ. — М.: Статистика, 1977. — 128 с.)
33. Ward R. W., Yang Z. L., Kim H. S., Yen C. Comparative analyses of RFLP diversity in landraces of *Triticum aestivum* and collections of *T. tauschii* from China and Southwest Asia // Theor. Appl. Genet. — 1998. — V. 96. — P. 312–318.

Стрельченко П. П., канд. биол. наук;

Митрофанова О. П., докт. биол. наук;

Малышев Л. Л., канд. биол. наук;

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

Всероссийский НИИ растениеводства им. Н. И. Вавилова

Д-р. Терами Ф.;

Государственная сельскохозяйственная опытная станция Хоккайдо,

Саппоро 062, Япония