

Д.Ш. МАЛЛАБАЕВА<sup>1</sup>, А.Н. ИГНАТОВ<sup>1</sup>, И.А. ШЕЙКО<sup>1</sup>,  
В.П. ИСИКОВ<sup>2</sup>, В.П. ГЕЛЮТА<sup>3</sup>, Н.Г. БОЙКО<sup>4</sup>,  
А.А. СЕРЯПИН<sup>5</sup>, Д.Б. ДОРОХОВ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Центр «Биоинженерия» РАН, Москва  
E-mail: dmallabaeva@rambler.ru

<sup>2</sup> Никитский ботанический сад, Украина

<sup>3</sup> Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, Киев

<sup>4</sup> Монсанто Украина, Киев

<sup>5</sup> Монсанто Европа С.А., Представительство в Москве

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ RAPD И ПТЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ В ИЗУЧЕНИИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ КРЫМСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ *T. BOEOTICUM* BOISS.



Оценивали влияние экологических условий произрастания на изменчивость случайных ПЦР-маркеров — RAPD и меж-MITE полиморфизма (IMP) праймеров в двух контрастных по климатическим условиям популяциях дикорастущей пшеницы *Triticum boeoticum* в Крыму. Сравнивали доли изменчивости, подверженной естественному отбору, для этих двух типов молекулярных маркеров. Обнаружили существенное различие между популяциями Сапун-гора — Байдарская долина по 24,7 % анализируемых локусов при небольшом генетическом расстоянии Нея (0,0324) между популяциями. Число достоверно различных RAPD и IMP локусов между популяциями было примерно равным. Тест на нейтральность эволюции выявил 13 локусов (17,8 %), на которые влиял естественный отбор. Популяция Сапун-горы была подвержена большему действию фактора отбора по 10 локусам (13,7 %), чем популяция Байдарской долины (4 локуса = 5,5 %). Из 13 локусов, подверженных отбору, 11 были амплифицированы IMP праймерами.

© Д.Ш. МАЛЛАБАЕВА, А.Н. ИГНАТОВ, И.А. ШЕЙКО,  
В.П. ИСИКОВ, В.П. ГЕЛЮТА, Н.Г. БОЙКО,  
А.А. СЕРЯПИН, Д.Б. ДОРОХОВ, 2007

**Введение.** Пшеница дикая однозернянка (*Triticum boeoticum* Boiss.) представляет интерес как родственник культурных пшениц [1, 2], свойства которого (например, устойчивость к болезням) используют в селекционной работе при улучшении сортов пшеницы. Это редкий вид, который в результате деятельности человека сокращает свои численность и ареал, охватывающий Малую Азию, Балканы, Иран, Южное и Восточное Закавказье и Крым. Он включен в Красную книгу Украины, в Крыму находится на северной границе ареала [3]. Поэтому данный вид нуждается во всестороннем детальном изучении для наиболее полного сохранения его генетического разнообразия и потенциала.

Сравнительный анализ ядерного и хлоропластного геномов диплоидных пшениц и близких к ним видов рода *Aegilops* L., которых часто включают в род *Triticum* L., показал, что *T. boeoticum* и *T. monococcum* L. сильно отличаются от *T. urartu* Thumanjan ex Gandilyan, а внутривидовая изменчивость пшениц-однозернянок меньше, чем у *A. speltoides* Tausch и *A. squarrosa* L. [4]. Генетическая изменчивость на видовом и внутривидовом уровнях хорошо изучена для многих растений с помощью белковых и ДНК-маркеров [5, 6]. Генетические различия внутри вида представляются результатом локальной естественной селекции [7—11] или эффекта основателя популяции [12, 13]. Действие естественного отбора обычно оценивается по зависимости уровня генетического разнообразия вида от эколого-климатических особенностей мест произрастания популяций. Процесс дифференциации популяций усиливается при самоопылении растений, характерном для пшениц [14, 15]. В большинстве случаев влияние естественного отбора на генетическое разнообразие злаков было показано с помощью изоферментных маркеров [9, 16, 17] и реже — ДНК-маркеров [18—22].

Среди молекулярных маркеров наиболее часто используются неспецифичные ПЦР-маркеры, включая RAPD, ISSR, IMP и др. [23—27]. Особенностью RAPD-маркеров является амплификация произвольно распределенных фрагментов генома, что подходит для изучения случайных мутаций и естественного генетического разнообразия в популяции растений или животных [28, 29]. Считается, что RAPD-маркеры

нейтральны из-за их преимущественной локализации в некодирующей области ДНК [24]. Транспозонные элементы второго класса типа МІТЕ (miniature inverted transposable elements) часто встречаются в геномах растений и преимущественно расположены в эухроматиновых районах, где они могут образовывать гнездовые структуры [30—33] и определять полиморфизм среди отдельных особей или популяций одного вида [34—36]. Известно, что МІТЕ активизируются при стрессовом воздействии на растения [37]. Для исследования генома злаков успешно была применена также технология ІМР маркеров, которая практически аналогична используемой нами ІТЕ технологии [25]. Таким образом, использование различных маркерных систем позволяет полнее охарактеризовать микроэволюционные изменения в популяциях растений, в частности и *T. boeoticum*.

Мы изучали генетическую структуру популяций *T. boeoticum* из двух географических точек Крыма (Сапун-гора и Байдарская долина) с помощью молекулярных маркеров, амплифицируемых RAPD и ІТЕ праймерами, гомологичными инвертированным повторам мобильных элементов класса МІТЕ. Мы выявили влияние естественного отбора на микроэволюцию данных популяций. При этом оценивалось влияние условий окружающей среды на частоту аллелей или их комбинацию для различных локусов. Оценка достоверности действия отбора проводилась при сравнении ожидаемой и наблюдаемой частот аллелей по индивидуальным локусам. Полученные результаты указывают на необходимость особой охраны популяций, произрастающих в наиболее благоприятных условиях, для сохранения максимального генетического разнообразия вида.

**Материалы и методы.** Согласно сведениям Масловой и др. [38] и данным Национального гербария Украины (KW), в Крыму *T. boeoticum* распространена в основном в горных и предгорных районах (Белогорск, Байдарская долина, Балаклава). В результате наших экспедиционных исследований, проведенных в 2001—2002 гг., указанный вид в районе Белогорска не обнаружен, однако было выявлено значительное количество новых его местпро-

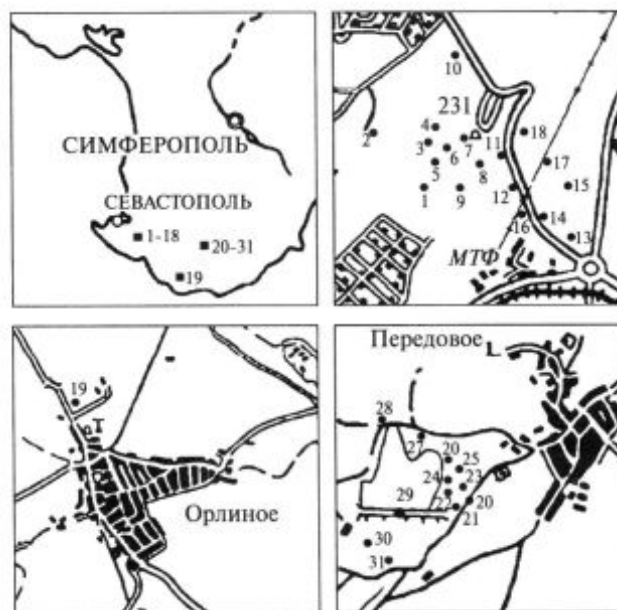


Рис. 1. Современное распространение *T. boeoticum* Boiss. в Крыму. Нумерация локалитетов соответствует тексту и таблице

израстаний в Байдарской долине и окрестностях г. Севастополя (Сапун-гора) [39]. Всего был обследован 31 локалитет (рис. 1). В табл. 1 приводится краткая характеристика мест произрастаний *T. boeoticum*, в которых были собраны семена образцов для данного исследования. Были также использованы и другие образцы видов пшениц: *T. boeoticum* (Нахичевань, ВИР, коллекционный № 59161), *T. aestivum* L. (сорт Саратов 42, коллекция центра «Биоинженерия», № 576) и *T. monococcum* (коллекция центра «Биоинженерия», № 589). Для анализа отбирали по 5—10 индивидуальных генотипов растений из указанных локалитетов (табл. 1).

Для выделения ДНК растения были выращены из семян в теплице центра «Биоинженерия» при постоянных условиях: температуре 25—28 °С, долгота светового дня 16 ч, относительная влажность 75 %. ДНК выделяли из листьев на стадии первого листа по протоколу Эдвардса и др. [40], модифицированному Дорховым и Клоке [41]. Измерение концентрации ДНК осуществляли с помощью спектрофотометра BioPhotometer (AG Eppendorf).

ПЦР проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 2 мкл 10× буфера, 1,6 мкл dNTP, 2 мкл праймера (2,5 пМ/мкл), 0,1 мкл Taq-по-

Краткая характеристика мест произрастаний *T. boeoticum*, из которых отобраны образцы для исследования (номер локалитета и описание приводится в соответствии [39])

№	Локализация подпопуляций	Площадь локалитета	Количество особей	Ассоциация	Обозначения образцов в настоящей работе	Количество проанализированных генотипов
1	Севастополь, Сапун-гора, старый заброшенный виноградник	800 × 300 м	3 600 тыс.	<i>T. boeoticum</i> — <i>Avena persica</i> — <i>Dasypyrum villosum</i> — <i>herba varia</i> ( <i>Cichorium intybus</i> , <i>Torilis arvensis</i> , <i>Salvia verticillata</i> , <i>Lapsana intermedia</i> , <i>Securigera varia</i> , <i>Medicago minima</i> )	212	5
2	Там же, Сапун-гора, защитная полоса из ореха грецкого в винограднике	800 × 8 м	64 тыс.	<i>T. boeoticum</i> — <i>A. persica</i> — <i>herba varia</i> ( <i>Xeranthemum annuum</i> , <i>D. villosum</i> , <i>Securigera varia</i> , <i>Echium vulgare</i> , <i>Trifolium angustifolium</i> , <i>M. minima</i> , <i>Convolvulus betonicifolius</i> )	219	5
6	Там же, вершина Сапун-горы, южнее диорамы, парковая зона с березами и кедрами	300 × 200 м	14 430 тыс.	<i>T. boeoticum</i> — <i>A. persica</i> — <i>X. annuum</i> — <i>herba varia</i> ( <i>Stachys germanica</i> , <i>Mentha arvensis</i> , <i>C. betonicifolius</i> , <i>Galium ruthenicum</i> , <i>Eryngium campestre</i> , <i>Plantago lanceolata</i> , <i>Lapsana intermedia</i> , <i>Carlina vulgaris</i> , <i>Trifolium angustifolium</i> , <i>Sideritis comosa</i> , <i>Anagallis foemina</i> , <i>Muscari neglectum</i> )	221	5
14	Там же, в 200 м от кольца в сторону Сапун-горы, правая сторона, между автодорогой и виноградником	7 × 4 м	200	<i>T. boeoticum</i> — <i>Medicago falcata</i> — <i>Dactylis hispanica</i> — <i>herba varia</i> ( <i>Elytrigia repens</i> , <i>A. persica</i> , <i>S. virgata</i> , <i>M. falcata</i> , <i>Securigera varia</i> , <i>Anthemis tinctoria</i> ssp. <i>subtinctoria</i> , <i>L. intermedia</i> , <i>Teucrium chamaedrys</i> , <i>Prunella laciniata</i> , <i>Aegilops cylindrica</i> , <i>A. ovata</i> )	13	10
20	Байдарская долина, с. Передовое, у пруда, на вершине холма, у дороги	20 × 10 м	500	<i>T. boeoticum</i> — <i>X. annuum</i> — <i>Festuca rupicola</i> — <i>herba varia</i> ( <i>Hordeum bulbosum</i> , <i>Leucanthemum vulgare</i> , <i>Salvia nemorosa</i> s.l., <i>Dorycnium graecum</i> , <i>Achillea setacea</i> , <i>Melampyrum arvense</i> , <i>Potentilla semilaciniosa</i> , <i>Securigera varia</i> , <i>Lotus corniculatus</i> , <i>M. falcata</i> , <i>M. lupulina</i> , <i>Trifolium ambiguum</i> , <i>T. campestre</i> , <i>T. pratense</i> , <i>Bellis perennis</i> , <i>Ornithogalum ponticum</i> , <i>Eryngium campestre</i> , <i>Thesium arvense</i> , <i>Aegilops biuncialis</i> , <i>A. triuncialis</i> )	220	10
21	Там же, с. Передовое, у пруда, склон юго-западной экспозиции, наклон 20°	20 × 20 м	1 тыс.	<i>Festuca rupicola</i> — <i>X. annuum</i> — <i>T. boeoticum</i> — <i>herba varia</i> ( <i>Poterium polygamum</i> , <i>Hordeum bulbosum</i> , <i>Carlina vulgaris</i> , <i>Achillea setacea</i> , <i>Potentilla astracanicum</i> , <i>S. varia</i> , <i>Stachys germanica</i> , <i>Dorycnium graecum</i> , <i>Trifolium campestre</i> , <i>Medicago lupulina</i> , <i>Aegilops ovata</i> , <i>A. geniculata</i> , <i>A. cylindrica</i> , <i>Leucanthemum vulgare</i> )	217	10
22	Там же, в 1 км на юго-запад от села, на берегу искусственного пруда	5 × 10 м	200	<i>F. rupicola</i> — <i>X. annuum</i> — <i>T. boeoticum</i> — <i>Leucanthemum vulgare</i> — <i>herba varia</i> ( <i>Carlina vulgaris</i> , <i>Dorycnium graecum</i> , <i>S. germanica</i> , <i>T. campestre</i> , <i>E. campestre</i> , <i>Rubus caesius</i> , <i>A. ovata</i> , <i>A. geniculata</i> , <i>A. cylindrica</i> , <i>Dipsacus sylvestris</i> )	218	10
27	Там же, между краем леса и кромкой поля, заходит на поле	5 × 15 м	300	<i>F. rupicola</i> — <i>X. annuum</i> — <i>T. boeoticum</i> — <i>herba varia</i> ( <i>D. hispanica</i> , <i>Poterium polygamum</i> , <i>Hordeum bulbosum</i> , <i>Dorycnium graecum</i> , <i>L. vu-</i>	216	10

Окончание табл. 1

№	Локализация подпопуляций	Площадь локалитета	Количество особей	Ассоциация	Обозначения образцов в настоящей работе	Количество проанализированных генотипов
				<i>Igare, Achillea setacea, S. nemorosa s.l., S. varia, O. ponticum, Filipendula vulgaris, A. cylindrica, A. ovata, T. campestre, T. pratense, Onobrychis tanaitica, Potentilla astracanic, P. laciniata, Melampyrum arvense, Cuscuta europaea</i> ). Отмечены формы с темным колосом		
30	Там же, на западной стороне дамбы, вдоль бетонного лотка	25 × 3 м	200	<i>T. boeoticum — T. campestre — A. triuncialis — herba varia (Poterium polygamum, Potentilla astracanic, Lolium perenne, M. falcata, M. lupulina, Eryngium campestre, Achillea setacea, X. annuum, T. pratense, T. angustifolium)</i>	215	10
31	Там же, в 50 м на восток от участка № 30, пойменный луг	3 × 3 м	200	<i>T. boeoticum — X. annuum — herba varia (Hordeum bulbosum, P. polygamum, Carlina vulgaris, S. varia, M. falcata, Dorycnium graecum, Salvia verticillata, Achillea setacea, Lathyrus tuberosus, Lotus corniculatus, T. campestre, M. lupulina, M. orbicularis)</i>	213	5

лимеразы (5 Ед/мкл), 3 мкл ДНК растворенной в ТЕ-буфере и до 20 мкл дистиллированной воды. При проведении ПЦР использовали праймеры, приведенные в табл. 2, и амплификатор GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems). Был применен температурный режим «тачдаун»: начальная денатурация — 3 мин; первые 20 циклов — 5 с при 94 °С, 30 с при 55 °С последующим снижением температуры на 1 градус каждый новый цикл и 30 с при 72 °С; следующие 20 циклов — 5 с при 94 °С, 30 с при 35° и 30 с при 72 °С. Конечная элонгация — 7 мин при 72 °С.

Предварительный кластерный и факторный анализ первичных данных проводили с помощью пакета программ STATISTICA 6.0. Для оценки уровня генетического разнообразия рассчитывали следующие показатели: процент полиморфных локусов при 99%-ном критерии полиморфности, среднюю гетерозиготность по Нею ( $h = \text{Nei's gene diversity}$ ). Структуру и степень дифференциации популяций исследовали с помощью генетического расстояния по Нею [42—44], влияние естественного отбора на частоту аллелей — методом Эвенса-Уаттерсона (Ewens-Watterson) [45]. Для вычисления перечисленных показателей

Таблица 2  
Список использованных праймеров и их последовательности

Праймер	Последовательность 3'-5'	Длина
RAPD		
OPB03	CAT CCC CCT G	10
OPA09	GGG TAA CGC C	10
OPA06	GGT CCC TGA C	10
OPN15	CAG CGA CTG T	10
OPN19	GTC CGT ACT G	10
OPD6	ACC TGA ACG G	10
OPD12	CAC CGT ATC C	10
ITE-PCR		
M1	CGT GGT TT(C/T) (C/T)AC TG	14
M2	CGA GGC AGC TAA GCG	15
MAR1	(C/G)2A CCA ACC TAA	12
M2a	CGC TTA GCT GCC TCG	15
KIDD	AAC CAA ACA NCC CC	14
PIF1	GTT CAA A(A/C)A (A/G)GC TC	14
PIF2	CAA CCA AAC (C/A)GG CCC	15

использовали пакет компьютерных программ POPGEN 1.32 [46].

**Результаты исследований и их обсуждение.** Для анализа генома 76 образцов *T. boeoticum*, входивших в состав двух популяций (50 образ-

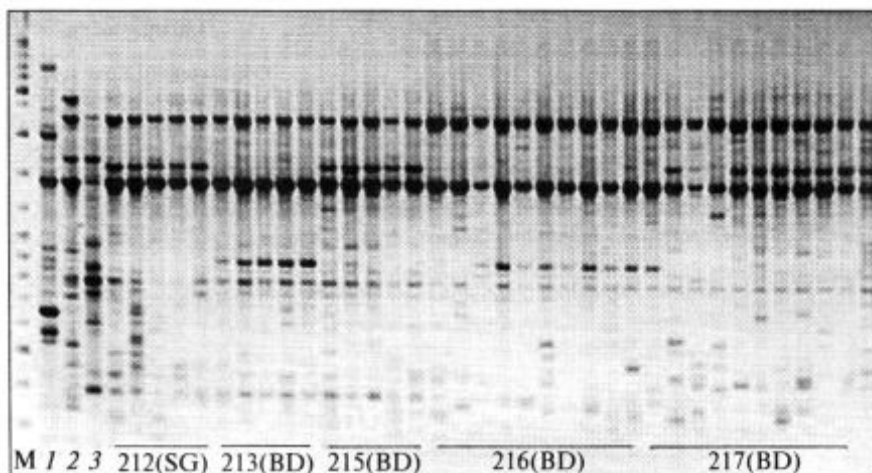


Рис. 2. Продукты IMP ПЦР с праймером MITE2: 1 — *T. aestivum*, 2 — *T. monococcum*, 3 — *T. boeoticum* (Нахичевань), 212–218 — *T. boeoticum* из соответствующих локусов, М — маркер

цов из Байдарской долины и 26 образцов с Сапун-горы), и коллекционных образцов *T. boeoticum* (Нахичевань), *T. aestivum* и *T. monococcum*, взятых в качестве аут-групп, использовали RAPD-праймеры, показавшие ранее высокий межвидовой полиморфизм у диких и культурных пшениц [47, 48]. Было получено 102 амплифицированных фрагмента. Из них полиморфными оказались 89 с молекулярной массой от 200 до 5000 п.о. При использовании 7 ИТЕ праймеров (табл. 2) получено 155 различных по массе ампликонов, из них 136 — полиморфных с молекулярной массой от 200 до 3500 п.о. В последующем анализе генетической структуры популяций использовали только 73 полиморфных информативных локуса, представленных не единичными растениями. На рис. 2 приведены результаты амплификации образцов ДНК *T. boeoticum* из различных локалитетов с ИТЕ праймером. На основании полученных данных была составлена бинарная матрица и определены попарные генетические расстояния.

Кластерный анализ данных по индивидуальным генотипам с использованием нескольких генетических расстояний и метода UPGMA не дал четкого деления на кластеры — число групп было велико, и расстояния между генотипами примерно были одинакового порядка с расстояниями между кластерами. Использование метода Варда [49] для расстояния Пирсона показало равномерное убывание генетической изменчивости при группировке объектов без образования больших групп, объединенных

по признаку субпопуляции или локалитета. Поэтому для более четкого выявления структуры генетической изменчивости в анализируемых популяциях был проведен факторный анализ. Было выделено 12 достоверных факторов, объяснявших более 50 % общей изменчивости. Первые два основных фактора описывали всего 6,2 и 5,8 % варибельности, однако фактор 2 с высокой достоверностью (> 90 %) разделял популяции Сапун-горы и Байдарской долины (рис. 3), были выявлены три основных кластера. Один кластер включал в себя только генотипы из Байдарской долины, два из них включали как генотипы с Сапун-горы, так и из Байдарской долины. Часть кластеров низких уровней включали в себя только генотипы разных локалитетов с Сапун-горы или из Байдарской долины.

Считается, что факторный анализ может отражать соответствие изменчивости каким-либо факторам отбора. Для подтверждения этой гипотезы был проведен генетический анализ популяций по отдельным молекулярным локусам. Значения основных показателей генетической изменчивости, включенных в исследование популяций, представлены в табл. 3. Наиболее высокий уровень генетической изменчивости обнаруживает популяция из Байдарской долины. Значения среднего наблюдаемого числа аллелей в этой популяции составляют 1,84, что близко к значению наблюдаемого числа аллелей во всех образцах двух популяций (1,89). В целом в изученных популяциях в полиморфном состоянии находится от 76,71 % (для Сапун-го-

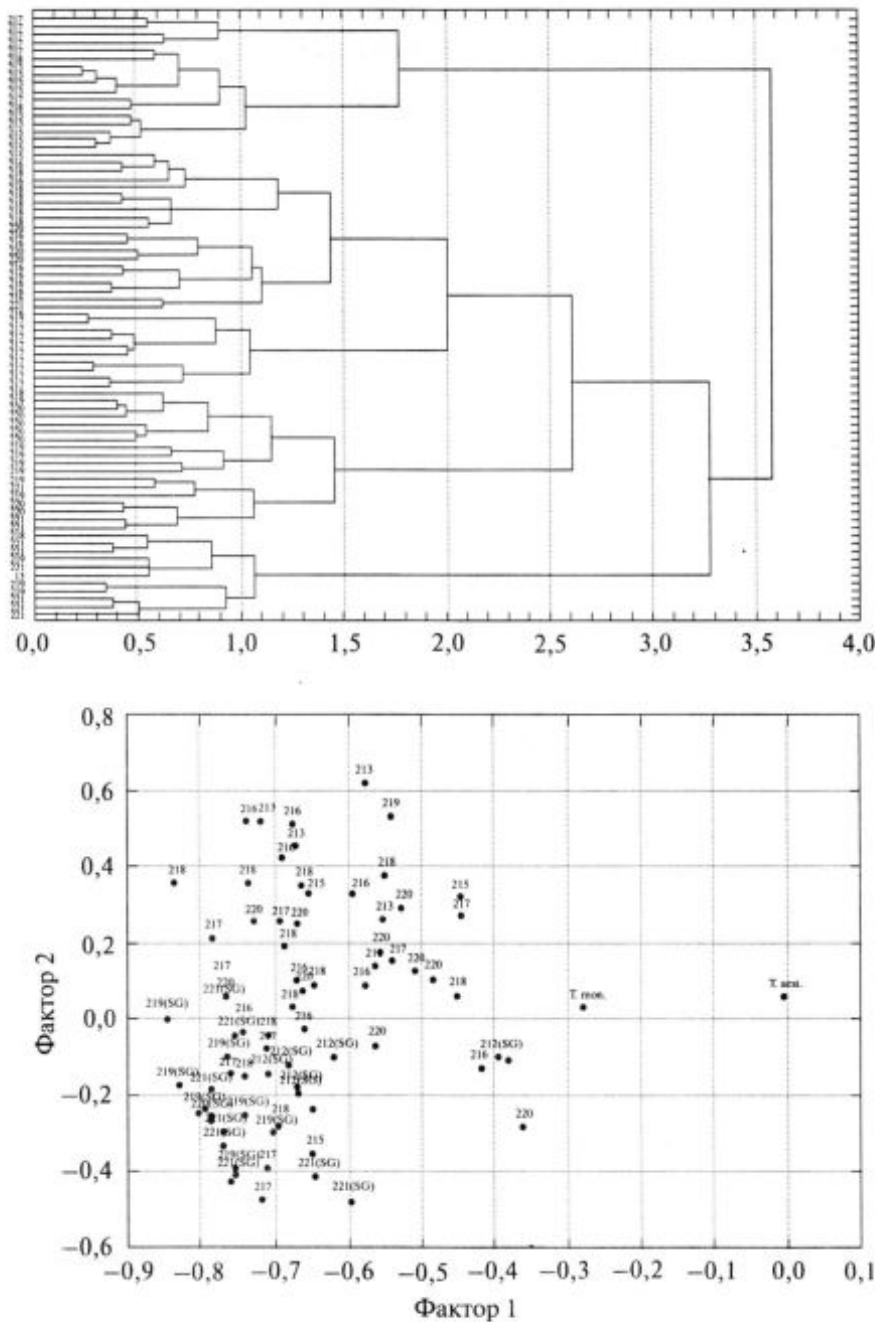


Рис. 3. Факторный анализ индивидуальных генотипов по данным амплификации с IMP-праймером MITE2. \* Образцы, обозначенные SG в скобках, произрастают на Сапун-горе, остальные — в Байдарской долине (кроме *T. aestivum* и *T. monococcum*)

ры) до 83,56 % выявленных локусов (для Байдарской долины) (табл. 3). Полученные значения свидетельствуют о высоком уровне генетического разнообразия изученных генотипов.

Значения генетических расстояний между популяциями представлены в табл. 4. Генетическое расстояние между двумя популяциями *T. boeoticum* с Сапун-горы и из Байдарской долины оказалось очень малым (0,0329) при том,

что между видами (*T. aestivum*, *T. monococcum* и *T. boeoticum*) оно было существенно выше — от 0,3967 до 0,5293. Выявлено достоверное генетическое различие между популяциями *T. boeoticum* с Сапун-горы и из Байдарской долины по 24,7% анализируемых локусов. Число достоверно различающих две популяции ИТЕ локусов оказалось 8, а RAPD — 11 (вероятность > 95 %). Коэффициент разделения по-

Таблица 3

Параметры внутривидовой изменчивости *Triticum boeoticum*

Популяция	Количество образцов	Значение h	Стандартное отклонение	Полиморфные локусы		Коэффициент разделения популяций, Gst	Оценка потока генов Nm
				количество	%		
Сапун-гора	26	0,2240	0,1938	56	76,71	0,0779	5,92
Байдарская долина	50	0,2569	0,1906	61	83,56		
Всего	76	0,2567	0,1840	73	100		

Примечание. h — генетическое разнообразие по Нею. Nm — оценка потока генов, Nm = 0,5(1 - Gst)/Gst.

Таблица 4

Значения генетических расстояний образцов различных видов рода *Triticum*

Вид	<i>T. aestivum</i>	<i>T. monococtum</i>	<i>T. boeoticum</i>	
			Сапун-гора	Байдарская долина
<i>T. aestivum</i>	****			
<i>T. monococtum</i>	0,5293	****		
<i>T. boeoticum</i> (Сапун-гора)	0,5605	0,4018	****	
<i>T. boeoticum</i> (Байдарская долина)	0,5263	0,3967	0,0329	****

Таблица 5

Локусы, подверженные действию естественного отбора

Локус	Компоненты вариации				Гетерозиготность, Nei, 1972		Локусы подверженные действию отбора	
	Ht	Hc	Gcs	Gst	SG	BD	SG	BD
MITE6	0,2868	0,053	0,8101	0,0272	0,0958	0,3372	1	
MITE19	0,3738	0,1624	0,4578	0,1986	0,3279	0,0562		1
MITE22	0,042	0,0371	0,107	0,0119	0,0958	0,6047	1	
MITE23	0,0608	0,0572	0,0578	0,0005	0,2255	0,0562		1
MITE25	0,0303	0,0292	0,0362	0,0003	0,0958	0,1706	1	
MITE26	0,0608	0,0572	0,0578	0,0005	0,0958	0,0988	1	
MITE31	0,0102	0,0097	0,039	0,0077	0,0958	0,1364	1	
MITE34	0,0506	0,0481	0,0487	0	0,0958	0	1	
MITE37	0,0102	0,0097	0,0431	0,0034	0,0958	0,1364	1	
MITE39	0,0102	0,0097	0,039	0,0077	0	0,0562		1
OPD64	0,2202	0,168	0,2348	0,003	0,0958	0	1	1
OPD613	0,2375	0,1361	0,3787	0,0779	0,5212	0,3605	1	

Примечание. Ht — общая гетерозиготность, Hc — внутривидовая компонента гетерозиготности, Gcs — коэффициент разделения между подпопуляциями, внутри одной популяции, Gst — коэффициент межпопуляционного разделения, SG — популяция на Сапун-Горе, BD — популяция в Байдарской долине (кроме *T. aestivum* и *T. monococtum*)

пуляций Gst составил 0,0779, а оценка потока генов — 5,92. Число локусов с существенным межпопуляционным Gst было мало, только для 4 локусов Gst > 20 %.

Для определения вклада условий местопрорастания в генетическое разнообразие по-

пуляций был проведен тест Эвенса-Ваттерсона на нейтральность, выявивший 13 локусов (17,8 %), на которые действует естественный отбор. Популяция Сапун-горы была подвержена большему действию неизвестного фактора отбора по 10 локусам (13,7 %), чем популяция

Байдарской долины (4 локуса, 5,5 %), причем в первой популяции число достоверно полиморфных локусов (< 5 %) оказалось больше, чем во второй — 10 и 4 соответственно. Возможно, это связано с подверженностью популяции Сапун-горы направленному действию отбора, вызванного, очевидно, неким антропогенным или климатическим фактором. В табл. 5 приведены параметры генетической структуры и степень дифференциации популяций по этим локусам. В обеих популяциях подверженным селекции оказался только один локус OPD614. Под действием отбора достоверно отличающим первую популяцию оказался только один локус MITE22. Из 13 локусов, подверженных отбору, 11 были амплифицированы MITE праймерами. Таким образом, совместное использование нескольких различных по своим мишеням маркерных систем позволяет наиболее полно охарактеризовать генетическую структуру близких популяций.

Для сравнения генетического разнообразия в популяциях *T. boeoticum*, произрастающих на Сапун-горе и Байдарской долине в Крыму, использовали два типа принципиально разных молекулярных маркеров — RAPD и ITE. Популяции на Сапун-горе и в Байдарской долине близки между собой, генетические различия между ними малы по сравнению с межвидовыми. Эти различия достоверно выявляются по 24,7 % локусов, показанных как с RAPD, так и ITE. Генетические различия внутри вида могут являться результатом или локальной селекции, или эффекта основателя популяции. Почти одинаково высокий уровень полиморфизма обеих популяций предполагает действие первого из факторов. Отметим, что условия произрастания *T. boeoticum* на Сапун-горе менее разнообразны, чем в Байдарской долине. Этим может объясняться несколько более низкий уровень генетического разнообразия в данной популяции. Основная часть локусов, подверженных отбору, была амплифицирована MITE праймерами, поэтому мы предполагаем, что это связано с адаптационной ролью мобильных элементов в геноме растений. Существуют две противоположные точки зрения на возможный адаптивный характер молекулярных маркеров. Одно из недавних исследований доказало нейтральную

природу RAPD-маркеров для четырех контрастных популяций дикорастущего ячменя [50]. Полученный результат был экстраполирован на весь класс молекулярных маркеров как эволюционно нейтральных признаков [51]. В свою очередь, отмечается связь распределения мобильных элементов в геномах популяций злаков с различиями в условиях окружающей среды [37]. Приведенные результаты с одной стороны поддерживают выводы о нейтральности RAPD-маркеров, а с другой — свидетельствуют об адаптивном потенциале ITE-маркеров. Таким образом, наши данные подтверждают ранее полученные результаты исследований, показывающие различия в дифференциации разных локусов и типов маркеров по отношению к естественному отбору [52—54]. Статистически достоверное значение естественного отбора было показано в основном для ITE-маркеров, что может служить косвенным подтверждением участия мобильных элементов 2-го типа в адаптации растений к стрессовым условиям окружающей среды. ITE-маркеры могут быть полезны при оценке популяционного разнообразия злаков.

Анализ полученных данных указывает на вероятную потерю генетического разнообразия *T. boeoticum* в местах произрастания со сравнительно неблагоприятными условиями (Сапун-гора). Поэтому необходимо обратить особое внимание на охрану популяций этого редкого вида в зонах с более благоприятными экологическими условиями (Байдарская долина) с целью сохранения максимального генетического разнообразия и потенциала дикорастущей пшеницы *T. boeoticum*.

**SUMMARY.** Wild wheat *Triticum boeoticum* Boiss. is the rare species are included in the Red Book of Ukraine. This species are reducing the magnitude of population and the area of distribution under anthropogenic activity. We studied genetic structure of two populations of *T. boeoticum*, located on Sapun Mountain and in Baidar Valley in Crimea. According RAPD and ITE molecular analysis we have estimated that the population of *T. boeoticum* on Sapun Mountain is genetically more impoverished than a population from the Baidar Valley. For preservation of maximal natural genetic polymorphism of the rare species it is recommended to direct efforts to preservations of a population of *T. boeoticum* from the Baidar Valley.

**РЕЗЮМЕ.** Оцінювали вплив екологічних умов зростання на мінливість випадкових ПЛР-маркерів RAPD



та між-МІТЕ поліморфізму (ІМР) праймерів у двох контрастних за кліматичними умовами популяціях дикорослої пшениці *Triticum boeoticum* в Криму. Порівнювали долю мінливості, підвладної природному добору, для цих двох типів молекулярних маркерів. Виявили істотну різницю між популяціями Сапун-гора—Байдарська долина за 24,7 % проаналізованими локусами при незначній генетичній відстані Нея (0,0324) між популяціями. Число достовірно різних RAPD та ІМР локусів між популяціями було приблизно однаковим. Тест на нейтральність еволюції виявив 13 локусів (17,8 %), на які впливав природний добір. Популяція Сапун-гори більш доступна до дії фактора добору за десятьма локусами (13,7 %), ніж популяція Байдарської долини (4 локуса = 5,5 %). З 13 локусів, що підвладні дії добору, 11 були ампліфіковані ІМР-праймерами.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Dvora'k J., Terlizzi P.D., Zhang H.B., Resta P. The evolution of polyploid wheats: identification of the A genome donor species // *Genome*. — 1993. — 36. — P. 21—31.
2. Takumi S., Nasuda S., Liu Y.G., Tsunewaki K. Wheat phylogeny determined by RFLP analysis of nuclear DNA. I. Einkorn wheat // *Japan. J. Genet.* — 1993. — 68. — P. 73—79.
3. Дубовик О.М. Пшениця дика однозернянка // Червона книга України. — Київ, 1996. — С. 451.
4. Mizumoto K., Hirose S., Nakamura C., Takumi S. Nuclear and chloroplast genome genetic diversity in the wild einkorn wheat, *Triticum urartu*, revealed by AFLP and SLP analyses // *Hereditas*. — 2002. — 137. — P. 208—214.
5. Levin D.A. Local differentiation and the breeding structure of plant populations // *Plant Evolutionary Biology* / Eds L.D. Gottlieb, S.K. Jain. — New York, 1998. — P. 305—329.
6. Linhart Y.B., Grant M.C. Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants // *Ann. Rev. Ecol. and System.* — 1996. — 27. — P. 237—277.
7. Hamrick J.L., Allard R.W. Microgeographical variation in allozyme frequencies in *Avena barbata* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 1972. — 69. — P. 2100—2104.
8. Zangerl A.R., Bazzaz F.A. Niche partitioning between two phosphoglucosomerase genotypes in *Amaranthus retroflexus* // *Ecology*. — 1984. — 65. — P. 218—222.
9. Lack A., Kay Q.O.N. Allele frequencies, genetic relationships and heterozygosity in *Polygala vulgaris* populations from contrasting habitats in southern Britain // *Biol. J. Linn. Soc.* — 1988. — 34. — P. 119—147.
10. Van Rossum F., Vekemans X., Meerts P., Gratia E., Lefebvre C. Allozyme variation in relation to ecotypic differentiation and population size in marginal populations of *Silene nutans* // *Heredity*. — 1997. — 78. — P. 552—560.
11. Owuor E.D., Fahima T., Beharav A., Korol A., Nevo E. RAPD divergence caused by microsite natural selection // *Genetica*. — 1999. — 105. — P. 177—192.
12. Schaal B.A. Population structure and local differentiation in *Liatris cylindracea* // *Amer. Natur.* — 1975. — 109. — P. 511—528.
13. Waser N.M. Spatial genetic heterogeneity in a population of the montane perennial herb *Delphinium nelsonii* // *Heredity*. — 1987. — 58. — P. 249—256.
14. Maynard S.J. Sympatric speciation // *Amer. Natur.* — 1966. — 100. — P. 637—650.
15. Dickinson H., Antonovics J. Theoretical considerations of sympatric divergence // *Amer. Natur.* — 1973. — 107. — P. 256—274.
16. Heywood J.S., Levin D.A. Associations between allozyme frequencies and soil characteristics in *Gaillardia pulchella* (Compositae) // *Evolution*. — 1985. — 39. — P. 1076—1086.
17. Mopper S., Mitton J.B., Whitham T.G., Cobb N.S., Christensen K.M. Genetic differentiation and heterozygosity in pinyon pine associated with resistance to herbivory and environmental stress // *Evolution*. — 1991. — 45. — P. 989—999.
18. Dawson I.K., Chalmer K.J., Waugh R., Powell W. Detection and analysis of genetic variation in *Hordeum spontaneum* populations from Israel using RAPD markers // *Mol. Ecol.* — 1993. — 2. — P. 151—159.
19. Latta R.G., Mitton J.B. A comparison of population differentiation across four classes of gene marker in limber analysis pine (*Pinus flexilis* James) // *Genetics*. — 1997. — 146. — P. 1153—1163.
20. Owuor E.D., Fahima T., Beiles A., Korol A., Nevo E. Population genetic response to microsite ecological stress divergence in wild barley, *Hordeum spontaneum* // *Mol. Ecol.* — 1997. — 6. — P. 1177—1187.
21. Pakniyat H., Powell W., Baird E., Handley L.L., Robinson D., Scrimgeour C.M., Nevo E., Hackett C.A., Caligari P.D.S., Forster B.P. AFLP variation in wild barley (*Hordeum spontaneum*) // *Genome*. — 1997. — 40. — P. 332—341.
22. Johnston J.A., Wesselinch R.A., Bouck A.C., Donovan L.A., Arnold M.L. Intimately linked or hardly speaking? The relationship between genotype and environmental gradients in a Louisiana Iris hybrid population // *Mol. Ecol.* — 2001. — 10. — P. 673—681.
23. Welsh J., McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers // *Nucl. Acids. Res.* — 1990. — 18. — P. 7213—7218.
24. Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // *Nucl. Acids Res.* — 1990. — 18, № 22. — P. 6531—6535.
25. Chang R.-Y., O'Donoghue L.S., Bureau T.E. Inter-MITE polymorphisms (IMP): a high throughput transposon-based genome mapping and fingerprinting approach // *Theor. Appl. Genet.* — 2001. — 102. — P. 773—781.
26. Gupta M., Chyi Y.-S., Romero-Severson J., Owen J.L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats // *Theor. Appl. Genet.* — 1994. — 89. — P. 998—1006.

27. Rakoczy-Trojanowska M., Bolibok H. Characteristics and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants // Cell. Mol. Biol. Lett. — 2004. — 9, № 2. — P. 221—238.
28. Hadrys H., Balick M., Schierwater B. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology // Mol. Ecol. — 1992. — 1. — P. 55—63.
29. Lynch M., Milligan B.G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers // Mol. Ecol. — 1994. — 3. — P. 91—99.
30. Feschotte C., Zhang X., Wessler S.R. Miniature inverted-repeat transposable elements and their relationships to established DNA transposons // Mobile DNA / Eds N.L. Craig, R. Craigie, M. Gellert, A.M. Lambowitz. — Washington : ASM Press, 2002. — P. 1147—1157.
31. Feschotte C., Swamy L., Wessler S.R. Genome-wide analysis of mariner-like transposable elements in rice reveals complex relationships with Stowaway MITEs // Genetics. — 2003. — 16. — P. 747—758.
32. Zhang X., Jiang N., Feschotte C., Wessler S. PIF- and Pong-Like Transposable Elements: Distribution, Evolution and Relationship With Tourist-Like Miniature Inverted-Repeat // Transposable Elements Genet. — 2004. — 166. — P. 971—986.
33. Li W.L., Zhang P., Feller J.P. et al. Sequence composition, organization, and evolution of core *Triticeae* genome // Plant J. — 2004. — 40. — P. 500—511.
34. Casacuberta E., Casacuberta J.M., Puigdomenech P., Monfort A. Presence of miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) in the genome of *Arabidopsis thaliana*: characterization of the Emigrant family of elements // Plant J. — 1998. — 16. — P. 79—85.
35. Casacuberta E., Puigdomenech P., Monfort A. Distribution of microsatellites in relation to coding sequences within the *Arabidopsis thaliana* genome // Plant Sci. — 2000. — 157. — P. 97—104.
36. Casacuberta J.M., Santiago N. Plant LTR-retrotransposons and MITEs: control of transposition and impact on the evolution of plant genes and genomes // Gene. — 2003. — 311. — P. 1—11.
37. Belyayev A., Raskina O., Nevo E. Variability of the chromosomal distribution of Ty3-gypsy retransposons in the populations of two wild *Triticum* species // Cytogenet. Gen. Res. — 2005. — 109, N 1/3. — P. 43—49.
38. Маслова И.И., Крайнюк Е.С. Пшеница беотийская (*Triticum boeoticum* Boiss., Poaceae Varnh.) в Байдарской долине (Крым) // Бюл. Никит. бот. сада. — 1989. — Вып. 70. — С. 10—13.
39. Исиков В.П., Гелюта В.П., Попкова Л.Л., Бойко Н.Г., Дорохов Д.Б., Серяпин А.А. Распространение и современное состояние популяций *Triticum boeoticum* Boiss. в Крыму // Укр. бот. журн. — 2005. — 62, № 1. — С. 56—66.
40. Edwards K.J., Johnstone C., Thompson C. A rapid and simple method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis // Nucl. Acids Res. — 1991. — 19. — P. 493—494.
41. Дорохов Д.Б., Клоке Э. Быстрая и экономичная технология RAPD анализа растительных геномов // Генетика. — 1997. — 33. — С. 443—450.
42. Nei M. Genetic distance between populations // Amer. Natur. — 1972. — 106. — P. 283—292.
43. Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1973. — 70. — P. 3321—3323.
44. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // Genetics. — 1978. — 89. — P. 583—590.
45. Manly B.F.J. The statistics of natural selection on animal populations. — London : Chapman and Hall, 1985.
46. Yeh F.C., Rong-Cai Y., Boyle T. 1998. POPGENE VERSION 1.31. Microsoft Windows-based Freeware for Population Genetic Analysis. Quick user guide. University of Alberta, Center for International Forestry Research.
47. Серова А.С., Игнатов А.Н., Дорохов Д.Б. Complex molecular marker system applied for estimation of genetic polymorphism within genera *Aegilops* and *Triticum* // Бюл. Никит. бот. сада. — 2002. — Вып. 85. — С. 14—16.
48. Горюнова С.В., Кочиева Е.З., Чикида Н.Н., Пухальский В.А. RAPD-анализ внутривидовой изменчивости и филогенетических связей видов эгилопса (*Aegilops* L.), содержащих D-геном // Генетика. — 2004. — 40, № 5. — С. 642—651.
49. Ward J.H. Hierarchical grouping to optimize an objective function // Amer. Stat. Ass. J. — 1963. — 56. — P. 236—244.
50. Volis S., Yakubov B., Shulgina I., Ward D., Zur V., Mendlinger S. Tests for adaptive RAPD variation in population genetic structure of wild barley, *Hordeum spontaneum* Koch // Biol. J. Linn. Soc. — 2001. — 74. — P. 289—303.
51. Clarke B. The contribution of ecological genetics to evolutionary theory: detecting the direct effects of natural selection on particular polymorphic loci // Genetics. — 1975. — 79. — P. 101—113.
52. Lewontin R.C., Krakauer J. Distribution of gene frequency as a test of the theory of the selective neutrality of polymorphisms // Genetics. — 1973. — 74. — P. 175—195.
53. McDonald J.H. Detecting natural selection by comparing geographic variation in protein and DNA polymorphisms // Non-Neutral Evolution. Theories and Molecular Data. New York: Chapman and Hall, 1994. — P. 88—100.
54. Beaumont M.A., Nichols R.A. Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure // Proc. Roy. Soc. London. Ser. B. — 1996. — 263. — P. 1619—1626.

Поступила 14.07.06