

Методы оценки генетической гетерогенности популяции

1. Изоферментный анализ

До середины 1960-х годов описание разнообразия признаков в популяциях строилось на изучении фенотипически различимых морфологических признаков. После открытия изоферментов в конце 1950-х годов оценку полиморфности природных популяций постепенно стали проводить на основе *изоферментного метода* – анализа множественных молекулярных форм ферментов (ММФФ).

Термином *множественные молекулярные формы ферментов* обозначают все белки, обладающие одной и той же ферментативной активностью (субстратной специфичностью), выделяемые у особей одного вида.

Начиная с конца 1960-х годов и по настоящее время изоферменты стали широко использоваться для анализа полиморфизма белков в популяциях растений (как естественных, так и культурных), так как они оказались удобными для описания полиморфизма белков в клеточных популяциях отдельных растений.

Если первые популяционные исследования полиморфизма популяций включали изучение видимых признаков, т. е. признаков хорошо различимых глазом, то ММФФ имеют ряд существенных преимуществ перед ними:

1. Изоферменты – это непосредственные продукты активности генов;
2. Между различными полипептидами (продуктами активности аллельных генов) нет отношения доминирования и рецессивности, как это в норме имеет место для любых сложных признаков, каковыми являются морфологические признаки растений. Изоферменты наследуются по кодоминантному принципу.

2. Методы электрофоретического разделения белка

Внедрение в середине 60-х годов метода *гель-электрофореза* для выявления генетически контролируемого полиморфизма по белкам означало переворот в генетике популяций.

Различные белки имеют отличающийся суммарный заряд в силу того, что представлены различными наборами аминокислот в своих последовательностях. Электрофорез использует это физико-химическое свойство белков для разделения их смесей на основе заряда. Если по локусу, кодирующему белок, обнаруживаются аллельные различия, то суммарный заряд полипептида или белка, детерминируемого ими, часто также отличается. Гелевый электрофорез белков позволяет обнаружить такие аллельные различия.

Систему идентификации и паспортизации мировых ГРП на основе электрофоретических спектров запасных белков разработали и внедрили в 1967 г. в ВИРе В. Г. Конарев и др.

В основу системы положен принцип эталонного спектра культуры, который формируется по результатам изучения внутривидовой изменчивости соответствующего маркерного белка в мировой коллекции.

К настоящему времени в виде белковых формул зарегистрировано более 5000 образцов пшеницы, ячменя, овса из коллекции ВИР; составлено 20 каталогов белковых формул, в том числе 7 в электронном виде.

3. Молекулярные методы на основе ДНК-зондов

ДНК-маркеры, или молекулярно-генетические маркеры – полиморфный признак, выявляемый методами молекулярной биологии на уровне нуклеотидной последовательности ДНК для определенного гена или для любого другого участка хромосомы при сравнении

Маркеры на основе ДНК-зондов:

RFLP, или **ПДРФ-маркеры** (от «полиморфизм длин рестрикционных фрагментов»). Оценка полиморфизма длин рестриктных фрагментов ДНК может быть осуществлена разными способами, но наиболее традиционен метод с использованием блот-гибридизации. Этот метод включает в себя выделение ДНК, получение фрагментов рестрикции, их электрофоретическое разделение, перенос на фильтры с последующей гибридизацией специфических ДНК-зондов с полученными фрагментами ДНК.

ДНК-зонд – относительно короткая последовательность клонированной ДНК с определенным уровнем гомологии и способностью гибридизоваться с соответствующим участком геномной ДНК. Комбинации рестриктаз и зондов дают высоко-воспроизводимые полиморфные спектры фрагментов ДНК, специфичные для каждого индивидуума. Различия между последними могут быть обусловлены, например, мутациями, меняющими сайт рестрикции.

VNTR (англ. *Variable Number Tandem Repeat*) – метод, получивший название ДНК-финггерпринта («отпечатки пальцев»).

4. Молекулярные методы на основе полимеразной цепной реакции

Маркеры на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР):

– полиморфизм длин амплифицированных фрагментов (в сайтах рестрикции), или ПДАФ (AFLP),

AFLP (англ. *Amplified Fragment Length Polymorphism*) – технология, представляющая собой комбинацию методов ПДРФ и ПЦР.

– случайно амплифицируемая полиморфная ДНК (RAPD),

RAPD (англ. *Random Amplified Polymorphic DNA*) – полимеразная цепная реакция с использованием единичного короткого (обычно 10-членного) праймера с произвольной нуклеотидной последовательностью. Последовательность праймеров не абсолютно любая, а ограничена значениями GC-состава 40–70 % и сложностью нуклеотидной последовательности 50–100 %.

– микросателлиты (SSR, или STR; с длиной повтора 1–5 пар оснований),

SSR (англ. *Simple Sequence Repeats*) – ПЦР с флангирующими праймерами к короткому мини- или микросателлитному повтору позволяет выявлять маркеры с кодоминантным наследованием и, соответственно, удобен для выявления гетерозигот по данному локусу. Однако одна пара праймеров для флангов в ПЦР позволяет рассматривать полиморфизм только одного локуса.

– однонуклеотидный полиморфизм (SNP).

SNP (англ. *Single Nucleotide Polymorphism*) – отличия последовательности ДНК размером в один нуклеотид (А, Т, G или С) в геноме (или в другой сравниваемой последовательности) представителей одного вида или между гомологичными участками гомологичных хромосом.