

ДНК-МАРКЕРЫ В РАСТЕНИЕВОДСТВЕ

К.Р. КАНУКОВА¹, И.Х. ГАЗАЕВ¹, Л.К. САБАНЧИЕВА¹,
З.И. БОГОТОВА^{1,2}, С.П. АППАЕВ¹

¹ФГБНУ «Федеральный научный центр
«Кабардино-Балкарский научный центр Российской академии наук»
360002, КБР, г. Нальчик, ул. Балкарова, 2
E-mail: kbncran@mail.ru

²ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет
им. Х.М. Бербекова»
360004, КБР, г. Нальчик, ул. Чернышевского, 173
E-mail: yka@kbsu.ru

На этапе становления генетики классические генетические маркеры не нашли широкого применения в селекционной практике. И впоследствии применение белковых маркеров при генетическом анализе растений сходит на нет по причине низкой встречаемости и большого числа недостатков. На смену белковым маркерам приходят молекулярные или ДНК-маркеры, такие признаки (качества), как надежность, информативность, достоверность, воспроизводимость и определяют значительное превосходство молекулярных маркеров перед другими методами исследования. Таким образом, использование молекулярных маркеров становится одним из основных стандартов селекции растений благодаря повсеместному распределению по геному и практической универсальности применения в современной науке.

Статья раскрывает сущность и целесообразность использования актуальных методов анализа с применением ДНК-маркеров в растениеводстве.

Ключевые слова: молекулярные маркеры, генетическая карта, ДНК-маркеры, генетическая паспортизация, RAPD, RFLP, CAPS, AFLP, ISSR, SSR, SNPs, DArT, MAS.

Изучение природного биоразнообразия является одним из важных аспектов в селекции растений, целью которой является определение новых форм для введения их в культуру. Но так как все свойства живых организмов определяются их генотипом, появляется необходимость изучения генетических ресурсов (генетической изменчивости) сельскохозяйственных растений, которое осуществляется с использованием разных методов генетического анализа.

Для оценки генетического разнообразия по фенотипу (совокупность всех признаков организма – морфологические (внешние) признаки (цвет глаз, окраска цветков), анатомические и т.д.) и генотипу (совокупность генов организма) используют маркеры, которые могут обнаружить в них изменчивость.

Маркеры генетического разнообразия делятся на:

- морфологические (фенотипические);
- протеиновые (биохимические);
- цитогенетические;
- маркеры ДНК (молекулярные) (табл. 1).

В России, как и во всем зарубежье, электрофоретический метод по определению полиморфизмов белка является основным для паспортизации с/х растений. Но применение белковых маркеров (как морфологических, так и цитогенетических) при генетическом анализе растений сходит на нет по причине большого числа недостатков и считается устаревшим на современном этапе селекции и генетики. На смену белковым (морфологиче-

ским и цитогенетическим) маркерам приходят ДНК-маркеры, так как методы генетической паспортизации, основанные на них, считаются более перспективными в силу повышенной разрешающей способности, быстроты, простоты и доступности.

Таблица 1

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ, ИХ СВОЙСТВА И ОТЛИЧИТЕЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ [1]

Свойства, отличительная особенность	Маркеры			
	фенотипические	биохимические	молекулярные	цитогенетические
Выявление	Визуально	Прокрашивание в геле посредством различного рода красителей и субстратов	Прокрашивание в геле бромистым этидием, флуоресцентное или радиоактивное мечение	Цитологическое, флуоресцентное или радиоактивное мечение
Уровень проявления	Морфология	Белки (ферменты, белки семян, клеток, тканей), метаболиты (углеводы, сахара и т.п.)	Нуклеиновые кислоты (ДНК, РНК)	Нуклеиновые кислоты (ДНК, РНК), белки (клеток, тканей)
Тип наследования	Доминантный, рецессивный	Доминантный, кодоминантный	Доминантный, кодоминантный	Доминантный
Возможность автоматизации	Нет	Нет	Да	Нет
Распространение в геноме/ покрытие генома	Низкое	Низкое	Высокое	Среднее
Необходимость специализированного оборудования	Нет	Да	Да	Да
Цена	Низкая	Средняя	Высокая	Высокая

ДНК-маркеры по своей сути полиморфны, могут быть выявлены при помощи методов молекулярной биологии для определенных генов и любых других участков хромосом, при сопоставлении отличающихся друг от друга геномов, популяций, пород, сортов и линий. Другими словами, ДНК-маркеры – короткие участки ДНК, расположенные максимально близко к гену (или нескольким генам) в ДНК, привносимый в растение выбранный селекционером признак (многопочатковость, сахаристость и т.д.) при создании новых сортов и гибридов сельскохозяйственных культур.

Признание к ДНК-маркерам пришло после того, как Edwin Southern рассказал о методе определения «специфические последовательности среди ДНК-фрагментов, разделенных гель-электрофорезом» во второй половине XX в. В Европе работы с их применением проводятся слабее, чем в США [2].

Спектр применения ДНК-маркеров довольно широк. Их используют для паспортизаций генотипов, оценки полиморфизма популяций, генетического картирования, филогенетических исследований, диагностики заболеваний и др. Так, технологии выявления молекулярных маркеров становятся одним из основных стандартов селекции растений. Главными преимуществами использования ДНК-маркеров являются точное и быстрое выявление генетического разнообразия популяций, видов, подвидов, составление подробных молекулярных карт генома растений и животных, определение хозяйственно-ценных призна-

ков еще на уровне ДНК. Также ускорению селекционного процесса у растений способствуют маркер-опосредованная селекция (Marker-Assisted Selection, MAS) и геномная селекция GS (Genomic Selection), в основе которых лежит исследование ДНК-маркеров; на основании получаемой генетической информации, паспортизации разрабатывают стратегию сохранения генетической изменчивости и их рационального использования при создании новых сортов культурных растений. Также методы генетической паспортизации применяются в семеноводстве для выявления соответствия семян тому или иному сорту.

Такие признаки (качества), как надежность, информативность, достоверность, воспроизводимость и определяют значительное превосходство молекулярных маркеров над другими методами исследования с применением морфологических и биохимических маркеров. Также одним из преимуществ молекулярного метода анализа является устойчивость результатов к внешним факторам.

Развитие и совершенствование молекулярных маркеров происходит акцентированно на быстроту, простоту и универсальность в использовании, а также на экономичность. Исходя из проведенных исследований сформулированы требования к ДНК-маркерам, включающие в себя комплекс характеристик, которым должны соответствовать ДНК-маркеры:

- высокополиморфность;
- кодоминантность;
- повсеместное распределение по геному;
- нейтральность;
- простота и дешевизна в использовании;
- высокая воспроизводимость;
- возможность обмена результатами между лабораториями [3];
- нейтральность и устойчивость к изменениям внешней среды [4].

Но по причине несоответствия комплексу перечисленных критериев существующих на сегодняшний день молекулярных маркеров возникает необходимость применения нескольких типов ДНК-маркеров при решении тех или иных задач, что приводит к более однозначным и достоверным результатам.

Следует отметить, что разновидность молекулярных маркеров, используемых в растениеводстве, насчитывает несколько десятков. На рисунке 1 представлены наиболее часто используемые ДНК-маркеры с указанием групп и методов их анализа.

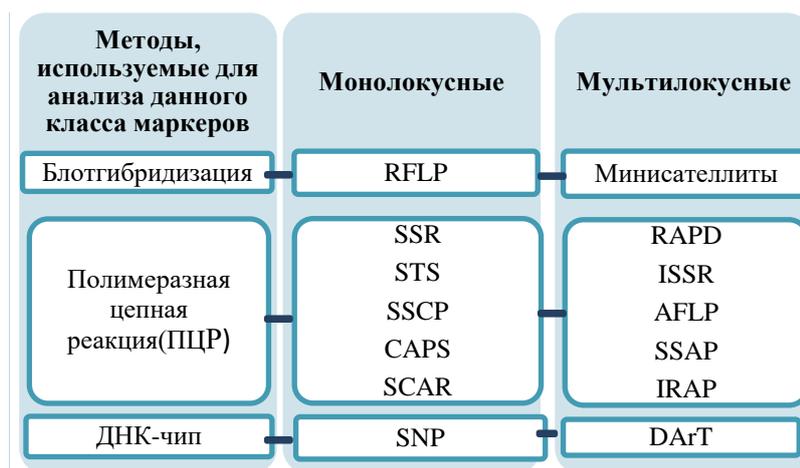


Рис. 1. Распределение ДНК-маркеров по группам и методам анализа

В таблице 2 представлены монолокусные и мультилокусные молекулярные маркеры по принципу актуальности и частоте использования в геномной селекции в растениеводстве по ряду причин.

Таблица 2

КЛАССИФИКАЦИЯ И СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МОНОЛОКУСНЫХ И МУЛЬТИЛОКУСНЫХ ДНК-МАРКЕРОВ И ГОД ИХ ПЕРВОГО УПОМИНАНИЯ В ПУБЛИКАЦИЯХ [5]

Классификация	Монолокусные маркеры	Мультилокусные маркеры
Методы, основанные на блот-гибридизации	RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) – полиморфизм длины рестриционных фрагментов (Botstein et al., 1980)	Минисателлиты (Jeffreys et al., 1985)
Методы, основанные на ПЦР	SSR (Simple Sequence Repeats) – простые повторяющиеся последовательности (микросателлиты) (Tautz, Renz, 1984) STS (Sequence Tagged Site) – нуклеотидные последовательности, характеризующие locus (Olson et al., 1989) SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) – нуклеотидная последовательность, характеризующая амплифицированную область (Paran, Michelmore, 1993) SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) – конформационный полиморфизм одноцепочечной ДНК (Orita et al., 1989) CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) – расщепленные амплифицированные (Konieczny, Ausubel, 1993)	RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) – случайно амплифицированная полиморфная ДНК (Welsh et al., 1990; Williams et al., 1990) ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) – межмикросателлитный полиморфизм (Zietkiewicz et al., 1994) IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) – полиморфизм амплифицированных последовательностей между ретротранспозонами (Kalendar, Schulman, 2006) AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) – полиморфизм длины амплифицированных фрагментов (Vos et al., 1995) SSAP (Sequence-Specific Amplification Polymorphism) – полиморфизм специфично амплифицированных последовательностей (Vaughn et al., 1997)
Методы, основанные на применении ДНК-чипов	SNP (Single-Nucleotide Polymorphism) – однонуклеотидный полиморфизм (Wang et al., 1998)	DarT (Diversity Array Technology) – ДНК-чиповая технология для изучения генетического разнообразия (Jaccoud et al., 2001)
Тип наследования и область применения		
Наследование	Кодоминантный тип	Доминантный тип
Область применения у растений	<ul style="list-style-type: none"> • Картирование генов, хромосом и геномов • Маркирование генов • Выделение нуклеотидных последовательностей генов • Селекция с помощью молекулярных маркеров • Молекулярная паспортизация сортов • Диагностика заболеваний • Исследование генетического разнообразия • Филогенетические исследования 	<ul style="list-style-type: none"> • Филогенетические исследования • Картирование генов геномов (только AFLP, DarT) • Молекулярная паспортизация сортов • Исследование генетического разнообразия

Молекулярные маркеры можно разделить на группы согласно степени выявления уровней внутривидового полиморфизма:

- минимальный (RAPD, RFLP и CAPS);
- умеренный (AFLP);
- сравнительно высокий (ISSR);
- повышенный (SSR, SNPs и DarT) [6].

Таким образом, можно заметить, что из перечисленных выше ДНК-маркеров наиболее высокоперспективными для исследования генетического разнообразия всех живых организмов являются микросателлиты и SNPs.

Рассмотрим вышеперечисленные ДНК-маркеры:

– **RFLP** (англ. Restriction Fragment Length Polymorphism – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов – ПДРФ) – один из первых способов исследования геномной ДНК.

Метод ПДРФ впервые упомянут в 1974 г., когда был использован в качестве генетического маркера при ДНК-идентификации мутации в геноме аденовируса. Но только с 1980 г. началось его широкое применение, чему способствовал выход научной работы Д. Ботштейна совместно с соавторами. В работе приведены итоги исследований по изучению особенностей RFLP, послужившие основой для разработки первых монолокусных генетических маркеров, и показана возможность построения генетических карт с их применением [7]. На этом применение RFLP-маркеров не ограничилось. Их также используют для генетических анализов, оценок генетического разнообразия в популяциях, фингерпринтинга и исследований по хромосомным локализациям генов [8].

RFLP-маркеры способствовали позиционному клонированию генов (map - based gene cloning), что позволило произвести репликацию гена устойчивости к бактерии «*Xanthomonas vesicatoria*» на растениях семейства «*Solanum lycopersicum*» (томаты).

Основоположниками в использовании ДНК-маркеров в селекции были С. Тенсли и Ж. Бекман (1983) [9, 10, 11].

Первой ПДРФ-картой была карта, описывающая геном *Triticum* [6], содержащая в себе в несколько раз больше участков ДНК, и длиннее ранее существовавшей эталонной генетической карты [12]; с помощью ПДРФ-анализа установлена гомология между хромосомами пшеницы (лат. «*Triticum tauschii*») и ячменя (лат. «*Hordeum vulgare*»); создана карта, описывающая геном репы (лат. «*Brassica rapa*») [13]; в 1995 г., после того как Song с соавторами сравнили физическую карту, построенную с помощью гибридизации *in situ* (с лат. - «на месте»), и генетическую карту риса (с лат. - «*Oryza sativa* L.»), основанную на 44 ПДРФ-маркерах, получили результаты, где разница в данных в среднем составила около 6%, и довольно большое расстояние между двумя маркерами на генетической карте по сравнению с физической. Первая работа по маркированию гена устойчивости к тле у плодовых (яблоня) была проделана Roche et al. (1997) и др.

Рассмотрим, что представляет собой метод полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (рис. 2).

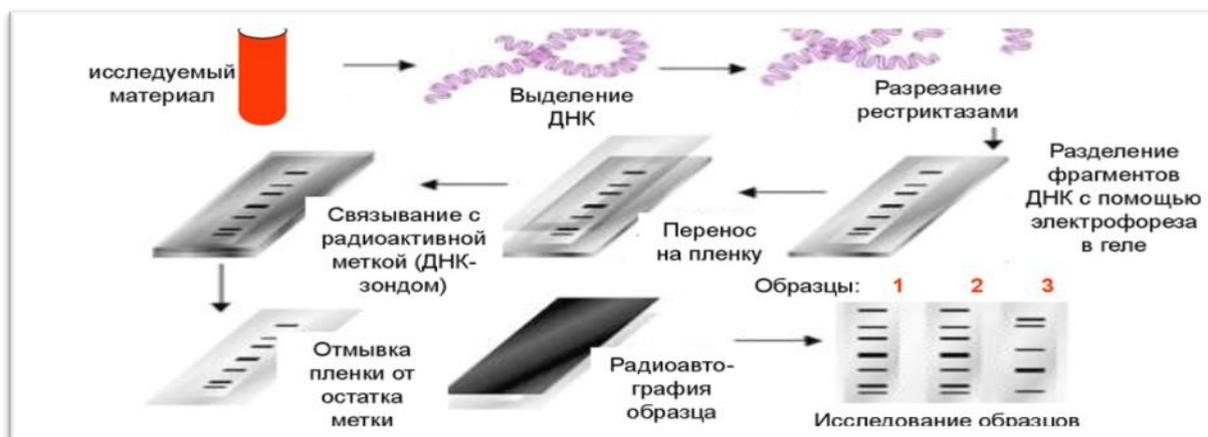


Рис. 2. RFLP (англ. Restriction Fragment Length Polimorphism – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов – ПДРФ)

Анализ ПДРФ проходит следующим образом:

- выделение ДНК из ткани исследуемого материала;
- рестрикция ДНК;
- электрофоретическая детекция и разделение продуктов рестрикции;
- метод Блоттинга по Саузерну – нанесение полученных участков ДНК на мембраны с последующей гибридизацией с меченым зондом;
- анализирование по положению на радиоавтографах [14, 15,16].

RFLP был разработан как первый метод для массового применения. Кроме того, данный метод обладает рядом преимуществ, такими как надежность, возможность проверки в разных лабораториях, кодоминантность, что позволяет различать гомо- и гетерозиготы, не требует информации о нуклеотидной последовательности, высокоэффективен при составлении генетических карт, геномном маркировании некоторых физиологически, морфологически и экологически важных признаков [17, 18].

Однако вместе с тем у ПДРФ также есть и недостатки, из-за которых данный метод используется все реже: необходимость большого количества ДНК; требует больших временных и денежных затрат (при использовании гибридизации по Саузерну); неравномерность распределения ПДРФ-маркеров по геному и др.

– **SSR-маркеры** ((микросателлиты) англ. Simple Sequence Repeats – простые повторяющиеся последовательности) – участки ДНК, состоящие из коротких тандемных повторов (фрагменты генома) длиной 2-6 нуклеотидов.

Первым, кто предложил использовать простые последовательности генома в качестве маркеров, был немецкий исследователь Дитхард Таутц в 1989 г. SSR-маркеры применяют для изучения филогеографии, популяционной структуры, идентификации сортов, определения родительских форм. На сегодняшний день микросателлиты применяют при дифференцировке растений внутри вида, ДНК-идентификации сортов, составлении генетических карт, изучении генетического разнообразия сельскохозяйственных растений, их паспортизации, а также в маркерной селекции. Также они имеются в геномах всех высших организмов.

Выполнен ряд научных работ с использованием полиморфизма SSR-локусов: с большой точностью проведена идентификация изученных образцов сои благодаря обнаруженным в группе из 100 генотипов 26 участкам SSR; были приспособлены для картирования таких культурных растений, как кукуруза (лат. «*Zea mays L.*»), рис (лат. «*Oryza sativa L.*»), ячмень (лат. «*Hordeum vulgare L.*»), соя (лат. «*Glycine max L.*»), арабидопсис (лат. «*Arabidopsis thaliana*») и др.; способствовали построению подробных молекулярно-генетических карт, проведению научных исследований по оценке генетического разнообразия и ДНК-паспортизации сортов, растений родов *Malus* (яблоня) и *Pyrus* (груша) и др.

Благодаря комплексу преимуществ **SSR-маркеры** ((микросателлиты) англ. Simple Sequence Repeats – простые повторяющиеся последовательности) – одни из самых перспективных и пригодных для исследований. К числу положительных свойств SSR-маркеров относятся: кодоминантность, сравнительно легко детектируются, в отличие от других генетических маркеров высокополиморфны, повсеместно распределены по геному, высокая точность, надежность, хорошая воспроизводимость результатов, практичность при выявлении гетерозигот по данному локусу.

Однако у SSR-маркеров есть и недостатки: для подбора специфических праймеров необходимо наличие информации о нуклеотидных последовательностях генома; дороговизна метода (необходимость амплификации, определения нуклеотидной последовательности у произвольных участков ДНК, выявления микросателлитных повторов и определения фланкирующих частей генома исследуемого локуса при конструировании того и или иного праймера).

– **RAPD** (Random Amplified Polymorphic DNA – случайно амплифицированная полиморфная ДНК) [19] – один из первых молекулярных методов, представляющий собой проведение ПЦР (амплификацию) фрагментов ДНК с использованием одного праймера с содержанием небольшого числа произвольных нуклеотидов (около 10). Активное применение

данного метода началось с конца XX века: для оценки полиморфизма среди соматклонов; для выявления межсортовой дифференциации у одного вида растений (лён культурный – лат. «*Linum usitatissimum*»), ирис – лат. «*Iris*»), каламус или ротанг – лат. «*Calamus*»), цитрус – лат. «*Citrus*»), манжетка – лат. «*Alchemilla*») и межсортовых различий и т.д.

Кроме того, на основании RAPD-метода было выявлено генетическое разнообразие сосны и ели, построены генетические карты для некоторых видов растений и т.д.

Преимуществами случайно амплифицированной полиморфной ДНК являются простота его проведения, дешевизна, скорость, знания нуклеотидных последовательностей не требуют, является экспресс-методом для полиморфизма генома ДНК.

На сегодняшний день использование RAPD-метода снизилось по причине ряда недостатков: доминантный тип наследования, что снижает точность анализа, так как невозможно отличить гетерозиготное состояние от гомозиготного; неустойчивость к изменениям условий реакций, следствием чего является снижение воспроизводимости результатов; низкая температура отжига, провоцирующая возникновение ошибок.

– **CAPS** (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences – расщепленные амплифицированные полиморфные последовательности) [19] – до настоящего времени проведено много исследований по изучению CAPS-маркеров в целом, принципа их деятельности, особенностей метода работы и области применения. Одним из первых научных работ, положивших начало использованию CAPS-маркеров, стала публикация с описанием научных исследований, основанных на применении данных маркеров у арабидопсиса. Основными направлениями использования молекулярных маркеров являются: поиск полиморфизма генетических локусов, ответственных за устойчивость к вирусам и болезням, гербицидам; составление генетических карт; изучение строения, функции, экспрессии и регуляции генов; локализация QTL (Quantitative Trait Loci – локусы количественных признаков).

Принцип работы CAPS-метода заключается в прохождении следующих этапов:

- выделения ДНК из исследуемого материала;
- ПЦР-анализ с применением специфического праймера;
- гидролиз ампликона с применением эндонуклеаз рестрикции;
- разъединение участков ДНК электрофорезом в соответствующем геле [3, 20].

Также CAPS-метод можно определить как объединение метода ПЦР с RFLP-методом, с той лишь разницей, что в данном методе проводится ПЦР-амплификация небольшого участка ДНК вместо всего генома.

Следует отметить, что данный метод имеет как положительные, так и отрицательные стороны в области своего применения.

Среди положительных можно выделить следующие: кодоминантный тип наследования; простота в использовании; высокая эффективность CAPS-маркеров в растениеводстве независимо от семейства растений.

К недостаткам метода относятся: менее полиморфны по сравнению с микросателлитными маркерами; дороговизна метода.

– **AFLP** (amplified fragment length polymorphism) – полиморфизм длины амплифицированных фрагментов, разработанный в XX веке. AFLP-анализ осуществляется в три этапа:

- рестрикция геномной ДНК двумя рестриктазами;
- лигирование (сшивание молекул ДНК посредством ферментов ДНК-лигаз) продуктов рестрикции (геномной ДНК) с адаптером;
- амплификация полученных фрагментов с использованием праймеров.

Одним из первых направлений применения AFLP-метода был ДНК-фингерпринтинг (англ. finger – палец и print – печать, «отпечатки пальцев») [21, 22]. Впоследствии проводили ряд научных исследований на основании AFLP-анализа по маркированию локусов, сцепленных с хозяйственно-ценными признаками таких растений, как *Capiscum annuum* L.

(перец стручковый), *Solanum tuberosum* L. (картофель), *Brassica napus* L. (рапс), по изучению популяционной генетики у *Salix alba* L. (ива), установлению генетического разнообразия у *Zéa máys* (кукуруза) и *Glycine max* (соя) и т.д. Также этот способ анализа используют для оценки и изучения самоклональной изменчивости, для геномного картирования, установления генетических полиморфизмов у разных сортов и линий с/х растений и т.д.

AFLP-метод получил широкое распространение благодаря таким положительным качествам, как надежность, стабильность, хорошая воспроизводимость метода, высокая информативность при оценке взаимосвязей между породами и близкими видами, не нуждается в предварительном клонировании и секвенировании ДНК, не требует знания первичной последовательности и специфических праймеров и др.

Также, помимо положительных качеств, у данного метода есть и отрицательные стороны: доминантный тип наследования, метод весьма сложный, дорогой, медленный и неточный.

– **ISSR** (Inter Simple Sequence repeats – межмикросателлитные последовательности) – метод, в котором проводится амплификация между повторами простых последовательностей генома ДНК. ISSR-маркеры были разработаны в качестве альтернативы RAPD-методу, но с той разницей, что выявляемый полиморфизм с их помощью выше и более четко воспроизводим. Так, ISSR-метод основан на клонировании последовательностей, ограниченных двумя микросателлитными повторами в присутствии праймера, комплементарного последовательности данного микросателлита (4-12 единицам повтора) и несущего на одном из концов последовательность из двух-четырёх произвольных нуклеотидов (так называемый «якорь»). Эти праймеры дают копировать участки ДНК, расположенные между двух рядом стоящих микросателлитных последовательностей. В итоге клонируется значительное количество участков, приведенных в электрофореграмме ISSR-фингерпринтингами. Полученные паттерны ПЦР-продуктов в большей степени уникальны для того или иного вида, помимо того они более надежны, чем RAPD-маркеры [16, 23, 24].

ISSR-анализ эффективен в оценке генетического разнообразия культурных растений, нет необходимости амплифицировать и секвенировать фрагменты при подборе того или иного праймера, не требует знаний нуклеотидной последовательности, удобен для генетического анализа. Также преимуществами метода являются дешевизна и простота. Благодаря вышеперечисленным положительным качествам ISSR-маркеры являются наиболее распространенными в настоящее время.

Вместе с тем данный метод имеет и свои минусы: необходимость подбора последовательностей ISSR-праймеров с большей точностью и использования в процессе анализа только «ярких» продуктов ISSR амплификации [18, 25]; доминантность, не позволяющая определить гомо- и гетерозиготность [26]; процесс реамплификации – вторичное копирование, которое увеличивает число ампликонов посредством изменения условий реакции, к примеру, температуры отжига [25].

На основании ISSR-метода было проведено значительное число научных работ: исследование генетического разнообразия вида *L. bienne* Mill (лен двулетний); выявлены генетические различия между близкородственными генотипами растений-регенерантов и определена их принадлежность к соответствующим родительским растениям; ISSR-маркеры (Inter Simple Sequence repeats – межмикросателлитные последовательности) в комплексе с маркерами ДНК-штрихкодирования применяли для восстановления филогенетических взаимоотношений у многих культурных растений.

– **SNP** (Single-Nucleotide Polymorphism – мононуклеотидный полиморфизм) – это мононуклеотидная позиция в геномном ДНК, для которой в популяции встречаются различные вариации последовательности (аллелей) с встречающимся уникальным аллелем не менее 1%: AAAACA и AAAATA – разница в один нуклеотид говорит о существовании двух аллелей (С и Т). Метод широко используется для изучения аллельного полиморфизма, тестирования чистоты семян, анализа гаплотипа и родословных, а также для генотипирования и построения генетических карт [27] и др.

SNP можно детектировать такими методами, как секвенирование, что обходится довольно дорого, создание CAPS-маркера, аллельспецифическая ПЦР в реальном времени, запрограммированная на поиск однонуклеотидных замен, а также при помощи микрочипов (SNP-arrays).

Рассмотрим последний метод (ДНК-чип – минипластинка с нанесенными на нее с заданной последовательностью фрагментами моноцепочечной ДНК), использование которого предполагает три этапа:

- создание ДНК-чипов (или приобретение);
- выделение ДНК, обработка ДНК для дальнейшей гибридизации с ДНК-чипами;
- сбор и анализ результатов [25].

Недостатки и преимущества данного метода.

К основным преимуществам ДНК-чипов относятся: возможность использования сравнительно малого количества исходного материала; надежность; удобство маркеров в использовании благодаря высокой плотности и эволюционной стабильности однонуклеотидных полиморфизмов; высокая информативность; возможность полной автоматизации анализа; подходят для геномной селекции; SNP располагается на или у интересующих в процессе исследований генов; кодоминантный тип наследования.

Недостатки SNP-array: наличие технических трудностей, связанных с выявлением SNP; дороговизна; необходимость знания последовательностей и фланкирующих областей.

Другим маркером, относящимся к маркерным системам на основе микрочипов, является DArT-маркер (Diversity Array Technology – ДНК-чиповой метод исследования генетического полиморфизма) [25].

Представленный выше маркер применяется для мониторинга состава популяций, изучения генетического разнообразия, идентификации сортов, количественных локусов (QTLs) и маркеров для селекции, а также составления генетических карт.

DArT-технология основывается на выявлении полиморфных ДНК фрагментов. Подготовка DArT-чипа происходит следующим образом:

- выделение и подготовка ДНК пробы путем рестрикции ДНК и лигирования;
- разделение полученного материала на непалиморфные и полиморфные фрагменты;
- отбор полиморфных фрагментов посредством их клонирования и трансформации в *E. coli*;
- амплификация полиморфных фрагментов, отобранных для создания генной библиотеки, с последующей окраской синим флуорофором и нанесением на стеклянные диски, в результате чего образуется DArT-чип.

На основании этих чипов осуществляют гибридизацию с подготовленными «ДНК-мишенями» путем геномной репрезентации и меченными зеленым флуорофором. Далее идет сканирование чипов и измерение интенсивности флуоресцентного свечения для каждого маркера.

DArT-технология отличается от SNP тем, что для разработки чипов не требует данных о последовательности генома. По сравнению с AFLP и SSR она является более точной и эффективной.

Однако данный метод не лишен и недостатков. DArT требует применения сложного оборудования, но при этом затраты на проведение анализа относительно невелики.

Несмотря на молодой «возраст», немало научных исследований проведено с применением DArT-чипов.

Научные исследования, проводившиеся в Китае, привели к разработке DArT-чипа для табака, который успешно применялся для филогенетических анализов 267 районированных сортов из Китая и др. стран, а также для составления генетической карты табака.

DArT-маркеры применяются в геномной селекции, привели к разработке чипов для пшеницы и риса и др.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многолетние научные исследования показали, что наиболее результативными в отношении решения проблем, связанных с паспортизацией генотипов, оценкой полиморфизма популяций, генетического картирования, филогенетических исследований, диагностики заболеваний и др., являются ДНК-маркеры.

Из всего многообразия существующих ДНК-маркеров широкое применение получили следующие молекулярные методы анализа: RAPD, RFLP, CAPS, AFLP, ISSR, SSR, SNPs, DArT, пришедшие на смену белковым (морфологическим и цитогенетическим) маркерам, так как они проявили себя более прогрессивными в силу повышенной разрешающей способности, быстроты, простоты и доступности.

Таким образом, можно заключить, что из вышеперечисленных ДНК-маркеров на сегодняшний день наиболее высокоперспективными являются микросателлиты (SSR-маркеры), маркеры, основанные на межмикросателлитных последовательностях (ISSR-маркеры) и ДНК-чипах (SNPs и DArT), и несмотря на их дороговизну более целесообразны в силу их высокой информативности, надежности, воспроизводимости, возможности полной автоматизации анализа, подходят для геномной селекции и исследований генетического разнообразия всех живых организмов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Чесноков Ю.В.* Генетические маркеры: сравнительная классификация молекулярных маркеров // Научно-практический журнал «Овощи России». 2018. № 3 (41). С. 11-15.
2. *Чекалин Н.М.* Генетика устойчивости растений и вирулентности патогенов: Молекулярно-генетические основы устойчивости растений и вирулентности патогенов // Генетические основы селекции зернобобовых культур на устойчивость к патогенам. 2003. С. 128-136.
3. *Омашева М.Е., Аубакирова К.П., Рябушкина Н.А.* Молекулярные маркеры. Причины и последствия ошибок // Биотехнология. Теория и практика. 2013. № 4. С. 20-28.
4. *Конарев В.Г.* Белки растений как генетические маркеры. Москва: Колос, 1983, 320 с.
5. *Хлесткина Е.К.* Молекулярные методы анализа структурно-функциональной организации генов и геномов высших растений // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2011. Том 15. № 4. С. 757-768.
6. *Хлесткина Е.К.* Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013. Т. 17. № 4/2. С. 1044-1054.
7. *Botstein D., White R.L., Scolnick M., Davis R.W.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms // Am. J. Hum. Genet. 1980. V. 32. P. 314-331.
8. *Moore G., Devos K.M., Wang Z., Gale M.D.* Grasses, line up and form a circle // Curr. Biol. 1995. V. 5. P. 737-739.
9. *Beckmann J.S., Soller M.* Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs // Theor. Appl. Genet. 1983. V. 67. P. 35-43.
10. *Burr B., Evola S.V., Burr F.A., Beckmann J.S.* The application of restriction fragment length polymorphism to plant breeding // Genetic Engineering. N.Y.: Plenum Press. 1983. P. 45-59.
11. *Tanksley S.D.* Molecular markers in plant breeding // Plant Mol. Biol. Rep. 1983. V. 1. P. 3-8.
12. *Рубель И.Э., Пантелеев С.В., Головченко Л.А., Дишук Н.Г., Константинов А.В.* Молекулярно-генетическая идентификация фитопатогенов некоторых цветочных растений в насаждениях Беларуси. Роль ботанических садов и дендрариев в сохранении, изучении и устойчивом использовании разнообразия растительного мира // Материалы Международной научной конференции, посвященной 85-летию Центрального ботанического сада НАН Беларуси. Минск: Медисонт, 2017. С. 414-418.
13. *Song Y.C., Gustafson J.P.* The physical location of 14 RFLP markers in rice (*Oryza sativa* L.) // Theor. Appl. Genet. 1995. V. 90. P. 113-119.
14. *Льюин Б.* Гены. М.: Мир, 1987, 544 с.

15. Чан В.– Т.В. Гибридизация нуклеиновых кислот // Молекулярная клиническая диагностика. М.: Мир, 1999. С. 375-394.
16. Матвеева Т.В., Павлова О.А., Богомаз Д.И., Демкович А.Е., Лутова Л.А. Молекулярные маркеры для видоидентификации и филогенетики растений // Экологическая генетика. Том IX. № 1. 2011. С. 32-43.
17. Кармен де Висенте М., Фултон Т. Использование технологии молекулярных маркеров в изучении генетического разнообразия растений: учебный модуль // Международный институт генетических ресурсов растений (IPGRI) и Институт разнообразия геномов (IGD) Корнельского университета. 2003. 372 с.
18. Календарь Р.Н., Глазко В.И. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение // Физиология и биохимия культ. растений. 2002. Т. 34. № 4. 19 с.
19. Кобозева Е.В. Видовая специфичность и таксономические взаимоотношения видов StY-геномной группы рода *Elymus* L. азиатской России: дисс. ... канд. биол. наук. Новосибирск, 2014.
20. Шавруков Ю.Н. CAPS-маркеры в биологии растений // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015. 19(2): С. 205-213.
21. Zabeau M., Vos P. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting // European Patent Office, publication 0 534 858 A1, 1993. bulletin 93/13;
22. Jo K.-R., Arens M., Kim T.-Y., Jongsma M.A., Visser R.G.F., Jacobsen E., Vossen H.J. Mapping of the *S. demissum* late blight resistance gene R8 to a new locus on chromosome IX // Theor Appl Genet. 2011. Vol. 123. P. 1331-1340.
23. 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 // Theoret. Appl. Genet. 1994. Vol. 89. P. 998-1006.
24. Боронникова С.В. Молекулярное маркирование и генетическая паспортизация ресурсных и редких видов растений с целью оптимизации сохранения их генофондов // Аграрный вестник Урала. 2009. Т. 2, С. 57-59.
25. Сухарева А.С., Кулуев Б.Р. ДНК-маркеры для генетического анализа сортов культурных растений // Биомика. 2018. Т. 10, № 1. С. 69-84.
26. Вдовиченко Л.Д., Глазко В.И. Генетическая паспортизация сортов пшеницы с использованием ISSR-PCR маркеров // Сельскохозяйственная биология. 2007. № 3. С. 33-37.
27. Eckert A.J. High-throughput genotyping and mapping of single nucleotide polymorphisms in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) // Tree Genetics & Genomes. 2009. Vol. 5(1). P. 225-234.

REFERENCES

1. Chesnokov Yu.V. *Geneticheskiye markery: sravnitel'naya klassifikatsiya molekulyarnykh markerov* [Genetic Markers: comparative classification of molecular markers] // Scientific and Practical Journal of Vegetables of Russia. 2018. № 3 (41). P. 11-15.
2. Chekalin N.M. *Genetika ustoychivosti rasteniy i virulentnosti patogenov: Molekulyarno-geneticheskiye osnovy ustoychivosti rasteniy i virulentnosti patogenov* [Genetics of plant resistance and virulence of pathogens: Molecular genetic basis of plant resistance and virulence of pathogens] // Genetic basis of legumes breeding for resistance to pathogens. 2003. Pp. 128-136.
3. Omasheva M.E., Aubakirova K.P., Rjabushkina N.A. *Molekuljarnye markery. Prichiny i posledstviya oshibok* [Molecular markers. Causes and consequences of errors] // *Biotekhnologiya. Teoriya i praktika* [Biotechnology. Theory and practice]. 2013. No. 4. P. 20-28.
4. Konarev V.G. *Belki rasteniy kak geneticheskiye markery* [Plant proteins as genetic markers] // V.G. Konarev-Moscow: Kolos. 1983, 320 p.
5. Khlestkina E.K. *Molekulyarnyye metody analiza strukturno-funktsional'noy organizatsii genov i genomov vysshikh rasteniy* [Molecular methods for analysis of structural and functional organization of high plants genes and genomes] // Vavilov Journal of Genetics and Selection, 2011. Volume 15. № 4. Pp. 577-768.

6. Khlestkina E.K. *Molekulyarnyye markery v geneticheskikh issledovaniyakh i v seleksii* [Molecular markers in genetic studies and breeding] // Russian Journal of Genetics: Applied Research. 2014. T. 4. № 3. P. 236-244.
7. Botstein D., White R.L., Scolnick M., Davis R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms // *Am. J. Hum. Genet.* 1980. V. 32. P. 314-331.
8. Moore G., Devos K.M., Wang Z., Gale M.D. Grasses, line up and form a circle // *Curr. Biol.* 1995. V. 5. P. 737-739.
9. Beckmann J.S., Soller M. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs // *Theor. Appl. Genet.* 1983. V. 67. P. 35-43.
10. Burr B., Evola S.V., Burr F.A., Beckmann J.S. The application of restriction fragment length polymorphism to plant breeding // Genetic Engineering. N.Y.: Plenum Press. 1983. P. 45-59.
11. Tanksley S.D. Molecular markers in plant breeding // *Plant Mol. Biol. Rep.* 1983. V. 1. P. 3-8.
12. Rubel I.E., Pantelev S.V., Golovchenko L.A., Dishuk N.G., Konstantinov A.V. *Molekulyarno-geneticheskaya identifikatsiya fitopatogenov nekotorykh tsvetochnykh rasteniy v nasa-zhdeniyakh Belarus. Rol' botanicheskikh sadov i dendrariyev v sokhranenii, izuchenii i ustoychivom ispol'zovanii raznoobraziya rastitel'nogo mira* [Molecular genetic identification phytopathogens of some flowering plants in Belarus, The role of botanical gardens and arboretums in the conservation, study and sustainable use of plant diversity] // *Materialy Mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii, posvyashchennoy 85-letiyu Tsentral'nogo botanicheskogo sada NAN Belarusi* [Materials of the International scientific conference dedicated to the 85th anniversary of the Central Botanical Garden of the NAS of Belarus]. Minsk: Medisont, 2017. P. 414-418.
13. Song Y.C., Gustafson J.P. The physical location of 14 RFLP markers in rice (*Oryza sativa* L.) // *Theor. Appl. Genet.* 1995. V. 90. P. 113-119.
14. Lewin B. *Geny* [Genes]. M.: Mir? 1987. 544 p.
15. Chan V.-T.V. *Gibridizatsiya nukleinykh kislot* [Hybridization of nucleic acids] // *Molekulyarnaya klinicheskaya diagnostika* [Molecular clinical diagnostics]. M.: Mir, 1999. P. 375-394.
16. Matveeva T.V., Pavlova O.A., Bogomaz D.I., Demkovich A.E., Lutova L.A. *Molekulyarnyye markery dlya vidoidentifikatsii i filogenetiki rasteniy* [Molecular markers for species identification and plant phylogenetics] // *Ecological genetics*. 2011. Volume IX. No. 1. Pp. 32-43.
17. Karmen de Visente M., Fulton T. *Ispol'zovanie tehnologii molekuljarnykh markerov v izuchenii geneticheskogo raznoobraziya rasteniy: training module* [Use of molecular marker technology in the study of plant genetic diversity: a training module] // *Mezhdunarodnyy institut geneticheskikh resursov rasteniy (IPGRI) i Institut raznoobraziya genomov (IGD) Kornel'skogo Universiteta* [International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) and Institute for Diversity of Genomes (IGD) Cornell University]. 2003. 372 p.
18. Kalendar' R. N., Glazko V.I. *Tipy molekuljarno-geneticheskikh markerov i ih primeneniye* [Types of molecular genetic markers and their application] // *Physiology and Biochemistry Plants*. 2002. V. 34. № 4. 19 p.
19. Kobozeva E.V. *Vidovaya spetsifichnost' i taksonomicheskiye vzaimootnosheniya vidov StY-genomnoy gruppy roda Elymus L. aziatskoy Rossii: diss. ... kand. biol. nauk* [Thesis for the degree of candidate of biological sciences, Species specificity and taxonomic relationships of species of the StY-genomic group of the genus Elymus L. of Asian Russia]. Novosibirsk, 2014.
20. Shavrukov Yu.N. *CAPS-markery v biologii rasteniy* [CAPS markers in plant biology] // *Vavilovsky journal genetics and selection*/ 2015. 19 (2). P. 205-213.
21. Zabeau M., Vos P. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting // European Patent Office. publication 0 534 858 A1, 1993. bulletin 93/13.
22. Jo K.-R., Arens M., Kim T.-Y., Jongsma M.A., Visser R.G.F., Jacobsen E., Vossen H.J., Mapping of the *S. demissum* late blight resistance gene R8 to a new locus on chromosome IX // *Theor Appl Genet.* 2011. Vol. 123. P. 1331-1340.
23. 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 // *Theoret. Appl. Genet.* 1994. Vol. 89. P. 998-1006.

24. Boronnikova S.V. *Molekulyarnoye markirovaniye i geneticheskaya pasportizatsiya resursnykh i redkikh vidov rasteniy s tsel'yu optimizatsii sokhraneniya ikh genofondov* [Molecular labeling and genetic certification of resource and rare plant species in order to optimize the conservation of their gene pools] // *Agrarnyy vestnik Urala*. 2009. V. 2. P. 57-59.

25. Sukhareva A.S., Kuluyev B.R. *DNK-markery dlya geneticheskogo analiza sortov kul'turnykh rasteniy* [DNA markers for genetic analysis of cultural plant varieties] // *Biomika*. 2018. Vol. 10. № 1. 69-84.

26. Vdovichenko L.D., Glazko V.I. *Geneticheskaja pasportizacija sortov pshenicy s ispol'zovaniem ISSR-PCR markerov* [Genetic certification of wheat varieties using ISSR-PCR markers] // *Agricultural Biology*. 2007. № 3. P. 33-37.

27. Eckert A.J. High-throughput genotyping and mapping of single nucleotide polymorphisms in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) // *Tree Genetics & Genomes*, 2009, Vol. 5(1). P. 225-234.

DNA MARKERS IN CROP PRODUCTION

**K.R. KANUKOVA¹, I.H. GAZAEV¹, L.K. SABANCHIEVA¹
Z.I. BOGOTOVA^{1,2}, S.P. APPAEV¹**

¹FSBSI " Federal scientific center

"Kabardin-Balkar scientific center of the Russian academy of sciences"

360002, KBR, Nalchik, 2 Balkarova st.

E-mail: lab.msb@mail.ru

² FSBEI HE «Kabardino-Balkar state university named after H. M. Berbekov»

360004, KBR, Nalchik, 173 Chernyshevsky st.

E-mail: yka@kbsu.ru

At the stage of genetics, the use of classical genetic markers did not find widespread use in breeding practice. As a consequence, the use of protein markers in the genetic analysis of plants comes to naught, due to low occurrence and a large number of disadvantages. Protein markers are replaced by molecular or DNA markers, such traits (qualities) as reliability, information content, reliability, reproducibility and determine the significant superiority of molecular markers over other research methods. Thus, the use of molecular markers is becoming one of the main standards for plant breeding, due to the ubiquitous distribution across the genome and the practical universality of application in modern science.

The article reveals the essence and expediency of applying current analysis methods using DNA markers in crop production.

Keywords: molecular markers, genetic map, DNA markers, genetic certification, RAPD, RFLP, CAPS, AFLP, ISSR, SSR, SNPs, DArT, MAS.

Работа поступила 25.11.2019 г.