**Фрагментный анализ.**

Умение точно и эффективно определять видовую принадлежность исследуемых организмов очень актуально в эколого-генетических исследованиях. Вопросы эффективной идентификации видов различных организмов, а также отслеживания их филогенетических отношений вызывали интерес на всем протяжении развития биологической науки. Возможность отличать представителей близких видов друг от друга может быть осложнена высоким полиморфизмом внутри каждого из видов, или напротив высоким межвидовым морфологическим сходством (как в случае видов-двойников). В то же время важность данной процедуры не вызывает сомнений (Матвеева и др., 2010).

Первоначально в качестве генетических маркеров использовались морфологические (фенотипические) признаки, например с использованием маркеров этого типа построена первая генетическая карта *Drosophilla melanogaster*. Однако количество информативных маркеров этого типа ограниченно. К тому же фенотипические признаки могут иметь сложный характер наследования и часто зависят от условий внешней среды (Сулимова, 2004).

В последние десятилетия с введением в генетику растений и животных молекулярных методов исследования появилось представление о молекулярно-генетических механизмах, лежащих в основе наследования и формирования полезных признаков у различных организмов. Были составлены хромосомные карты наиболее важных сельскохозяйственных культур с нанесенными на них молекулярными маркерами и генами. Произошло внедрение молекулярных методов в селекционно-генетические исследования, возникло понятие молекулярной паспортизации сортов, а также благодаря информативным генетическим маркерам стало возможным создание новых информативных тест-систем позволяющих анализировать генетический полиморфизм на уровне генов (белковый полиморфизм) и на уровне генетического материала клетки (полиморфизм ДНК). Помимо очевидного практического значения примене­ние молекулярных методов позволило существенно расширить и фундаментальные исследования в области генетики и эволюции организмов (Хлесткина, 2011).

**Задачи, решаемые с использованием методов Фрагментного Анализа:**

1. Характеристика генетической изменчивости
2. Изучение уровня и структуры генетического разнообразия популяций (наличие в популяциях разных аллелей генов)
3. Идентификация сортов растений и пород животных
4. Оценка генеалогических связей
5. Поиск молекулярно-генетических маркеров, ассоциированных с желательными признаками

В настоящее время данные о различных типах молекулярно-генетических маркеров у растений и животных классифицируют следующим образом: **Биохимические маркеры и маркеры ДНК.**

**Биохимические маркеры** – это маркеры, созданные на основе белкового полиморфизма. Использование нескольких сотен биохимических маркеров позволило оценить уровень генетического полиморфизма более чем у 2000 видов (от микроорганизмов до человека) и разработать основные положения популяционной генетики. Но в результате исследований выяснились ограничения в применении данного типа маркеров. Прежде всего, это то, что анализ белков позволяет исследовать полиморфизм только белок кодирующих последовательностей и только у экспрессирующихся генов. Учитывая, что данные последовательности у высших эукариот составляют около 1% генома, получается, что основная часть генома ускользает от внимания исследователей. При этом из анализа исключаются такие функционально-значимые участки, как промоторные области, различные сайты регуляции, расположенные в интронах, нетранслируемых областях генов, а также вне генов, часто на значительном расстоянии от кодирующей последовательности (Сулимова, 2004).

Более перспективно использование в качестве маркерных систем полиморфных нуклеотидных последовательностей ДНК, позволяющих тестировать генетический полиморфизм непосредственно на уровне генов, а не на уровне их продуктов. Данная маркерная система дает возможность использовать для анализа любые ткани и органы, не зависимо от стадии развития организма.

Маркеры ДНК или молекулярные маркеры представляют собой генетические маркеры, позволяющие анализировать организм на уровне ДНК. К ним применимы термины классической генетики, такие как локус, аллель, доминантный и кодоминантный тип наследования. Аллели маркерных локусов представляют собой различные формы (нуклеотидные после­довательности, отличающиеся по длине и/или по нуклеотидным заменам) одного и того же маркера, расположенные в одинаковых участках (локусах) гомологичных хромосом. Если метод анализа маркера позволяет выявлять оба аллеля, говорят о кодоминантном типе наследования данного маркера, если выявляется только один аллель – о доминантном наследовании (Хлесткина, 2011).

ДНК маркеры условно можно разделить на три группы: маркеры, основанные на блот-гибридизации, маркеры, основанные на ПЦР и маркеры, основанные на ДНК-чипах. Сегодня я остановлюсь подробней на маркерах, основанных на ПЦР:

* RAPD маркеры – маркеры получающиеся в результате случайной амплификации ДНК (Williams et al, 1990).
* ISSR маркеры – маркеры основанные на межмикросателитных последовательностях (Zietkiewicz et al, 1994).
* AFLP маркеры – маркеры полиморфизма длин амплифицированных фрагментов ДНК (Vos et al., 1995).
* SSAP маркеры – маркеры полиморфизма специфично амплифицированных последовательностей (Waugh et al., 1997).
* IRAP маркеры – маркеры полиморфизма амплифицированных последовательностей между ретротранспозонами (Kalendar, Shulman, 2006).

Рассмотрим первые три из пяти методов представленных на слайде, которые будет возможно провести на базе организующемся в нашем институте ЦКП «молекулярная биология».

**RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA**

RAPD анализ включает в себя проведение полимеразной цепной реакции с использованием одного декануклеотидного праймера с произвольной нуклеотидной последовательностью. Продукты RAPD анализа образуется в результате амплификации фрагмента геномной ДНК, фланкированного инвертированной последовательностью данного праймера.

Свойства:

* Высокая чувствительность к изменениям условий реакций.
* Достаточно низкая температура отжига (37С) - (увеличена вероятность образования продуктов амплификации с большим количеством неспаренных оснований).
* RAPD маркеры ведут себя как доминантные и их гетерозиготное состояние на отличается от гомозиготного, поэтому снижается точность оценки при популяционном анализе и при идентификации генетических ресурсов в сравнении с кодоминантными маркерами.
* Низкая воспроизводимость результатов ПЦР.
* Для повышения достоверности необходима большая выборка.

Но все же RAPD анализ может служить своеобразным экспресс - методом выявления генетического полиморфизма, что особенно актуально для малоизученных таксономических групп, а также как источник уникальных локус – специфичных маркеров.

Диагностические возможности RAPD-технологии успешно проиллюстрированы на многочисленных примерах описания генетического разнообразия микроорганизмов, высших растений, беспозвоночных и позвоночных животных.

**Примеры:….**

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ RAPD МАРКЕРОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПОРОД БЫКОВ NELORE СПОСОБНЫХ К РАННЕЙ РЕПРОДУКТИВНОЙ АКТИВНОСТИ.**

Маркеры RAPD анализа использовались авторами работы (Alves et al., 2005) для того, чтобы идентифицировать животных с ранним и поздним репродуктивным созреванием. Авторами в исследовании использовались 320 праймеров и только 38 из них давали полиморфные участки. Всего праймеры показали на электрофорезе 443 хорошо различимых и воспроизводимых полосы, из которых 174 были полиморфны, а 269 мономорфны. Построенные на основании этого дендрограммы, позволили дифференцировать обе группы животных и по внешним признакам(Alves et al., 2005).

**ФЕНОТИПИЧЕСКОЕ И ГЕНОТИПИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ *LATHYRUS SATIVUS* L. ИЗ КОЛЛЕКЦИИ ВИР**.

Авторы работы, используя RAPD маркеры выявли внутривидовой полиморфизм чины посевной по генотипу. Использование RAPD-анализа позволило классифицировать изученные образцы на внутривидовые группы *L. sativus*, соответствующие эколого-географической дифференциации вида и его эволюции как культуры. На примере данной работы можно заключить, что RAPD-маркирование может быть полезным для выявления сходных экотипов. Определение коэффициента генетической оригинальности образцов показало, что наряду с наличием в коллекции генотипов со стандартным для культуры набором аллелей существуют образцы с редко встречающимися аллелями, которые могут оказаться полезными для селекции (Бурляева, Вишнякова, 2010)

**ISSR – Inter Simple Sequence Repeat**

При ISSR анализе также как и в RAPD используется один или несколько праймеров длиной 15-24 нуклеотида. Праймеры комплементарны повторяющимся участкам генома, таким как микросателлиты. Микросателлитная ДНК – ДНК из коротких тандемных повторов длиной от 1 до 6 пар оснований. Используются как молекулярные маркеры в определении родства, принадлежности к конкретной популяции, для исследования гибридизации. Микросателлиты характеризуются высокой скоростью изменения последовательностей, обусловленной «проскальзыванием» при репликации ДНК и точечными мутациями.

.

 В данном случае праймеры состоят из тандемных коротких 2-4 нуклеотидных повторов и одного селективного нуклеотида на 3’- конце праймера. Таким образом, продукты ISSR – амплификации содержат на флангах инвертированную микросателлитную последовательность праймера.

Выявляемый полиморфизм с использованием праймеров ISSR более четко воспроизводим, чем в RAPD.

В геномах растений и животных количество **микросателлитных повторов** очень велико, что делает этот метод удобным для генетического анализа. Микросателлитные последовательности окружают многие гены и могут использоваться как якорные последовательности к этим генам.

Свойства:

* Доминантный тип наследования.
* Относительно высокая точность и улучшенная воспроизводимость по сравнению с RAPD в связи с большей длиной праймера и более ысокой температурой отжига.
* Однако локализация в геноме продуктов амплификации, так же как и функция, остаются неизвестными

**Примеры:….**

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НА ОСНОВЕ ISSR И АНАЛИЗ ЛЕТУЧИХ СОЕДИНЕНИЙ ИЗ ЛИСТЬЕВ ПИТТОСПОРУМА ВОЛНИСТОГО, КУЛЬТИВИРУЕМОГО НА АРХЕПЕЛАГЕ АЗОРСКИХ ОСТРОВОВ (ПОРТУГАЛИЯ).**

Коллективом авторов (Mendes et all, 2011) проведена корреляция между генетической изменчивостью 123 образцов *Pittosporum undulatum* с архипелага Азорских островов определенной на основе ISSR анализа и содержанием летучих соединений из листовой пластинки. Корреляции не обнаружено. Молекулярный анализ, с использованием ISSR маркеров ясно показал, что образцы *P. undulatum* генетически полиморфны, хотя и были некоторые доказательства, тому, что образцы сгруппированы в основном согласно их месту произрастания, все же часть из них не подчинялась данному выводу, вероятно из-за недавней колонизации и недостаточной географической изоляции.

**ISSR МАРКЕРЫ, КАК НОВЫЕ МАРКЕРЫ ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ И УСТАНОВЛЕНИЯ ЭВОЛЮЦИОННЫХ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ СРЕДИ ФИТОПЛАНКТОНА.**

Идентификация фитопланктона, основанная на морфологических характеристиках (световой и электронной микроскопии), требует много времени и сопровождается определенными сложностями. Авторы поставили перед собой цель - оценить возможность использования ISSR маркеров для оценки генетического разнообразия между 12-ю культивируемыми линиями из 4 родов (6, 4, 1 и 1 Alexandrium, Skeletonema, Pseudonitzschia и Tetraselmis родов соответственно). Маркеры, полученные на основе ISSR анализа ДНК фитопланктона, оказались подходящими для того, чтобы охарактеризовать генетическое разнообразие, что в свою очередь позволило авторам рассматривать их как новое средство для идентификации фитопланктона. Также данные ISSR анализа позволили изучить генетические отношения среди большого количества видов и родов в сравнении с предыдущими результатами, полученными на основе морфологических данных (Bornet, et all., 2004).

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ISSR-АНАЛИЗА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ И ПАСПОРТИЗАЦИИ РАСТЕНИЙ В КОЛЛЕКЦИЯХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ БАНКОВ IN VITRO.**

Проведенный ISSR-анализ позволил авторам (Ветчинкина, Шанцер, 2010) изучить генетическую изменчивость исследуемых образцов на межвидовом и популяционном уровне. Помимо видоспецифичных маркеров в ISSR-спектрах были обнаружены уникальные полиморфные ДНК-фрагменты, присущие только отдельным популяциям на уровне вида. Выявленные в ходе данной работы специфичные «видовые» и «популяционные» полиморфные ISSR-маркеры позволяют использовать полученные данные в дальнейших исследованиях по разработке генетической паспортизации коллекций *in vitro* редких и исчезающих видов растений с использованием существующих современных методик. Предложенные генетические паспорта позволяют идентифицировать принадлежность объекта не только к роду (виду), но и к группе популяций, и к конкретной популяции, что дает возможность использовать их в качестве основы для дальнейших всесторонних исследований по молекулярному маркированию на популяционном уровне (Ветчинкина, Шанцер, 2010).

 **AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism**

AFLP анализ – сложный метод анализа, состоящий из нескольких этапов. В анализе используется праймер с искусственно добавленной последовательностью.

1. Геномная ДНК рестрицируется двумя рестриктазами (EcoRI и MseI) с образованием фрагментов с выступающими 3’ – концами.
2. Рестрицированная геномная ДНК легируется с адаптером, содержащим «липкие» концы для данных рестрикционных сайтов.
3. Далее проводятся две последовательные ПЦР: В первой ПЦР используются праймеры полностью комплементарные адаптерам EcoRI и MseI, в результате чего образуется большое количество продуктов амплификации между адаптерами EcoRI и MseI, которые невозможно дифференцировать с помощью электрофореза. Поэтому во второй ПЦР праймеры с адаптерами EcoRI и MseI содержат на 3’ – конце дополнительные и некомплементарные адаптерам основания (от 1 до 3) для селективной амплификации.
4. Разделение фрагментов ДНК проводят в полиакриламидном геле с радиоктивной или с флуорисцентной меткой.

Получаемый фингенрпринт ДНК обычно высоко полиморфен и как правило хорошо воспроизводим.

Свойства:

* Полиморфизм AFLP выше, чем RAPD и ISSR.
* Этот метод позволяет определять генетические изменения, вызванные точечными мутациями в сайтах рестрикции или в участках отжига праймеров (присутствие или отсутствие продукта амплификации в спектре) и небольшими вставками и (или) делециями внутри рестрикционного фрагмента (изменение размера полосы в спектре).
* Молекулярно генетические маркеры легко картируются на хромасомах.

**Примеры:….**

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ И ФИЛОГЕОГРАФИЯ СМОЛЕВКИ БЕСТЕБЕЛЬНОЙ *SILENE ACAULIS* (L.) JAC Q. (CARYOPHYLLACEAE) НА СЕВЕРЕ ЕВРОПЫ И АРХИПЕЛАГЕ ШПИЦБЕРГЕН.**

В данной работе авторы ставили своей целью изучить уровень и структуру генетического разнообразия *Silene acaulis* на европейском Севере c использованием мультилокусных маркеров AFLP, а также выявить географические территории, послужившие возможными источниками заселения этим видом архипелага Шпицберген. Кроме того, сравнение северо- и южно-европейских популяций послужило материалом для оценки гипотезы Abbott et al. (1995) о происхождении североевропейских популяций смолевки бесстебельной (Михайлова и др., 2010).

С помощью мультилокусных маркеров AFLP была изучена молекулярная изменчивость в 49 популяциях *Silene acaulis*. Авторами получены данные в пользу послеледниковой колонизации севера из рефугиумов, расположенных в горных районах юга Европы. Большинство североевропейских популяций характеризуются низким уровнем генетического разнообразия и слабо выраженной генетической структурой, по сравнению с южными монтанными популяциями. Колонизация *Silene acaulis* высокоарктического архипелага Шпицберген осуществлялась из разных источников, среди которых наиболее значимым была восточная Гренландия (Михайлова и др., 2010).

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ AFLP АНАЛИЗА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОРОНЦА КИСТИВИДНОГО (*ACTAEA RACEMOSA*).**

Авторы данной работы (Nyree et all,. 2002) ставили перед собой следующую задачу, можно ли использовать метод AFLP для идентификации воронца кистевидного от трех других близко родственных ему видов совместно с ним прорастающих, а также проверить уже имеющихся препараты на его основе на чистоту сырья.

Из 262 полученных маркеров AFLP только один единственный маркер был идентифицирован для *Actaea racemosa*. В то время как для трех близкородственных видов *A. pachypoda, A. cordifolia, A. podocarpa* было идентифицировано 2, 6 и 8 маркеров соответственно. Анализ образцов показал, что данный метод (AFLP), пригоден для видовой идентификации растения *Actaea racemosa.* Два коммерческих препарата воронца кистевидного также были проанализированы по маркерам AFLP, и показали содержание только травы *Actaea racemosa*. Данный результат показывает, что AFLP – маркеры, являются пригодными для качественного контроля растительной добавки к пище (Nyree et all,. 2002).

***Таким образом, в настоящее время молекулярные маркеры активно используются для решения различных вопросов, связанных с определением видовой принадлежности, выяснения степени родства различных групп организмов, их генетического полиморфизма и филогеографии, а также в практических целях для обнаружения того или иного полезного признака.***