

© Т. В. Матвеева¹,
О. А. Павлова¹, Д. И. Богомаз¹,
А. Е. Демкович², Л. А. Лутова¹

¹ Санкт-Петербургский
государственный университет,
кафедра генетики и селекции,
Санкт-Петербург, Россия

² Донецкий ботанический сад
НАН Украины, Донецк, Украина

✿ В обзоре обобщена информация по использованию молекулярных маркеров для целей видоидентификации и филогенетики растений: обсуждаются достоинства и недостатки основных маркеров, представляющих собой результаты секвенирования таксономически значимых хлоропластных и ядерных районов ДНК; охарактеризованы маркеры, основанные на полиморфизме продуктов ПЦР и/или рестрикции, используемые как вспомогательные в филогенетических исследованиях.

✿ **Ключевые слова:** молекулярные маркеры; растения; ДНК-штрихкод; ДНК-фингерпринтинг.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ ДЛЯ ВИДОИДЕНТИФИКАЦИИ И ФИЛОГЕНЕТИКИ РАСТЕНИЙ

ВВЕДЕНИЕ

Вопросы эффективной идентификации видов растений, 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.

По мнению А. Л. Тахтаджяна (1974): «Вид представляет собой важнейшую таксономическую категорию не только для систематики, но и для всей биологии вообще. Каждое растение, с которым имеет дело исследователь, должно быть определено с точностью до вида, а во многих случаях даже точнее. Не меньшая точность требуется при хозяйственном или медицинском использовании растений, например, в лесном хозяйстве и при сборе лекарственных растений. К сожалению, вид, как, впрочем, и все другие таксономические категории, с трудом поддается сколько-нибудь точному логическому определению. Очень трудно, в частности, дать такое определение вида, которое одинаково хорошо подходило бы как к растениям, размножающимся половым путем, так и к растениям, размножающимся бесполом путем. В одном случае вид представляет собой систему популяций, а в другом случае он есть система клонов. Но в обоих случаях вид характеризуется некоторой целостностью и определенной биологической обособленностью от других видов. Целостность видов выражается в том, что входящие в их состав клоны или популяции связаны между собой переходами. Как бы ни была велика внутривидовая изменчивость, и как бы резко не различались крайние формы, при наличии достаточного материала всегда можно расположить представителей вида таким образом, что они составят непрерывный ряд форм. Обособленность же вида заключена в том, что даже группа близких видов представляет собой прерывистый, дискретный комплекс, где, как правило, нет переходных форм».

Умение точно и эффективно определять видовую принадлежность исследуемых организмов очень важно и в эколого-генетических исследованиях. В последние десятилетия развитие молекулярных методов дало возможность применять молекулярные маркеры для видоидентификации и филогенетических исследований. Конечно, данные методы не могут полностью вытеснить классические подходы, но способны эффективно их дополнить. В основе молекулярных подходов лежит закономерность, согласно которой степень родства между живыми организмами обычно коррелирует с уровнем сходства в гомологичных последовательностях нуклеиновых кислот и белков.

Молекулярная филогения использует такие данные для построения филогенетического древа, которое отражает гипотетический ход эволюции исследуемых организмов.

По своей природе молекулярные маркеры, используемые в таких исследованиях можно подразделить на две группы.

К первой группе относятся маркеры, представляющие собой продукты секвенирования таксономически значимых районов. Ко второй группе относятся

Поступила в редакцию 21.10.2010.
Принята к публикации 21.12.2010.

маркеры, базирующиеся на полиморфизме продуктов ПЦР различного происхождения или рестрикционных фрагментов. В исследованиях, посвященных видоидентификации и изучению филогении, вторая группа маркеров может быть использована, лишь как вспомогательная, в дополнение к первой. Остановимся подробнее на первой группе маркеров.

ДНК-ШТРИХКОД

Для универсализации подходов к видоидентификации живых организмов в 2003 году канадский ученый Пол Хеберт (Hebert, 2003 a, b) предложил использовать короткие стандартные последовательности ДНК (ДНК-штрихкод, DNA barcode). В 2004 году был основан международный консорциум «Штрихкод жизни» («Consortium for the Barcode of Life, CBOL <http://www.barcodeoflife.org>). Россия присоединилась к этому проекту в 2005 году (elementy.ru/news/164539).

Программа «Штрихкод жизни» особенный упор делает на стандартизацию и координирование работы. «Штрихкод жизни» предполагает создание библиотеки ДНК-штрихкодов (ДНК-ШК) для всех видов, живущих на планете, путем прочтения одного и того же участка генома каждого из них. Основные требования к эталонному участку ДНК:

- 1) небольшой размер (от 500 до 600–800 нуклеотидов);
- 2) последовательность нуклеотидов ДНК-ШК должна быть одинаковой у особей одного вида и достоверно различаться у особей разных видов;
- 3) во избежание ошибок последовательность нуклеотидов должна быть прочитана в обоих направлениях (с обеих цепочек ДНК);
- 4) необходимо знать прямой и обратный праймеры, чтобы можно было без труда выделить нужный участок ДНК из клеток исследуемого организма;
- 5) количество полиморфных (т. е. различающихся у разных особей одного и того же вида) позиций (нуклеотидов) в последовательности не должно превышать 1 %.

По такому ДНК-ШК можно опознать живое существо даже по крошечному фрагменту любой ткани, практически не повреждая организм. Определение по штрихкоду особенно актуально в случаях, когда классические методы «не работают». Например, если имеются внешне неотличимые виды-двойники, или, наоборот, виду присущ половой диморфизм. Важно и то, что выбранные участки ДНК будут совпадать у особей на любой стадии развития: от яиц или семян до взрослых половозрелых организмов (Hebert et al., 2003). Кроме того, сравнение штрихкодов разных видов позволит сделать вывод, в каких филогенетических отношениях они находятся.

Создатели программы «Штрихкод жизни» предполагают возможность существования универсального для всех организмов (или по крайней мере для эукариот)

ДНК-ШК и предлагают в качестве эталона использовать 5'-фрагмент первой субъединицы митохондриального гена, кодирующего белок цитохром-С-оксидазу (*COI*) (Hebert et al., 2003).

В группу каталогизируемых живых организмов не попадают пока прокариоты (по причине отсутствия у них митохондрий как таковых). У грибов длина *COI* существенно варьирует из-за присутствия интронов, поэтому в филогенетике грибов используют различные последовательности ядерной ДНК. Для растений фрагмент *COI* не подходит в качестве эталона в силу низкой и очень неравномерной варибельности этой последовательности (Шнеер, 2009). Применительно к растениям в настоящее время обсуждают следующие районы ДНК в качестве кандидатов на роль ДНК-ШК: ядерные последовательности — ITS1 и ITS2, пластидные последовательности — *rpoB*, *rpoC1*, *rbcL*, *matK*, *psbK-psbI*, *trnH-psbA*, *atpF-atpH* (Kress et al., 2005, 2007; Chase et al., 2005; Lahaye, 2008a; CBOL Plant Working Group, 2009; Chen, 2010).

В данном обзоре мы рассмотрим молекулярные маркеры, используемые для видоидентификации растений и описания их филогенетических взаимоотношений.

КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ МОЛЕКУЛЯРНОГО МАРКЕРА

При выборе оптимального маркера принято прибегать к следующим критериям оценки:

- **Универсальность:** какие из последовательностей могут быть амплифицированы и отсеквенированы в максимальном количестве растительных таксонов. В первую очередь этот показатель зависит от возможности подобрать универсальные для широкого круга организмов праймеры для амплификации фрагмента, который впоследствии подлежит секвенированию.
- **Качество сиквенса и степень перекрытия:** какие из локусов наиболее пригодны для получения перекрывающихся сиквенсов с прямого и обратного праймеров с минимумом или отсутствием неоднозначностей прочтения нуклеотидов.
- **Способность различать виды:** какие из локусов дают возможность различить как можно большее количество видов? Оптимальной является ситуация при которой внутривидовой полиморфизм ниже межвидового, а формы, относящиеся к одному виду кластеризуются отдельно от форм других видов (Шнеер, 2009)

Исходя из предложенных критериев, рассмотрим различные молекулярные маркеры подробнее. Начнем рассмотрение с цитоплазматических (хлоропластных) маркеров.

ХЛОРОПЛАСТНЫЕ МАРКЕРЫ

Хлоропластными маркерами, широко используемыми для идентификации видов и филогенетических ис-

следований являются последовательности генов *rpoB*, *rpoC1*, *rbcl*, *matK*, и межгенных спейсеров *psbK-psbI*, *trnH-psbA*, *atpF-atpH*.

matK

Ген *MatK* кодирует матуразу К. Это один из наиболее быстро эволюционирующих пластидных генов растений, который сохранился в том числе и у всех проанализированных на настоящий момент бесхлорофильных растений (Chase et al., 2003). При помощи праймеров к *matK* можно амплифицировать фрагмент и получить хорошие сиквенсы, однако, по данным CBOL Plant Working Group (2009), показатель «универсальность» этого маркера составляет около 90 % для покрытосеменных растений при использовании следующих праймеров к *matK*:

3F_KIM f CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG
1R_KIM r ACCCAGTCCATCTGGAATCTTGGTTC

Вместе с тем, в той же работе данным методом удалось проанализировать только 83 % видов голосеменных и около 10 % видов споровых растений (CBOL Plant Working Group, 2009).

rbcl

rbcl — ген большой субъединицы рибулозобисфосфаткарбоксилазы — наиболее подробно охарактеризованный хлоропластный ген растений. Детальные исследования его последовательности на разных объектах позволили разработать праймеры, с использованием которых можно амплифицировать фрагменты на ДНК разных видов растений (*rbclLa_R* — GTAAAATCAAGTCCACCRG, *rbclLa_F* — ATGTCACCACAACAGAGACTAAAGC). При этом качество сиквенса с прямого и обратного праймеров является приемлемым, а разрешающая способность недостаточна для самостоятельного использования данного маркера. Вместе с тем, данный ген является хорошим кандидатом для совместного использования с каким-либо другим маркером для идентификации видов (Newmaster et al, 2006; CBOL Plant Working Group, 2009).

rpoB и rpoC1

Маркеры *rpoB* и *rpoC1* кодируют субъединицы РНК-полимеразы и характеризуются высокой универсальностью праймеров (*rpoB*: 2f ATGCAACGTCAAGCAGTTCC 3r CCGTATGTGAAAAGAAGTATA; *rpoC*: 2f GGCAAAGAGGGAAGATTCG, 4r CCATAAGCATATCTTGAGTTGG) для их амплификации, но уступают маркерам, описанным выше, по способности различать виды (CBOL Plant Working Group, 2009).

psbK-psbI

Гены *psbK* и *psbI* консервативны от водорослей до покрытосеменных и контролируют синтез двух низкомолекулярных полипептидов К и I соответственно, являющихся компонентами фотосистемы II (Meng et al., 1991). Маркер *psbK-psbI* является продуктом сек-

венирования межгенного спейсера. Данный фрагмент может быть легко амплифицирован с помощью праймеров *psbK* — TTAGCCTTGTGGCAAG, *psbI* — AGAGTTTGAGAGTAAGCAT. По комплексу признаков (способность различать виды, универсальность, качество сиквенса) он лишь незначительно уступает маркеру *matK* (Lahaye et al., 2008, б). Как и *matK*, данный маркер имеет ограничения по применению в отношении голо-семенных по причине недостаточной универсальности праймеров (CBOL Plant Working Group, 2009).

trnH-psbA

Маркер *trnH-psbA* является продуктом секвенирования межгенного спейсера между генами гистидиновой транспортной РНК и геном, контролирующим синтез белка D1 фотосистемы II. Он хотя и является не очень протяженным (длина около 450 по), считается самым варибельным фрагментом пластидной ДНК, кроме того, он может быть легко амплифицирован с тотальной ДНК многих видов растений при помощи праймеров *psbA3f* GTTATGCATGAACGTAATGCTC, *trnHf_05* CGCGCATGGTGGATTACAATCC (CBOL Plant Working Group, 2009; Kress et al., 2005). Недостатком является то, что для данного фрагмента не всегда можно получить сиквенсы высокого качества (CBOL Plant Working Group, 2009), а также существенная варибельность данного маркера по длине, что затрудняет процедуру выравнивания последовательностей. Кроме того, данная последовательность не обнаружена у бесхлорофильных растений (Lahaye et al., 2008 a, b) и недостаточно варибельна у орхидных (Chang et al., 2006.).

atpF-atpH

Спейсер *atpF-atpH* находится между генами, кодирующими субъединицы АТФ-синтазы. Как и *trnH-psbA*, он обладает высокой варибельностью, на ДНК покрытосеменных легко амплифицируется с использованием праймеров *atpF* ACTCGCACACACTCCCTTCC, *atpH* GCTTTTATGGAAGCTTAAACAAT, но имеет следующие недостатки: недостаточная универсальность (CBOL Plant Working Group, 2009), варибельность по длине, отсутствие у бесхлорофильных растений (Lahaye et al., 2008a).

Подводя итог вышесказанного, можно отметить, что выбор хлоропластного маркера для исследования во многом может зависеть от целей работы и той таксономической группы растений, в пределах которой проводится исследование. Для повышения разрешающей способности метода многие исследователи рекомендуют комбинировать нескольких маркеров в одном исследовании (Chase et al., 2003; CBOL Plant Working Group, 2009; Шнеер, 2009).

Вместе с тем, у хлоропластных маркеров есть общие недостатки:

- наследование по материнскому типу недостаточно полно отражает историю вида, особенно, если в ходе его становления имела место межвидовая гибридизация, хотя позволяет проследить происхождение цитоплазмы у межвидовых гибридов (Антонова, Гавриленко, 2006);
- наличие обмена генетического материала между органеллами, и/или между органеллами и ядром затрудняют интерпретацию результатов (Cowan et al., 2006, Шестаков, 2009);
- существование горизонтального переноса хлоропластных генов, особенно между паразитическими растениями и их хозяевами (Richardson, Palmer, 2007) может повлечь за собой ошибки в построении филогенетического древа.

ЯДЕРНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ITS

В настоящее время одними из наиболее популярных последовательностей для филогенетических исследований растений является последовательности внутренних транскрибируемых спейсеров рибосомальных генов (ITS internal transcribed spacer). Мотив ITS локализуется между структурными генами рибосомальной РНК 18S, 5.8S и 26S. Рибосомальные гены представляют собой единый кластер ядерных генов, организованный в виде тандемно расположенных повторов. Каждый кластер рибосомальных генов состоит из транскрибируемой области (гены 18S, 5.8S и 26S рРНК), внутренних транскрибируемых спейсеров, расположенных по обе стороны от 5.8S рРНК, эти спейсеры называются: ITS1 и ITS2, и фланкирующих внешних транскрибируемых спейсеров — (ETS1 и ETS2) (рис. 1).

Предполагается, что ITS, как любые некодирующие последовательности, эволюционировали с высокой скоростью. Следовательно, они могут сильно отличаться даже у близкородственных организмов, поэтому их используют для филогенетических и биогеографических исследований (Baldwin et al., 1995; Alvarez et al., 2003). ITS широко используются в качестве филогенетического маркера для классификации растений на разных таксономических уровнях: родовом, видовом и подвидовом (Feliner and Rossello, 2007). Также есть данные, что ITS могут быть использованы и на более высоком уровне систематического анализа (Schultz et al. 2006).

Как мы уже отмечали, участок генома, используемый в качестве филогенетического маркера, должен удовлетворять ряду требований. Он должен присутствовать у всех особей таксономической группы, быть одинаковым в пределах одного вида, но достаточно вариабельным для эффективного различения близкородственных групп. Кроме того, он должен быть достаточно коротким и содержать на 5' и 3' — концах консервативные последовательности для удобства анализа. Последовательности



Рис. 1. Рибосомальный кластер (Lewin, 1980) ETS — внешние транскрибируемые спейсеры; ITS — внутренние транскрибируемые спейсеры; 18S, 5.8S, 26S — гены рРНК

внутренних транскрибируемых спейсеров соответствуют перечисленным требованиям, а также обладают рядом преимуществ перед митохондриальными и хлоропластными маркерами:

1. **Универсальность.** ITS локализованы в пределах рибосомального кластера в ядерном геноме и, в отличие от хлоропластных маркеров, ITS присутствуют у всех групп живых организмов.
2. **Высокая вариабельность.** Последовательности ITS высоко вариабельны и позволяют легко отличать близкородственные организмы. Высокая степень варьирования обусловлена тем, что данные последовательности являются некодирующими, следовательно, могли не подвергаться давлению отбора. Накопление синонимичных замен у ITS могло протекать с приблизительно одинаковыми скоростями у разных видов, тогда как в митохондриальных генах скорости накопления замен и перестроек варьируют у разных видов растений. Причем данные скорости у маркеров митохондрий значительно ниже, чем у последовательности ITS (Drouin et al, 2008). У хлоропластных последовательностей, используемых в качестве филогенетических маркеров, также могут сильно варьировать скорости эволюции. В ряде случаев она оказалась низкой при расхождении близких видов, что ограничивает возможность использования таких маркеров (Шнеер, 2009).
3. **Наличие консервативных границ.** Внутренние транскрибируемые спейсеры фланкированы консервативными участками (генами 18S и 26S рРНК). Это позволяет использовать универсальные праймеры (ITS4 TCCTCCGCTTATTGATATGC, ITS5 GGAAGTAAAAGTCGTAACAAG) для обнаружения данных мотивов у отдаленных групп организмов (Baldwin et al., 1995).
4. **Высокая копияность.** Последовательности ITS высоко копияны — до 30000 копий на клетку (Dubouzet and Shinoda 1999), и организованы тандемно в виде повторов. Большое число повторов позволяет легко изолировать и амплифицировать последовательности ITS, по сравнению с низкокопийными генами. Кроме того, возможно проведение анализа при крайне малых количествах исходного материала, а также на гербарном, палеонтологическом или сильно деградировавшем материале.
5. **Протяженность ITS.** Длина анализируемого участка (ITS1-5.8S-ITS2) удобна для ПЦП-анализа и секвенирования. У покрытосеменных протяженность составляет 500–700 п. о. (Baldwin et al., 1995) и

1500–3700 п. о. у голосеменных (Bobola et al., 1992; Germano and Klein, 1999; Liston et al., 1996; Maggini et al., 2000; Maggocco et al., 1996, цит. по Alvarez et al., 2003). Протяженность мотивов ITS относительно консервативна у разных видов растений, в то время как хлоропластные и митохондриальные маркеры могут сильно варьировать по длине и подвержены крупным перестройкам.

6. **Двуродительское наследование.** Важным отличием внутренних транскрибируемых спейсеров является двуродительское наследование ITS, поскольку в случае однородительского (цитоплазматического) наследования маркера (митохондриальных и хлоропластных мотивов) невозможно точно идентифицировать недавно возникшие гибриды и определить происхождение полиплоидов (Alvarez et al., 2003).

Тем не менее, у столь удобных последовательностей для филогенетических исследований есть недостатки.

1. Гены, кодирующие структурные единицы рибосом, присутствуют в ядре растительной клетки в виде множества копий, которые могут быть локализованы на разных хромосомах. Отдельные копии могут эволюционировать более или менее независимо друг от друга. Следовательно, ITS могут варьировать по длине и по количеству вставок и делеций. В пределах одного генома возможно присутствие паралогов, которые могут появляться в результате неполной согласованной эволюции (Burckler et al., 1997; Alvarez et al., 2003). Таким образом, возможно наличие внутривидового или даже внутриорганизменного полиморфизма. Как правило, преобладает какой-либо один тип, тем не менее, в ряде случаев было выявлено присутствие нескольких функциональных копий (Rapini et al., 2006).
2. Гомоплазия. Последовательности ITS характеризуются более высоким уровнем гомоплазии по сравнению низкокопийными генами. И в некоторых случаях последовательности ITS могут оказаться недостаточно информативными для филогенетических исследований (Hodges et al., 1994; Sang et al., 1995, цит. по Шнеер, 2009; Alvarez et al., 2003; Cronn et al., 2002).

В завершение этого раздела можно сказать, что несмотря на имеющиеся недостатки, в настоящее время ITS являются наиболее востребованными маркерами для видоидентификации и филогенетики растений.

ДНК-ФИНГЕРПРИНТИНГ

После детальной характеристики маркеров для ДНК-штрихкодирования рассмотрим маркеры, которые могут быть использованы, как вспомогательные при исследовании межвидовых взаимоотношений, но чаще используются для описания внутривидового полиморфизма. К ним относятся маркеры RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), AFLP (Amplified Fragment Length

Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), SSR (simple sequence repeats) или STR (short tandem repeats), а также ISSR (inter simple sequence repeats) (Kema et al., 2002; Selkoe, Toonen, 2006).

Вне зависимости от деталей методики результатом эксперимента будет набор фрагментов ДНК, число которых и электрофоретическая подвижность различаются между генотипами. Идеальной является ситуация при которой каждый генотип характеризуется своим набором фрагментов. Определение профиля фрагментов ДНК получило название генетический фингерпринтинг (Рысков и др., 1999). Чем больше совпадающих фрагментов в полученных профилях, тем более родственны исследуемые генотипы.

Остановимся подробнее на данных методах.

Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) (RFLP — Restriction Fragment Length Polymorphism)

Процедура ПДРФ включает в себя фрагментацию ДНК посредством рестриктазы (фермента, узнающего и разрезающего специфическую последовательность ДНК в ходе процесса, называемого рестрикцией). Далее продукты рестрикции разделяются электрофоретически, переносятся на нитроцеллюлозную, или нейлоновую мембрану (процесс Саузерн-блоттинга) после чего их гибридизуют с мечеными ДНК-зондами. Далее сравнивают размеры прогибридизовавшихся фрагментов у разных генотипов (рис. 2). Различные длины фрагментов свидетельствуют о различиях на уровне последовательности ДНК — мутациях в районе рестрикционных сайтов, делециях, захватывающих рестрикционные сайты, инсерциях в области, гибридизуемой с зондом (Botstein et al., 1980; Landry, Michelmore, 1987). Примером удачного использования данного подхода для целей филогении является работа Ямазаки с соавторами (Yamazaki et al., 1993). Авторы изучали филогению растений рода *Lupinus* и наряду с основной задачей показали корреляцию определенных гибридационных паттернов с содержанием алкалоидов в исследуемых объектах.

В последнее время этот метод употребляется все реже ввиду трудоемкости, невозможности автоматизации процесса и необходимости наличия большого количества ДНК для анализа (Сулимова, 2004).

AFLP (или AFLP-PCR — Amplified Fragment Length Polymorphism PCR — полиморфизм длин амплифицированных фрагментов)

AFLP — подход, разработан для ДНК-фингерпринтинга в начале 90-х годов XX века (Zabeau, Vos, 1993). В ходе процедуры AFLP проводят рестрикцию геномной ДНК двумя рестриктазами, далее лигируют два варианта адаптеров к продуктам рестрикции. После этого полученные фрагменты амплифицируют с использованием

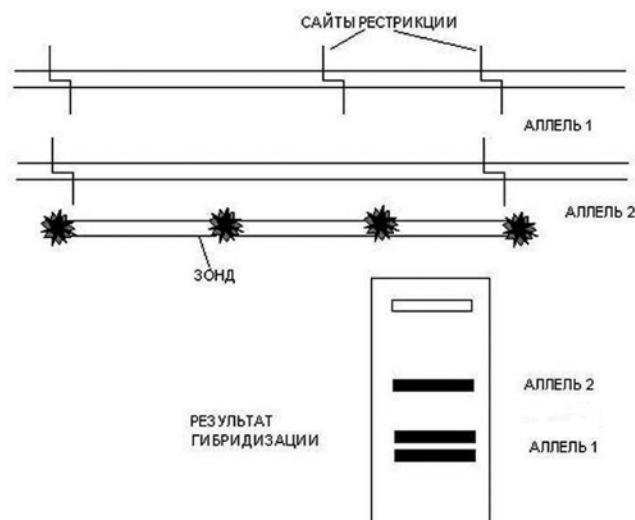


Рис. 2. Завершающий этап RFLP анализа. Варианты гибридационного паттерна в случае полиморфизма последовательностей ДНК (у аллели 2 отсутствует один из сайтов рестрикции в области, перекрывающейся с зондом)

праймеров, один из которых радиоактивно, или флуоресцентно мечен. Каждый из праймеров комплементарен одному из адаптеров, последовательности рестриционного сайта, а также содержит еще несколько произвольных нуклеотидов на 3' конце. Амплифицированные фрагменты могут быть визуализированы после электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (рис. 3).

Достоинством метода является достаточно широкий спектр фрагментов ДНК, подлежащих анализу в результате эксперимента. При этом доля полиморфных фрагментов является существенной (Сулимова, 2004; Календарь, Глазко, 2004) Примером использования метода AFLP в филогенетических исследованиях является работа Гоберта с соавторами (Gobert et al., 2006). В данном исследовании метод AFLP был использован совместно с анализом ISSR маркеров, а также сиквенсов ITS для выяснения родства между дикими видами и культурными формами мяты (*Minta*).

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA — случайно амплифицированная полиморфная ДНК)

Методика основана на использовании 10-нуклеотидных праймеров случайной последовательности для амплификации фрагментов ДНК (Williams et al., 1990). Праймеры находят зоны комплементации в разных частях генома. В тех случаях, когда места посадки праймеров находятся на небольшом расстоянии друг от друга (до 2000 п. о.) на разных цепях ДНК, становится возможным прохождение ПЦР (рис. 4). Поскольку таких сайтов отжига праймеров оказыва-

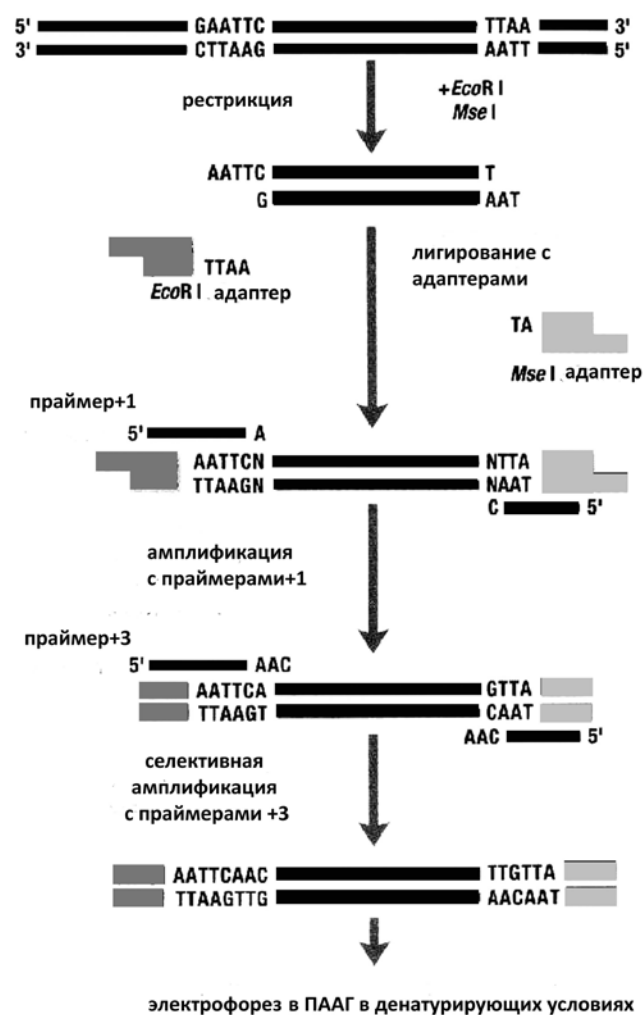


Рис. 3. Схема одного из вариантов AFLP анализа (Zabeau, Vos, 1993)

ется много, в результате амплификации получается серия фрагментов разной длины. Достоинствами метода являются невысокая стоимость анализа, небольшие количества ДНК, требуемой для работы, отсутствие необходимости в предварительной информации об исследуемых генотипах (Кочиева, Оганисян, 2000; Matveeva et al., 2003; Сулимова, 2004; Календарь, Глазко, 2004) (рис. 4).

Недостатком метода является то, что результат реакции сильно зависит от концентрации и качества выделения ДНК, а также концентрации праймеров. Кроме того, неспаренности праймера и матрицы могут приводить как к полному отсутствию продукта ПЦР, так и к его слабой амплификации. Вследствие этого результаты RAPD трудно воспроизводить и интерпретировать (Сулимова, 2004).

Попыткой исправить ситуацию является использование полуслучайных (semi-specific) праймеров. Полуслучайные праймеры состоят из двух частей: 5' концевая

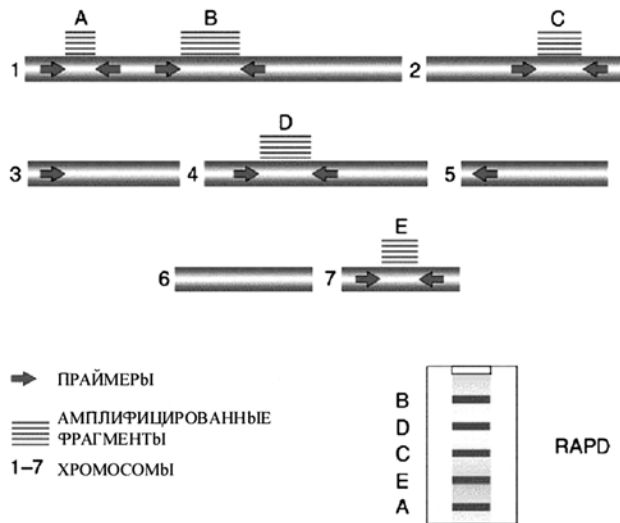


Рис. 4. Схема RAPD анализа (Williams et al., 1990)

часть комплементарна интрон-экзонной границе, 3' концевой участок имеет случайную последовательность. За счет консервативной части увеличивается длина праймера, что повышает воспроизводимость метода (Gawel et al., 2002, Матвеева и др., 2008).

Удачным примером использования RAPD анализа для целей филогении является работа Форте с соавторами (Forte et al., 2001), где для изучения филогении диких яблонь были удачно скомбинированы методы анализа последовательностей ITS1, 5,8S rRNA, ITS2 и гена хлоропластной матуразы *matK*, а также RAPD-маркеров и морфологических признаков.

SSR (simple sequence repeats — простые повторяющиеся последовательности) или STR (short tandem repeats — короткие тандемные повторы)

SSR (simple sequence repeats) и STR (short tandem repeats) — это синонимы. По сути это одна методика. Разница заключается лишь в области применения понятий: в исследованиях растений используют аббревиатуру SSR, животных и человека — STR (Сулимова, 2004).

SSR представляют собой короткие последовательности длиной от 2 до 6 п. о., тандемно повторяющиеся в геноме несколько раз (Tautz, Renz, 1984). Фланкирующие последовательности микросателлитных локусов обычно идентичны у разных индивидуумов одного вида, поэтому к ним легко подбирать праймеры. SSR локусы идеальны для использования в генетических и популяционных исследованиях, поскольку представляют собой кодоминантные маркеры и амплифицируются с помощью специфических праймеров, в связи с этим результаты SSR анализа являются надежными, воспроизводимыми и могут быть однозначно интерпретированы (рис. 5). Кроме того, SSR маркеры отличают-

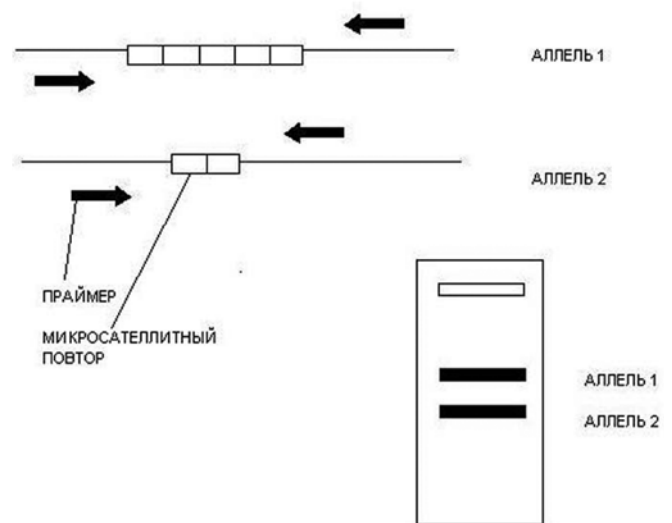


Рис. 5. Схема SSR анализа (Tautz, Renz, 1984)

ся относительно высоким уровнем полиморфизма, а процесс их анализа может быть частично автоматизирован. К числу недостатков данного метода можно отнести необходимость наличия данных о нуклеотидных последовательностях генома, содержащих простые повторяющиеся последовательности, для того чтобы подобрать специфические праймеры. На сегодняшний день SSR маркеры обладают наибольшей разрешающей способностью для описания внутривидового полиморфизма (Blouin et al., 1996; Palombi, Damiano, 2002).

Одним из примеров использования для филогенетических исследований SSR маркеров является исследование филогенетических отношений между видами в пределах рода *Cucumis*. SSR маркеры совместно с сиквенсами ITS и RAPD-маркерами были использованы в этой работе (Staub et al. 1992; Jobst et al. 1998; Chung et al., 2006). Важное значение в данном исследовании имели хлоропластные SSR маркеры (Chung et al., 2006). Характеристика хлоропластных маркеров особенно оправдана в тех случаях, когда в эволюции видов существенную роль играла межвидовая гибридизация. Так для выяснения особенностей филогенетических отношений представителей рода *Solanum* хлоропластные SSR маркеры были также с успехом использованы в работе Антоновой и Гавриленко (2006).

ISSR (Inter Simple Sequence Repeats)

ISSR маркеры были разработаны как альтернатива RAPD. Данный метод основан на амплификации последовательностей, ограниченных двумя микросателлитными повторами в присутствии праймера, комплементарного к последовательности данного микросателлита (4–12 единицам повтора) и несущие на одном из концов последовательность из двух-четырёх произвольных нуклеотидов (так называемый «якорь») (Zietkiewicz et al. 1994; Gupta

Таблица 1

Основные особенности молекулярных маркеров, используемых для ДНК-штрихкодирования растений

Название	Последовательности праймеров	Особенности
matK	3F_KIM f: cgtacagtactttgtgttacgag 1R_KIM r: acccagtcacatctggaaatcttggttc	Высокая вариабельность внутренней последовательности, хорошее качество сиквенса, ограничения по применению для споровых растений
rbcL	rbcLa_R gtaaaatcaagtccaccrcg, rbcLa_F atgtcaccacaacacagagactaaagc	Высокая универсальность праймеров, хорошее качество сиквенса, но не достаточная разрешающая способность для самостоятельного использования
rpoB	2f atgcaacgtcaagcagttcc 3r ccgtatgtgaaagaagtata	Высокая универсальность праймеров, низкая разрешающая способность при различении видов
rpoC1	2f ggcaaagaggggaagattcg, 4r ccataagcatacttgagtgg	- "-
psbK-psbI	psbK ttagcctttgtttggcaag, psbI agagttgagagtaagcat	По комплексу признаков незначительно уступает matK, имеет ограничения в использовании в отношении голосеменных
trnH-psbA	psbA3f gttatgcatgaacgtaatgctc, trnHf_05 cgcgcatggtggattcacaatcc	Самый вариабельный фрагмент пластидной ДНК (в том числе и по длине), часто дает низкое качество сиквенса
atpF-atpH	atpF actcgcacacactccctttcc atpH gcttttatggaagctttaacaat	Высокая вариабельность (в том числе по длине), недостаточная универсальность, отсутствие у бесхлорофильных растений
ITS1-5.8S-ITS2	ITS4 tcctccgcttattgatatgc, ITS5 ggaagtaaaagtcgtaacaag	Высокая универсальность праймеров, вариабельность внутренней последовательности, высокая копияность, двуродительский тип наследования, но возможен внутривидовой и внутриорганизменный полиморфизм, гомоплазия выше, чем у уникальных последовательностей

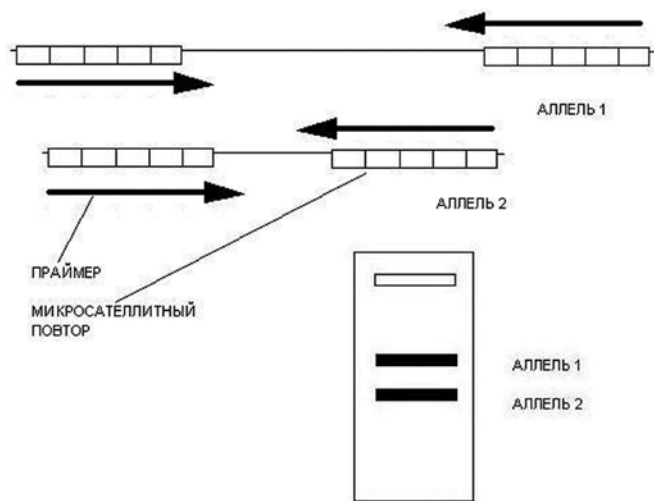


Рис. 6. Схема ISSR анализа (Zietkiewicz et al., 1994; Gupta et al., 1994; Bornet, Branchard, 2001)

et al. 1994; Bornet, Branchard, 2001). Такие праймеры позволяют амплифицировать фрагменты ДНК, которые находятся между двумя достаточно близко расположенными микросателлитными последовательностями (как правило, это уникальная ДНК). В результате амплифицируется большое число фрагментов, представленных на электрофореграмме дискретными полосами (ISSR-фингерпринтинг). Полученные паттерны ПЦР-продуктов в значительной степени видоспецифичны, кроме того, они значительно надежнее RAPD-маркеров (Zietkiewicz

et al., 1994; Gupta et al., 1994; Prevost, Wilkinson, 1999; Боронникова, 2009) ISSR-маркеры относятся к маркерам доминантного типа наследования (рис. 6). Они дешевы в использовании, не требуют предварительных знаний о последовательности ДНК и вместе с тем дают более воспроизводимые результаты, чем RAPD-маркеры (Wolfe et al., 1998).

ISSR-маркеры являются наиболее распространенными маркерами, используемыми в настоящее время в филогенетических исследованиях совместно с методами ДНК-штрихкодирования. Так ISSR-маркеры совместно с данными секвенирования ITS с успехом использовали для исследования филогении секции *Melanium* в пределах рода *Viola* (Yockteng et al., 2003). ISSR-маркеры совместно с комплексом маркеров ДНК-штрихкодирования использовали для реконструкции филогенетических отношений в пределах рода *Encephalartos* сем. *Cycadaceae* (Treutlein et al., 2005), а также для целого ряда родов в пределах сем *Asphodelaceae* (subfamily *Alooidae*) (Treutlein et al., 2003a, б).

ИЗУЧЕНИЕ НОВООБРАЗОВАННЫХ ИЛИ ЭВОЛЮЦИОННО НЕДАВНО ПРИВНЕСЕННЫХ В ГЕНОМЫ ФРАГМЕНТОВ ДНК

В некоторых случаях для детального исследования филогенетических взаимоотношений оказывается весьма эффективным использование уникальных новообразованных или эволюционно недавно привнес-

ных в геномы фрагментов ДНК-последовательностей (последовательностей характерных для конкретного таксона). Такой подход позволяет не только максимально достоверно расположить отдельные виды в кластеры, но и отследить взаимоотношение видов внутри кластеров. Полезен такой подход и для определения вида (популяции) основателя кластера. В перспективе наибольшую ценность такой подход может представлять для детального изучения эволюционных скачков (ароморфозов).

Так, у некоторых представителей рода *Nicotiana*, обнаружены последовательности, гомологичные Т-ДНК агробактерий, как результат горизонтального переноса, имевшего место в эволюции данного рода (White et al., 1982). Эти последовательности были использованы как детализирующий метод для изучения филогении рода (Suzuki et al., 2002).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в настоящее время молекулярные маркеры очень активно используют для решения различных вопросов, связанных с определением видовой принадлежности, выяснения степени родства различных групп растений. Вместе с тем до последнего времени ведутся активные дискуссии о том, какой из маркеров лучше подходит на роль ДНК-штрихкода растений (особенности молекулярных маркеров, используемых в качестве ДНК-штрихкода растений сведены в таблице 1), в то время как для животных в данном вопросе консенсус уже достигнут. Вероятно, новые исследования, корректировка последовательностей праймеров с целью повышения их универсальности для амплификации перспективных с точки зрения филогенетики последовательностей позволят уже в ближайшем будущем продвинуться в решении проблемы выбора универсального маркера для ДНК-штрихкодирования. Вместе с тем, это не означает необходимости отказа от остальных подходов, поскольку использование в работе нескольких типов маркеров повышает разрешающую способность метода.

Работа выполнена при поддержке Российского Фонда Фундаментальных исследований, грант 08-04-01005-а.

Литература

1. Антонова О. Ю., Гавриленко Т. А., 2006. Полиморфизм последовательностей оргanelльных ДНК видов картофеля // Экологическая генетика. Т. 4. № 1. С. 3–10.
2. Боронникова С. В., 2009. Молекулярное маркирование и генетическая паспортизация ресурсных и редких видов растений с целью оптимизации сохранения их генофондов // Аграрный вестник Урала. Т. 2. С. 57–59.
3. Гостимский С. А., Кокаева З. Г., Боброва В. К., 1999. Использование молекулярных маркеров для анализа генома растений // Генетика. Т. 35. № 11. С. 1538–1549.
4. Гостимский С. А., Кокаева З. Г., Коновалов Ф. А., 2005. Изучение организации и изменчивости генома растений с помощью молекулярных маркеров // Генетика. Т. 41. № 4. С. 480–492.
5. Календарь Р. Н., Глазко В. И., 2002. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение // Физиология и биохимия культурных растений. Т. 34. № 4. С. 279–296.
6. Кочиева Е. З., Оганисян А. Г., 2000. Молекулярный анализ RAPD-маркеров генома картофеля // Сельскохозяйственная биотехнология. Избранные работы / Под. ред. Шевелухи В. С.: Евразия, Т. 1. С. 24–32.
7. Матвеева Т. В., Машкина О. С., Исаков Ю. Н., Лутова Л. А., 2008. Молекулярная паспортизация клонов карельской березы методом ПЦР с полуслучайными праймерами // Экологическая генетика. Т. 4. № 3. С. 16–21.
8. Рысков А. П., 1999. Мультилокусный ДНК-фингерпринтинг в генетико-популяционных исследованиях биоразнообразия // Молекуляр. биология. Т. 33. № 6.
9. Сулимова Г. Е., 2004. ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и области применения // Успехи соврем. биологии. Т. 124. № 3. С. 260–271.
10. Россия присоединяется к проекту «Штрихкод жизни» // Элементы. 2005. URL: <http://elementy.ru/news/164539> (дата обращения: 20. 06. 10).
11. Тахтаджян А. Л., 1974. Растения в системе организмов // Жизнь растений. В 6-ти т. Т. 1. Введение. Бактерии и актиномицеты / Под ред. Н. А. Красильникова, А. А. Уранова., М.: Просвещение, С. 49–57.
12. Шестаков С. В., 2009. Горизонтальный перенос генов у эукариот // Вестник ВОГиС Т. 13. № 2. С. 345–354.
13. Шнеер В. С., 2009. ДНК-штрихкодирование видов животных и растений — способ их молекулярной идентификации и изучения биоразнообразия // Журнал общей биологии. Т. 70. № 4. С. 296–315.
14. Шнеер В. С., 2009. ДНК-штрихкодирование — новое направление в сравнительной геномике растений // Генетика. Т. 45. № 11. С. 1436–1448.
15. Alvarez I., Wendel J. F., 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference // Molecular Phylogenetics and Evolution. Vol. 29. P. 417–434.
16. Baldwin B. G., Sanderson M. J., Porter J. M. et al., 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny // Ann. Missouri Bot. Gard. Vol. 82 P. 247–277.

17. Blouin M. S., Parsons M., Lacaille V., Lotz S. 1996. Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness // *Molecular Ecology*. Vol. 5 (3). P. 393–401.
18. Bornet B., Branchard M., 2001. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting // *Plant Mol. Biol. Rep.* Vol. 19. P. 209–215.
19. Botstein D., White R. L., Scolnick M., Davis R. W., 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms // *Am. J. Human Genet.* 1980. Vol. 32. P. 314–331.
20. Buckler E. S., Ippolito A., Holtsford T. P., 1997. The evolution of ribosomal DNA: Divergent paralogous and phylogenetic implications // *Genetics*. Vol. 145. P. 821–832.
21. Chang C. C. Lin H. C., Linet I. P. et al., 2006. The chloroplast genome of *Phalaenopsis aphrodite* (*Orchidaceae*): Comparative analysis of evolutionary rate with that of grasses and its phylogenetic implications // *Mol. Biol. Evol.* Vol. 23. P. 279–291.
22. Chase M. W., Salamin N., Wilkinson M. et al., 2005. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* Vol. 360. P. 1889–1895.
23. Chase M. W., Knapp S., Cox A. V. et al., 2003. Molecular systematics, GISH and the origin of hybrid taxa in *Nicotiana* (*Solanaceae*) // *Ann. Bot.* Vol. 92. I. 1. P. 107–127.
24. Chen S., Yao H., Han J. et al., 2010. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species // *PLoS One*. Vol. 5. I. 1. e8613.
25. Chung S. M., Staub J. E., Chen J. F., 2006. Molecular phylogeny of *Cucumis* species as revealed by consensus chloroplast SSR marker length and sequence variation // *Genome*. Vol. 49 (3) P. 219–229.
26. Cowan R. S., Chase M. W., Kress W. J., Savolainen V., 2006. 300000 species to identify: problems, progress, and prospects in DNA barcoding of land plants // *Taxon*. Vol. 55. I. 3. P. 611–616.
27. Cronn R. C., Small R. L., Haselkorn T., Wendel J. F., 2002. Rapid diversification of the cotton genus (*Gossypium*: *Malvaceae*) revealed by analysis of sixteen nuclear and chloroplast genes // *Am. J. Bot.* Vol. 89. P. 707–725.
28. Drouin G., Daoud H., Xia J., 2008. Relative rates of synonymous substitutions in the mitochondrial, chloroplast and nuclear genomes of seed plants // *Mol. Phylogenet. Evol.* Vol. 49. I. 3. P. 827–31.
29. Feliner G. N., Rosselló J. A., 2007. Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants // *Mol. Phylogenet. Evol.* Vol. 44. I. 2. P. 911–919.
30. Forte A. V., Dorochov D. B., Savelyev N. I., 2001. Phylogeny of wild *Malus* species revealed by morphology, RAPD markers, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 and chloroplast gene matK sequences // SALAŠ, P.: Proceedings of 9TH International Conference of Horticulture, September 3th–6th 2001 Lednice, Czech Republic, Vol. 1, P. 60–65.
31. Gawel M., Wiśniewska I., Rafalski A., 2002. Semi-specific PCR for the evaluation of diversity among cultivars of wheat and triticale // *Cell Mol Biol Lett.* Vol. 7. I. 2A. P. 577–582.
32. Gobert V., Moja S., Taberlet P., Wink M., 2006. Phylogenetic relationships and genetic exchanges between cultivated and wild mints (*Mentha*; *Lamiaceae*) revealed by nucleotide sequences of ncDNA (ITS I, ITS II), cpDNA and genomic fingerprinting (AFLP, ISSR) // *Plant Biology*. Vol. 8. P. 470–485.
33. Gupta M., Chyi Y. S., Romero-Severson J., Owen J. L., 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats // *Theoret. Appl. Genet.* Vol. 89. P. 998–1006.
34. Hebert P. D. N., Cywinska A., Ball S.L., deWaard J. R., 2003b. Biological identifications through DNA barcodes // *Proc. R. Soc.* Vol. 270 P. 313–321.
35. Hebert P. D. N., Ratnasingham S., de Waard J. R. 2003a. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species // *Proc. R. Soc.* Vol. 270 P. 596–599.
36. Hollingsworth P. M., Forresta L. L., Spouge J. L. et al., 2009. CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants // *Proc Natl Acad Sci USA*. Vol. 106 (31). P. 12794–12797.
37. Jobst J., King K. and Hemleben V., 1998. Molecular evolution of the internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) and phylogenetic relationships among species of the family *Cucurbitaceae* // *Mol. Phylogenet. Evol.* Vol. 9. P. 204–219.
38. Kema G. H., Goodwin S. B., Hamza S. et al., 2002. A combined amplified fragment length polymorphism and randomly amplified polymorphism DNA genetic linkage map of *Mycosphaerella graminicola*, the septoria tritici leaf blotch pathogen of wheat // *Genetics*. Vol. 161. P. 1497–505.
39. Kress W. J., Erickson D. L., 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding rbcL gene complements the non-coding trnH-psbA spacer region // *PLoS ONE*. Vol. 2. e508.
40. Kress W. J., Wurdack K. J., Zimmer E. A. et al., 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* Vol. 102. I. 23. P. 8369–74.
41. Lahaye R., Savolainen V., Duthoit S. et al., 2008. A test of psbK-psbI and atpF-atpH as potential plant DNA barcodes using the flora of the Kruger

- National Park (South Africa) as a model system // URL: <http://hdl.handle.net/10101/npre>. 2008. 1896.1.
42. *Lahaye R., van der Bank M., Bogarin D., et al.*, 2008. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 105. P. 2923–2928.
 43. *Landry B. S., Michelmore R. W.*, 1987. Methods and applications of restriction fragment length polymorphism analysis to plants / Eds. G. Bruening, et al., New York: Plenum.
 44. *Lewin B.*, 1980. Gene Expression, 2, Eucariotic Chromosomes. Wiley, NY, P. 875–906.
 45. *Matveeva T. V., Simonova A. V., Lutova L. A.*, 2002. Molecular markers of inbred radish (*Raphanus sativus* var. *radicola pers*) lines // *Cell. and Mol. Biol. Lett.* Vol. 7. P. 845–848.
 46. *Meng B. Y., Wakasugi T., Sugiura M.*, 1991. 2 Promoters within the Psbk-Psbl-Trng Gene-Cluster in Tobacco Chloroplast DNA // *Curr. Genet.* Vol. 20. P. 259–264.
 47. *Newmaster S. G., Fazekas A. J., Ragupathy S.*, 2006. DNA barcoding in land plants: evaluation of *rbcL* in a multigene tiered approach // *Canad. J. Bot.* Vol. 84. P. 335–341.
 48. *Palombi M. A., Damiano C.*, 2002 Comparison between RAPD and SSR molecular markers in detecting genetic variation in kiwifruit (*Actinidia deliciosa* A. Chev) // *Plant Cell Reports.* Vol. 20, N11, P. 1061–1066.
 49. *Prevost A., Wilkinson M.*, 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato accessions. // *TAG* Vol. 98., P. 107–112.
 50. *Rapini A., Chase M. W., Konno T. U. P.*, 2006. Phylogenetics of the New World *Asclepiadeae* (*Apocynaceae*) // *Taxon.* Vol. 55. I. 1. P. 119–124.
 51. *Richardson A. O., Palmer J. D.*, 2007. Horizontal gene transfer in plants // *Journal of Experimental Botany.* Vol. 58. P. 1–9.
 52. *Schultz J., Muller T., Achtziger M. et al.*, 2006. The internal transcribed spacer 2 database — a web server for (not only) low level phylogenetic analyses // *Nucleic Acids Research.* Vol. 34, Web Server issue doi:10. 1093/nar/gkl129.
 53. *Selkoe K. A., Toonen R. J.*, 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers // *Ecol Lett.* Vol. 9. P. 615–29.
 54. *Staub J. E., Knerr L. D., Holder D. J., May B.*, 1992. Phylogenetic relationships among several African Cucumis species. // *Can. J. Bot.* Vol. 70. P. 509–517.
 55. *Suzuki K., Yamashita I., Tanaka N.*, 2002. Tobacco plants were transformed by *Agrobacterium rhizogenes* infection during their evolution // *Plant J.* Vol. 32. I. 5. P. 775–787.
 56. *Tautz D., Renz M.*, 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes // *Nucl. Acids Res.* Vol. 12. P. 4127–4138.
 57. *Treutlein J., Smith G. F., van Wyk B.-E. Wink M.*, 2003. Phylogenetic relationships in the Asphodelaceae (subfamily Alooideae) inferred from chloroplast DNA sequences (*rbcL*, *matK*) and from genomic fingerprinting (ISSR) // *Taxon.* Vol. 52, P. 193–207.
 58. *Treutlein J., Smith G. F., van Wyk B.-E., Wink M.*, 2003. Evidence for the polyphyly of Haworthia (Asphodelaceae, subfamily Alooideae; Asparagales) inferred from nucleotide sequences of *rbcL*, *matK*, ITS1 and genomic fingerprinting with ISSR-PCR // *Plant Biology* Vol. 5. P. 513–521.
 59. *Treutlein J., Vorster P., Wink M.*, 2005. Molecular relationships in Encephalartos (Zamiaceae, Cycadales) based on nucleotide sequences of nuclear ITS 1&2, *rbcL*, and genomic ISSR fingerprinting // *Plant. Biology.* Vol. 7, P. 79–90.
 60. *White F. F., Garfinkel D. J., Huffman G. A., et al.*, 1983. Sequence homologous to *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA in the genome of uninfected plants // *Nature.* V. 301 (5898). P. 348–350.
 61. *Williams J. G., Kubelik A. R., Livak K. J., et al.*, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // *Nucleic Acids Res.* Vol. 18. I. 22. P. 6531–6535.
 62. *Wolfe A. D., Xiang Q-Y and Kephart S. R.*, 1998. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (*Scrophulariaceae*) using hypervariable inter simple sequence repeat markers // *Molecular Ecology.* Vol. 7. P. 1107–1125.
 63. *Yamazaki M., Sato A., Saito K., Murakoshi I.*, 1993. Molecular phylogeny based on RFLP and its relation with alkaloid patterns in *Lupinus* plants. // *Biol Pharm Bull.* Vol. 16 (11). P. 1182–1184.
 64. *Yockteng R., Ballard H. E. Jr., Mansion G., et al.* 2003. Relationships among pansies (*Viola* section *Melanium*) investigated using ITS and ISSR markers // *Plant Systematics and Evolution.* Vol. 241, N. 3–4, P. 153–170.
 65. *Young N. D., de Pamphilis C. W.*, 2000. Purifying selection detected in the plastid gene *matK* and flanking ribozyme regions within a group II intron of nonphotosynthetic plants // *Mol. Biol. Evol.* Vol. 12. P. 1933–1941.
 66. *Zabeau M., Vos P.*, 1993. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting // European Patent Office, publication 0 534 858 A1, bulletin 93/13.
 67. *Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D.*, 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification // *Genomics.* Vol. 20. P. 176–183.

MOLECULAR MARKERS FOR PLANT SPECIES IDENTIFICATION AND PHYLOGENETICS

Matveeva T. V., Pavlova O. A., Bogomaz D. I., Lutova L. A., Demkovich A. E.

✿ **SUMMARY:** In this review we summarized the information on application of molecular markers for plant species identification and phylogenetics: positive sides and limitations of main markers, representing sequencing data of taxonomically important chloroplast and nuclear DNA regions. Markers, based on polymorphism of PCR and restriction products, are also discussed as accessorial markers in phylogenetic studies.

✿ **KEY WORDS:** molecular markers; plants; DNA barcode; DNA-fingerprinting.

✿ Информация об авторах

Матвеева Татьяна Валерьевна — к. б. н., с. н. с.

Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики и селекции. 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9. E-mail: radishlet@mail.ru.

Павлова Ольга Андреевна — аспирант.

Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики и селекции. 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9. E-mail: radishlet@mail.ru.

Богомаз Денис Игоревич — к. б. н., нач. отд. физиологии ЦТСОП.

Санкт-Петербургский государственный университет. 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9. E-mail: radishlet@mail.ru.

Лутова Людмила Алексеевна — д. б. н., профессор.

Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики и селекции. 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9. E-mail: radishlet@mail.ru.

Демкович Андрей Евгеньевич — к. б. н., старший научный сотрудник. Донецкий ботанический сад НАН Украины, Донецк, Украина. 83059, г. Донецк, пр. Ильича, 110. E-mail: radishlet@mail.ru.

Matveeva Tatiana Valer'evna — PhD., senior reseacher.

St. Petersburg State University. department of Genetics and Breeding. 199034, St. Petersburg, Universitetskaya nab., 7/9. E-mail: radishlet@mail.ru.

Pavlova Olga Andreyevna — PhD student.

St. Petersburg State University. department of Genetics and Breeding. 199034, St. Petersburg, Universitetskaya nab., 7/9. E-mail: radishlet@mail.ru.

Bogomaz Denis Igorevich — PhD., head of the department of Physiology of CTSEP. St. Petersburg State University. department of Genetics and Breeding. 199034, St. Petersburg, Universitetskaya nab., 7/9. E-mail: radishlet@mail.ru.

Lutova Ludmila Alekseyevna — D. sci., Professor.

St. Petersburg State University. department of Genetics and Breeding. 199034, St. Petersburg, Universitetskaya nab., 7/9. E-mail: radishlet@mail.ru.

Demkovich Andrey Evgen'yevich — PhD., senior reseacher.

Donetsk botanical garden of NAS of Ukraine. Ilich av., 10. Donetsk, Ukraine. 83059. E-mail: radishlet@mail.ru.