

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ СОРГО С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ МУЛЬТИПЛЕКСНОГО МИКРОСАТЕЛЛИТНОГО АНАЛИЗА

Анискина Ю.В.^{1*}, Малиновская Е.В.², Мицурова В.С.¹, Велишаева Н.С.¹, Колобова О.С.¹, Шилов И.А.¹

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии (ВНИИСБ), Россия 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42
✉ *aniskina.julia@gmail.com

² Кубанская опытная станция-филиал ВИР, Федеральный исследовательский центр Всероссийский научно-исследовательский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Россия 352183, Краснодарский край, Гулькевичский район, п. Ботаника, ул. Центральная, д. 2

Данное исследование направлено на оценку степени генетического разнообразия и анализ генетической структуры отечественной коллекции сорго. Исследование генетического разнообразия видов сельскохозяйственных культур имеет большое значение для управления генетическими ресурсами и обеспечения продовольственной безопасности любой страны. Значительное генетическое разнообразие сорго представляет большие возможности для улучшения агрономических признаков этой зерновой культуры. Эффективность анализа полиморфизма микросателлитных локусов для изучения генетического разнообразия и генетических взаимосвязей представителей различных рас и различных эколого-географических групп сорго продемонстрирована во многих исследованиях. Значительно ускорить генетический анализ большого количества растительных образцов позволяет использование мультиплексных систем ПЦР-анализа на основе набора полиморфных микросателлитных локусов. Для исследования генетического разнообразия коллекции культурных и дикорастущих форм сорго разработана единая система мультиплексного ПЦР-анализа на основе 12 полиморфных микросателлитных локусов, позволяющая проводить анализ образцов растений в одну стадию. В результате микросателлитного анализа 200 растений сорго было выявлено 229 аллелей. Исследованные локусы продемонстрировали высокий полиморфизм. В большинстве локусов было выявлено более 17 аллелей. Индексы полиморфности локусов (PIC) варьируют от 0,694 до 0,954. Установлен высокий показатель эффективного мультиплексного отношения (EMR) разработанной системы – 0,833. В результате микросателлитного анализа исследуемых образцов были получены оцифрованные генетические профили, составлены генетические паспорта каждого образца, установлен значительный полиморфизм среди представителей разных разновидностей (рас) сорго. В работе продемонстрирована эффективность применения разработанной мультилокусной системы для оценки генетического разнообразия и генетических взаимосвязей образцов сорго, относящихся к различным разновидностям. Анализ полученных данных тремя взаимодополняющими методами: кластерным анализом родства NJ, факторным анализом PCoA и кластерным анализом на основе байесовской модели позволил дифференцировать образцы по группам в соответствии с классификацией по морфологическим и агрономическим признакам.

Ключевые слова: сорго, генетическая идентификация, микросателлиты, мультиплексный анализ.

Прозрачность финансовой деятельности / The transparency of the financial activities Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы / The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work

Дополнительная информация / Additional information Полные данные этой статьи доступны / Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2019-3-01>

Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы / The journal's opinion is neutral to the presented materials, the author, and his or her employer

Все авторы одобрили рукопись / All authors approved the manuscript

Конфликт интересов отсутствует / No conflict of interest

RESEARCHING THE GENETIC DIVERSITY OF SORGHUM USING THE MULTIPLEX MICROSATELLITE ANALYSIS

Aniskina Yu. V.^{1*}, Malinovskaya E. V.², Mitsurova V. S.¹, Velishaeva N. S.¹, Kolobova O. S.¹, Shilov I. A.¹

¹ All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology (VNIISB), 42 Timiryazevskaya St., Moscow 127550, Russia
✉ *aniskina.julia@gmail.com

² Kuban Experimental Station of VIR, N.I. Vavilov All-Russian Research Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 2 Tsentralnaya St., Botanica, Krasnodar region, 352183, Russia.

This study is focused on evaluation of the genetic structure and diversity of the national sorghum collection. Analyzing the genetic diversity of crop species is of great importance for genetic resources management and food security of any country. Huge genetic diversity of sorghum provides a great opportunity to improve the agronomic characteristics of this crop. The efficiency of microsatellite analysis has been demonstrated in many studies on the genetic diversity of different races and geographical groups of sorghum plants. Development of multiplex PCR analysis systems based on a set of polymorphic microsatellite loci will facilitate genetic tests on a large number of plant samples, thus making the research on sorghum diversity more efficient and comprehensive. A system of multiplex PCR analysis based on 12 polymorphic microsatellite loci was developed to perform single-stage high-throughput screening of cultivated and wild forms preserved in the sorghum germplasm collection. As a result of the microsatellite analysis of 200 sorghum plants, 229 alleles were detected. The studied loci showed high polymorphism. More than 17 alleles were identified in most loci, their polymorphic index content (PIC) ranging from 0.694 to 0.954. The value of the effective multiplex ratio (EMR) in the developed system was estimated at 0.833. The microsatellite analysis of sorghum accessions resulted in obtaining quantized gene expressions profiles, with a DNA profile for each accession, and revealed significant polymorphism among the plants of different sorghum varieties (races). The developed multiplex PCR system was shown to be efficient for evaluation of the genetic diversity and genetic relationships of sorghum plants from different races. The analysis of the obtained data using three bioinformatic techniques, NJ cluster analysis, PCoA, and the Bayesian model-based clustering, helped to classify the analyzed sorghum accessions into cluster groups according to their morphological and agronomic traits.

Key words: sorghum, genetic diversity, genetic identification, microsatellites (SSR), multiplex PCR analysis, DNA fragment analysis.

Для цитирования: Анискина Ю.В., Малиновская Е.В., Мицурова В.С., Велишаева Н.С., Колобова О.С., Шилов И.А. Исследование генетического разнообразия сорго с использованием технологии мультиплексного микросателлитного анализа. *Биотехнология и селекция растений*. 2019;2(3):20-29. DOI: 10.30901/2658-6266-2019-3-01

For citation: Aniskina Yu.V., Malinovskaya E.V., Mitsurova V.S., Velishaeva N.S., Kolobova O.S., Shilov I.A. The study of the sorghum genetic diversity using the multiplex microsatellite analysis. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2019; 2(3):20-29. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2019-3-01

ORCID:

Aniskina Yu.V. <https://orcid.org/0000-0002-3376-0263>
Malinovskaya E.V. <https://orcid.org/0000-0002-0136-3650>
Mitsurova V.S. <https://orcid.org/0000-0001-8998-5608>
Velishaeva N.S. <https://orcid.org/0000-0002-2755-3313>
Kolobova O.S. <https://orcid.org/0000-0003-3172-8099>
Shilov I.A. <https://orcid.org/0000-0003-2448-6239>

УДК 575.22:633.174

Поступила в редакцию: 28.06.2019

Принята к публикации: 03.10.2019

Введение

Сорго [*Sorghum bicolor* (L.) Moench, 2n = 20] занимает пятое место в мире среди зерновых культур и является основной продовольственной зерновой культурой в полусухих тропиках (Salih et al., 2016). Крупнейшими производителями сорго, по данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации Объединенных Наций, опубликованным на интернет-портале <http://faostat.fao.org>, являются США, Нигерия, Судан, Мексика, Эфиопия и Индия. В России эта теплолюбивая культура выращивается преимущественно в южных регионах.

Культура сорго — ценный сельскохозяйственный и промышленный ресурс. Она отличается быстрым ростом и созреванием, устойчивостью к высоким температурам и низкому плодородию почвы. Сорго — культура многоцелевого использования. Она широко используется для производства муки, крупы, крахмала и сахара, в качестве корма для домашних животных, является одним из ценных источников биотоплива (биоэтанол, биогаз, твердое топливо), применяется в севообороте для возобновления почвы (Bolshakov et al., 2008).

Род *Sorghum* Moench., относящийся к семейству *Poaceae*, характеризуется большим видовым и сортовым разнообразием. Таксономия рода неоднократно пересматривалась и уточнялась. Основы ботанической классификации сорго были разработаны О. Stapf, J. D. Snowden, J. M. J. De Wet, J. P. Huckabay, J. R. Harlan, E. C. Якушевским и рядом других исследователей (Stapf, 1934; Snowden, 1936; De Wet, Huckabay, 1967; Yakushevsky, 1969; Harlan, de Wet, 1972).

На основе морфологических признаков колосков и зерновок J. D. Snowden подразделил род сорго на две секции: *Eu-Sorghum* и *Para-Sorghum*. Возделываемые виды были отнесены к серии *Sativa* секции *Eu-Sorghum*, и объединены в 6 подсерий: *Bicoloria*, *Guineensia*, *Caffra*, *Durra*, *Nervosa*, *Drummondii* (Snowden, 1936). В дальнейшем вследствие отсутствия генетических барьеров между таксонами, выделенными J. D. Snowden, J. M. J. de Wet и J. P. Huckabay объединили все формы сорго в один вид — *S. bicolor* (L.) Moench. (De Wet, Huckabay, 1967).

J. R. Harlan и J. M. J. de Wet предложили упрощенную классификацию вида *S. bicolor*, разделив его на два подвида — *S. bicolor* ssp. *bicolor* и *S. bicolor* ssp. *arundinaceum*. Все культурные формы авторы отнесли к подвиду *S. bicolor* ssp. *bicolor*, в котором на основе морфологических особенностей колосков и зерновок выделили пять основных рас: *Bicolor*, *Caudatum*, *Durra*, *Guinea*, *Kafir* и десять вариантов, являющихся результатом межрасовых скрещиваний (Harlan, de Wet, 1972).

В России предпочитают систематику Е. С. Якушевского. Он классифицировал все возделываемые в разных странах мира сорговые культуры с учетом хозяйственного назначения, биологических и эколого-географических особенностей как отдельные виды: сорго зерновое гвинейское, сорго

зерновое кафрское, сорго зерновое китайское, сорго зерновое негритянское, сорго зерновое хлебное, сорго сахарное, сорго техническое или веничное, суданская трава и сорго щедрое (Yakushevsky, 1969). Эта систематика считается более естественной и удобной, хотя и имеет недостатки в эволюционно-филогенетическом отношении (Shepel et al., 1985).

Согласно современной номенклатуре таксонов растений, опубликованной на интернет-портале <http://www.the-plantlist.org/>, все культивируемые формы сорго объединены в вид сорго двуцветное (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) и рассматриваются как расы или разновидности, а не как отдельные виды (Deu, Hamon, 1994; Wiersema, Dahlberg, 2007).

Сорго характеризуется большим генетическим разнообразием. Наибольшее разнообразие форм этого растения обнаружено в северо-восточном регионе Африки, который считается центром происхождения или разнообразия этой культуры (Vavilov, 1935; Vavilov, Chester, 1951). В коллекциях генетических ресурсов сорго в настоящее время сохраняется более 42 тысяч образцов (Tesfaye et al., 2017). Одна из крупнейших коллекций находится в Международном научно-исследовательском координирующем центре растениеводства полусухих тропиков (ICRISAT — International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics) (Billot et al., 2013). В России самая большая коллекция, насчитывающая более 8 тыс. образцов, находится во Всероссийском научно-исследовательском институте генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова (ВИР) (Malinovskaya, 2007). Исследование генетического разнообразия и паспортизация образцов, интегрированных в мировые коллекции, имеет большое значение для классификации и управления генетическими ресурсами сорго.

Использование генетически различных форм является ключевым условием любой селекционной программы для получения перспективных сортов (Ramu et al., 2013). Понимание генетического разнообразия сорго будет способствовать более целенаправленному подбору исходного материала для селекции и интрогрессии генов и позволит улучшить агрономические показатели этой зерновой культуры.

Традиционным методом оценки генетического разнообразия является анализ морфологических признаков, поскольку их анализ не требует сложного оборудования и методологии. Исследование морфологических признаков позволяет проводить предварительную оценку разнообразия в посевах. Однако, для исследования генетического разнообразия этих признаков бывает недостаточно, из-за их небольшого числа, ограниченного полиморфизма и вариабельности проявления в изменчивых условиях окружающей среды.

Наиболее надежным подходом является исследование разнообразия на генетическом уровне с использованием ДНК-маркеров. По сравнению с морфологическими признаками, они стабильны, хорошо воспроизводимы и не зависят от влияния факторов окружающей среды. Исследования генетического разнообразия сорго с использованием молекулярных маркеров были начаты в начале 1990-х годов. На начальных этапах разработки и применения молекулярных

маркеров значительную роль в идентификации геномных областей, ответственных за важные агрономические признаки, исследованиях генетического разнообразия и сравнительном картировании генома играли RFLP-маркеры, основанные на анализе полиморфизма длин рестрикционных фрагментов ДНК. С помощью RFLP-маркеров M. Deu и P. Hamon (1994) впервые дифференцировали образцы сорго в зависимости от расы и происхождения.

Микросателлитные маркеры (SSR, simple sequence repeats) являются эффективным инструментом для изучения генетического разнообразия, поскольку они широко представлены в геноме растений, характеризуются высоким полиморфизмом, точностью воспроизведения результатов и кодоминантным типом наследования, что позволяет получать информацию о гомозиготном или гетерозиготном состоянии локусов. Анализ полиморфизма микросателлитных локусов дает возможность установить индивидуальную характеристику каждого отдельного генотипа — ДНК-профиль. Микросателлитные маркеры сорго были разработаны независимо несколькими исследовательскими группами (Brown et al., 1996; Taramino et al., 1997; Bhatramakki et al., 2000; Kong et al., 2000; Schloss et al., 2002; Srinivas et al., 2009; Li et al., 2009; Wang et al., 2012) и широко применялись для исследования генетических взаимосвязей между представителями разных рас и эколого-географических групп, в том числе в рамках международного проекта “The Generation Challenge Programme” (Ali et al., 2008; Sagnard et al., 2011; Ng'uni et al., 2011, 2012; Billot et al., 2012; 2013; Ramu et al., 2013; Salih et al., 2016; Ouedraogo et al., 2017; Maina et al., 2018).

Ранее на основе 17 микросателлитных локусов мы разработали две мультиплексные системы — «Сорго-7» и «Сорго-10» (Aniskina et al., 2018), которые дали возможность дифференцировать выборку из 249 образцов коллекции сорго ВИР. Однако для анализа большого количества образцов требуется создание единой системы ПЦР-анализа, позволяющей сократить сроки проведения молекулярно-генетического анализа.

Цель настоящего исследования заключается в разработке единой системы генотипирования сорго на основе мультиплексного анализа полиморфизма микросателлитных локусов и выяснение возможности ее использования для оценки уровня генетического разнообразия образцов сорго коллекции ВИР.

Материалы и методы

Исходный материал для исследования включал 200 образцов видов *Sorghum*, в том числе: 9 образцов гвинейского сорго (*S. guineensis* Snowd), 47 — кафрского сорго (*S. caffrorum* (Beauv.) Snowd.), 12 — китайского сорго (*S. nervosum* Bess.), 19 — негритянского сорго (3 образца *S. bantuanum* L. и 16 образцов *S. caudatum* (Hack.) Stapf), 23 — хлебного сорго (9 образцов

S. cernuum (Host.) Gram. и 14 образцов *S. durra* (Forsk.) Stapf.), 59 — сахарного сорго (*S. saccharatum* (L.) Pers.), 13 — веничного сорго (*S. technicum* (Koern.) Snowd) и 18 — суданской травы (*S. sudanense* Stapf.) (Приложение). Видовые названия образцов приведены в соответствии с классификацией Е.С. Якушевского по способу использования и хозяйственно-ценным признакам.

Методики выделения ДНК, амплификации и фрагментного анализа описаны нами ранее (Анискина и др., 2018).

Для оценки уровня полиморфизма использовали значение коэффициента полиморфизма PIC (polymorphic information content). Коэффициент полиморфизма был рассчитан отдельно для каждого локуса микросателлитных последовательностей генома сорго. Значение коэффициента вычисляли по формуле: $PIC = 1 - \sum(P_i)^2$, где P_i — частота встречаемости i -ой аллели (Ali et al., 1979).

Для определения эффективности предлагаемой мультиплексной системы был произведен расчет эффективного мультиплексного отношения (effective multiplex ratio, EMR) (Chesnokov et al., 2015). EMR находится с помощью произведения общего числа полиморфных локусов и доли полиморфных локусов от их общего числа: $EMR = n_p(n_p/n)$, где n_p — число полиморфных локусов, n — общее число локусов.

Для выяснения генетической структуры изученной выборки образцов сорго использовались три взаимодополняющих подхода. Для оценки генетических расстояний между растительными образцами в программе DARwin 6.0.21 были выполнены кластерный анализ родства NJ (Neighbor Joining) и факторный анализ PCoA (Principle Coordinate Analysis). Различия между всеми парами отдельных генотипов были оценены на основе стандартной процедуры сопоставления. Факторный анализ позволил получить общее представление о разнообразии выборки, в то время как генетические отношения между образцами коллекции были проанализированы построением дендрограммы с использованием метода Neighbor Joining (NJ).

Для исследования популяционной структуры и распределения изученных образцов по подгруппам (K) был выполнен кластерный анализ на основе байесовской модели с использованием программного обеспечения STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). Байесовская модель предполагает, что каждый индивид происходит от одной из популяций K. Были установлены следующие параметры анализа: алгоритм Admixture model, корреляция с частотой аллелей, 100000 итераций Burn-in и 200000 повторов MCMC. Для каждого K в диапазоне от 2 до 10 было выполнено пять независимых анализов.

Результаты

Для создания эффективной системы мультиплексного микросателлитного анализа, позволяющей надежно различать и идентифицировать образцы растений определяющее значение

имеет подбор наиболее информативных микросателлитных маркеров. С этой целью было проведено исследование полиморфизма более 40 микросателлитных локусов. При выборе локусов по литературным данным учитывались такие данные как количество аллелей, выявленных в локусе (более 5), расположение на разных хромосомах, обеспечивающее независимое наследование ДНК-маркеров, и небольшая длина получаемых фрагментов (100-300 пн) для проведения достоверного анализа длин ПЦР-фрагментов. Полиморфизм данных локусов был исследован экспериментально у образцов расширенной коллекции сорго. В результате были отобраны наиболее полиморфные микросателлитные локусы, с использованием которых получены четко интерпретируемые и воспроизводимые результаты (Aniskina et al., 2018). Мономорфные микросателлитные локусы, трудно амплифицируемые или дающие неоднозначные и нестабильные результаты были исключены из исследования.

С целью разработки универсальной системы мультиплексного микросателлитного анализа для оценки генетического разнообразия сорго были отобраны 12 локусов, которые, по данным проведенных ранее исследований, характеризуются наиболее высокими индексами полиморфности (PIC). Модифицированная мультиплексная система обозначена нами как «Сорго-12» (таблица 1).

В предложенной системе анализа каждого микросателлитного локуса осуществляется с парой специфичных праймеров, один из которых помечен определенным флуоресцентным красителем (FAM, R6G, TAMRA, ROX или Sy630), в соответствии с ранее опубликованным протоколом (Анискина и др., 2018). Это позволяет анализировать получаемые по каждому локусу ПЦР-фрагменты отдельно по соответствующему каналу детекции (см. табл. 1). В используемой мультиплексной

системе по каждому каналу осуществлялся анализ 2–3 локусов, подобранных по длине таким образом, чтобы диапазоны длин их фрагментов не перекрывались (см. табл. 1). Для одновременной амплификации микросателлитных локусов в одной ПЦР-пробе подобрана единая оптимальная температура отжига нескольких пар праймеров ($T_{отж} = 55\text{ }^{\circ}\text{C}$). Длина полученных ПЦР-фрагментов определяется с точностью до одного нуклеотида при разделении электрофорезом высокого разрешения в капиллярах на автоматическом генетическом анализаторе «Нанофор-05».

На рисунке 1 в качестве примера представлены результаты фрагментного анализа сорта “Feterita” негритянского сорго. Каждый пик на электрофореграмме представляет собой фрагмент определенной длины, соответствующий одной из аллелей микросателлитного локуса (рисунок 1А). Длина каждого микросателлитного фрагмента определена с точностью до одного нуклеотида. Совокупность фрагментов всех локусов представляет собой оцифрованный генетический профиль, который может быть записан в виде генетического паспорта (рисунок 1Б).

Уникальные генетические характеристики были получены для каждого образца коллекции (Приложение). Большинство исследуемых генотипов характеризуются гомозиготным состоянием локусов. Однако у некоторых образцов, например, у представителей суданской травы и технического сорго, некоторые локусы оказались гетерозиготными. Отметим, что стерильные и фертильные линии-аналоги (83-А и 83-В, Перспектива 80-А и Перспектива 80-В) имеют абсолютно идентичные профили.

В результате анализа коллекции сорго по 12 микросателлитным локусам было выявлено 229 аллелей, или так называемых дескрипторов генетического разнообразия.

Таблица 1. Характеристика микросателлитных локусов сорго, входящих в состав мультиплексной системы «Сорго–12»

Table 1. Characteristics of sorghum SSR loci involved in the Sorghum–12 multiplex system

№ п/п	Буквенный индекс	Локус	Повтор	Краситель	Длина фрагмента, пн	Число аллелей	PIC локуса*
1	A	Sb4-15	(AG)	FAM	111 - 149	9	0,694
2	B	Sb4-32	(AG)	FAM	170 - 242	25	0,880
3	C	Sb1-10	(AG)	FAM	255 - 322	22	0,802
4	D	Xtxp25	(CT)	R6G	126 - 212	27	0,920
5	E	Dsenhsbm4	(TG)	R6G	245 - 265	10	0,855
6	F	SbAGA01	(AG)	TAMRA	99 - 133	17	0,826
7	G	Xtxp10	(CT)	TAMRA	145 - 171	10	0,758
8	H	Sb6-36	(AG)	TAMRA	173 - 225	17	0,859
9	I	Sb5-206	(AC)	ROX	116 - 184	23	0,904
10	J	Sb6-84	(AG)	ROX	194 - 250	25	0,860
11	K	SbAGH04	(AG)	Sy630	110 - 186	31	0,954
12	L	Sb6-342	(AC)	Sy630	242 - 308	13	0,789

Исследованные локусы продемонстрировали высокий полиморфизм. В каждом локусе было выявлено от 9 до 31 аллелей. Частота встречаемости аллелей варьировала от 0,004 до 0,49. Редкие аллели, встречающиеся с частотой менее 0,01, составили 26 % от числа всех выявленных аллелей. Доля наиболее часто встречающихся аллелей (0,20 – 0,49) составила 5 %. Индекс полиморфности локусов (PIC) варьировал от 0,694 до 0,954, что свидетельствует о высоком уровне

не информативности используемых микросателлитных маркеров (см. табл. 1). При этом индекс полиморфности локуса может существенно различаться среди представителей различных разновидностей сорго. На основе полученных данных был вычислен показатель эффективного мультиплексного отношения (EMR) разработанной системы. Его значение составило 0,833, что свидетельствует об эффективности созданной мультиплексной системы.

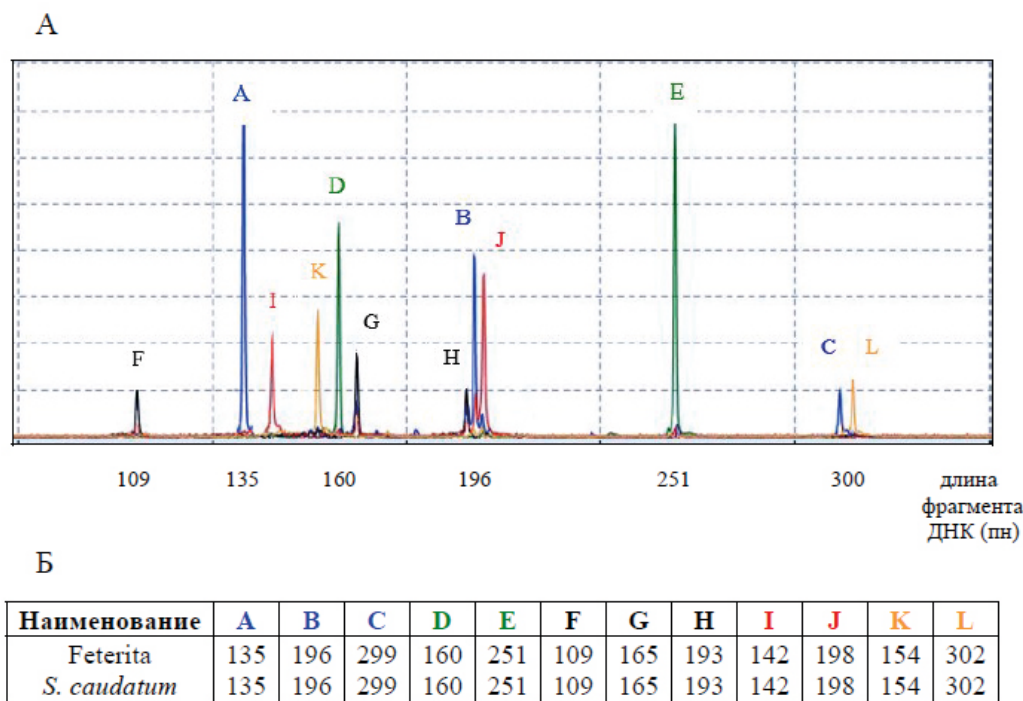


Рис. 1. Генетический профиль (А) и генетический паспорт (Б) сорта сорго «Feterita», полученные в результате анализа с использованием мультилокусной системы «Сорго-12». Латинскими буквами обозначены исследуемые микросателлитные локусы (см. табл. 1), цвет пика на графике соответствует цвету канала детекции на приборе «Нанофор-05». По оси абсцисс отложена длина фрагментов ДНК, по оси ординат - интенсивность соответствующего сигнала. Генетический паспорт – совокупность аллелей, выявленных в 12 локусах.

Fig. 1. DNA profile (A) and genetic passport (B) obtained after analyzing the sorghum cultivar «Feterita» with the developed multiplex system «Sorghum-12». Latin letters indicate the SSR loci (see Table 1), peak colors on the graph correspond to the detection channels of the Nanofor-05 device; figures correspond to the fragment sizes of detected alleles, bp; DNA fragment sizes are plotted on the X axis (bp), and the intensity of the corresponding signal on the Y axis. The genetic passport is a set of alleles identified at 12 loci.

Для оценки генетического разнообразия сорго на основе данных микросателлитного анализа были использованы три взаимодополняющих подхода. Кластерный анализ родства NJ и факторный анализ PCoA позволили установить генетические расстояния между образцами.

Из полученной в программе DARwin 6.0.21 дендрограммы (рисунок 2А) следует, что все образцы технического сорго, 78% сахарного сорго, 79 % кафрского сорго, 83% китайского сорго и 56 % хлебного сорго образуют отдельные кластеры в соответствии с ботанической классификацией (таблица 2). Некоторые образцы сахарного, кафрско-

го, гвинейского и негритянского сорго, а также суданской травы объединились в кластеры с представителями других рас. Так, например, в единый кластер вместе с растениями кафрского сорго вошли представители других разновидностей зернового сорго и сахарного сорго. Такие образцы могут относиться к промежуточным формам, возникшим вследствие высокой способности сорго к гибридизации и сложной селекционной истории.

Так, например, сорт сахарного сорго Schrock (к-3046, образец № 140) является межрасовым гибридом сахарного и зернового сорго и группируется в кластер с зерновым

негритянским сорго. Образец № 149 (линия ДНВ-26, к-9402) является межрасовым гибридом суданской травы и зернового сорго и группируется в кластер с зерновым кафрским сорго.

В изученной выборке образцов сорго также были выявлены дублированные образцы с одинаковыми генотипами. Так, например, образец негритянского сорго с номером по каталогу к-2827 был представлен в коллекции дважды: как №78 – SPT-20 (*S. caudatum*) и №87 – SBT-20 (*S. banturum*).

Данные факторного анализа методом PCoA, проведенного в программе DARwin 6.0.21, в целом соответствуют результатам кластерного анализа с использованием алгоритма

Neighbor Joining (NJ) и позволяют дифференцировать группы образцов сорго в соответствии с классификацией по морфологическим и агрономическим признакам. При рассмотрении по осям 1/2 большинство образцов сахарного сорго были сгруппированы в левом верхнем квадранте, большинство образцов кафрского сорго – в правом верхнем квадранте, образцы китайского и негритянского сорго – в левом нижнем квадранте (рисунок 2Б). Образцы технического сорго локализованы обособленно в левом верхнем квадранте при рассмотрении по осям 2/3.

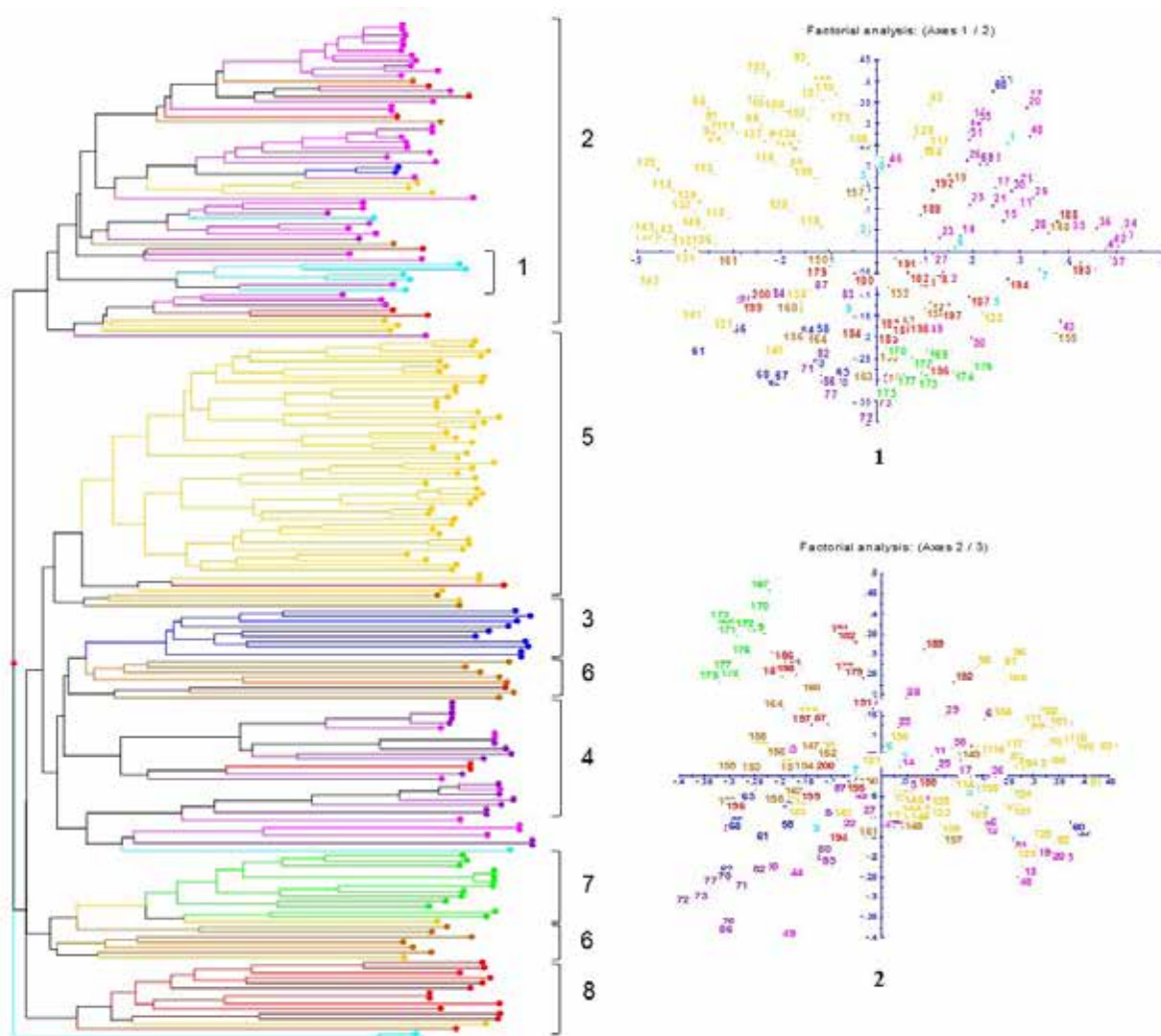


Рис. 2. Обработка результатов генетического анализа образцов сорго методами многомерной статистики в программе DARwin. А – Кластеризация образцов с использованием алгоритма NJ. Цвет шрифта соответствует таксономической классификации образцов: 1 – гвинейское (*S. guineensis*), 2 – кафрское (*S. caffrorum*), 3 – китайское (*S. nervosum*), 4 – негритянское (*S. caudatum* / *S. banturum*), 5 – сахарное (*S. saccharatum*), 6 – суданская трава (*S. sudanense*), 7 – техническое (*S. technicum*), 8 – хлебное (*S. cernum* / *S. durra*); Б – Группировка образцов выборки по результатам факторного анализа (PCoA). 1 – оси 1/2; 2 – оси 2/3.

Fig. 2. Processing the results of the genetic analysis of sorghum accessions using multivariate statistics based on the DARwin software. А – NJ analysis. Font colors correspond to the taxonomic classification of accessions: 1 – *S. guineensis*, 2 – *S. caffrorum*, 3 – *S. nervosum*, 4 – *S. caudatum* / *S. banturum*, 5 – *S. saccharatum*, 6 – *S. sudanense*, 7 – *S. technicum*, 8 – *S. cernum* / *S. durra*; Б – Principle coordinate analysis (PCoA). 1 – axes 1/2; 2 – axes 2/3.

Для исследования популяционной структуры и распределения образцов сорго по подгруппам (К) в программе STRUCTURE был выполнен кластерный анализ на основе байесовской модели. Было исследовано от 2 до 10 возможных подгрупп (К). Достаточно четкой дифференциации всех рас удалось достичь при значении $K = 8$. Кластерный анализ, выполненный при $K = 8$, в целом подтвердил результаты, полученные методами NJ и PCoA. Анализ структуры изученной выборки образцов сорго показывает, что 100%

образцов технического сорго (7), 88% суданской травы (6), 81% сахарного сорго (5), 83% китайского сорго (3), 71% кафрского сорго (2), 66% гвинейского сорго (1), 65% хлебного сорго (8) и 52% негритянского сорго (4) группируются в кластеры в соответствии с их ботанической классификацией (рисунок 3, см. табл. 2). Значение величины дифференциации образцов (F_{ST}) в полученных кластерах (группах) составил от 0,286 до 0,635.

Таблица 2. Кластеризация разновидностей сорго на основе результатов NJ анализа и структурного анализа на основе байесовской модели (BM)

Table 2. Clustering of sorghum accessions using the Neighbour-Joining (NJ) method and Bayesian model-based (BM) clustering technique

Метод	Кластеры образцов сорго							
	1	2	3	4	5	6	7	8
DARwin NJ	55%	79%	83%	47%	78%	38%	100%	56%
Structure BM	66%	71,5%	83%	52%	81%	88%	100%	65%

Примечание: цифрами обозначены разновидности сорго, объединенные в соответствующие кластеры:

1–гвинейское (*S. guineensis*), 2–кафрское (*S. caffrorum*), 3–китайское (*S. nervosum*), 4–негритянское (*S. caudatum*–*S. bantuoorum*), 5–сахарное (*S. saccharatum*), 6–суданская трава (*S. sudanense*), 7–техническое (*S. technicum*), 8–хлебное (*S. cernum* / *S. durra*).

Note: the numbers indicate sorghum varieties, grouped into corresponding clusters:

1–*S. guineensis*, 2–*S. caffrorum*, 3–*S. nervosum*, 4–*S. caudatum*–*S. bantuoorum*, 5–*S. saccharatum*, 6–*S. sudanense*, 7–*S. technicum*, 8–*S. cernum*–*S. durra*.

Таким образом, исследуемые образцы сорго образовали восемь хорошо отличимых групп (кластеров) как в результате использования метода NJ (DARwin), так и кластерного анализа на основе байесовской модели BM (STRUCTURE). В кластерах, полученных разными методами, наблюдается значительное соответствие состава и числа образцов. (см. табл. 2). В целом, распределение образцов сорго по группам соответствует их расовой принадлежности.

Обсуждение

Ключевым фактором в селекции сельскохозяйственных культур для создания перспективных сортов является подбор родительских форм, характеризующихся большим генетическим разнообразием. Анализ разнообразия на генетическом уровне с использованием микросателлитных маркеров является самым надежным и экономически оправданным методом выявления различий между генотипами.

Ранее для исследования генетического разнообразия представителей разных рас сорго были разработаны 2 мультиплексные системы «Сорго-7» и «Сорго-10» на основе 17 микросателлитных локусов (Aniskina et al., 2018). Однако несмотря на все достоинства этих ПЦР-систем, оказалось, что не все локусы подходят для дифференциации рас (различные разновидности сорго могут иметь сходный состав аллелей по некоторым микросателлитным локусам), и

использование таких локусов в кластерном анализе может способствовать объединению растений разных рас в общий кластер. Кроме того, этот подход оказался недостаточно удобен для анализа большой партии растительных образцов, поскольку анализ каждого образца необходимо осуществлять в 2 стадии.

Поэтому в целях оптимизации этапов проведения широкомасштабного генетического анализа была разработана единая мультиплексная система, позволяющая проводить ПЦР-анализ в одну стадию. Данный подход является более технологичным и экономичным, поскольку позволяет существенно сократить стоимость и сроки проведения подобных исследований. Для создания мультиплексной системы из 17 локусов сорго, выбранных ранее для оценки генетического разнообразия, были отобраны 12 локусов с наиболее высокими показателями PIC. Эти локусы характеризуются большим числом аллелей, а также низкой или средней частотой их встречаемости. Из анализа были исключены локусы с небольшим числом аллелей и высокой частотой их встречаемости.

Высокий уровень полиморфизма микросателлитных локусов, входящих в мультиплексный набор, позволил получить генетические паспорта всех образцов коллекции. На основании генетических профилей, полученных в результате использования данной мультиплексной системы, все исследуемые образцы были дифференцированы и установлены их генетические взаимосвязи. Достаточно четкие отличия наблюдались между образцами зернового и сахарного

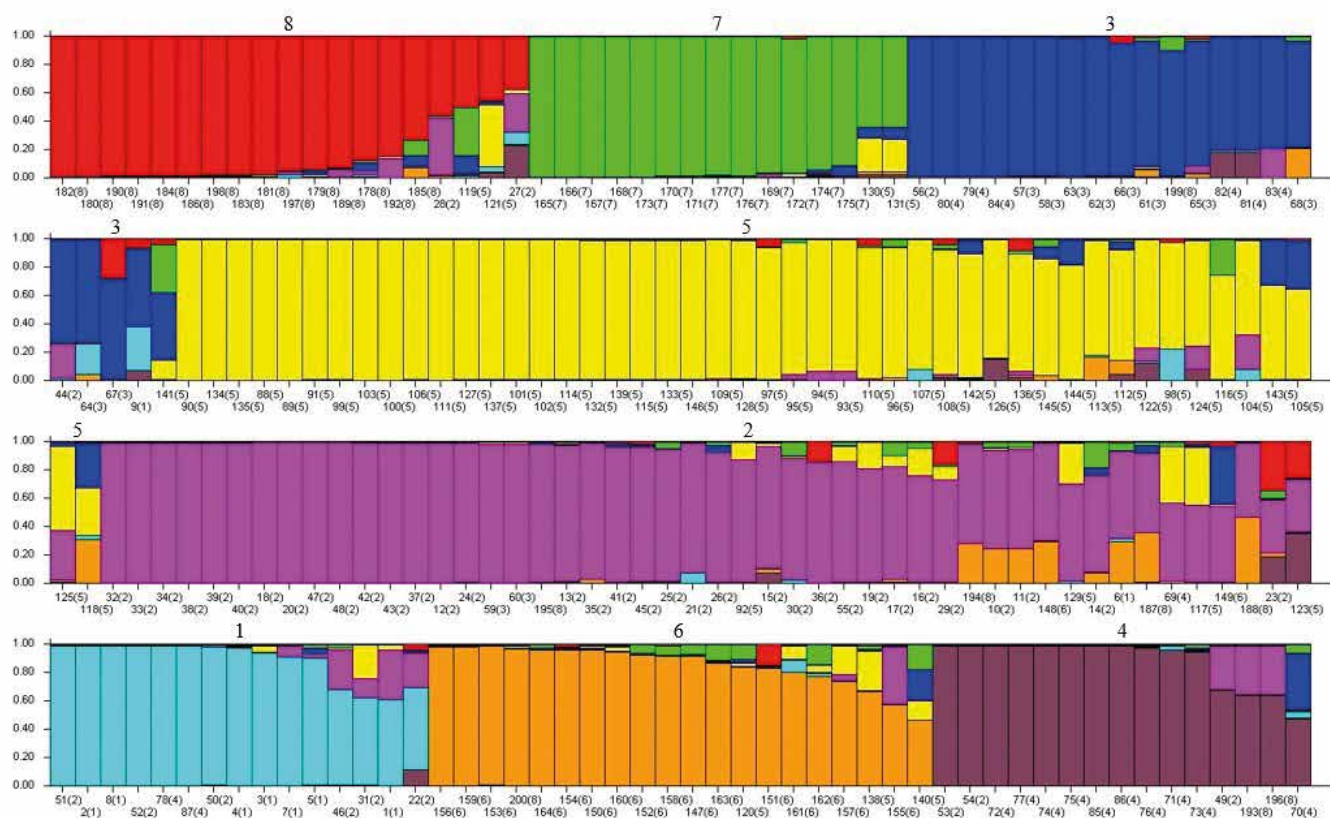


Рис. 3. Структура изученной выборки образцов коллекции сорго, полученная с использованием программы STRUCTURE. На основании байесовского анализа ($K = 8$), образцы сорго распределены по восьми кластерам, которые обозначены разными цветами.

Fig. 3. Structure of the studied samples from the sorghum collection obtained using the STRUCTURE program. According to the Bayesian analysis ($K = 8$) sorghum samples are lotted up in eight clusters which are differently colored.

сорго. Аналогичная дифференциация генотипов сахарного и зернового сорго также была достигнута другими авторами при использовании технологий секвенирования следующего поколения (NGS) (Zheng et al., 2011).

Генетические взаимосвязи, выявленные среди образцов сорго с использованием дистанционных методов парной дифференциации, PCoA и NJ-анализа, и кластерного анализа на основе байесовской модели, подтвердили дифференциацию образцов в соответствии с классификацией по расам, разработанной J.R. Harlan и J.M.J. de Wet (1972) и классификацией Е.С.Якушевского (1969). Тем не менее, представители некоторых рас сорго оказались распределены в другие группы в результате кластерного анализа. Это может быть связано со сложной селекционной историей исследуемых образцов и наличием в коллекции промежуточных форм (межрасовых гибридов). Дальнейшее исследование расширенной коллекции позволит более четко дифференцировать образцы сорго спорного происхождения.

Похожие результаты были получены другими исследовательскими группами. Так, например, в результате исследования 3367 образцов сорго разных рас и разного географического происхождения с использованием 41 микросателлитного

локуса также было выявлено глобальное совпадение в распределении образцов по группам на основе результатов NJ анализа и байесовской модели кластерного анализа (Billot et al., 2013). Среди культивируемых форм, за исключением кафрского сорго, практически не было обнаружено совпадения между расой и группой, сформированной на основе микросателлитных маркеров. Представители рас Bicolor, Caudatum, Durra и Guinea сгруппировались в три и более различных кластеров. Исследователи сообщают о подтверждении популяционной структуры сорго, и считают, что кластеризация образцов сорго по расам связана с их географическим происхождением (Billot et al., 2013). Разделение представителей сорго по расам в пределах географического происхождения также было продемонстрировано этой исследовательской группой в исследовании эталонного набора сорго из 384 образцов пяти рас сорго и их промежуточных форм (Ramu et al., 2013).

Авторы объясняют выявленную географическую дифференциацию исследуемых растений и различия в классификации, составленной на основе микросателлитных маркеров, и классификацией по расам, основанной на морфологических и агрономических признаках, следующими

факторами: географическим распространением радиально в направлениях от центра происхождения и сложными эволюционными процессами, а также обменом генами между культурными и дикими типами, обеспечивающим динамику популяции (Billot et al., 2013).

Работы других исследователей также свидетельствуют об определяющем значении таких факторов, как географическое происхождение и поток генов между культурными и дикорастущими растениями сорго для классификации сорго (Sagnard et al., 2011; Salih et al., 2016).

Сокращение числа исследуемых локусов, а, следовательно, и выявляемых аллелей (дескрипторов) существенно не повлияло на распределение представителей сорго по кластерам. В целом, результаты анализа генетического разнообразия исследуемых образцов сорго соответствуют результатам исследования, полученным нами ранее (Aniskina et al., 2018), но обработка результатов с помощью более расширенного арсенала биоинформатических методов (PCoA и NJ-анализа, и кластерного анализа на основе байесовской модели) позволила получить более точное распределение исследуемых представителей сорго по кластерам.

Заключение

Разработана единая система мультиплексного анализа сорго на основе 12 микросателлитных локусов, которая может быть использована в исследованиях генетического разнообразия коллекционных образцов сорго. Использование данной системы позволяет проводить анализ в одну стадию и, следовательно, сократить сроки его проведения, по сравнению с ранее предложенным подходом (Aniskina et al., 2018). Технология позволяет получать оцифрованные генетические профили, что значительно повышает точность идентификации растительных образцов при широкомасштабном исследовании. С использованием разработанной технологии был проведен генетический анализ отечественной коллекции сорго и получены уникальные генетические профили каждого образца коллекции. Анализ полученных данных тремя взаимодополняющими методами позволил дифференцировать образцы в соответствии с их классификацией по морфологическим и агрономическим признакам.

Понимание географического, экологического и социального аспектов формирования генетического разнообразия является ключом к устойчивому управлению генетическими ресурсами. Применение разработанной технологии для идентификации генотипов культуры сорго, характеризующейся высоким уровнем морфо-биологического разнообразия, будет способствовать уточнению классификации недостаточно изученных образцов сорго, формированию стержневых коллекций, что позволит уменьшить число ежегодно размножаемых образцов и сократить затраты на их содержание.

Работа выполнена в рамках государственного задания № 0574-2019-0003. Авторы благодарны сотрудникам ЦКП «Биотехнология» за помощь при работе на генетическом анализаторе «Нанофор-05».

References/Литература

- Ali M.L., Rajewski J.F., Baenziger P.S., Gill K.S., Eskridge K.M., Dweikat I. Assessment of genetic diversity and relationship among a collection of US sweet sorghum germplasm by SSR markers. *Molecular Breeding*. 2008;21(4): 497-509. DOI: 10.1007/s11032-007-9149-z
- Aniskina Yu.V., Malinovskaya E.V., Shalaeva T.V., Mitsurova V.S., Rodionova D.A., Kharchenko P.N. et al. Technology for genetic identification of sorghum varieties and hybrids based on multiplex microsatellite analysis. *Russian Journal of Biotechnology*. 2018;34(2):54-69. [in Russian] (Анискина Ю.В., Малиновская Е.В., Шалаева Т.В., Мишурова В.С., Родионова Д.А., Харченко П.Н. и др. Технология генетической паспортизации сортов и гибридов сорго на основе мультилокусного микросателлитного анализа. *Биотехнология*. 2018;34(2):54-69). DOI: 10.21519/0234-2758-2018-34-2-54-69
- Bhatramakki D., Dong J., Chhabra A.K., Hart G.E. An integrated SSR and RFLP linkage map of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Genome*. 2000;43(6):988-1002.
- Billot C., Ramu P., Bouchet S., Chantereau J., Deu M., Gardes L. et al. Massive sorghum collection genotyped with SSR markers to enhance use of global genetic resources. *PLoS One*. 2013;8(4):e59714. DOI: 10.1371/journal.pone.0059714
- Billot C., Rivallan R., Sall M.N., Fonceca D., Deu M., Glaszmann J.C. et al. A reference microsatellite kit to assess for genetic diversity of *Sorghum bicolor* (Poaceae). *Am. J. Bot.* 2012;99(6):e245-250. DOI: 10.3732/ajb.1100548
- Bolshakov A.Z., Bondarenko S.M., Kadyrov S.V., Klepko Yu.N., Kritsky A.N., Fedotov V.A., Usatova O.A. Time to honor sorghum (Vremya chestvovat sorgo). Rostov-on-Don: Rostizdat, 2008. [in Russian] (Большаков А.З., Бондаренко С.М., Кадыров С.В., Клепко Ю.Н., Крицкий А.Н., Федотов В.А., Усатова О.А. Время чествовать сорго. Ростов-на-Дону: Ростиздат; 2008).
- Brown S.M., Hopkins M.S., Mitchell S.E., Senior M.L., Wang T.Y., Duncan R.R. et al. Multiple methods for the identification of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Theor. Appl. Genet.* 1996;93(1-2):190-198. DOI: 10.1007/BF00225745
- Chesnokov Yu.V., Artemyeva A.M. Evaluation of the measure of polymorphism information of genetic diversity. *Agricultural Biology*. 2015;50(5):571-578. [in Russian] (Чесноков Ю.В., Артемьева А.М. Оценка меры информационного полиморфизма генетического разнообразия. *Сельскохозяйственная биология*. 2015;50(5):571-578. DOI: 10.15389/agrobiology.2015.5.571rus
- De Wet J.M.J., Huckabay J.P. (1967) The origin of *Sorghum bicolor*. II. Distribution and domestication. *Evolution*. 1967;21(4):787-802. DOI: 10.1111/j.1558-5646.1967.tb03434.x
- Deu M., Hamon P. The genetic organization of sorghum. *Agriculture et développement*. 1994;Special issue:25-30.
- Harlan J.R., de Wet J.M.J. A simplified classification of cultivated sorghum. *Crop Science*. 1972;12(2):172-176. DOI: 10.2135/cropsci1972.0011183X001200020005x
- Kidwell K.K., Osborn T.C. Simple Plant DNA Isolation Procedures. In: J. Beckman, T.C. Osborn (eds). *Plant Genomes. Methods for Genetic and Physical Mapping*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1992. p.1-13.
- Kong L., Dong J., Hart G.E. Characteristics, linkage-map positions, and allelic differentiation of *Sorghum bicolor* (L.) Moench DNA simple-sequence repeats (SSRs). *Theor. Appl. Genet.* 2000;101(3):438-448. DOI: 10.1007/s0012200051501
- Li M., Yuyama N., Luo L., Hirata M., Cai H. In silico mapping of 1758 new SSR markers developed from public genomic sequences for *Sorghum*. *Molecular Breeding*. 2009;24(1):41-47. DOI: 10.1007/s11032-009-9270-2
- Maina F., Bouchet S., Marla S.R., Hu Z., Wang J., Mamadou A. et al. Population genomics of sorghum (*Sorghum bicolor*) across diverse agro-

- climatic zones of Niger. *Genome*. 2018;61(4):223-232. DOI: 10.1139/gen-2017-0131
- Malinovskaya E.V. Intraspecific diversity of *Sorghum guineensis* Snowd. in connection with the formation of the core collection (Vnutrividovoye raznoobrazie *Sorghum guineensis* Snowd. v svyazi s formirovaniyem sterzhnevoy kolleksii) [dissertation]. St. Petersburg; 2007. [in Russian] (Малиновская Е.В. Внутривидовое разнообразие *Sorghum guineensis* Snowd. в связи с формированием стержневой коллекции: дис. ... канд. с.-х. наук. Санкт-Петербург; 2007).
- Ng'uni D., Geleta M., Bryngelsson T. Genetic diversity in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) accessions of Zambia as revealed by simple sequence repeats (SSR). *Hereditas*. 2011;148(2):52-62. DOI: 10.1111/j.1601-5223.2011.02208.x
- Ng'uni D., Geleta M., Hofvander P., Fatih M., Bryngelsson T. Comparative genetic diversity and nutritional quality variation among some important Southern African sorghum accessions [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Aust. J. Crop Sci.* 2012;6(1):56-64.
- Ouedraogo N., Sanou J., Traore H., Gracen V., Tongoona P., Danquah E.Y. Genetic diversity among sorghum landraces and polymorphism assessment of local improved varieties for stay-green trait. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 2017;11(1):1-14. DOI: 10.4314/ijbcs.v11i1.1
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000;155(2):945-959.
- Ramu P., Billot C., Rami J.F., Senthilvel S., Upadhyaya H.D., Ananda Reddy L. et al. Assessment of genetic diversity in the sorghum reference set using EST-SSR markers. *Theor. Appl. Genet.* 2013;126(8):2051-2064. DOI: 10.1007/s00122-013-2117-6
- Sagnard F., Deu M., Dembélé D., Leblois R., Touré L., Diakité M. et al. Genetic diversity, structure, gene flow and evolutionary relationships within the *Sorghum bicolor* wild-weedy-crop complex in a western African region. *Theor. Appl. Genet.* 2011;123(7):1231-1246. DOI: 10.1007/s00122-011-1662-0
- Salih S.A., Herselman L., Labuschange M.T., Mohammed A.H. Assessment of genetic diversity of sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] germplasm in East and Central Africa. *World Journal of Biotechnology*. 2016;1(3):113-120.
- Schloss J., Mitchell E., White M., Kukatla R., Bowers E., Paterson H. et al. Characterization of RFLP probe sequences for gene discovery and SSR development in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Theor. Appl. Genet.* 2002;105(6-7):912-920. DOI: 10.1007/s00122-002-0991-4
- Shepel N.A. Breeding and seed production of hybrid sorghum (Selektsiya i semenovodstvo gibridnogo sorgo). Rostov-on-Don: Rostov University Publishers; 1985. [in Russian] (Шепель Н.А. Селекция и семеноводство гибридного сорго. Ростов-на-Дону: Изд-во Ростовского университета; 1985).
- Snowden J.D. Cultivated races of sorghum. London: Adlard and Sons; 1936.
- Srinivas G., Satish K., Madhusudhana R., Seetharama N. Exploration and mapping of microsatellite markers from subtracted drought stress ESTs in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Theor. Appl. Genet.* 2009;118(4):703-717. DOI: 10.1007/s00122-008-0931-z
- Stapf O. Gramineae, sorghum. In: D. Praln (ed.). *Flora of Tropical Africa*. Vol. 9. London; 1934. p.104-154.
- Taramino G., Tarchini R., Ferrario S., Lee M., Pe' M.E. Characterization and mapping of simple sequence repeats (SSRs) in *Sorghum bicolor*. *Theor. Appl. Genet.* 1997;95(1-2):66-72. DOI: 10.1007/s001220050533
- Tesfaye K. Genetic diversity study of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) genotypes, Ethiopia. *Acta Universitatis Sapientiae, Agriculture and Environment*. 2017;9(1):44-54. DOI: 10.1515/ausae-2017-0004
- Vavilov N.I. Phylogeographic basis of plant breeding (Botaniko-geograficheskiye osnovy selektsii). In: N.I. Vavilov (ed.). *The Scientific Bases of Plant Breeding*. Vol. 1. *Plant Breeding as a Science (Teoreticheskiye osnovy selektsii rasteniy. T. 1. Selektsiya kak nauka)*. Moscow, Leningrad: Selkhozgiz; 1935. p.17-74. [in Russian] (Вавилов Н.И. Ботанико-географические основы селекции. В кн.: Теоретические основы селекции растений. Т. 1. Селекция как наука / под ред. Н.И. Вавилова. Москва, Ленинград: Сельхозгиз; 1935. С.17-74).
- Vavilov N.I., Chester K.S. Phylogeographic basis of plant breeding. In: *The Origin, Variation, Immunity and Breeding of Cultivated Plants. Selected writings of N.I. Vavilov, translated from the Russian by K. Starr Chester. Chronica Botanica, Vol. 13*. Waltham, Mass.: Chronica Botanica Co.; 1951. p.14-53.
- Wang Y.H., Bible P., Loganantharaj R. Identification of SSR markers associated with height using pool-based genome-wide association mapping in sorghum. *Molecular Breeding*. 2012;30(1):281-292. DOI: 10.1007/s11032-011-9617-3
- Wiersema J.H., Dahlberg J. The nomenclature of *Sorghum bicolor* (L.) Moench (Gramineae). *Taxon*. 2007;56(3):941-946. DOI: 10.2307/25065876
- Yakushevsky E.S. Species composition of sorghum and its use in breeding (Vidovoy sostav sorgo i ego selektsionnoye ispolzovaniye). *Bulletin of Applied Botany, Genetics and Plant Breeding*. 1969;41(2):148-178. [in Russian] (Якушевский Е.С. Видовой состав сорго и его селекционное использование. Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 1969;41(2):148-178).
- Zheng L.Y., Guo X.S., He B., Sun L.J., Peng Y., Dong S.S. et al. Genome-wide patterns of genetic variation in sweet and grain sorghum (*Sorghum bicolor*). *Genome Biology*. 2011;12(11):R114. DOI: 10.1186/gb-2011-12-11-r114