

УДК 575.22:633.174

Технология генетической идентификации сортов и гибридов сорго на основе мультилокусного микросателлитного анализа

© 2018 Ю.В. АНИСКИНА^{1,*}, Е.В. МАЛИНОВСКАЯ², Т.В. ШАЛАЕВА¹, В.С. МИЦУРОВА¹, Д.А. РОДИОНОВА¹, П.Н. ХАРЧЕНКО¹, И.А. ШИЛОВ¹

¹ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии (ВНИИСБ), Москва, 127550

²ГНУ Кубанская опытная станция Всероссийского научно-исследовательского института растениеводства им. Н.И. Вавилова, Краснодарский край, Гулькевичский район, пос. Ботаника, 352183

e-mail: aniskina.julia@gmail.com*

Поступила 31.08.2017 г.

Принята в печать 01.03.2018 г.

Для исследования генетического разнообразия и генетической паспортизации культурных и дикорастущих растений сорго (249 образцов) на основе 17 полиморфных микросателлитных локусов разработан формат мультиплексного ПЦР-анализа в 96-луночном планшете с последующей флуоресцентной детекцией ПЦР-фрагментов посредством капиллярного электрофореза. Разработанный подход позволяет проводить анализ каждого образца одновременно по нескольким микросателлитным локусам и получать индивидуальную характеристику каждого генотипа коллекции – уникальный набор аллельных фрагментов, длина которых определена с точностью до одного нуклеотида. В результате данного исследования получен генетический профиль и составлен генетический паспорт каждого образца коллекции. Выявлен значительный полиморфизм среди культурных и дикорастущих представителей сорго: в большинстве локусов детектировано более 17 аллелей. Установленные значения индекса полиморфизма (PIC) варьируют в диапазоне от 0,621 до 0,950, что свидетельствует о высоком уровне информативности исследуемых локусов. На основе полученных данных была построена дендрограмма, отражающая генетические взаимосвязи между культурными и дикорастущими представителями сорго, согласно которой большинство исследуемых образцов распределились в группы в соответствии с их классификацией по морфо-биологическим признакам и хозяйственному назначению. Разработанная технология мультиплексного микросателлитного анализа для генетической паспортизации культурных и дикорастущих представителей рода *Sorghum* позволяет надежно различать и идентифицировать сорта, линии и гибриды, осуществлять контроль генетической подлинности, однородности и гибридности растений. Внедрение данной технологии генетического анализа позволит осуществлять генетический контроль растительного материала на всех этапах селекции и усовершенствовать систему регистрации селекционных форм и защиты авторских прав селекционеров.

Ключевые слова: сорго, генетическая идентификация, микросателлиты (SSR), мультилокусный ПЦР-анализ, анализ фрагментов ДНК.

doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-2-54-69

Список сокращений: пн – пар нуклеотидов; ЭДТА – этилендиаминтетраацетат; СТАВ – цетилтриметиламмоний бромид (гексадецилтриметиламмоний бромид); dNTP – дузоксинуклеозидтрифосфат(ы); PIC (Polymorphic Information Content) – величина информационного полиморфизма (индекс полиморфизма); SSR (Simple Sequence Repeats) – простые повторяющиеся последовательности, или микросателлиты.

Сорго – широко распространенная в мире злаковая культура, представляющая большой интерес для многопрофильного использования в сельскохозяйственном и промышленном производстве благодаря устойчивости к засухе и повышенной концентрации соли, высокой урожайности, хорошим кормовым качествам и возможности многоцелевого применения [1].

Сорго характеризуется большим эколого-географическим и сортовым разнообразием, а также наличием множества промежуточных форм, что существенно затрудняет классификацию представителей этой культуры. Согласно современным представлениям (<http://www.theplantlist.org/>), большинство культивируемых растений сорго относятся к виду сорго двуцветное (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). Harlan и de Wet предложили упрощенную классификацию культивируемых растений сорго на основе морфологических особенностей соцветия и зерна и выделили пять основных рас (Bicolor, Caudatum, Durra, Guinea, Kafir) и десять промежуточных, которые являются комбинациями основных [цит. по 2].

В России широко используется классификация, предложенная Е.С. Якушевским, согласно которой все сорговые культуры подразделены с учетом хозяйственного назначения, биологических и эколого-географических особенностей на следующие виды: сорго зерновое гвинейское, сорго зерновое кафрское, сорго зерновое китайское, сорго зерновое негритянское, сорго зерновое хлебное, сорго сахарное, сорго техническое (или венечное), суданская трава и сорго щедрое [3].

Центром сохранения генетических ресурсов культурных растений сорго и их дикорастущих сородичей в России является Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства им. Н.И. Вавилова (ВИР), коллекция которого в настоящее время насчитывает более 8 тыс. образцов. Однако наличие в коллекции недостаточно изученных и систематизированных растений, зачастую сходных по фенотипическим признакам, существенно затрудняет работу с ними. Идентификация растений сорго, характеризующихся большим морфо-биологическим разнообразием, позволит сформировать стержневые коллекции, уменьшить число ежегодно размножаемых образцов и сократить затраты на их содержание [4].

Дифференциация и идентификация сортов, линий и гибридов сорго является важным элементом селекции и семеноводства и актуальной задачей генетических исследований. Для создания ге-

терозисных гибридов сорго нередко используют сорта-популяции, самоопыленные линии, стерильные линии или гибриды. В результате их скрещивания могут быть созданы межсортовые, сортолинейные и межлинейные простые, трехлинейные и двойные гибриды.

Традиционно для определения сорта используют фенотипические показатели, проявление которых в значительной степени зависит от условий выращивания и стадии развития растений. По мере появления все большего количества сортов и усложнения схем их создания одних фенотипических показателей становится недостаточно. Существенной проблемой является установление генетической чистоты линий и определение уровня гибридности партий семян первого поколения [5]. Генетический анализ в совокупности с оценкой по фенотипическим признакам позволит повысить достоверность идентификации растительных образцов и сократить сроки селекционного процесса.

Для надежного различения и идентификации генотипов растений одним из эффективных подходов является анализ полиморфизма длины микросателлитных локусов, в результате которого можно установить индивидуальную характеристику каждого отдельного генотипа – ДНК-профиль. Микросателлитные маркеры равномерно распределены в геноме растений, характеризуются высоким полиморфизмом и кодоминантным типом наследования, а результаты их анализа – точностью воспроизведения, что позволяет проводить идентификацию и контроль гибридности семян.

Микросателлитные, или SSR-маркеры, были разработаны независимо несколькими исследовательскими группами [6–11] и применялись для изучения генетического разнообразия коллекций сорго [12–13], поиска генотипов, определяющих признаков, например, сахаристость [14] и высоту побега [15], засухоустойчивость [16], устойчивость к болезням [17] и др. Недавно ряд исследовательских групп объединили свои усилия для оценки генетического разнообразия коллекции сорго Международного научно-исследовательского координирующего центра растениеводства полусухих тропиков (ICRISAT–International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics), в котором сосредоточена самая крупная коллекция сорго в мире. В результате исследования 3367 наименований коровой коллекции сорго с использованием 41 микросателлитного маркера им удалось распределить все образцы по

13 генетическим группам с учетом происхождения и расовой принадлежности растений [18–19]. Полученные результаты могут быть полезны при выборе стратегии для скрещивания и подборе родительских пар.

В большинстве ранних работ полиморфизм каждого отдельного микросателлитного локуса исследовали по результатам разделения полученных ПЦР-фрагментов в полиакриламидном геле. Данный подход является трудоемким и требует серьезных временных затрат при масштабном скрининге, поскольку он связан с необходимостью анализа каждого растительного образца коллекции отдельно по каждому локусу. Поэтому для изучения генетического разнообразия больших растительных коллекций возникла необходимость в разработке мультилокусного ПЦР-анализа образцов с возможностью автоматической детекции одновременно по ряду микросателлитных маркеров.

Целью данного исследования была разработка технологии мультилокусного микросателлитного анализа сортов и гибридов сорго отечественной и зарубежной селекции на основе мультиплексной ПЦР в 96-луночной планшете с последующей флуоресцентной детекцией ПЦР-фрагментов посредством капиллярного электрофореза, которая позволила бы в короткие сроки проводить генетический анализ большого количества растительных образцов и получать точную характеристику каждого генотипа – его оцифрованный генетический профиль.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Материал для исследования

Растительный материал был предоставлен Е.В. Малиновской (Кубанская опытная станция ВИР им. Н.И. Вавилова) и включал образцы следующих растений: гвинейское сорго (*Sorghum guineensis* Snowd.) – 9 наименований, кафрское сорго (*Sorghum caffrorum* (Beauv.) Snowd.) – 48, китайское сорго (*Sorghum nervosum* Bess.) – 12, негритянское сорго – 18 (*Sorghum bantuorum* L. – 3 и *Sorghum caudatum* (Hack.) Stapf – 15), хлебное сорго – 23 (*Sorghum cernuum* (Host.) Gram. – 9 и *Sorghum durra* (Forsk.) Stapf. – 14), сахарное сорго (*Sorghum saccharatum* (L.) Pers.) – 61, веничное сорго (*Sorghum technicum* (Koern.) Snowd.) – 13, суданская трава (*Sorghum sudanense* Stapf.) – 20, сорго щедрое (*Sorghum* × *almum* Parodi) – 2, тунисская трава (*Sorghum virgatum* (Hack.) Stapf) – 1, джонсова трава (*Sorghum halepense* (L.) Pers.) – 2

и 40 наименований селекционных форм, полученных в результате межвидовой и межсортовой гибридизации (табл. 1).

Выделение ДНК

Геномную ДНК выделяли из зеленых листьев двухнедельных проростков методом экстракции с использованием СТАВ и хлороформа [20]. Для получения достоверных результатов использовали растительный материал пяти разных растений одного сорта. Растительные образцы растирали в фарфоровых ступках с жидким азотом, добавляли по 500 мкл экстракционного буфера (100 мМ трис-НСl, рН 8,0 (Sigma, США); 1,4 М NaCl (Sigma); 20 мМ ЭДТА (Sigma); 2 % СТАВ (Sigma)), переносили в пластиковые пробирки емкостью 1,5 мл и инкубировали при 65 °С в течение 60 мин. Далее добавляли 500 мкл хлороформа («Реахим», Россия), перемешивали и центрифугировали при 15000 г в течение 5 мин. Верхнюю фазу переносили в пробирки с 50 мкл СТАВ-буфера (10% СТАВ, 0,7 М NaCl), перемешивали и инкубировали 10 мин при 60 °С. Затем добавляли 500 мкл хлороформа, перемешивали и центрифугировали при 15000 г в течение 5 мин. Верхнюю фазу переносили в пробирки с 30 мкл 5 М СН₃СООК (AppliChem, США), добавляли 1 мл 96%-ного этилового спирта, перемешивали и инкубировали при –20 °С в течение 60 мин. После этого пробы центрифугировали при 15000 г 10 мин, полученный осадок промывали в 200 мкл 75%-ного этилового спирта, сушили и растворяли в 100 мкл ТЕ-буфера (производитель трис-НСl и ЭДТА – Sigma).

Аmplификация ДНК

Аmplификацию растительной ДНК осуществляли методом ПЦР с локус-специфичными парами праймеров, описанными в работах [5–9, 15]. ПЦР проводили в реакционной смеси объемом 25 мкл следующего состава: 67 мМ трис-НСl, рН 8,8; 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄ (AppliChem); 2,5 мМ MgCl₂ (AppliChem); 5 ед/мкл *Taq*-ДНК-полимеразы («ДНК-Технология», Россия), 25 мМ dNTP («Медиген», Россия), 5–20 пмоль каждого праймера в зависимости от уровня флуоресценции («Синтол», Россия) и 2 мкл раствора ДНК. Амплификацию осуществляли в термоциклере (CFX-96 Bio-Rad, США) по программе: 95 °С – 5 мин; 30 циклов: 94 °С – 30 с, 55 °С – 30 с, 72 °С – 30 с; 72 °С – 5 мин. Наличие продуктов амплификации подтверждали путем электрофореза в 2%-ном агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием (Helicon, Россия).

Коллекция культурных и дикорастущих представителей сорго, а также гибридов поколения F1

Collection of cultured and wild sorghum representatives and F1 hybrids

№ п/п	Название образца	№ кат. ВИР	№ п/п	Название образца	№ кат. ВИР
	<i>Sorghum guineensis</i> Snowd.		41	Перспектива 80-В	9977
			42	СЛВ-2	10107
1	Pop sorghum	2973	43	83- А	10774
2	Pop sorghum	3045	44	83-В	10775
3	D.D.Shallu-4E	6111	45	Рось	10837
4	Pop II/14	9808	46	Славянка желтая	10838
5	TAM 2753-A2	10062	47	Низкорослое 81	б/н
6	TAM 2753-B2	10063	48	Пикадор 5	б/н
7	JS	7285	49	Ростовское белое	б/н
8	Перлына	б/н	50	Стрелец-68	б/н
9	Shallu×Геническое 11	7836	51	Pink kaffir	267
	<i>Sorghum caffrorum</i> (Beauv.) Snowd.		52	Early Kalo	1677
10	Steynsrust Early White	2105	53	Steynrust Early White	2105
11	2219 -В	8242	54	F12 BC1 H-81*928	б/н
12	10428-В	8276	55	F2 928	б/н
13	10438-А	8281	56	F2 928	б/н
14	10590-А	8313	57	F2 938	б/н
15	10566-А	8319		<i>Sorghum nervosum</i> Bess.	
16	10692-А	8359	58	Гаолян 257 -А	10073
17	TAM 2604 В-В	8568	59	Гаолян 257-В	10074
18	TAM 2608 В-В	8570	60	Darso	569
19	TAM 2616 1-В	8574	61	Darso	691
20	TAM 2616 В-В	8575	62	Гаолян коричневый 272	2122
21	TAM 2617 В-В	8576	63	Early Huanceke	б/н
22	TAM 2672 В-В	8622	64	Da Bai se	б/н
23	TAM 2680 В-В	8629	65	Da Bai ke	б/н
24	TAM 2685 В-В	8635	66	Da Bai Koaling	б/н
25	TAM 2693 В-В	8643	67	Da LI Gu	б/н
26	TAM 2694 В-В	8646	68	Da Pi Tou	б/н
27	TAM 2702 В-В	8651	69	Bai Sincer Hao	б/н
28	10598-А	9072		<i>Sorghum caudatum</i> (Hack.) Stapf.	
29	10315-А	9078			
30	КУ-2	9319	70	Redhull Feterita	266
31	КУ -3	9320	71	Gassabi	2056
32	КУ-4	9322	72	Early Hegari	6914
33	КУ-5	9323	73	Хегари раннее 172	9328
34	Кубанская-198	9346	74	Feterita	б/н
35	КУ-15	9356	75	Feteerita	141
36	ДН-1-В	9385	76	Геническое 204	б/н
37	ДН-19-А	9397	77	Kadeiba	3732
38	Низкорослое 2-В	9480	78	Геническое 11	9267
39	JS-21421	9643	79	Гудок	б/н
40	Перспектива 80 -А	9976	80	Feterita 834	1789

Таблица 1 (продолжение)

№ п/п	Название образца	№ кат. ВИР	№ п/п	Название образца	№ кат. ВИР
81	Местное	2808	119	Сумак	3859
82	SPT-20	2827	120	Sorghum dochna	3886
83	Feterita Kagugli	2841	121	NS-8	4571
84	Местное	2870	122	NS-11	4573
	<i>Sorghum bantuaorum L.</i>		123	Honey Drip	581
			124	Саратовское 3-с	9973
85	SBT-20	2827	125	Сахарное 20	10826
86	Геническое 200	9526	126	Янтарь красный 271	10814
87	Геническое бурое	б/н	127	Оранжевое 160	10815
	<i>Sorghum cernum (Host.) Gram.</i>		128	Сорго сахарное	45
			129	Янтарь ранний	84
88	Джугара	642	130	Amber Dacota Cane	157
89	Ак-дары	962	131	Cane Japanese Honey Drip	163
90	Ак-джугара	1149	132	Cane Orange Viets	165
91	Уч-алтык	1167	133	Cane Texas Seeded Ribbon	166
92	Джугара	1667	134	Sumac Sorgo	275
93	Джугара белая	2365	135	Honey Sorgo	285
94	Кырк-гунлик	2459	136	Club Cane	300
95	Бой-джугара	4510	137	Copro	451
96	Кирк-кун-лик	4514	138	Early Sumac	572
	<i>Sorghum durra (Forsk.) Stapf.</i>		139	Red Amber	585
			140	Янтарь ранний	660
97	Сорго местное	722	141	Sorgo Canad'azucar	731
98	Сорго	905	142	Сорго кормовое	1073
99	Durra	966	143	Без названия	1202
100	Biver milo	1647	144	Сахарное местное	1658
101	Палестинское белое 553	1721	145	Early Orange Sorghum Cane	1660
102	Майло карликовое 361	9369	146	Янтарь ранний (желтый)	1674
103	ДН-15-ф	9396	147	Early Amber (черный)	1675
104	Ефремовское -2В	10813	148	Пестропленчатое 115	1798
105	Палестинское	1330	149	Black Amber Sorgo	1802
106	Tella Jonna Iowar	1480	150	Improved Evergreen	2027
107	Бивер майло	1647	151	Sorghum saccharatum	2057
108	А-С3 Белозерное ВИР-12	4030	152	Sumac	2336
109	КС-4т. Майло	8902	153	Szegedi barna	2400
110	Durra	966	154	Frekete Maguar	2402
	<i>Sorghum saccharatum (L.) Pers.</i>		155	Сорго местное	2466
			156	Schrock (ранний)	3046
111	Оранжевое краснопленчатое	1202	157	Early Atlas	3052
112	То же	442	158	Rox Orange	3054
113	Atlas sorgo	1576	159	Kansas Orange	3055
114	Indiana Amber	1802	160	Sumac (б/низкорослый)	3060
115	Fekete Maguar	2402	161	Early Fulgar	3434
116	Ellis	2520	162	Sorghum Sumac 1712	3556
117	Stok 16-16	2963	163	Sorghum Leoti	3558
118	Saccaline	3843	164	Сумак	3868

Таблица 1 (продолжение)

№ п/п	Название образца	№ кат. ВИР	№ п/п	Название образца	№ кат. ВИР
165	S-35 Rex	4000	191	ДНВ-26	9402
166	Yrano Vestido DL/59/943	4015			
167	Сорго местное	4917			
168	Силосное 3	9274	192	Кубанское 1356	2125
169	Комплексное 137	9421	193	Dogget	6358
170	Узбекское 18	9502	194	E-2915	6364
171	Сахарное 20	10826	195	Peer	6694
	<i>Sorghum sudanense</i> Stapf.		196	Без названия	7830
172	Б/названия	141	197	Без названия	7831
173	Черноморка	154	198	Без названия	7832
174	Сочностебельная 16/1	466	199	SOR 23/76	7844
175	Сочностебельная 18	475	200	Без названия	9288
176	Каштановая-30	488	201	Донское-35	9437
177	Без названия	141	202	Азововеничное	10088
178	Краснодарская 1967	151	203	Новоалексеевское №5	б/н
179	Северо-донецкая 1	188	204	Мастер	б/н
180	Sweet Sudan SS-6	226			
181	Dekalb 229 m	308			
182	IS 3192	443	205	Без названия	117
183	Тугай	461	206	Без названия	77
184	RSP 3 BR	463			
185	Приволжская	470			
186	Зональская б	489	207	Без названия	139
187	Юбилейная 20	494			
188	Кубанская 183-21	500			
189	Памяти Шмараяева	501	208	Без названия	б/н
190	Майор СКМ	506	209	Без названия	б/н

Гибриды поколения F1

	<i>S. guineensis</i> × <i>S. guineensis</i>	221	10566-A × TAM 2693 B-B
		222	ДН-19-A × TAM 2672 B-B
210	Pop sorghum 2973 × 3045	223	10438-A × TAM 2672 B-B
	<i>S. guineensis</i> × <i>S. caffrorum</i>	224	TAM 2685 × 2219-A
		225	10598-A × TAM 2685
211	D.D.Shallu-4E × 10566-A		
212	D.D.Shallu-4E × СЛВ-2		
	<i>S. caffrorum</i> × <i>S. caffrorum</i>	226	2219-A × D.D.Shallu-4E
		227	10598-A × D.D.Shallu-4E
213	10590-A × TAM 2685 B-B	228	10590-A × D.D.Shallu-4E
214	TAM 2694 × 2219-A	229	83- A × 2219-A × D.D.Shallu-4E
215	10598-A × TAM 2694		
216	2219-A × Ростовское белое		
217	2219-A × TAM 2694	230	10590-A × Сочностебельная 18
218	ДН-19-A × КУ-4	231	10692-A × Суданская 141
219	ДН-19-A × Низкорослое 2-B	232	ДН-9-ф × Сочностебельная 18
220	2219-A × TAM 2685	233	10566-A × Сочностебельная 18

234	10692-A × Каштановая-30 <i>S. caffrorum</i> × <i>S. saccharatum</i>	242	Atlas sorgo × 10438-A
235	10438-A × Ellis	243	Ellis × 10438-A
236	10692-A × NS-8 <i>S. caffrorum</i> × <i>S. cernum</i>	244	Сумак × 10438-A
237	10315-A × к-905	245	NS-11 × 10438-A <i>S. sudanense</i> × <i>S. caffrorum</i>
238	10438-A × к-905 <i>S. caffrorum</i> × <i>S. alnum</i>	246	Сочностебельная 16/1 × 83- А <i>S. cernum</i> × <i>S. cernum</i>
239	10692-A × <i>S. alnum</i> к-77	247	Палестинское белое × Ефремовское <i>S. cernum</i> × <i>S. guineensis</i>
240	10692-A × <i>S. alnum</i> к-117 <i>S. caffrorum</i> × <i>S. virgatum</i>	248	ДН-15-ф × D.D.Shallu-4E <i>S. cernum</i> × <i>S. sudanense</i>
241	10692-A × <i>S. virgatum</i> к-139	249	Ефремовское -2В × Каштановая-30

Примечание: б/н – без номера (without number).

Анализ фрагментов ПЦР

Анализ флуоресцентно-меченых ПЦР-фрагментов проводили на базе ЦКП «Биотехнология» ВНИИСБ методом высокоразрешающего электрофореза в денатурирующих условиях с использованием генетического анализатора Нанофор-05 («Синтол», ФГБНУ ИАП, Россия), согласно инструкции к прибору. Для анализа длины фрагментов 1 мкл ПЦР-продукта смешивали с 1 мкл маркера молекулярной массы S-450 («Синтол») и 8 мкл формамида Super DI (MCLab, США) и проводили денатурацию фрагментов в течение 5 мин при 95 °С.

Анализ полученных данных

Размер ПЦР-фрагментов устанавливали с помощью программного обеспечения «ДНК Фрагментный анализ» (ФГБНУ ИАП РАН, Россия).

Статистическая обработка данных

Для оценки уровня полиморфизма использовали значение коэффициента полиморфизма PIC. Этот показатель был рассчитан отдельно для каждого локуса микросателлитных последовательностей генома сорго. Его вычисляли по формуле: $PIC = 1 - \sum(P_i)^2$, где P_i – частота встречаемости i -го аллеля [21]. Дендрограмма, отражающая генетические взаимосвязи между исследуемыми растениями сорго, была получена с помощью программы Treemap методом UPGMA с использованием коэффициента генетического сходства Nei [22].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка технологии мультилокусного микросателлитного анализа

Важным этапом работы было исследование полиморфизма микросателлитных локусов генома сорго и отбор наиболее полиморфных локусов, пригодных для надежного различения, идентификации и генетической паспортизации отечественных сортов растения. Для исследования были выбраны 42 микросателлитных локуса, описанные в литературных источниках [5–9, 15]. Основными критериями для отбора локусов служили число выявленных аллелей в локусе, расположение локусов на разных хромосомах, обеспечивающее независимое наследование ДНК-маркеров, и небольшая длина получаемых ПЦР-фрагментов (100–300 пн) для достоверного определения их величины. Все исследуемые локусы были представлены ди-, три- и тетрануклеотидными повторами.

В результате предварительного исследования девяти видов (рас) сорго было установлено 17 наиболее полиморфных микросателлитных локусов, представленных пятью и более аллелями. С их использованием были получены четко интерпретируемые и воспроизводимые результаты. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей этих локусов показал, что их полиморфизм среди растений одного вида (расы) определяется исключительно числом tandemных повторов, тогда как фрагменты, изолированные у растений разных видов (рас), отличались

не только вариабельностью микросателлитной последовательности, но также инсерциями/делециями во фланкирующих консервативных областях. Мономорфные трудно амплифицируемые локусы или локусы, дающие неоднозначные и нестабильные результаты, были исключены из исследования.

Для анализа большого числа растительных образцов нами был разработан формат мультиплексного ПЦР-анализа в 96-луночном планшете с последующей детекцией ПЦР-продуктов посредством капиллярного электрофореза, позволяющий исследовать образец ДНК одновременно по нескольким микросателлитным локусам. Данный подход позволил значительно сократить материальные и временные затраты на проведение генетического анализа.

На основе 17 полиморфных микросателлитных локусов были разработаны две мультилокусные системы. Первая система (мультиплекс Сорго-7) включала в себя 7 микросателлит-

ных локусов (Dsenhsbm4, Dsenhsbm57, Sb6-84, Xcup02, Xcup49, Xtxp10 и Xtxp25), регистрируемых по четырем каналам детекции, вторая (мультиплекс Сорго-10) – 10 микросателлитных локусов (Sb1-10, Sb4-15, Sb4-32, Sb5-206, Sb5-236, Sb6-36, Sb6-342, SbAGA01, SbAGF08, SbAGH04), регистрируемых по пяти каналам детекции (см. табл. 2).

В процессе разработки систем были оптимизированы условия проведения одновременного ПЦР-анализа нескольких микросателлитных локусов: были спланированы праймеры со специальными флуоресцентными красителями, подобрана оптимальная температура одновременного отжига нескольких пар праймеров ($T_{отж} = 55\text{ }^{\circ}\text{C}$). Флуоресцентные красители были подобраны таким образом, чтобы диапазоны длин фрагментов микросателлитных локусов, детектируемых по одному каналу, не перекрывались. Таким образом, по каждому каналу детекции осуществлялся анализ 2–3 локусов (см. табл. 2).

Таблица 2

Характеристика микросателлитных локусов сорго, входящих в состав мультиплексных систем

Characteristics of sorghum SSR loci involved in multiplex systems

Обозначение локуса	Локус	Повтор	Краситель	Длина ПЦР-фрагментов, пн	Количество аллелей	Частота встречаемости аллелей		PIC локуса
						min	max	
Мультиплекс Сорго-7								
A	Xtxp10	(CT)	FAM	135–161	9	0,005	0,383	0,756
B	Sb6-84	(AG)	FAM	183–229	22	0,002	0,366	0,829
C	Dsenhsbm4	(TG)	FAM	242–262	10	0,002	0,212	0,849
D	Xtxp25	(CT)	R6G	125–209	25	0,002	0,198	0,918
E	Xcup02	(GCA)	TAMRA	206–221	6	0,004	0,565	0,621
F	Xcup49	(GGAT)	ROX	157–173	5	0,002	0,292	0,681
G	Dsenhsbm57	(CATA)	ROX	198–246	8	0,004	0,317	0,724
Мультиплекс Сорго-10								
H	Sb4-15	(AG)	FAM	112–158	18	0,004	0,361	0,814
I	Sb4-32	(AG)	FAM	170–242	24	0,005	0,180	0,876
J	SbAGH04	(AG)	R6G	105–179	33	0,002	0,097	0,950
K	Sb6-342	(AC)	R6G	199–299	16	0,002	0,342	0,845
L	SbAGA01	(AG)	TAMRA	99–133	17	0,009	0,309	0,827
M	Sb6-36	(AG)	TAMRA	173–223	19	0,005	0,242	0,875
N	Sb1-10	(AG)	TAMRA	264–332	24	0,002	0,382	0,816
O	Sb5-206	(AC)	ROX	114–176	24	0,004	0,220	0,909
P	Sb5-236	(AG)	ROX	173–209	17	0,005	0,300	0,837
Q	SbAGF08	(AG)	Dy630	128–194	21	0,004	0,436	0,773

Примечание: жирным шрифтом выделены минимальные и максимальные данные по каждой категории.

Footnote: minimal and maximal data in each category are typed bold.

Дифференциация и идентификация представителей коллекции растений сорго

С использованием разработанных мультилокусных систем для каждого растительного образца коллекции была получена уникальная генетическая характеристика – профиль фрагментов ДНК определенной длины. Длина каждого микросателлитного фрагмента была определена с точностью до одного нуклеотида. На основе полученных цифровых характеристик для каждого исследуемого представителя сорго был составлен генетический паспорт, где буквами обозначены исследуемые локусы, а цифрами – длина выявленных аллелей.

На рис. 1 в качестве примера представлены результаты анализа ПЦР-фрагментов сорта Сахарное 20, полученные с использованием разработанных мультилокусных систем. Для данного сорта установлен следующий Генетический паспорт: A₁₄₉ B₁₈₇ C₂₅₄ D₁₂₅ E₂₁₂ F₁₆₁ G₂₀₂ H₁₃₀ I₁₇₆ J₁₅₃ K₂₉₁ L₁₀₉ M₁₉₅ N₂₆₄ O₁₆₀ P₁₈₇ Q₁₆₈ (см. рис. 1).

В результате анализа коллекции культурных и дикорастущих растений сорго с использованием разработанных мультилокусных систем был выявлен значительный полиморфизм как между растениями разных видов (рас) сорго, так и между сортами одного вида (расы) (рис. 2).

Сравнительный анализ полученных генетических паспортов показал, что большинство исследованных растительных форм сорго имеют уникальный генетический профиль. Большую часть исследуемой коллекции составляют выровненные линии, генотип которых характеризуется гомози-

готным состоянием аллелей. Однако у некоторых растений, например, у представителей суданской травы, технического сорго и джонсовой травы, в ряде локусов было выявлено гетерозиготное состояние аллелей.

В результате проведенного исследования установлен аллельный состав каждого микросателлитного локуса и подсчитана частота встречаемости выявленных аллелей (см. табл. 2). Каждый выявленный фрагмент микросателлитного локуса определенной длины учитывался как отдельный аллель. В результате анализа в каждом локусе выявлено от 5 до 33 аллелей (см. табл. 2). В большинстве локусов число детектированных аллелей составило более 17, а частота их встречаемости варьировала от 0,002 до 0,436. Индекс полиморфизма исследованных локусов (PIC) изменялся в диапазоне от 0,621 до 0,950, что свидетельствует о высоком уровне информативности используемых микросателлитных маркеров (см. табл. 2). При этом индекс полиморфизма локуса может существенно различаться у разных видов (рас) сорго.

Следует отметить, что каждый локус вносит существенный вклад в оценку генетического разнообразия. Особого внимания заслуживают локусы Xtxp25 (D) и SbAGH04 (J), которые характеризуются большим количеством редких аллелей (см. табл. 2). Эти локусы обладают высокой дискриминирующей способностью и представляют наибольший интерес при различении близкородственных растений сорго. Однако для надежной идентификации представителей коллекции сорго необходимо проводить анализ совокупности всех 17 локусов. Это позволит получать уникальные

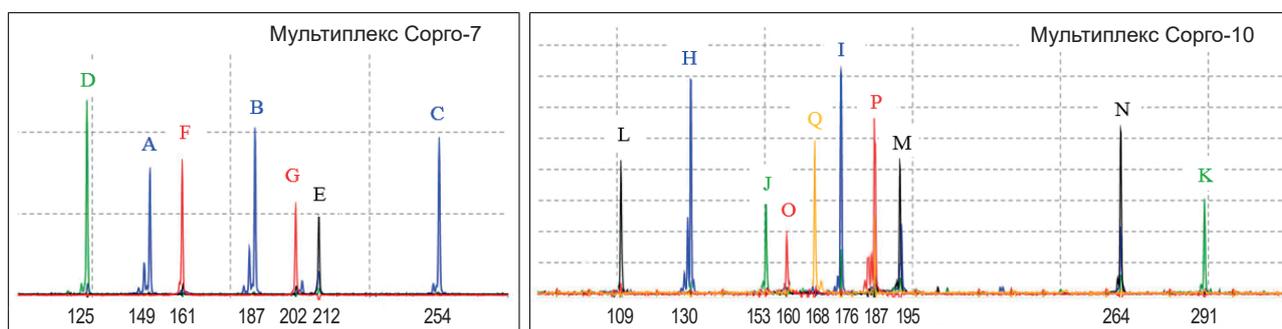


Рис. 1. Генетические профили, полученные в результате анализа сорта Сахарное-20 с использованием мультилокусных систем Сорго-7 и Сорго-10. Здесь и далее латинскими буквами обозначены исследуемые микросателлитные локусы (см. табл. 2), их цвет соответствует цвету канала детекции на приборе Нанофор-05. Цифры – длина выявленных аллелей, пн

Fig. 1. Genetic profiles resulting from analysis of Sakharnoye-20 sorghum variety using multiplex systems of Sorgho-7 and Sorgho-10. Here and below, Latin letters stand for studied SSR loci (Table 2), their color corresponding to color of registration on Nanofor-05 device; digits mean size of detected alleles, bp

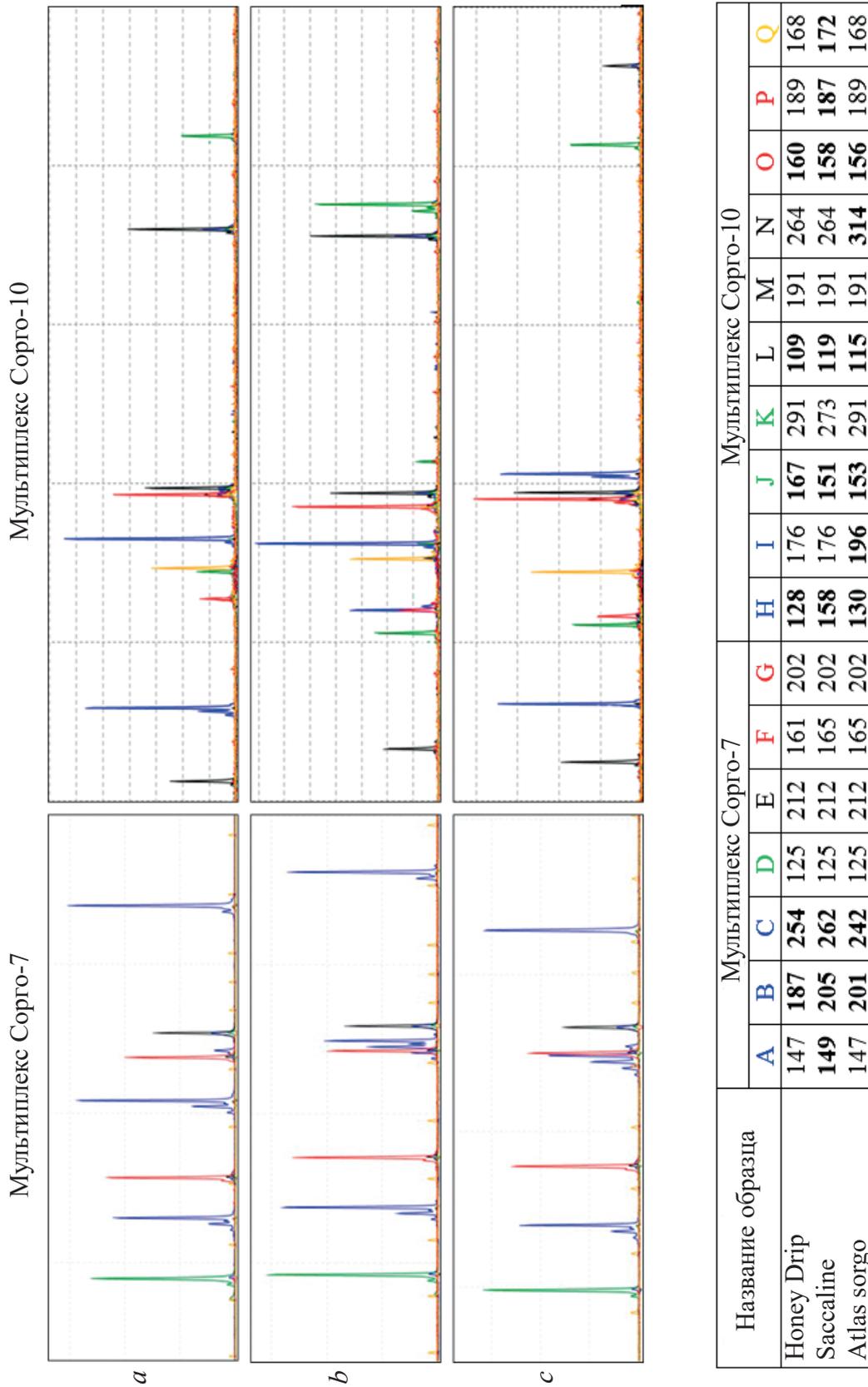


Рис. 2. Полиморфизм микросателлитных локусов соргов сахарного сорго: *a* – Honey Drip, *b* – Saccaline, *c* – Atlas sorgho. Жирным шрифтом выделены аллели, дифференцирующие представленные сорга

Fig. 2. Polymorphism of microsatellite loci of sugar sorghum varieties: *a*, Honey Drip, *b*, Saccaline, and *c*, Atlas sorgho. Alleles distinguishing varieties are highlighted bold

аллельные комбинации, которые сделают возможным достоверное различие многообразия сортов сорго.

У большинства растений сорго в каждом исследуемом локусе были выявлены фрагменты определенной длины. Исключение составило техническое сорго, в локусе Sb6-342 (K) которого не было обнаружено соответствующих данному локусу фрагментов. Отсутствие характерных для локуса ПЦР-фрагментов у ряда представителей сорго при многократном воспроизведении генетического анализа, возможно, связанное с видовыми (расовыми) отличиями их нуклеотидной последовательности в зоне посадки праймеров, было обозначено в генетических паспортах растений как нулевой аллель.

Интересно отметить, что нулевой аллель наследуется также у гибридов, полученных с участием *S. technicum* (Koern.) Snowd., у которых в данном локусе детектируется только аллель второй родительской формы. В некоторых локусах установлены видоспецифичные аллели, а также выявлены наиболее характерные для видов комбинации аллелей. Так, например, у всех растений *S. technicum* (Koern.) Snowd. в локусе Sb4-32 (I) выявлен аллель длиной 190 пн, а в локусе Sb6-342 (K) – так называемый нулевой аллель. Эти маркеры позволяют надежно дифференцировать растения данного вида от представителей других видов сорго.

В результате микросателлитного анализа коллекции сорго было выявлено 313 аллелей, или так называемых дескрипторов генетического разнообразия. Анализ полученных данных в программе Treecon позволил получить дендрограмму, отражающую генетические взаимосвязи между представителями коллекции растений сорго (рис. 3).

Из полученной дендрограммы следует, что 88% образцов сахарного сорго, 100% технического, 83% кафрского и 57% хлебного сорго, а также 50% суданской травы группируются в кластеры в соответствии с их видовой принадлежностью. Растения *Sorghum halepense* (L.) Pers, классифицированного согласно <http://www.theplantlist.org/> как самостоятельный вид, образуют базальный кластер, отличающийся существенным генетическим расстоянием от культивируемых растений вида *Sorghum bicolor* (L.) Moench.

Однако в связи с высокой способностью растений разных видов (рас) сорго к гибридизации и со сложной селекционной историей исследуемых сортов четко выраженную кластеризацию ряда исследуемых образцов получить не удалось. Так, например, в единый кластер с растениями

кафрского сорго были включены другие представители зернового сорго, сахарного сорго и суданко-зерновые гибриды. Похожие результаты были получены при исследовании более 3300 растений сорго с использованием 41 микросателлитного маркера, среди которых представители рас Bicolor, Caudatum, Durra и Guinea распределились по трем и более группам [19].

Применение технологии мультилокусного микросателлитного анализа для контроля гибридности, однородности и подлинности селекционных форм

В селекционном процессе важным этапом является подтверждение наследования в гибридах генетического материала родительских форм. Поскольку микросателлитные маркеры имеют кодоминантный тип наследования, в генетическом профиле гибрида F₁, как правило, выявляются аллели обоих родителей, что позволяет осуществлять оценку гибридности получаемых селекционных форм. На рис. 4 в качестве примера представлено кодоминантное сочетание аллелей родительских форм в генотипе гибрида кафрское сорго 2219-А × гвинейское сорго D.D. Shallu-4E.

Необходимым условием для выявления гибридности является различие исходных родительских форм по составу аллелей микросателлитного локуса. Если фрагменты родительских форм совпадают по длине по одному или нескольким микросателлитным локусам, то получаемый гибрид невозможно отличить по данным локусам от родительских форм. Таким образом, не все локусы пригодны для оценки гибридности и для каждого гибрида список этих локусов индивидуален; поэтому в данной работе предлагалось использовать набор из 17 локусов. По результатам микросателлитного анализа коллекции родительских форм и гибридов сорго для идентификации каждого имеющегося в коллекции гибрида был подобран уникальный набор микросателлитных маркеров.

Одной из важных задач селекции сорго является создание и поддержание генетически однородных сортов и гибридов. В генотипах большинства исследуемых гибридов выявлено кодоминантное сочетание аллелей соответствующих родительских форм. Тем не менее, в ряде случаев обнаружено несоответствие аллелей в одном или нескольких микросателлитных локусах у гибридов и их родительских форм. Вероятнее всего, такое несоответствие связано с тем, что для создания этих гибридов были использованы не выровненные линии, а сорта-популяции.

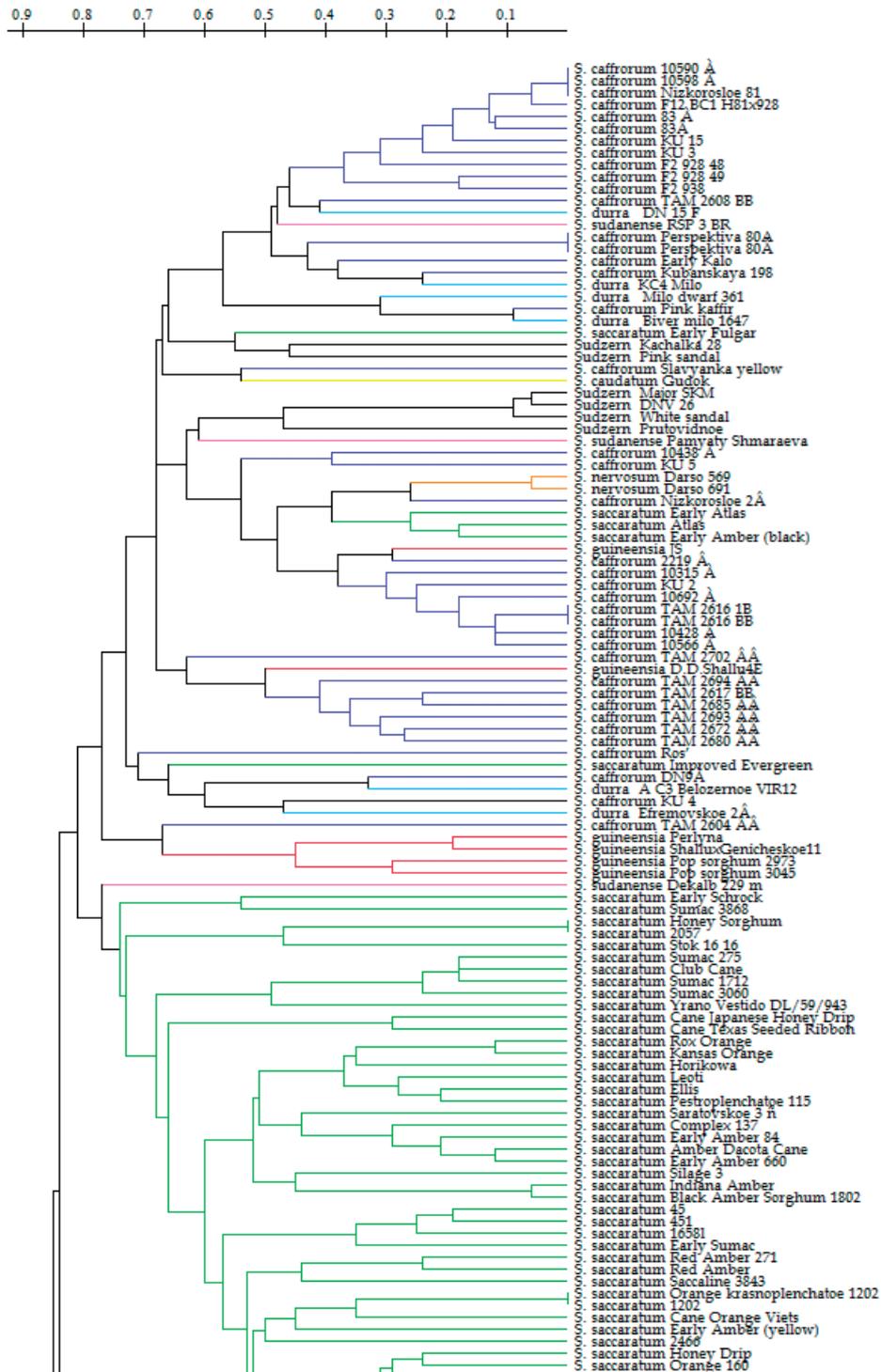


Рис. 3. Дендрограмма, отражающая генетические взаимосвязи культурных и дикорастущих представителей сорго, установленные с помощью мультиплексного ПЦР-анализа. Растения, относящиеся к одному виду (расе), обозначены на дендрограмме одним цветом: гвинейское сорго – красным, кафрское – синим, китайское – оранжевым, негритянское – желтым, хлебное – голубым, сахарное – светло зеленым, веничное – бордовым, суданская трава – розовым, джонсова трава – темно-зеленым, межвидовые (межрасовые) гибриды – черным. Sudzern – гибрид суданской травы и зернового сорго

Fig. 3. Dendrogram reflecting genetic interrelations of cultured and wild sorghum representatives revealed by suggested multiplex PCR analysis. Plants belonging to one species (race) are designated by one color: *S. guineensia*, red; *S. caffrorum*, dark blue; *S. nervosum*, orange; negro sorghum – *S. banturum* and *S. caudatum*, yellow; grain sorghum – *S. cernum* and *S. durra*, light blue; *S. saccaratum*, light green; *S. technicum*, burgundy; *S. sudanense*, pink; *S. halepense*, dark green; interspecies = interracial hybrids, black. Sudzern is a hybrid of Sudanese grass and grain sorghum.

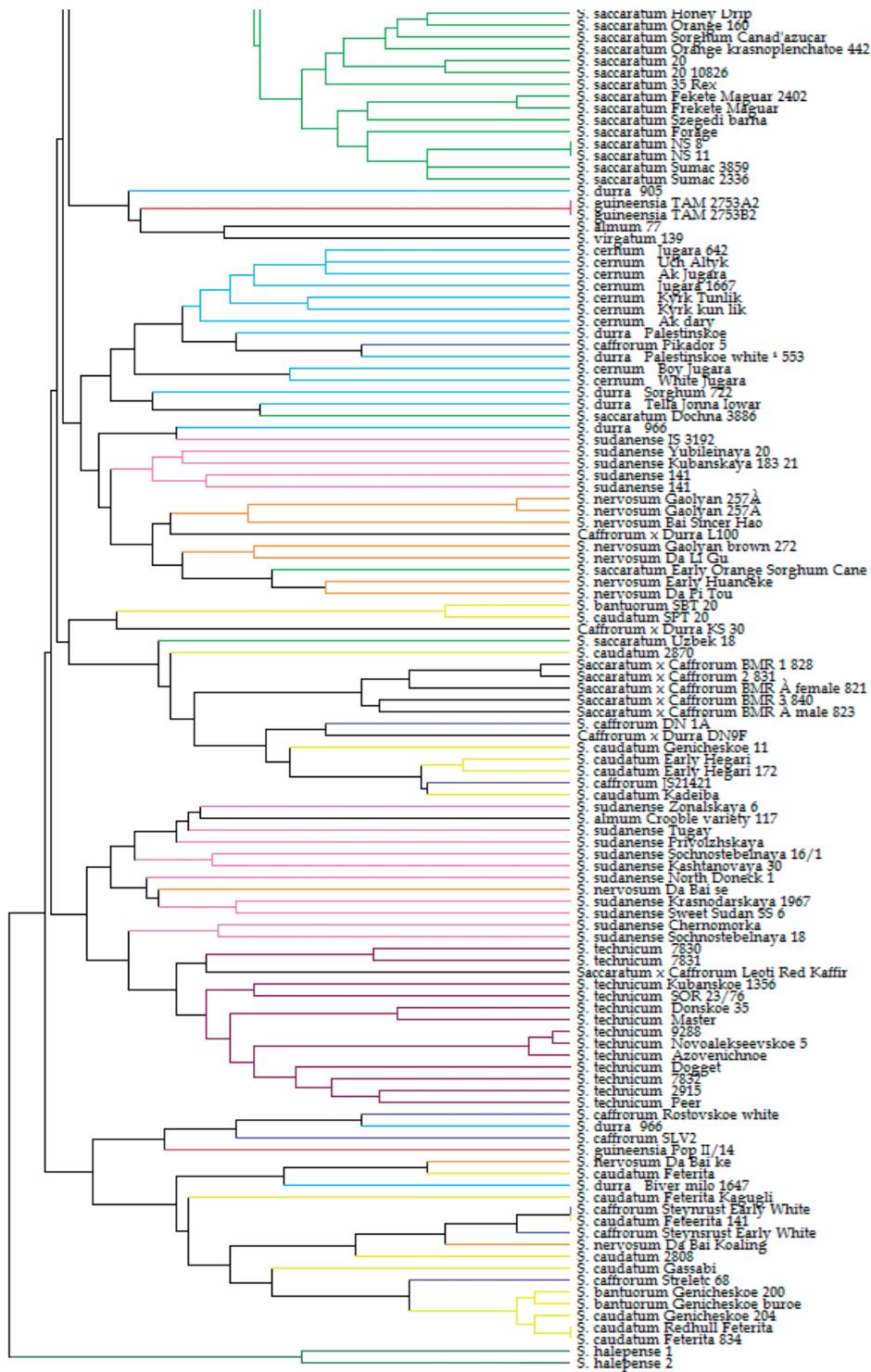


Рис. 3. (окончание)

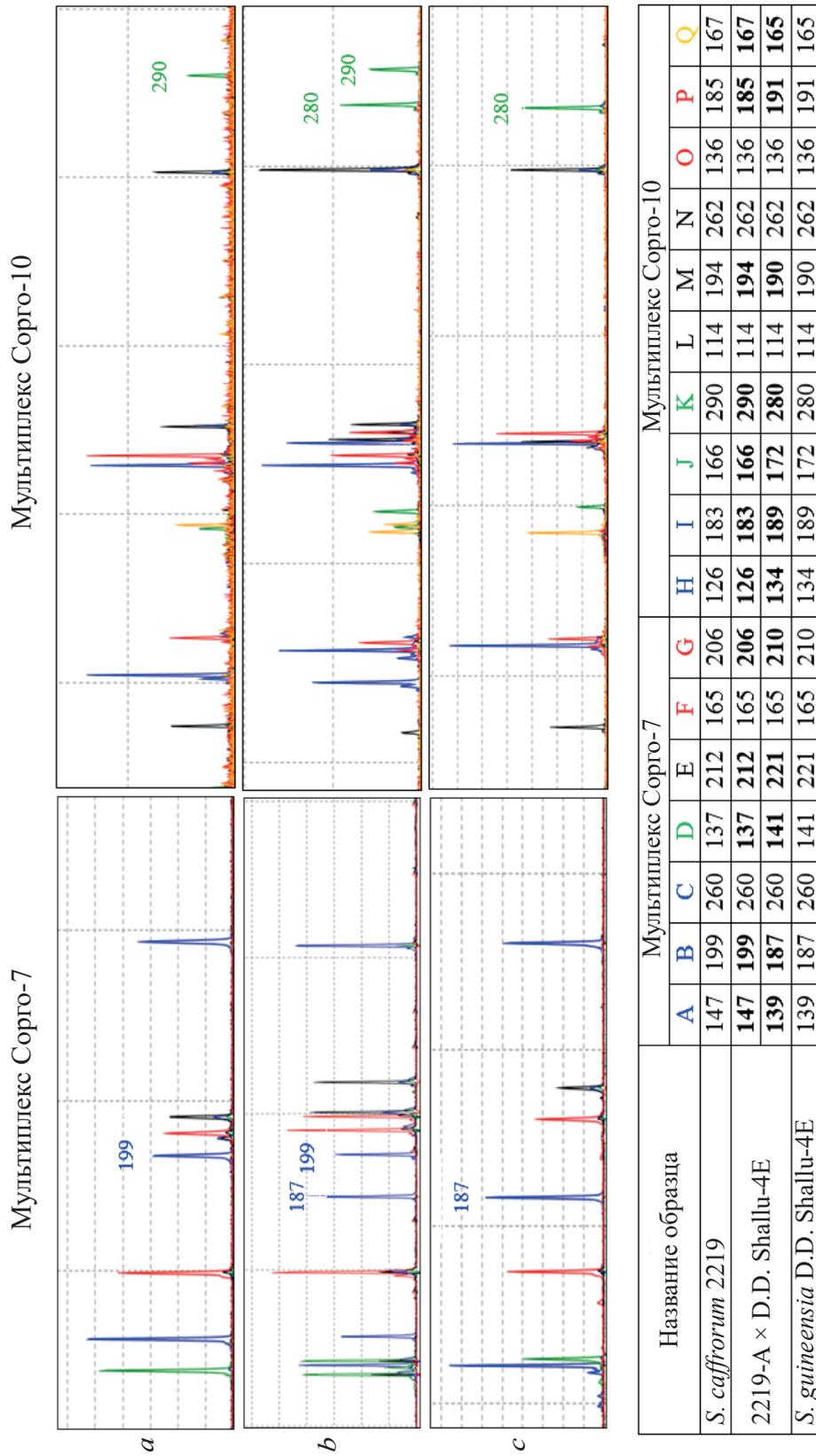


Рис. 4. Генетические профили гибрида сорго кафрское 2219-A × сорго гвинейское D.D.Shallu-4E (b) и его родительских форм – *S. caffrorum* 2219 (a) и *S. guineensis* D.D. Shallu-4E (c), полученные в результате анализа с использованием мультиплексных систем Сорго-7 и Сорго-10. Жирным шрифтом выделены аллели, определяющие гибридность

Fig. 4. Genetic profiles of *S. caffrorum* 2219-A × *S. guineensis* D.D.Shallu-4E hybrid (b) and corresponding parental forms (a and c, respectively) obtained using suggested multiplex PCR. Alleles defining the hybridity are highlighted bold

Таким образом, настоящая работа продемонстрировала эффективность созданной технологии мультилокусного микросателлитного анализа для дифференцирования сортов и гибридов и оценки подлинности, однородности и гибридности селекционных форм сорго. Данная технология может служить эффективным вспомогательным инструментом контроля в ходе селекционного процесса, а также при проведении теста на отличимость, однородность и стабильность (ООС-тест) для регистрации новых селекционных форм и защиты авторских прав.

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме «Разработка технологий нового поколения для масштабного генетического анализа растительных форм сельскохозяйственных культур с целью ускорения селекционного процесса» (проект № 0574-2018-0007).

ЛИТЕРАТУРА

1. Беседа Н.А., Лушпина О.А., Ковтунов В.В., Горпиниченко С.И. Проблемы и результаты по селекции сорго зернового. *Зерновое хозяйство России*, 2010, 6(12), 50–52.
2. Deu M., Hamon P. The genetic organization of sorghum. *Agriculture et développement*. 1994, 25–30.
3. Шепель Н.А. Селекция и семеноводство гибридного сорго. Ростов-на-Дону: Изд-во Ростовского университета, 1985, 256 с.
4. Малиновская Е.В. Внутривидовое разнообразие *Sorghum guineensis* Snowd. в связи с формированием стержневой коллекции: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. Санкт-Петербург, 2007.
5. Сиволап Ю.М., Кожухова Н.Э., Календарь Р.Н. Вариативность и специфичность геномов сельскохозяйственных растений. Одесса: Изд-во Астропринт, 2011, 336 с.
6. Brown S.M., Hopkins M.S., Mitchell S.E., et al. Multiple methods for the identification of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Theoretical Appl. Genet.*, 1996, 93(1–2), 190–198. doi: 10.1007/BF00225745
7. Taramino G., Tarchini R., Ferrario S., et al. Characterization and mapping of simple sequence repeats (SSRs) in *Sorghum bicolor*. *Theoretical and Applied Genetics*, 1997, 95(1-2), 66–72. doi: 10.1007/s001220050533
8. 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. doi: 10.1023/A:1014831302392
9. 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/s001220051501
10. Schloss S.J., Mitchell S.E., White G.M., 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
11. Li M., Yuyama N., Luo L., et al. *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
12. Casa A.M., Mitchell S.E., Hamblin M.T., et al. Diversity and selection in sorghum: simultaneous analyses using simple sequence repeats. *Theor. Appl. Genet.*, 2005, 111(1), 23–30. doi: 10.1007/s00122-005-1952-5
13. Deu M., Sagnard F., Chanterreau J., et al. Niger-wide assessment of *in situ* sorghum genetic diversity with microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* (2008) 116: 903–913. doi: 10.1007/s00122-008-0721-7
14. Murray S.C., Rooney W.L., Hamblin M.T., et al. Sweet Sorghum Genetic Diversity and Association Mapping for Brix and Height. *Plant genome*, 2009, 2(1), 48–62. doi: 1007/s11032-011-9617-3
15. Wang Y.H., Bible P., Loganantharaj R., et al. 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
16. 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
17. Mittal M., and Boora K.S. Molecular tagging of gene conferring leaf blight resistance using microsatellites in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Indian J. Exp. Biology*, 2005, 43(5), 462–466.
18. Billot C., Rivallan R., Sall M.N., et al. A reference microsatellite kit to assess for genetic diversity of *Sorghum bicolor* (Poaceae). *American J. Botany*, 2012, 99(6), e245–250. doi: 10.3732/ajb.1100548
19. Billot C., Ramu P., Bouchet S., 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
20. Kidwell K.K., Osborn, T.C. Simple Plant DNA Isolation Procedures. In: Beckman J., Osborn T.C. *Plant Genomes: Methods for Genetic and Physical Mapping*, Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1992, 1–13. doi: 10.1007/978-94-011-2442-3_1

21. Ali M.L., Rajewski J.F., Baenziger P.S., et al. Assessment of genetic diversity and relationship among a collection of US sweet sorghum germplasm by SSR markers. *Mol. Breeding*, 2008, 21(4), 497–509. doi: 10.1007/s11032-007-9149-z
22. Nei M. and Li W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1979, 76, 5269–5273.

Technology for Genetic Identification of Sorghum Varieties and Hybrids Based on Multiplex Microsatellite Analysis

Yu.V. ANISKINA^{1,*}, E.V. MALINOVSKAYA², T.V. SHALAEVA¹, V.S. MITSUROVA¹, D.A. RODIONOVA¹, P.N. KHARCHENKO¹, and I.A. SHILOV¹

¹The All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, 127550, Moscow Russia

²The Kuban Experimental Station, Vavilov All-Russian Research Institute of Plant Genetic Resources, 352183, poselok Botanica, Gulkevichskii region, Krasnodarskii Kray Russia

e-mail: aniskina.julia@gmail.com*

Received August 31, 2017

Accepted March 1, 2018

Abstract—The technology for the study of genetic diversity and for genetic certification of cultured and wild sorghum plants (249 samples) has been developed on the basis of the multiplex PCR analysis of 17 polymorphic microsatellite loci in a 96-well plate followed by fluorescent detection of PCR fragments by capillary electrophoresis. The suggested approach allows to analyze each sample for a few loci simultaneously and to obtain an individual characteristic of each genotype in the collection, namely, a unique set of allele fragments the size of which is determined to the accuracy of one nucleotide. As a result, a genetic profile for each sample in the collection was obtained and a genetic passport was compiled. A significant polymorphism among the different sorghum species and varieties was found out; more than 17 alleles were identified in the majority of the loci. The established polymorphic information contents (PIC) varied in the range from 0.621 to 0.950, which indicates that the studied loci are highly informative. The dendrogram of the genetic diversity of the cultivated and wild sorghum species was constructed on the basis of the data obtained, where the majority of the sorghum samples were grouped into clusters in accordance with their classification based on morphobiological and economic features. The developed technology for the genetic identification of sorghum species allows to reliably distinguish and identify varieties, lines and hybrids as well as to control the genetic authenticity, homogeneity and hybridity of the plants. The implementation of this technology into the breeding practice will allow the genetic control of plant material at all breeding stages and the improvement of the selected forms registration and breeders' rights protection.

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

Acknowledgments—The work was carried out within the framework of the State Assignment “Development of New Technologies for High-Throughput Genetic Analysis of Agricultural Crops for Accelerating the Breeding Process” (Project 0574-2018-0007).

doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-2-54-69