

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ И ИХ ДИКИХ РОДИЧЕЙ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ И ПРИКЛАДНЫХ ПРОБЛЕМ

Научная статья

УДК 633.171

DOI: 10.30901/2227-8834-2024-1-161-171



Эффективность ISSR-маркеров для выявления variability генома образцов проса посевного (*Panicum miliaceum* L.)

Д. Х. Архестова^{1,2}, А. А. Яхутлова², А. Д. Хаудов^{1,2}, Л. Х. Сокурова², Т. В. Кулемина³

¹ Кабардино-Балкарский научный центр Российской академии наук, Нальчик, Россия

² Кабардино-Балкарский научный центр Российской академии наук, Институт сельского хозяйства, Нальчик, Россия

³ Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия

Автор, ответственный за переписку: Татьяна Владимировна Кулемина, kkku@ya.ru

Актуальность. Просо посевное – одна из основных зерновых культур с широким ареалом возделывания. За последнее десятилетие наблюдается значительный рост потребления проса и продуктов его переработки. Как следствие, становится актуальной селекция сортов с высокими потребительскими свойствами, что требует знания генетического разнообразия образцов для выявления доноров хозяйственно ценных признаков и подбора родительских форм с помощью ISSR-маркеров.

Материалы и методы. Проанализировали 21 образец *Panicum miliaceum* L. коллекции ВИР из разных мест происхождения с использованием восьми ISSR-праймеров. Выделили ДНК каждого образца СТАВ-методом, провели ISSR-анализ в термоциклере BioRad T100 Thermal Cycler. Статистическую обработку выполнили в программе DARwin (версия 6.0.21).

Результаты и заключение. С помощью восьми праймеров было проамплифицировано 116 фрагментов, 62 (53,4%) из них оказались полиморфными. Для оценки эффективности анализируемых праймеров и выявления полиморфизма проса рассчитали основные показатели их информативности, которые оценивали расчетом четырех маркерных параметров. Для большинства ISSR-праймеров были получены средние значения PIC (0,27–0,36); EMR – 1,38–14,5; MI – 0,12–4,87. Четыре ISSR-праймера обладали высокими значениями Rp (3,52–6,76) и были наиболее информативными для генотипирования. Отобранные ISSR-маркеры использовали для оценки генетической изменчивости образцов и их идентификации. Значения генетических расстояний (GD) составили 0,05–0,21. Было показано, что четыре ISSR-маркера с наилучшими значениями информативности обеспечивают достаточный полиморфизм для оценки генетического разнообразия анализируемых генотипов *P. miliaceum* и могут быть рекомендованы для выявления variability генома образцов проса.

Ключевые слова: информативность праймеров, амплификация, генетическое разнообразие, генотипирование

Благодарности: работа выполнена в рамках государственного задания согласно тематическому плану Кабардино-Балкарского научного центра РАН по теме НИР № FMEW-2022-0014 «Молекулярно-генетические технологии и традиционная селекция для получения новых сортов и линий с хозяйственно-значимыми характеристиками культурных растений и животных» и государственного задания согласно тематическому плану ВИР по проекту № FGEM-2022-0009 «Структурирование и раскрытие потенциала наследственной изменчивости мировой коллекции зерновых и крупяных культур ВИР для развития оптимизированного генбанка и рационального использования в селекции и растениеводстве».

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы.

Для цитирования: Архестова Д.Х., Яхутлова А.А., Хаудов А.Д., Сокурова Л.Х., Кулемина Т.В. Эффективность ISSR-маркеров для выявления variability генома образцов проса посевного (*Panicum miliaceum* L.). *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2024;185(1):161-171. DOI: 10.30901/2227-8834-2024-1-161-171

IDENTIFICATION OF CULTIVATED PLANT GENETIC DIVERSITY AND CROP WILD RELATIVES FOR SOLVING FUNDAMENTAL AND APPLIED PROBLEMS

Original article

DOI: 10.30901/2227-8834-2024-1-161-171

Effectiveness of ISSR markers for detecting genomic variability in *Panicum miliaceum* L. accessions

Dzhenet Kh. Arkhestova^{1,2}, Alena A. Yakhutlova², Aliy-bek D. Khaudov^{1,2}, Larisa Kh. Sokurova², Tatiana V. Kulemina³

¹ Kabardin-Balkar Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Nalchik, Russia

² Kabardin-Balkar Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Institute of Agriculture, Nalchik, Russia

³ N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, St. Petersburg, Russia

Corresponding author: Tatiana V. Kulemina, kkku@ya.ru

Background. Millet is one of the main cereal crops with a wide area of cultivation. Over the past decade, there has been a significant increase in the consumption of millet and its processed products. As a result, the breeding of cultivars with high consumer properties is becoming relevant, requiring knowledge of the genetic diversity of germplasm accessions to identify donors of valuable agronomic traits and select parental forms using ISSR markers.

Materials and methods. The analysis with 8 ISSR primers included 21 accessions of *Panicum miliaceum* L. of various origin from the VIR collection. The DNA of each accession was isolated by the CTAB method, and ISSR analysis was performed in a BioRad T100 Thermal Cycler. Statistical processing was made in the DARwin program (version 6.0.21).

Results and conclusion. Eight primers were used to amplify 116 fragments, 62 (53.4%) of which turned out to be polymorphic. To assess the effectiveness of the analyzed primers and identify the polymorphism of millet, basic indicators of their informativeness were calculated and assessed by quantifying four marker parameters. Average PIC (0.27–0.36), EMR (1.38–14.5) and MI (0.12–4.87) values were obtained for most ISSR primers. Four ISSR primers had high Rp values (3.52–6.76) and were the most informative for genotyping. The selected ISSR markers were used to assess the genetic variability of the accessions and identify them. The values of genetic distances (GD) were 0.05–0.21. It was shown that four ISSR markers with the best informativeness values provided sufficient polymorphism to assess the genetic diversity of the analyzed *P. miliaceum* genotypes and could be recommended for identification of the variability in the genome of millet accessions.

Keywords: primer informativeness, amplification, genetic diversity, genotyping

Acknowledgements: the work was performed within the framework of the state task according to the thematic plan of the Kabardin-Balkar Scientific Center of the RAS, Research Topic No. FMEW-2022-0014 “Molecular genetic technologies and traditional breeding for obtaining new cultivars and lines with economically significant characteristics of cultivated plants and animals”, and the state task according to the thematic plan of VIR, Project No. FGEM-2022-0009 “Structuring and disclosing the potential of hereditary variation in the global collection of cereal and groat crops at VIR for the development of an optimized genebank and its sustainable utilization in plant breeding and crop production”.

The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work.

For citation: Arkhestova D.Kh., Yakhutlova A.A., Khaudov A.D., Sokurova L.Kh., Kulemina T.V. Effectiveness of ISSR markers for detecting genomic variability in *Panicum miliaceum* L. accessions. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2024;185(1):161-171. DOI: 10.30901/2227-8834-2024-1-161-171

Введение

Просо посевное (*Panicum miliaceum* L.) считается одним из первых domesticiрованных злаков. Центром его происхождения и культивирования является Северный Китай, откуда культура позднее распространилась в Индию, Восточную Азию и Восточную Европу (Hunt et al., 2008; Lu et al., 2009).

Просо является шестой по значимости зерновой культурой (Awika et al., 2011), и его мировое производство составляет более 30 млн т (FAO Statistical Yearbook..., 2022). Популярность проса определяется пищевой, кормовой и зернофуражной ценностью, высокими агрономическими качествами. Просо уникально благодаря богатому составу питательных веществ. По содержанию общего белка зерно проса (до 15%) превосходит кукурузу (10%), сорго (10%) и пшеницу (12,5%), а по показателям энергетической ценности и усвояемости сопоставимо с ними (Kulemina et al., 2010; Saha et al., 2016). Также в сравнении с другими злаками просо содержит большее количество липидов (2,9%) (Sridhar et al., 1994). Кроме того, эндосперм зерна проса не содержит глютен, что делает его диетическим безглютеновым продуктом. Просо также является важным источником микроэлементов, витаминов, незаменимых аминокислот и антиоксидантов (Kalinova et al., 2023). Богатое полезными веществами зерно проса оказывает и лечебное воздействие на организм, снижает уровень холестерина, предотвращает развитие сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний, уменьшает риск развития сахарного диабета 2-го типа, улучшает работу печени (Nabiyaremye et al., 2017; Das et al., 2019).

P. miliaceum также имеет много преимущественных агрономических качеств, так как относится к зерновым культурам с крайне низким требованием к воде и питательным веществам; при этом растения высокоадаптивны к различным климатическим условиям, устойчивы к фитопатогенам и обладают высокой урожайностью (Rajasekaran et al., 2020; Narciso, Nyström, 2023).

За последнее десятилетие интерес к этой культуре, а также к продуктам ее переработки значительно вырос, что привело к более активной селекции новых сортов проса посевного с улучшенными хозяйственно ценными признаками.

Селекция новых сортов, в том числе и проса посевного, требует оценки и подбора родительских форм и, в свою очередь, базируется на знании генетического разнообразия. Именно данные о генетической составляющей помогают разрабатывать селекционные программы и создавать сорта с определенными характеристиками. Источником генетического разнообразия являются в первую очередь коллекции генбанков, в которых в настоящее время представлено более 20 тысяч образцов *P. miliaceum*.

Генетическое разнообразие вида обычно оценивают по общим морфологическим признакам. Однако на них оказывают влияние внешняя среда, стадии развития растения и т. п., а также требуется несколько повторений их оценки в течение ряда лет для установления генетической составляющей признака. В связи с этим морфологическая характеристика образцов считается менее надежной для анализа генетического разнообразия вида растений, чем использование молекулярных маркеров (Agarwal et al., 2008). По сравнению с традиционными методами фенотипирования молекулярные маркеры имеют многочисленные преимущества, поскольку их легко

идентифицировать и они стабильны в различных тканях растений (Zhang et al., 2016).

На сегодняшний день для оценки генетического разнообразия видов сельскохозяйственных растений используют достаточно большое количество различных систем молекулярного маркирования – как мультилокусных, так и монолокусных, включая генотипирование путем секвенирования (GBS), амплификацию ДНК со случайными праймерами (RAPD), анализ полиморфизма длин амплифицированных фрагментов (AFLP), вариативности длин простых микросателлитных повторов (SSR), полиморфизма длин межмикросателлитных последовательностей (ISSR) и ряд других методов (Elshire et al., 2011; Cui et al., 2017; Souza et al., 2017; Liu et al., 2018).

ISSR-маркирование (Inter Simple Sequence Repeat) представляет собой метод, основанный на ПЦР, который включает амплификацию участка ДНК, находящегося между двумя идентичными микросателлитными повторами, и позволяет выявлять вариативность длин межмикросателлитных последовательностей у анализируемых образцов. Использование ISSR-маркеров стало надежным инструментом для анализа генетического разнообразия растений (Souza et al., 2017). Метод ISSR, в отличие от SSR-анализа, выявляет вариативность не одного конкретного локуса, а является мультилокусным, охватывая весь геном. В качестве праймеров используются 16–25-нуклеотидные последовательности ди-, три- и тетра-нуклеотидных повторов (Reddy et al., 2002). ISSR-маркеры широко применяют при анализе биоресурсных коллекций, поскольку метод не требует информации о последовательности ДНК, может обнаруживать вариации в нескольких локусах одновременно, специфичен к микросателлитным последовательностям, маркеры имеют доминантный тип наследования, результаты высоковоспроизводимы и надежны для генотипирования, особенно для образцов одного или близкородственных видов (Cui et al., 2017). Немаловажную роль в популярности ISSR-маркеров для оценки вариативности большого количества образцов играет малая цена анализа и отсутствие необходимости в дорогостоящих ферментах или оборудовании.

Несмотря на всю возрастающую значимость проса посевного как сельскохозяйственной культуры, работ по определению геномной вариативности крайне мало, и исследовано лишь малое количество образцов, охватывающее ограниченные зоны произрастания (M'Rib, Hilu, 1994; Colosi, Schaal, 1997; Karam et al., 2004; Trivedi et al., 2015; Ghimire et al., 2019). Коллекция *P. miliaceum* ВИР включает более 9 тыс. образцов, представляющих весь культурный ареал, однако генотипирование образцов коллекции ранее не проводили.

Целью данной работы стал подбор ISSR-праймеров, пригодных для выявления полиморфизма образцов *P. miliaceum* и оценки их дальнейшего использования для генотипирования коллекции проса посевного, представленного в ВИР, а также определение генетической вариативности у 21 образца проса из коллекции ВИР, используемых в селекционных программах ИСХ КБНЦ РАН.

Материалы и методы

Растительный материал и экстракция ДНК

Для анализа был отобран 21 образец *P. miliaceum* коллекции ВИР. Эти образцы используются в селекционном процессе при создании сортов и гибридов проса посевного в Институте сельского хозяйства Кабардино-Балкар-

ского научного центра РАН (ИСХ КБНЦ РАН) (табл. 1). Тотальную ДНК выделяли из смеси 5–12 свежесобранных листьев 10-дневных проростков каждого образца СТАВ-методом с модификациями (Filyushin et al., 2023).

ISSR-анализ

ПЦР проводили в реакционной смеси объемом 15 мкл, содержащей ~100 нг геномной ДНК, 1х ПЦР-буфер, 2,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ dNTP, 0,1 ед. Таq-полимеразы («Диа-

лат ЛТД», Россия), 1,0 мкМ ISSR-праймера (табл. 2). Реакцию проводили в термоциклере BioRad T100 Thermal Cycler. Условия реакции: первичная денатурация матрицы при 94°C для 5 мин, 35 циклов денатурации при 94°C в течение 1 мин, отжиг ISSR-праймера при температуре 42–61°C (см. табл. 2), характерной для каждого праймера, в течение 1 мин и элонгации при 72°C в течение 1 мин; заключительный этап элонгации при 72°C в течение 7 мин.

Таблица 1. Анализируемые образцы проса посевного

Table 1. The analyzed millet accessions

Номер образца	№ по каталогу ВИР	Место происхождения	Номер образца	№ по каталогу ВИР	Место происхождения
1	10215	Самарская обл.	12	10311	Орловская обл.
2	10483	Самарская обл.	13	507	Китай
3	10344	Саратовская обл.	14	2881	Китай
4	10211	Саратовская обл.	15	919	Приморский край
5	10343	Саратовская обл.	16	986	Приморский край
6	10374	Орловская обл.	17	3590	Приморский край
7	10326	Орловская обл.	18	3180	Республика Тува
8	10377	Орловская обл.	19	10458	Беларусь
9	10378	Орловская обл.	20	10475	Таджикистан
10	10196	Орловская обл.	21	10476	Таджикистан
11	10323	Орловская обл.			

Таблица 2. ISSR-праймеры, используемые для маркирования образцов проса

Table 2. ISSR primers used to analyze millet accessions

Праймер	Последовательность праймера / повтор	Температура отжига праймера, °C	Количество амплифицированных фрагментов	Количество полиморфных фрагментов	Процент полиморфных фрагментов локусов
M1	(AC) ₈ CG	56	11	5	45,5
M2	(AC) ₈ CG	56	21	14	66,7
M7	(CAG) ₅	52	–	–	–
M10	(CA) ₆ RG	42	16	6	37,5
M11	(CA) ₆ R	45	18	9	50
M13	(AGC) ₄ Y	42	–	–	–
M14	(AG) ₈ YT	46	–	–	–
UBC809	(AG) ₇ A	44	–	–	–
UBC827	(AC) ₈ G	51	10	5	50
UBC841	(GA) ₈ YC	53	12	8	66,7
UBC844	(CT) ₈ RC	53	20	12	60
ISSR2	(GAG) ₆ C	61	–	–	–
ISSR11	(GA) ₈ C	56	8	3	37,5
ISSR14	(TC) ₈ AG	51	–	–	–
ISSR15	TG(TACA) ₄	46	–	–	–

Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 3-процентном агарозном геле (High resolution agarose, Sigma, США) в 1x TBE-буфере с окрашиванием бромистым этидием. Фрагменты визуализировали на УФ-транслюминаторе и документировали с использованием системы документации гелей в системе BioRad Gel Doc XR+ Imaging System (BioRad, США). Длины амплифицированных ISSR-фрагментов оценивали с использованием 1 kb и 100 bp ДНК-маркера (Fermentas, Литва).

Статистический анализ

Поскольку ISSR-праймеры используются для амплификации доминантных маркеров, для составления матрицы амплифицированные фрагменты оценивали по наличию (1) или отсутствию (0). С использованием полученной матрицы рассчитывали генетические расстояния (GD) (коэффициент Нея) в программе DARwin (версия 6.0.21). Кластерный анализ методом UPGMA (невзвешенный парно-групповой метод со средними арифметическими) и анализ основных координат PCoA также был проведен в программе DARwin вер. 6.0.21. Значение PIC (индекс информационного полиморфизма), ожидаемая гетерозиготность (H), коэффициент эффективного мультиплексирования (EMR), разрешающая способность (Rp) и дискриминационная способность (D), были рассчитаны в программе iMEC (<https://irscope.shinyapps.io/iMEC/>) (Amiryousef et al., 2018). Значение PIC вычисляли с использованием формулы (Botstein et al., 1980):

Разрешающую способность Rp каждого праймера рассчитывали по формуле (Prevost, Wilkinson, 1999):

$$R = \sum I_p$$

где I_p представляет собой информативность полос и определяется как $I_p = 1 - (2 \times |0,5 - p_i|)$, где p_i – доля особей, содержащих i-ю полосу.

Дискриминационная способность D оценена по C. Tessier et al. (1999) как:

$$D = 1 - C$$

где C – вероятность ошибки, которую в свою очередь определяли по формуле $C = \sum c_i = \sum p_i \times N_{p_i} - 1 / N - 1$, где N – количество индивидуумов, C равно сумме всех c_i для всех полос, амплифицированных праймером.

Чтобы охарактеризовать способность каждого праймера обнаруживать полиморфные локусы генотипов, также был рассчитан индекс маркера (MI) для каждого праймера как произведение PIC и E (Varshney et al., 2007).

Результаты и обсуждение

Сравнение эффективности использования ISSR-праймеров для анализа генетического полиморфизма образцов проса

Для характеристики геномной вариабельности 21 образца *P. miliaceum* на основе литературных данных были взяты пятнадцать ISSR-праймеров (см. табл. 2, рис. 1). Для семи праймеров (M7, M13, M14, ISSR2, ISSR14, ISSR15, UBC809) не были получены четкие воспроизводимые продукты амплификации (см. табл. 2).

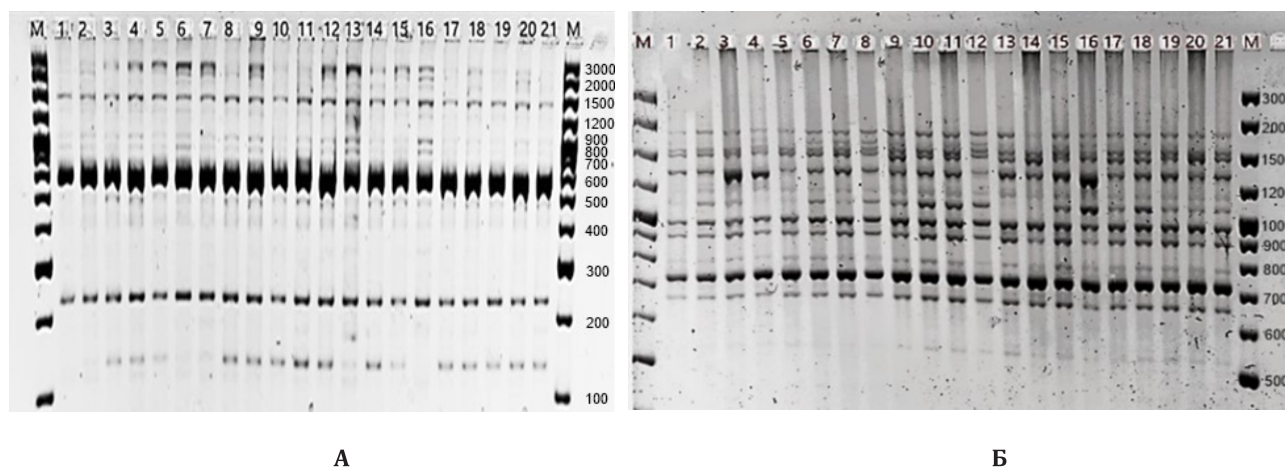


Рис. 1. Электрофореграммы продуктов амплификации ДНК 21 образца *Panicum miliaceum* L. (3-процентный агарозный гель) с использованием ISSR-праймеров M2 (А) и M11 (Б). М-маркер 1 kb ДНК (Fermentas, Литва)

Fig. 1. DNA amplification results for 21 *Panicum miliaceum* L. accessions (3% agarose gel) using the M2 (A) and M11 (Б) ISSR primers. M-marker 1 kb DNA (Fermentas, Lithuania)

$$PIC = 1 - \sum p_i^2 - \sum \sum p_i^2 p_j^2$$

где p_i и p_j – частоты i-го и j-го аллелей.

Ожидаемая гетерозиготность рассчитана по формуле:

$$H = 1 - \sum p_i^2$$

где p_i – частота i-го аллеля, а суммирование производится по всем имеющимся аллелям.

EMR рассчитывали по формуле (Powell et al., 1996):

$$E = n \times \beta$$

где n – среднее число амплифицированных фрагментов определенного системного маркера (мультиплексный коэффициент), β оценивается по количеству полиморфных (n_p) и неполморфных локусов (n_{np}): $\beta = n_p / (n_p + n_{np})$.

Всего с использованием восьми ISSR-праймеров было амплифицировано 116 фрагментов ДНК генома проса посевого. Размер ампликонов составил от 150 до 3000 пн (см. рис. 1). Количество амплифицированных фрагментов для каждого праймера варьировало в диапазоне от 8 до 21, в среднем 14,5 фрагментов на праймер (см. табл. 2). Наибольшее количество фрагментов было получено с использованием праймеров M2 (21) и UBC844 (20), при этом количество полиморфных также было высоким: 14 и 12 соответственно. При меньшем количестве ампликонов (12) праймер UBC841 показал более высокий уровень выявляемого полиморфизма – 8 вариабельных фрагментов (66,7%). Среднее количество числа полиморфных фрагментов в пересчете на праймер составило

7,75. Использование отобранных ISSR-праймеров позволило генотипировать каждый из анализируемых образцов *P. miliaceum*.

Среднее значение выявляемого с использованием восьми ISSR-праймеров полиморфизма составило 53,4%, при этом наибольшие значения были показаны для праймеров UBC841 и M2 (по 66,7% каждый), а для праймеров M10 и ISSR11 – самые низкие (по 37,5% каждый). Праймер ISSR11 амплифицировал наименьшее число фрагментов (8), всего три из которых оказались полиморфными.

Ранее для ISSR-анализа 16 дикорастущих образцов проса посевного из центральных районов Гималаев были использованы восемь микросателлитных праймеров (Trivedi et al., 2015). Эти праймеры отличались от взятых для маркирования в данной работе, однако также представляли собой ди- и тринуклеотидные повторы. А. К. Trivedi с соавторами при использовании этих праймеров амплифицировали 54 ISSR-фрагмента; среднее значение составило всего 6,75 фрагмента на праймер, а среднее значение полиморфных фрагментов – только 3,75 (Trivedi et al., 2015). Доля выявленных полиморфных фрагментов в изученной А. К. Trivedi с соавторами выборке образцов составила 55,6%, что близко к полученному в нашей работе показателю. Также полученные нами значения полиморфизма для ISSR-маркеров были значительно выше, чем при генотипировании образцов родственных видов итальянского проса (чумиза) и пальчатого проса (дагусса) (Ajithkumar et al., 2013), что может объясняться более удачным выбором праймеров или же спецификой анализируемых видов/образцов.

Существует ряд показателей, которые позволяют оценивать меру информационного полиморфизма праймеров и сопутствующие ей величины (Chesnokon, Artemyeva, 2015). Для оценки эффективности использования анализируемых ISSR-праймеров и выявления генетического полиморфизма образцов проса посевного было выбрано несколько параметров (Chesnokon, Artemyeva, 2015; Serrote et al., 2020). При характеристике праймеров значение PIC считается одним из основных показателей, отражающих дискриминационную возможность праймера, и зависит от общего числа аллелей и частот их распределения в анализируемой выборке. Показатели EMR и MI были выбраны Ю. В. Чесноковым

и А. М. Артемьевой для определения эффективности и общей утилитарности выбранной маркерной системы для оценки геномной вариабельности исследуемой выборки образцов проса посевного (Chesnokon, Artemyeva, 2015).

Для оценки возможности использования выбранных ISSR-праймеров для генотипирования образцов *P. miliaceum* были рассчитаны основные параметры информативности (табл. 3). Значения PIC были рассчитаны для характеристики способности каждого из ISSR-праймеров выявлять полиморфизм во всех анализируемых образцах проса. Диапазон значений PIC при использовании восьми праймеров составил 0,077–0,361 со средним значением 0,246 (см. табл. 3). При использовании двух праймеров UBC844 и M2 были выявлены наиболее высокие значения PIC (0,361 и 0,337). При использовании праймера M10 значения PIC были минимальными (0,077). Среднее значение PIC (0,246) анализируемых в данной работе маркеров выше, чем маркеров, полученных при использовании восьми ISSR-праймеров для анализа гималайских образцов, для которых разброс значений PIC составил 0,097–0,306 со средним значением 0,18 (Trivedi et al., 2015). Они несколько ниже средних значений PIC (0,33), показанных для 25 SSR-маркеров, используемых для генотипирования 50 образцов *P. miliaceum* (Cho et al., 2010), но при этом среднее число выявляемых аллелей на праймер в случае SSR составило 4,4, в то время как для ISSR-маркеров – практически в два раза больше (8,7 фрагментов на праймер). Известно, что значение PIC > 0,5 показывает, что используемые праймеры обладают достаточно высокой дискриминационной способностью для анализа генетической вариабельности. Однако для выявления вариабельности образцов проса посевного значения PIC не превышали 0,361 (см. табл. 3). Средние значения PIC, выявленные при использовании ISSR-праймеров, примененных для оценки вариабельности образцов проса как в данном исследовании, так при анализе гималайских образцов (Trivedi et al., 2015), могут, по всей видимости, свидетельствовать о низком уровне полиморфизма генома *P. miliaceum*. Для этих же праймеров, характеризующихся контрастными значениями PIC, были определены наиболее высокие (UBC844 и M2) и низкие (M10, M11) показатели MI и EMR (см. табл. 3).

Таблица 3. Характеристика ISSR-праймеров, используемых для генотипирования образцов *Panicum miliaceum* L.

Table 3. Characteristics of the ISSR primers used for genotyping *Panicum miliaceum* L. accessions

Праймер	H	PIC	EMR	MI	D	Rp
M1	0,206	0,185	9,714	2,005	0,221	2,571
M2	0,428	0,337	14,476	4,872	0,525	6,762
M10	0,080	0,077	1,533	0,118	0,082	1,333
M11	0,357	0,293	1,381	0,405	0,412	4,381
ISSR11	0,182	0,165	7,190	1,189	0,193	0,952
ISSR827	0,320	0,269	8,000	2,560	0,361	2,476
UBC841	0,332	0,277	9,476	2,625	0,377	3,524
UBC844	0,473	0,361	12,333	4,453	0,620	6,762
Среднее	0,297	0,246	8,013	2,278	0,349	3,595

Для оценки способности ISSR-праймера определять различия между большим числом генотипов был использован показатель разрешающей способности (Rp). В нашем исследовании значения Rp варьировали от 0,952 (ISSR11) до 6,762 (M2 и UBC844), в среднем – 3,595. Rp положительно коррелировал с общим количеством амплифицированных фрагментов генома проса. Три ISSR-праймера (M2, UBC844 и M11) имели достаточно высокие значения Rp (6,762, 6,762 и 4,381 соответственно) и поэтому являются наиболее информативными из использованных праймеров для генотипирования образцов проса посевного. Показатели дискриминационной способности D были максимальными для этих же трех праймеров (см. табл. 3).

Таким образом, с использованием лишь четырех праймеров M2, M11, UBC841, UBC844 все анализируемые генотипы проса могут быть идентифицированы; следовательно, данные ISSR-праймеры могут быть рекомендованы для анализа геномной вариабельности образцов *P. miliaceum* коллекций генбанков и селекционных образцов.

Определение генетического разнообразия выборки образцов проса посевного

С использованием коэффициента Нея были получены попарные оценки генетического расстояния (GD) у 21 образца *P. miliaceum* (табл. 4). Значения GD варьировали от 0,05 до 0,21. В целом для анализируемой выборки проса посевного средние генетические расстояния составили 0,11. Полученные показатели в целом были ниже значений, детектированных для 16 гималайских образцов проса (GD 0,11–0,38; среднее GD 0,18) (Trivedi et al., 2015). Это можно объяснить тем, что гималайские

образцы были отобраны из центра разнообразия вида. В то же время AFLP-анализ девяти североамериканских образцов *P. miliaceum* выявил гораздо более низкий уровень вариабельности (GD 0,02–0,04) (Karam et al., 2004), чем в наших исследованиях. Это еще раз доказывает необходимость проведения более широкомасштабных исследований биоразнообразия данной культуры.

Согласно данным таблицы 4, максимальное генетическое расстояние наблюдалось между образцами к-986 (Приморский край) и к-10196 (Орловская обл.) (0,211). Высокие значения GD были также показаны для образцов к-986 (Приморский край) и к-10343 (Саратовская обл.) (GD 0,182); к-10476 (Таджикистан) и к-10215 (Самарская обл.) (GD 0,174); к-10476 (Таджикистан) и к-507 (Китай) (GD 0,174); к-10476 (Таджикистан) и к-919 (Приморский край) (GD 0,172). Минимальные различия были показаны для образцов к-10475 (Таджикистан) и к-10458 (Беларусь) (GD 0,053), а также между образцами к-10458 (Беларусь) и к-10377 (Орловская обл.) (GD 0,057); к-10378 (Орловская обл.) и к-10196 (Орловская обл.) (GD 0,06); к-10475 (Таджикистан) и к-10377 (Орловская обл.) (GD 0,063).

На дендрограмме (рис. 2) базальная ветвь была образована образцом 16 (к-986, Приморский край). Отдельные ветви формировали также образцы 21 (к-10476, Таджикистан) и 14 (к-2881, Китай) вместе с 17 (к-3590, Приморский край). Дистальное положение данных образцов на дендрограмме соответствует расположению на плоскости графика PCoA (анализ основных координат) (рис. 3). Остальные образцы проса на дендрограмме кластеризовались в две группы: первая включала образцы 7 (к-10326), 8 (к-10377), 9 (к-10378), 10 (к-10196),

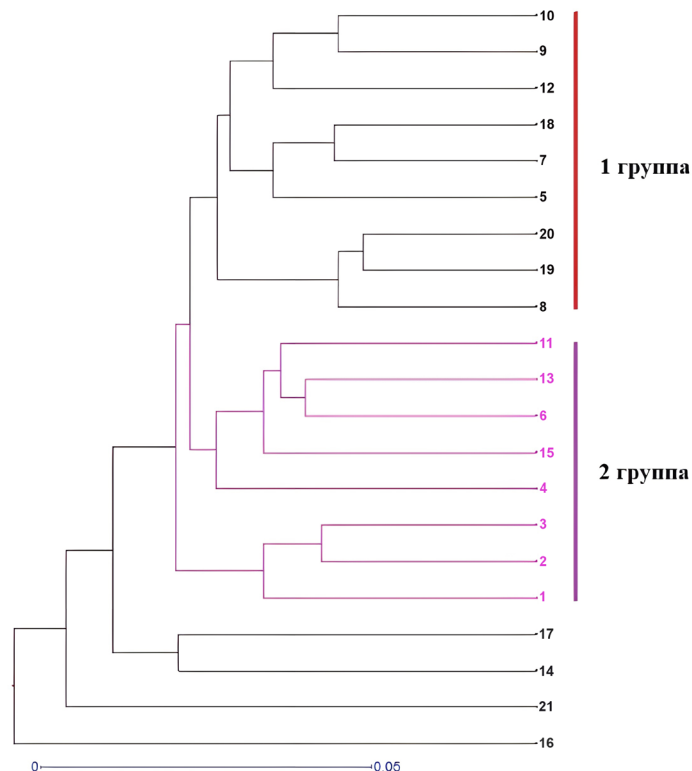


Рис. 2. Генетические отношения между 21 образцом проса посевного. UPGMA-дендрограмма, созданная на основе ISSR-данных

Fig. 2. UPGMA dendrogram generated on the basis of GD data formed by using 8 ISSR markers, showing the relationships among the studied millet accessions

Таблица 4. Матрица попарных генетических расстояний Нея у образцов *Panicum miliaceum* L.
Table 4. Pairwise matrix of Nei's genetic distance in *Panicum miliaceum* L. accessions

Образцы	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
2	0,072																			
3	0,094	0,065																		
4	0,129	0,111	0,069																	
5	0,116	0,098	0,109	0,111																
6	0,096	0,099	0,099	0,082	0,089															
7	0,112	0,127	0,127	0,118	0,083	0,106														
8	0,079	0,094	0,105	0,118	0,116	0,085	0,101													
9	0,116	0,120	0,109	0,122	0,087	0,068	0,072	0,072												
10	0,122	0,126	0,093	0,128	0,093	0,095	0,133	0,111	0,060											
11	0,115	0,075	0,129	0,120	0,097	0,078	0,093	0,082	0,065	0,114										
12	0,106	0,110	0,099	0,112	0,088	0,101	0,095	0,073	0,066	0,094	0,098									
13	0,126	0,078	0,119	0,091	0,109	0,070	0,126	0,116	0,109	0,125	0,077	0,120								
14	0,168	0,136	0,159	0,149	0,102	0,148	0,133	0,133	0,136	0,154	0,112	0,138	0,124							
15	0,133	0,104	0,126	0,096	0,093	0,074	0,067	0,100	0,082	0,132	0,081	0,116	0,094	0,154						
16	0,157	0,149	0,160	0,129	0,182	0,149	0,169	0,146	0,171	0,211	0,137	0,151	0,126	0,168	0,167					
17	0,135	0,103	0,126	0,140	0,092	0,138	0,111	0,099	0,115	0,133	0,091	0,128	0,137	0,108	0,110	0,135				
18	0,128	0,121	0,110	0,112	0,077	0,111	0,061	0,095	0,077	0,105	0,087	0,100	0,110	0,103	0,094	0,151	0,105			
19	0,103	0,107	0,130	0,143	0,119	0,109	0,080	0,057	0,085	0,136	0,073	0,086	0,140	0,148	0,102	0,161	0,102	0,086		
20	0,109	0,112	0,112	0,148	0,101	0,103	0,097	0,063	0,079	0,119	0,089	0,091	0,134	0,141	0,130	0,154	0,107	0,068	0,053	
21	0,174	0,166	0,154	0,167	0,120	0,165	0,128	0,128	0,120	0,126	0,130	0,098	0,174	0,150	0,172	0,186	0,139	0,098	0,119	0,089

Factorial analysis: (Axes 1 / 2)

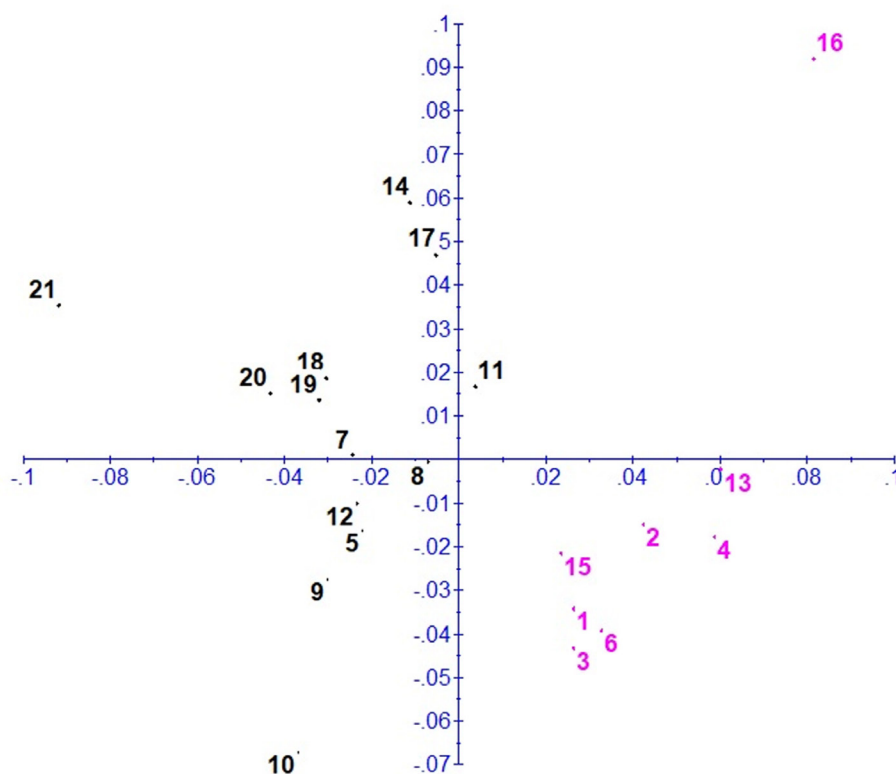


Рис. 3. График анализа основных координат (PCoA) по данным ISSR-анализа 21 образца *Panicum miliaceum* L., сгенерированная программой DARwin

Fig. 3. Graph of the Principal Coordinate Analysis (PCoA) according to the ISSR analysis of 21 *Panicum miliaceum* L. accessions, generated by the DARwin software

12 (к-10311) из Орловской области, 5 (к-10343, Саратовская обл.), 18 (к-3180, Тува), 20 (к-10475, Таджикистан), 19 (к-10458, Беларусь); вторая – 3 (к-10344) и 4 (к-10211) из Саратовской обл., 1 (к-10215) и 2 (к-10483) из Самарской обл., 6 (к-10374, Орловская обл.) и 13 (к-507, Китай), 11 (к-10323, Орловская обл.), 15 (к-919, Приморский край).

График PCoA (см. рис. 3) также выявил достаточный полиморфизм образцов 21 и 16 и формирование двух дисперсных групп. При этом образец 16, формирующий отдельную ветвь на дендрограмме, расположен дальше остальных, в то время как три других образца (21, 17 и 14) локализуются ближе к образцам 1 группы (см. рис. 2, 3).

В целом кластеризация анализируемых образцов *P. miliaceum* и на дендрограмме, и на графике PCoA не выявила группировки по районам происхождения. Ранее при анализе геномной варибельности также показано отсутствие кластеризации (за исключением двух образцов) у 16 образцов проса посевного, собранных на различных высотах в Гималаях (Trivedi et al., 2015). Аналогично ISSR- и RAPD-маркирование 15 образцов проса из Кореи тоже не выявило группировки образцов из одного места произрастания, несмотря на их достаточно близкую локализацию, в отличие от образцов данного исследования (Ghimire et al., 2019). Однако в работе В. К. Ghimire et al. (2019) была показана группировка образцов со сходными признаками, такими как количество и ориентация листьев, время цветения, диаметр стебля.

Выводы

Таким образом, использование метода ISSR-маркирования с отобранными праймерами позволило генотипировать 21 образец *P. miliaceum*. Праймеры M2, M11, UBC841, UBC844 могут быть рекомендованы для определения характеристик варибельности генома образцов, представленных в коллекциях генбанков. Генетическое разнообразие образцов проса, оцениваемое в настоящем исследовании, в сочетании с агрономическими и морфологическими характеристиками может быть использовано в селекционных программах для подбора родительских форм при селекции новых сортов.

References / Литература

- Agarwal M., Shrivastava N., Padh H. Advances in molecular marker techniques and their replications in plant sciences. *Plant Cell Reports*. 2008;27(4):617-631. DOI: 10.1007/s00299-008-0507-z
- Ajithkumar I.P., Panneerselvam R. Analysis of intra specific variation in *Setaria italic* (L.) P. Beauv landraces using RAPD and ISSR markers. *International Journal of Research in Biochemistry and Biophysics*. 2013;3(2):15-20.
- Amiryousefi A., Hyvönen J., Pocza P. iMEC: Online marker efficiency calculator. *Applications in Plant Sciences*. 2018;6(6):e01159. DOI: 10.1002/aps3.1159
- Awika J.M. Major cereal grains production and use around the world. In: J.M. Awika, V. Piironen, S. Bean (eds). *Advances in*

- Cereal Science: Implications to Food Processing and Health Promotion*. Washington DC: American Chemical Society; 2011. p.1-13. DOI: 10.1021/bk-2011-1089.ch001
- Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*. 1980;32(3):314-331.
- Chesnokon Yu.V., Artemyeva A.M. Evaluation of the measure of polymorphism information of genetic diversity. *Agricultural Biology*. 2015;50(5):571-578. DOI: 10.15389/agrobiology.2015.5.571eng
- Cho Y.I., Chung J.W., Lee G.A., Ma K.H., Dixit A., Gwag J.G. et al. Development and characterization of twenty-five new polymorphic microsatellite markers in proso millet (*Panicum miliaceum* L.). *Genes and Genomics*. 2010;32(3):267-273. DOI: 10.1007/s13258-010-0007-8
- Colosi J.C., Schaal B.A. Wild proso millet (*Panicum miliaceum*) is genetically variable and distinct from crop varieties of proso millet. *Weed Science*. 1997;45(4):509-518. DOI: 10.1017/s0043174500088743
- Cui C., Li Y., Liu Y., Li X., Luo S., Zhang Z. et al. Determination of genetic diversity among *Saccharina* germplasm using ISSR and RAPD markers. *Comptes Rendus Biologies*. 2017;340(2):76-86. DOI: 10.1016/j.crvi.2016.11.005
- Das S., Khound R., Santra M., Santra D.K. Beyond bird seed: proso millet for human health and environment. *Agriculture*. 2019;9(3):64. DOI: 10.3390/agriculture9030064
- Elshire R.J., Glaubitz J.C., Sun Q., Poland J.A., Kawamoto K.; Buckler E.S. et al. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS One*. 2011;6(5):e19379. DOI: 10.1371/journal.pone.0019379
- FAO Statistical Yearbook. World Food and Agriculture 2022. Rome: FAO; 2022. Available from: <https://www.fao.org/3/cc2211en/online/cc2211en.html> [accessed Apr. 12, 2023].
- Filyushin M.A., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. Antocyanidin-3-O-glucosyltransferase genes in pepper (*Capsicum* spp.) and their role in anthocyanine biosynthesis. *Russian Journal of Genetics*. 2023;59(5):517-529. [in Russian] (Филушин М.А., Щенникова А.В., Кочиева Е.З. Характеристика генов антоцианидин-3-О-глюкозилтрансфераз перца (*Capsicum* spp.) и их роль в биосинтезе антоцианов. *Генетика*. 2023;59(5):517-529). DOI: 10.31857/S0016675823050041
- Ghimire B.K., Yu C.Y., Kim S.H., Chung I.M. Diversity in accessions of *Panicum miliaceum* L. based on agro-morphological, antioxidative, and genetic traits. *Molecules*. 2019;24(6):1012. DOI: 10.3390/molecules24061012
- Habiyaremye C., Matanguihan J.B., D'Alpoim Guedes J., Ganjyal G.M., Whiteman M.R., Kidwell K.K. et al. Proso millet (*Panicum miliaceum* L.) and its potential for cultivation in the Pacific Northwest, U.S.: a review. *Frontiers in Plant Science*. 2017;7:1961. DOI: 10.3389/fpls.2016.01961
- Hunt H.V., Linden M.V., Liu X., Motuzaite-Matuzeviciute G., Colledge S., Jones M.K. Millets across Eurasia: chronology and context of early records of the genera *Panicum* and *Setaria* from archaeological sites in the Old World. *Vegetation History and Archaeobotany*. 2008;17 Suppl 1):5-18. DOI: 10.1007/s00334-008-0187-1
- Kalinova J.P., Trška J., Horejší K. Comparison of the main constituents in two varieties of proso millet using GC-MS. *Foods*. 2023;12(12):2294. DOI: 10.3390/foods12122294
- Karam D., Westra P., Nissen S.J., Ward S.M.; Figueiredo J.E.F. Genetic diversity among proso millet (*Panicum miliaceum*) biotypes assessed by AFLP technique. *Planta Daninha*. 2004;22(2):167-174. DOI: 10.1590/S0100-83582004000200001
- Kulemina T.V., Khoreva V.I., Shelenga T.V., Kurtseva A.F., Sidorenko V.S. The grain quality of milletlike cultures in conditions of the south Nonblack Earth Zone of Russia. *Agrarian Russia*. 2010;(1):19-23. [in Russian] (Кулемина Т.В., Хорева В.И., Шеленга Т.В., Курцева А.Ф., Сидоренко В.С. Биохимические показатели качества зерна просовидных культур в условиях юга Нечерноземной зоны РФ. *Аграрная Россия*. 2010;(1):19-23). DOI: 10.30906/1999-5636-2010-1-19-23
- Liu S., Feuerstein U., Luesink W., Schulze S., Asp T., Studer B. et al. DArT, SNP, and SSR analyses of genetic diversity in *Lolium perenne* L. using bulk sampling. *BMC Genetics*. 2018;19(1):10. DOI: 10.1186/s12863-017-0589-0
- Lu H., Zhang J., Liu K.B., Wu N., Li Y., Zhou K. et al. Earliest domestication of common millet (*Panicum miliaceum*) in East Asia extended to 10,000 years ago. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(18):7367-72. DOI: 10.1073/pnas.0900158106
- M'Ribu H.K., Hilu K.W. Detection of interspecific and intraspecific variation in *Panicum* millets through random amplified polymorphic DNA. *Theoretical and Applied Genetics*. 1994;88(3-4):412-416. DOI: 10.1007/BF00223653
- Narciso J.O., Nyström L. The genetic diversity and nutritional quality of proso millet (*Panicum miliaceum*) and its Philippine ecotype, the ancient grain "kabog millet": a review. *Journal of Agriculture and Food Research*. 2023;11(2):100499. DOI: 10.1016/j.jafr.2023.100499
- Powell W., Morgante M., Andre C., Hanafey M., Vogel J., Tingey S. et al. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*. 1996;2(3):225-238. DOI: 10.1007/BF00564200
- Prevost A., Wilkinson M.J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*. 1999;98(1):107-112. DOI: 10.1007/s001220051046
- Rajasekaran R., Francis N. Genetic and genomic resources for improving proso millet (*Panicum miliaceum* L.): a potential crop for food and nutritional security. *The Nucleus*. 2020;64(1):21-32. DOI: 10.1007/s13237-020-00331-2
- Reddy M.P., Sarla N., Siddiq E.A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*. 2002;128(1):9-17. DOI: 10.1023/A:1020691618797
- Saha D., Gowda V.C., Arya L., Verma M., Bansal K.C. Genetic and genomic resources of small millets. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2016;35(1):56-79. DOI: 10.1080/07352689.2016.1147907
- Serrote C.M.L., Reiniger L.R.S., Silva K.B., dos Santos Rabaioli S.M., Stefanel C.M. Determining the polymorphism information content of a molecular marker. *Gene*. 2020;726(1):144175. DOI: 10.1016/j.gene.2019.144175
- Souza C.P.F., Ferreira C., de Souza E.H., Neto A.R.S., Marconcini J.M., da Silva Ledo C.A. et al. Genetic diversity and ISSR marker association with the quality of pineapple fiber for use in industry. *Industrial Crops and Products*. 2017;104:263-268. DOI: 10.1016/j.indcrop.2017.04.059
- Sridhar R., Lakshminarayana G. Contents of total and lipid classes and composition of fatty acids in small millets: fox-tail (*Setaria italica*), proso (*Panicum miliaceum*), and finger (*Eleusine coracana*). *Cereal Chemistry*. 1994;71(4):355-359.
- Tessier C., David J.L., Tis P., Boursiquot J.M., Charrier A. Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. *Theoretical and Applied Genetics*. 1999;98(1):171-177. DOI: 10.1007/s001220051054

- Trivedi A.K., Arya L., Verma M., Verma S.K., Tyagi R.K., Heman-taranjan A. Genetic variability in proso millet (*Panicum miliaceum*) germplasm of Central Himalayan Region based on morpho-physiological traits and molecular markers. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2015;37(2):23. DOI: 10.1007/s11738-014-1770-y
- Varshney R.K., Chabane K., Hendre P.S., Aggarwal R.K., Graner A. Comparative assessment of EST-SSR, EST-SNP and AFLP markers for evaluation of genetic diversity and conservation of genetic resources using wild, cultivated and elite barleys. *Plant Science*. 2007;173(6):638-649. DOI: 10.1016/j.plantsci.2007.08.010
- Zhang Y., Yan H., Jiang X., Wang X., Huang L., Xu B. et al. Genetic variation, population structure and linkage disequilibrium in switchgrass with ISSR, SCoT and EST-SSR markers. *Hereditas*. 2016;153(1):4. DOI: 10.1186/s41065-016-0007-z

Информация об авторах

Дженет Хазреталиевна Архестова, младший научный сотрудник, Кабардино-Балкарский научный центр Российской академии наук, 360002 Россия, Нальчик, ул. Балкарова, 2, научный сотрудник, Кабардино-Балкарский научный центр Российской академии наук, Институт сельского хозяйства – филиал КБНЦ РАН, 360004 Россия, Нальчик, ул. Кирова, 224, khavpacheva.dzhenet@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1239-3641>

Алена Аслановна Яхутлова, младший научный сотрудник, Кабардино-Балкарский научный центр Российской академии наук, Институт сельского хозяйства – филиал КБНЦ РАН, 360004 Россия, Нальчик, ул. Кирова, 224, alena.khakunova@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0004-4104-4349>

Алий-Бек Данильбекович Хаудов, научный сотрудник, Кабардино-Балкарский научный центр Российской академии наук, 360002 Россия, Нальчик, ул. Балкарова, 2, научный сотрудник, Кабардино-Балкарский научный центр Российской академии наук, Институт сельского хозяйства – филиал КБНЦ РАН, 360004 Россия, Нальчик, ул. Кирова, 224, aliy-beck@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5187-3229>

Лариса Хасеновна Сокурова, кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник, Кабардино-Балкарский научный центр Российской академии наук, Институт сельского хозяйства – филиал КБНЦ РАН, 360004 Россия, Нальчик, ул. Кирова, 224, kbniish2007@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2352-8057>

Татьяна Владимировна Кулемина, младший научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44, kkku@ya.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5069-7390>

Information about the authors

Dzhenet Kh. Arkhestova, Associate Researcher, Kabardin-Balkar Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, 2 Balkarova St., Nalchik 360002, Russia, Researcher, Kabardin-Balkar Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Institute of Agriculture, branch of the KBSC RAS, 224 Kirova St., Nalchik 360004, Russia, khavpacheva.dzhenet@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1239-3641>

Alena A. Yakhutlova, Associate Researcher, Kabardin-Balkar Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Institute of Agriculture, branch of the KBSC RAS, 224 Kirova St., Nalchik 360004, Russia, alena.khakunova@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0004-4104-4349>

Aliy-beck D. Khaudov, Researcher, Kabardin-Balkar Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, 2 Balkarova St., Nalchik 360002, Russia, Researcher, Kabardin-Balkar Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Institute of Agriculture, branch of the KBSC RAS, 224 Kirova St., Nalchik 360004, Russia, aliy-beck@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5187-3229>

Larisa Kh. Sokurova, Cand. Sci. (Agriculture), Leading Researcher, Kabardin-Balkar Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Institute of Agriculture, branch of the KBSC RAS, 224 Kirova St., Nalchik 360004, Russia, kbniish2007@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2352-8057>

Tatiana V. Kulemina, Associate Researcher, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, kkku@ya.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5069-7390>

Вклад авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Contribution of the authors: the authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests: the authors declare no conflicts of interests.

Статья поступила в редакцию 07.09.2023; одобрена после рецензирования 01.12.2023; принята к публикации 04.03.2024. The article was submitted on 07.09.2023; approved after reviewing on 01.12.2023; accepted for publication on 04.03.2024.