Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(2):189-197
DOI 10.18699/VJ17.236

Полиморфизм RAPD- и ISSR-маркеров у зерновых видов амаранта

С.В. Лиманская[1], Л.А. Мирошниченко[2] ✉, Т.И. Гопций[1], О.С. Корнеева[2]

[1] Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева, Харьков, Украина
[2] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет инженерных технологий», Воронеж, Россия

В генетико-селекционных программах сельскохозяйственных культур для идентификации генотипов, составления генетических карт, изучения генетики, филогении и систематики растений используют различные молекулярно-генетические маркеры, это ускоряет селекцию и способствует эффективному изучению и сохранению генофонда культуры. С помощью RAPD- и ISSR-маркеров возможно быстро идентифицировать большое количество локусов, что удобно при изучении генетической структуры популяций и проведении эволюционных и филогенетических исследований. С целью изучения генетического полиморфизма зерновых видов рода *Amaranthus* L. по молекулярно-генетическим маркерам и возможностей их практического использования проанализировано 18 коллекционных образцов сортов и популяций разного эколого-географического происхождения. Молекулярно-генетический анализ амаранта позволил выявить высокий уровень полиморфизма ДНК-маркеров (около 85 %). Внутрипопуляционный полиморфизм, установленный с применением RAPD-маркеров, составил от 36.4 до 63.6 %, ISSR – 40.0–65.9 %. Также идентифицировано 203 локуса, из которых 173 оказались полиморфными, 30 – мономорфными (встречались во всех исследованных генотипах), 13 – уникальными (встречались только у какого-либо одного генотипа). Рассчитаны генетические дистанции, значения которых по результатам RAPD-анализа варьировали от D_{ij} = 0.0009 между популяциями 00038 и 00110 вида *A. hybridys* L. до D_{ij} = 0.0141 между сортом Харьковский-1 (*A. hypochondriacus* L.) и популяцией 00097 (*A. hybridus* L.). По результатам ISSR-анализа генетические дистанции варьировали от D_{ij} = 0.0018 между сортом Харьковский-1 и популяцией К-61 вида *A. hypochondriacus* L. до D_{ij} = 0.0113 между популяциями К-146 (*A. caudatus* L.) и 00039 (*A. hybridus* L.). Установлено генетическое родство зерновых видов амаранта, подтверждена монофилетическая теория их происхождения. Доказано, что *A. mantegazzianus* Passer. является подвидом *A. caudatus* L. Детектированные уникальные и мономорфные локусы ДНК могут быть использованы для разработки специфических генетических маркеров для идентификации растительного материала и контроля генетической изменчивости амаранта.

Ключевые слова: зерновые виды амаранта; полиморфизм ДНК; RAPD; ISSR; генетическое родство; монофилетическая теория.

Polymorphism of RAPD and ISSR markers in grain amaranth species

S.V. Lymanska[1], L.A. Miroshnichenko[2] ✉, T.I. Goptsiy[1], O.S. Korneeva[2]

[1] V.V. Dokuchaev Kharkiv National Agrarian University, Kharkiv, Ukraine
[2] Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh, Russia

Different molecular genetic markers are effectively used in agricultural genetic selection programs. Genetic markers can be used in commercial breeds certification performance, fast and reliable genotype identification, genetic maps creation, genetics, phylogeny and plant systematic studies, which can accelerate selection, provide effective study and culture genofond maintenance. Amaranth, in this regard, has not been studied well, there is not enough data to effectively perform amaranth marker selection or for the certification of new and existing varieties; there are inaccuracies in the systematization of the crop. Important are the questions about the origin of grain amaranth species and the processes of their evolutionary formation. Amaranth is a pseudo-cereal with a millennia-long history, it has been actively cultivated in many countries around the world in recent decades. A high level of alterability and the formation of a huge number of spontaneous hybrids in natural populations of amaranth significantly complicate the identification of individual genotypes and entire taxonomic units of *Amaranthus* L. Due to the lack of research and depending on the environmental conditions, the morphological markers of amaranth are not able to provide sufficient genomic information to the breeder; thus it is necessary to search for reliable genetic markers that allow the genetic diversity of the *Amaranthus* L. species to be studied and effectively maintained. This research includes grain amaranth species DNA polymorphism analysis. Using RAPD and ISSR technologies, 203 loci have been identified, of which 173 appear to be polymorphic, 30 monomorphic (found in all genotypes analyzed) and 13 unique (found only in one genotype). Unique and monomorphic DNA loci can be used as specific genetic markers, in particular, for the certification of breeds, which is especially important for the identification of plant material and plant genetic variability monitoring. A high level of DNA polymorphism was revealed (about 85 %), a genetic relationship between grain amaranth species

Received 25.02.2016
Accepted for publication 30.09.2016
© AUTHORS, 2017

✉ e-mail: lidamir@mail.ru

established, their monophyletic origin theory verified. *A. mantegazzianus* Passer. was proved to be an *A. caudatus* L. subspecies.

Key words: grain amaranth species; DNA polymorphism; RAPD; ISSR; genetic relationships; monophyletic theory.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:
Лиманская С.В., Мирошниченко Л.А., Гопций Т.И., Корнеева О.С. Полиморфизм RAPD- и ISSR-маркеров у зерновых видов амаранта. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(2):189-197. DOI 10.18699/VJ17.236

HOW TO CITE THIS ARTICLE:
Lymanska S.V., Miroshnichenko L.A., Goptsiy T.I., Korneeva O.S. Polymorphism of RAPD and ISSR markers in grain amaranth species. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(2):189-197. DOI 10.18699/VJ17.236

Амарант – псевдозерновая культура с тысячелетней историей, в последние десятилетия активно культивируется во многих странах мира. Растущий интерес к амаранту объясняется повышенным содержанием в нем белка (16–18 %), метионина и лизина (около 15.8 и 55.8 мг/г соответственно) по сравнению с традиционными зерновыми культурами, сбалансированным аминокислотным составом. Зерно амаранта считается хорошим источником нерастворимой клетчатки (4 %), липидов (6–8 %), богатым источником витаминов и минеральных веществ. Повсеместное выращивание этой засухоустойчивой высокопродуктивной культуры открывает перспективу использования амаранта для приготовления безглютеновых продуктов питания.

Значительное генетическое разнообразие рода *Amaranthus* L. обусловлено наличием в настоящее время более 60 видов амаранта (Costea, DeMason, 2001; Железнов и др., 2009). Высокий уровень изменчивости и образование огромного числа спонтанных гибридов в природных популяциях амаранта (Chan, 1997) существенно усложняют идентификацию отдельных генотипов и целых таксономических единиц рода *Amaranthus* L. Неточности в систематике культуры обусловлены также существованием большого количества таксономических синонимов, которые авторы часто не принимают во внимание (Гопцій, 1999).

Тем не менее учеными определены основные виды амаранта, имеющие наибольшее хозяйственное значение. Различают зерновые, овощные, кормовые, декоративные виды амаранта. Однако такое разделение весьма условно, поскольку зерновые виды амаранта в фазу вегетативного роста могут использоваться как овощные, а при наличии соответствующих признаков любой вид амаранта может рассматриваться как лекарственный или декоративный. К зерновым видам традиционно относятся *A. cruentus*, *A. caudatus*, *A. hypochondriacus* и их предполагаемый предшественник *A. hybridus*. Эти виды дискретны по морфологическим признакам вегетативных (тип и окраска листьев и соцветий) и генеративных (строение цветков, их форма и размеры) органов (Гопцій, 1999). Между тем ученые отмечают генетическую близость зерновых видов амаранта (Chan, 1997; Mandal, Das, 2002; Faseela, Salikutty, 2007), что обусловливает ряд вопросов относительно их эволюционного становления и филогенетического развития. В связи с этим возникает необходимость вовлечения в генетико-селекционные работы по амаранту методов, позволяющих эффективно решать проблемы относительно филогении амаранта, а также различных аспектов прикладной генетики и систематики культуры.

Одним из таких методов является применение генетических маркеров. Насыщение генома амаранта различными типами генетических маркеров позволит генотипировать растительный материал, контролировать уровень генетической изменчивости у сортов амаранта, способствовать пониманию эволюционных и филогенетических процессов, происходящих в пределах рода. Из-за недостаточной изученности и зависимости от условий окружающей среды морфологические маркеры у амаранта не способны обеспечить селекционера достаточной геномной информацией, поэтому необходим поиск надежных молекулярно-генетических маркеров, позволяющих изучать и сохранять генетическое разнообразие рода *Amaranthus* L. Различные молекулярно-генетические маркеры все чаще используются в генетико-селекционных программах амаранта. Так, M.A. Mallory с коллегами (2008) и P.J. Maughan с коллегами (2011) на базе SSR- и SNP-маркеров построили первые генетические карты амаранта. T. Ray и S. Roy (2008) с использованием ДНК-технологий удалось маркировать ген *AmA1*, отвечающий за синтез высококачественного белка у амаранта. Проводятся исследования по секвенированию генома амаранта, в том числе генов, детерминирующих хозяйственно ценные признаки (Riggins et al., 2010), и разработке на основе секвенированных участков видоспецифических маркеров (Maughan et al., 2011; Park, Nishikawa, 2012; Park et al., 2014), применяемых в изучении филогении видов рода *Amaranthus* L.

С целью более детального изучения генетической изменчивости коллекции амаранта в настоящей работе применяли метод молекулярно-генетического анализа с использованием RAPD- и ISSR-маркеров. RAPD-технология (Randomly Amplified Polymorphic DNA), невзирая на низкую специфичность, доминантную природу проявления, повышенную чувствительность к условиям реакции и недостаточно высокую воспроизводимость результатов, имеет ряд преимуществ перед другими маркерными системами: быстрота и простота метода, использование произвольных 10-нуклеотидных праймеров, универсальных для разных видов и родов живых организмов, низкая себестоимость в сравнении с другими маркерными системами (Матвеева и др., 2011). Кроме того, RAPD – это полилокусная система, позволяющая анализировать сразу значительную часть генотипа, что достаточно удобно при изучении генетической структуры популяций, установлении родственных связей между таксонами, сравнении геномов разных групп организмов. ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) – также полилокусная система, которая за счет удлинения праймера и

повышения температуры отжига характеризуется более высокой точностью и воспроизводимостью результатов в сравнении с RAPD, сохраняя при этом относительно невысокую себестоимость. Обе маркерные системы могут быть использованы как экспресс-метод установления генетического полиморфизма, это особенно актуально для мало изученных таксономических групп, и как источник локус-специфических SCAR-маркеров (Sequence Characterized Amplified Region), что весьма успешно было реализовано для рода *Amaranthus* L. (Ray, Roy, 2009).

RAPD- и ISSR-маркеры применяются в генетике, филогенетике и селекции амаранта для изучения генетического разнообразия и дифференциации генотипов (Stefunova, 2008; Алексеева и др., 2010; Štefunova et al., 2015), генотипирования мутантных форм амаранта, полученных при помощи гамма-облучения семян (Labajová et al., 2011; Ražná et al., 2012), исследования филогенетических процессов в популяциях различных видов амаранта (Xu, Sun, 2001; Ray, Roy, 2009; Fatinah et al., 2012). Однако, несмотря на указанные достижения мировой науки, амарант все еще остается мало изученным с точки зрения молекулярной генетики. Недостаточно данных для эффективного ведения маркерной селекции амаранта и паспортизации новых и существующих сортов, имеют место неточности в систематике культуры. Нерешенной остается проблема происхождения зерновых видов амаранта и процессов их эволюционного становления.

Целью нашего исследования стало изучение генетического полиморфизма зерновых видов рода *Amaranthus* L. по молекулярно-генетическим маркерам и возможностей их практического использования.

Материалы и методы

Растительный материал представлен коллекцией амаранта, включающей 6 сортов и 12 популяций разного эколого-географического происхождения, отнесенных к зерновым видам (*A. caudatus* L., *A. cruentus* L., *A. hybridus* L., *A. hypochondriacus* L., *A. mantegazzianus* Passer.) (табл. 1). Популяции К-61, К-146 и К-22 получены из Всероссийского института растениеводства им. Н.И. Вавилова. Популяции 00038, 00039, 00050, 00079, 00087, 00097, 00110, Багряный и Кармен предоставлены Устимовской опытной станцией Института растениеводства им. В.Я. Юрьева. Семена сортов амаранта Лера, Студенческий, Харьковский-1, Роганский, Вогняна кулька, Ультра селекции Харьковского национального аграрного университета им. В.В. Докучаева получены на кафедре генетики, селекции и семеноводства этого университета. В данной коллекции образцы различались по морфологическим признакам (окраска семян, метелок, листьев), длительности вегетационного периода, ценным хозяйственным признакам (продуктивность семян, содержание масла в семенах и др.).

Использованная в настоящем исследовании коллекция вовлечена в селекционный процесс по созданию адаптивных и высокоурожайных сортов амаранта.

С целью изучения полиморфизма ДНК амаранта применяли 10 RAPD-праймеров, среди которых Р-28, Р-37, Р-39, Р-52 разработаны авторами работы (Сиволап, 1998), а праймеры OPF-10, OPA-11, OPP-10, OPW-04, OPW-06, OPW-10 – фирмой Operon Technologies, США (табл. 2). Для ISSR-анализа коллекции амаранта использовали семь праймеров к межмикросателлитным последовательностям ДНК: ISSR 2, ISSR 3, ISSR 810, ISSR 825, ISSR 826, ISSR 834, ISSR 842 (University of British Columbia, Канада) (см. табл. 2).

ДНК выделяли из смеси 10 зрелых семян амаранта каждого образца CTAB методом, описанным в работе (Murray, Thompson, 1980). Анализировали семена 30 растений каждого образца. Концентрацию ДНК определяли при помощи спектрофотометра Shimadzu Uvmini 1240.

Амплификацию проводили с использованием наборов для ПЦР GenePak^{tm} PCR Core (ООО «Лаборатория ИзоГен», Россия). В пробирки из указанных наборов, содержащих лиофилизированные сухие реакционные смеси, готовые для проведения ПЦР, добавляли 20 нг выделенной ДНК, 0.2 мкМ праймера, затем реакционную смесь растворителем из набора для ПЦР доводили до 20 мкл. ПЦР проводили на четырехканальном термостате ТП4-ПЦР-01-«Терцик» при условиях: 1) RAPD-анализ: 1 цикл – денатурация при 94 °С – 5 мин; 45 циклов: 94 °С – 1 мин, отжиг – 36 °С – 1 мин, элонгация – 72 °С – 2 мин; 1 цикл – финальная элонгация, 72 °С – 7 мин; 2) ISSR-анализ: 1 цикл – денатурация при 94 °С – 5 мин; 40 циклов: 94 °С – 30 с, отжиг – 52 °С – 45 с, элонгация – 72 °С – 2 мин; 1 цикл – финальная элонгация, 72 °С – 7 мин. ПЦР с каждым праймером на ДНК, выделенной из каждого образца амаранта, выполняли в двукратной повторности.

Электрофорез продуктов амплификации проводили в 2 % агарозном геле в присутствии бромистого этидия. В работе использовали Трис-ЭДТА-боратную буферную систему – 0.09 М Трис, 0.09 М H_3BO_3, 0.0031 М ЭДТА ($pH_3$8.3). Визуализацию спектров осуществляли при помощи трансиллюминатора TCP-20 MC с последующим фотографированием гелей. В качестве маркеров для определения размеров ампликонов использовали 1 kb DNA ladder и pUC19/Msp 1.

Молекулярную массу продуктов амплификации вычисляли при помощи программного пакета TotalLab TL120.

По результатам молекулярно-генетического анализа были составлены бинарные матрицы для каждого праймера, в которых отмечали присутствие (1) или отсутствие (0) фрагментов с одинаковой молекулярной массой на электрофореграмме. Каждый RAPD- и ISSR-фрагмент рассматривался как отдельный генетический локус. Уровень полиморфизма по каждому праймеру определяли частью полиморфных локусов от общего количества локусов на праймер, выраженной в процентах. Внутрипопуляционный полиморфизм ДНК-маркеров определяли частью выявленных локусов у конкретного образца амаранта от общего количества идентифицированных локусов по каждому типу маркеров, выраженной в процентах. Генетическое разнообразие анализировали посредством вычисления генетических расстояний по M. Nei и W.-H. Li (1979). Кластеризацию и построение дендрограммы, демонстрирующей филогенетические отношения между изученными образцами амаранта, проводили методом Neighbor-joining (NJ) при помощи пакета программ Phylip-3.69. Достоверность полученного дерева филогенетических взаимоотношений проверяли с

Table 1. Origins of amaranth accessions

Accession no. in the catalogue of the National Center for Plant Genetic Resources of Ukraine	Population/variety designation	Amaranth species	Origin
UJ 5200055	00038	*A. hybridus* L.	USA
UJ 5200071	00039	*A. hybridus* L.	Germany
UJ 5200096	00050	*A. hypochondriacus* L.	
UJ 5200043	00079	*A. hybridus* L.	India
UJ 5200062	00087	*A. caudatus* L.	Russia
UJ 5200069	00097	*A. hybridus* L.	India
UJ 5200066	00110	*A. hybridus* L.	USA
UJ 5200001	Bagryanyy	*A. cruentus* L.	Russia
UJ 5200122	Karmen	*A. cruentus* L.	Ukraine
–	K-22	*A. hypochondriacus* L.	India
–	K-61	*A. hypochondriacus* L.	USA
UJ 5200170	K-146	*A. caudatus* L.	Germany
UJ 5200113	Roganskiy	*A. caudatus* L.	Ukraine
UJ 5200111	Vogniana kulka	*A. mantegazzianus* Passer.	
UJ 5200112	Ultra	*A. hybridus* L.	
UJ 5200171	Lera	*A. hypochondriacus* L.	
UJ 5200172	Studencheskiy	*A. hypochondriacus* L.	
UJ 5200110	Kharkovskiy 1	*A. hypochondriacus* L.	

Table 2. Nucleotide sequences of RAPD and ISSR primers used in the analysis of the amaranth collection

RAPD primer	Nucleotide sequence 5′–3′	ISSR primer	Nucleotide sequence 5′–3′
OPF-10	GGAAGCTTGG	ISSR 2	$(CA)_8AG$
OPA-11	CAATCGCCGT	ISSR 3	$(CA)_8GG$
OPP-10	TCCCGCCTAC	ISSR 810	$(GA)_8T$
OPW-04	CAGAAGCGGA	ISSR 825	$(AC)_8T$
OPW-06	AGGCCCGATG	ISSR 826	$(AC)_8C$
OPW-10	TCGCATCCCT	ISSR 834	$(AG)_8CTT$
P-28	CAAACGTCGG	ISSR 842	$(GA)_8CTG$
P-37	CTGACCAGCC		
P-39	CCAGTTCGCC		
P-52	AGGACTGGAC		

помощью bootstrap-анализа с использованием программы Phylip-3.69.

Результаты и обсуждение

Полиморфизм ДНК-маркеров зерновых видов амаранта

Молекулярно-генетические исследования позволили нам идентифицировать 118 RAPD-локусов, 100 из которых были полиморфными, а также 85 ISSR-локусов, среди которых полиморфными оказались 73. Примеры полученных спектров представлены на рис. 1 и 2. Следует отметить, что 30 локусов были мономорфными и выявлялись у всех изученных видов амаранта. Для праймера OF-10 обнаружены мономорфные фрагменты, включающие ~970, 750, 725 и 637 п. н.; для OPA-11 ~350 и 214 п. н.; для OPP-10 ~332 п. н.; OPW-06 ~995, 825 и 277 п. н.; для OPW-10 ~1520, 950, 880, 527 и 453 п. н.; для P-39 – 450 и 345 п. н. и для P-52 – фрагмент размером ~326 п. н.

Идентифицированы мономорфные фрагменты для праймеров: ISSR 2 – размером ~394 п. н., ISSR 3 ~578 п. н.; ISSR 810 ~563 п. н.; ISSR 825 – ампликоны размером ~466

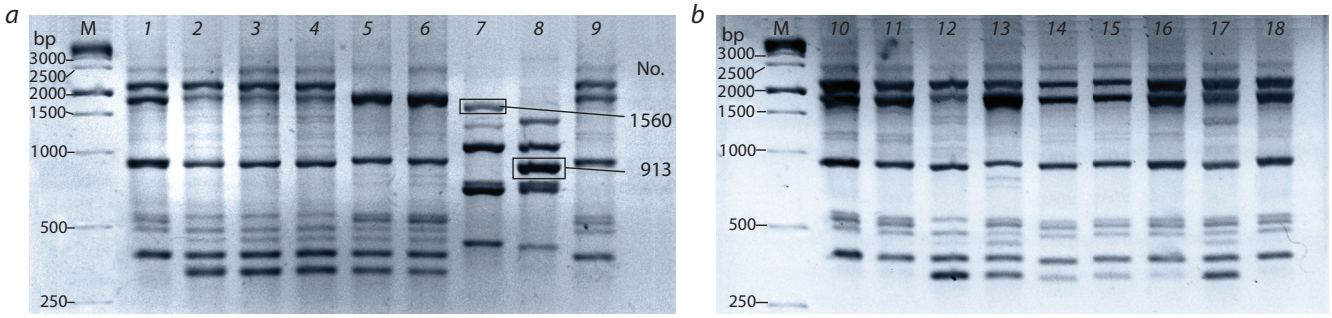

Fig. 1. Electrophoretic image of the amplification products of amaranth DNA with the OPW-04 primer.

Unique loci are indicated with numerals and boxes (bp). M is a marker of molecular weight (1-kb DNA ladder). Lanes: *1*, variety Ultra; *2*, variety Lera; *3*, variety Kharkovskiy-1; *4*, variety Studencheskiy; *5*, variety Roganskiy; *6*, variety Vogniana kulka; *7*, variety Karmen; *8*, population 00087; *9*, variety Bagryanyy (*a*); *10*, population 00038; *11*, population 00110; *12*, population K-61; *13*, population K-146; *14*, population 00050; *15*, population 00039; *16*, population 00097; *17*, population K-22; *18*, population 00079 (*b*).

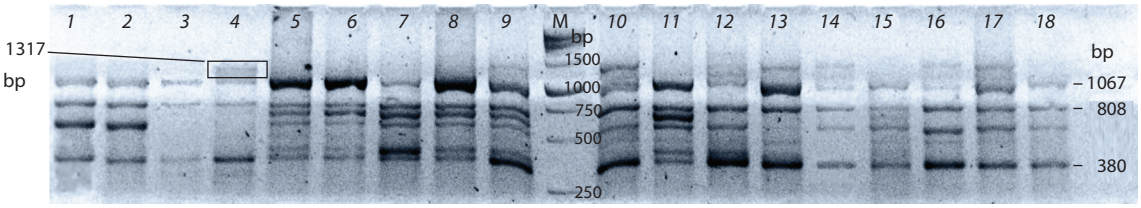

Fig. 2. Electrophoretic image of the amplification products of amaranth DNA with the ISSR 826 primer.

Monomorphic and unique loci are indicated with numerals (bp), the unique locus is boxed. M is a marker of molecular weight (1-kb DNA ladder). Lanes: *1*, variety Roganskiy; *2*, population 00087; *3*, population K-146; *4*, variety Vogniana kulka; *5*, variety Lera; *6*, variety Studenchesky; *7*, variety Kharkovsky-1; *8*, population K-61; *9*, population 00050; *10*, variety Bagryanyy; *11*, variety Karmen; *12*, population K-22; *13*, variety Ultra; *14*, population 00038; *15*, population 00039; *16*, population 00079; *17*– population 00097; *18*, population 00110.

и 3544 п. н.; ISSR 826 ~380, 808 и 1067 п. н.; ISSR 834 ~636 и 712 п. н., и ISSR 842 ~616 и 1297 п. н.

Мономорфные фрагменты могут быть консервативными участками ДНК и свидетельствовать о единстве происхождения зерновых видов амаранта. Для подтверждения этого предположения необходимо проведение дополнительных исследований с привлечением других видов амаранта и генетически близких таксонов. В случае их видовой консервативности мономорфные локусы могут быть секвенированы и использованы для разработки видоспецифических ДНК-маркеров генома зерновых видов амаранта.

Дальнейшие исследования были направлены на идентификацию уникальных участков ДНК, характерных только для какого-либо одного сорта или популяции. Так, у популяции 00039 обнаружены уникальные локусы OPA-11_{269}, ISSR 2_{414}, ISSR 825_{585}, ISSR 825_{1285}; у популяции Кармен – OPW-04_{1560}, P-37_{325}, ISSR 810_{1204}; у сорта Лера – OPA-11_{155}, OPW-06_{489}; у сорта Харьковский-1 – OPW-10_{346}; у сорта Вогняна кулька – ISSR 826_{1317}; у популяции 00087 – OPW-04_{913}; у популяции К-146 – уникальный локус ISSR 842_{997}. Уникальные локусы могут быть использованы для разработки специфических ДНК-маркеров, которые позволят паспортизировать соответствующие сорта и популяции амаранта.

Молекулярно-генетический анализ генетического разнообразия коллекции амаранта позволил установить высокий уровень полиморфизма ДНК-маркеров зерновых видов рода *Amaranthus* L., среднее значение которого составляло 85.0 и 81.9 % при использовании RAPD- и ISSR-праймеров (табл. 3).

С использованием RAPD-технологии минимальный уровень полиморфизма (70.6 %) выявлен при амплификации ДНК амаранта с праймером OPW-10; максимальный – 100 % – отмечен при амплификации с праймерами OPW-04, P-28 и P-37. Полиморфизм ДНК-маркеров амаранта по результатам ISSR-анализа оказался немного меньше и варьировал от 66.7 % при амплификации с праймерами ISSR 810 и ISSR 826 до 94.1 % при амплификации с праймером ISSR 2.

Полученные результаты согласуются с данными других авторов. Так, разные группы ученых отмечают полиморфизм RAPD-маркеров у различных видов амаранта на уровне 68–100 % (Ranade et al., 1997; Mandal, Das, 2002; Faseela, Salikutty, 2007); ISSR-маркеров – около 88 % (Stefunova, 2008). Это может свидетельствовать о том, что род *Amaranthus* L. – высокополиморфный и характеризуется значительным генетическим разнообразием форм, перспективных для селекции сортов амаранта различных направлений использования.

Внутрипопуляционный полиморфизм ДНК-маркеров у коллекционных образцов амаранта был несколько ниже и составлял в среднем по результатам RAPD-анализа 51.2 %, ISSR-анализа – 54.6 % (табл. 4).

Наибольшей полиморфностью RAPD-маркеров характеризовались сорта Харьковский-1 (61.0 %) и Лера (63.6 %) вида *A. hypochondriacus* L., в генотипе которых

Table 3. Polymorphism of RAPD and ISSR markers in grain amaranth species

RAPD-primer	Number of loci		ISSR primer	Number of loci		Polymorphism, %	
	overall	polymorphic		overall	polymorphic	RAPD	ISSR
OPF-10	19	15	ISSR 2	17	16	79.0	94.1
OPA-11	10	8	ISSR 3	11	10	80.0	90.9
OPP-10	6	5	ISSR 810	3	2	83.3	66.7
OPW-04	17	17	ISSR 825	13	11	100.0	84.6
OPW-06	13	10	ISSR 826	9	6	76.9	66.7
OPW-10	17	12	ISSR 834	11	9	70.6	81.8
P-28	6	6	ISSR 842	21	19	100.0	90.5
P-37	15	15				100.0	
P-39	10	8				80.0	
P-52	5	4				80.0	
Total	118	100		85	73	Average	
						85.0	81.9

Table 4. Polymorphism of RAPD and ISSR markers in the amaranth collection

Genotype	RAPD			ISSR		
	Number of loci detected		Polymorphism, %	Number of loci detected		Polymorphism, %
	In all amaranth species	In the particular accession		In all amaranth species	In the particular accession	
Roganskiy	118	55	46.6	85	39	45.9
00087	118	58	49.2	85	53	62.4
K-146	118	59	50.0	85	47	55.3
Vogniana kulka	118	49	41.5	85	50	58.8
Bagryanyy	118	62	52.5	85	42	49.4
Karmen	118	63	53.4	85	56	65.9
Ultra	118	61	51.7	85	39	45.9
00038	118	66	55.9	85	34	40.0
00039	118	66	55.9	85	37	43.5
00079	118	59	50.0	85	46	54.1
00097	118	43	36.4	85	46	54.1
00110	118	62	52.5	85	41	48.2
Lera	118	75	63.6	85	53	62.4
Studencheskiy	118	67	56.8	85	53	62.4
Kharkovskiy-1	118	72	61.0	85	49	57.6
K-22	118	51	43.2	85	54	63.5
K-61	118	69	58.5	85	49	57.6
00050	118	50	42.4	85	48	56.5
Average			51.2			54.6

идентифицировано, соответственно, 72 и 75 локусов из 118 возможных. Минимальный полиморфизм RAPD-локусов (36.4 %) установлен у популяции 00097, у которой идентифицировано 43 локуса из 118. Максимальный полиморфизм ISSR-маркеров отмечен у популяции Кармен (65.9 %), у которой выявлено 56 из 85 локусов. Минимальное количество ISSR-локусов (34 из 85) идентифицировано у популяции 00038, уровень полиморфизма составил 40.0 %.

Достаточно высокий уровень молекулярно-генетического полиморфизма свидетельствует о значительной генетической изменчивости коллекционных образцов

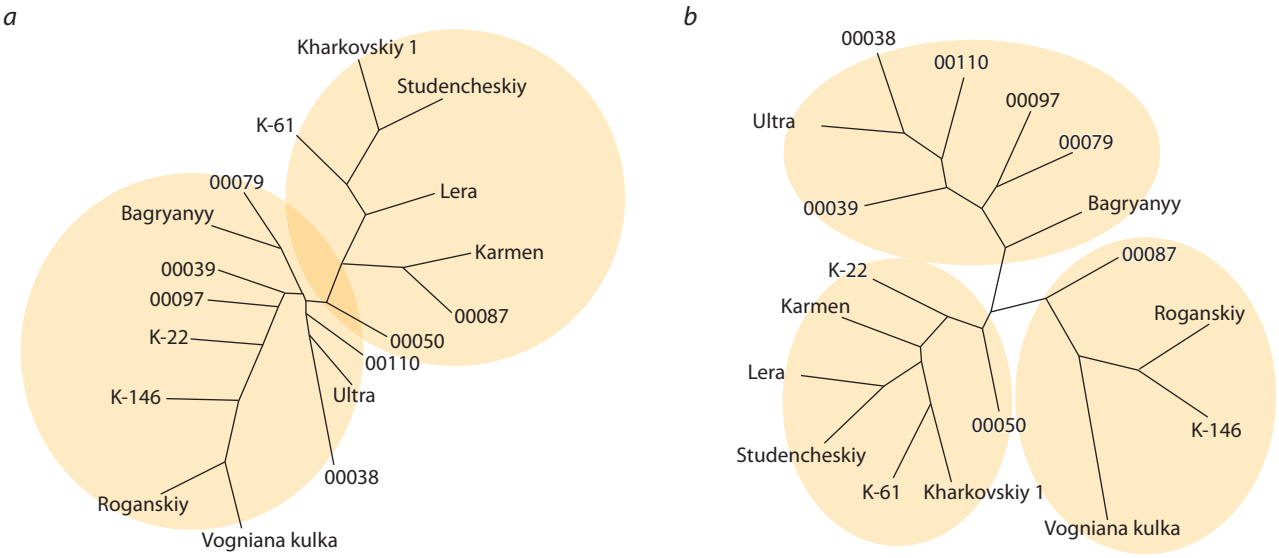

Fig. 3. Phylogenetic trees constructed from results of RAPD polymorphism estimation in the collection of amaranth varieties and populations. Clusters are boxed.

амаранта, что, очевидно, можно объяснить биологическими особенностями культуры, в частности способностью амаранта к перекрестному опылению. Полученные результаты также демонстрируют степень генетической дивергенции исследованных образцов, которая является как следствием природных эволюционных процессов, протекающих в популяциях амаранта, так и результатом действия селективного отбора.

Филогения зерновых видов амаранта

Выявление уровня генетического подобия среди таксонов позволит сделать предварительные выводы об эффективности применения метода гибридизации у разных образцов амаранта. Генетически близкие формы скрещиваются значительно легче, чем отдаленные. Однако во втором случае больше вероятность привнести новый генетический материал в гибридный организм, что является важной задачей селекционеров.

С целью выявления уровня генетической дивергенции между коллекционными сортами и популяциями по результатам молекулярно-генетических исследований нами был проведен филогенетический анализ коллекции амаранта. Рассчитаны генетические дистанции по M. Nei и W.-H. Li (1979), значения которых по результатам RAPD-анализа варьировали от D_{ij} = 0.0009 между популяциями 00038 и 00110 вида *A. hybridys* L. до D_{ij} = 0.0141 между сортом Харьковский-1 (*A. hypochondriacus* L.) и популяцией 00097 (*A. hybridus* L.). По результатам ISSR-анализа генетические дистанции варьировали от D_{ij} = 0.0018 между сортом Харьковский-1 и популяцией К-61 вида *A. hypochondriacus* L. до D_{ij} = 0.0113 между популяциями К-146 (*A. caudatus* L.) и 00039 (*A. hybridus* L.). В целом отмечен высокий уровень генетического подобия исследованных образцов амаранта.

На основании матрицы генетических расстояний построены филогенетические деревья (рис. 3), которые различались по количеству кластеров и особенностям группирования сортов и популяций амаранта в пределах каждого кластера.

По результатам RAPD-анализа коллекционные образцы амаранта были дифференцированы в два основных кластера. В первый вошли сорт Роганский, популяция К-146 (*A. caudatus* L.), сорт Вогняна кулька (*A. montegazzianus* Passer.), популяция Багряный (*A. cruentus* L.), популяции 00038, 00039, 00079, 00097, 00110, сорт Ультра (*A. hybridus* L.) и популяция К-22 (*A. hypochondriacus* L.). Во втором кластере оказались сорта Харьковский-1, Студенческий, Лера, популяции К-61, 00050 (*A. hypochondriacus* L.), Кармен (*A. cruentus* L.) и 00087 (*A. caudatus* L.).

ISSR-анализ позволил кластеризовать образцы амаранта в три группы. В первый кластер вошли все образцы вида *A. hybridus* L. (Ультра, 00038, 00039, 00079, 00097, 00110), а также популяция Багряный (*A. cruentus* L.). Второй кластер образован преимущественно образцами вида *A. hypochondriacus* L. (Лера, Студенческий, Харьковский-1, К-61, К-22, 00050). Сюда же вошла популяция Кармен (*A. cruentus* L.). Кластер 3 включает образцы 00087, К-146, сорт Роганский (*A. caudatus* L.) и сорт Вогняна кулька (*A. mantegazzianus* Passer.).

На обеих дендрограммах можно выделить похожие узлы: Ультра – 00038; К-146 – Роганский – Вогняна кулька; Лера – Студенческий – Харьковский-1 – К-61. Отметим, что образцы амаранта в пределах указанных подгрупп схожи не только по видовой принадлежности, но и по ряду морфологических и хозяйственных признаков, центру происхождения. Так, Ультра и 00038 (*A. hybridus* L.) – низкорослые и раннеспелые, со светлыми листьями, стеблями и метелками. Сорта Лера, Студенческий, Харьковский-1 и популяция К-61 (*A. hypochondriacus* L.) берут начало от форм с пурпурными соцветиями, интродуцированных из США. У этих образцов белые с мучнистым эндоспермом семена, крупные листья, плотные метелки, высокая урожайность семян, длительность вегетационного периода составляет около 115 дней. Популяция К-146, сорта

Роганский и Вогняна кулька характеризуются светло-зелеными листьями, светлыми семенами со стекловидным эндоспермом, густым расположением цветков на веточках соцветия. Кластеризация сорта Вогняна кулька (*A. mantegazzianus* Passer.) в один блок с образцами вида *A. caudatus* L. по двум типам маркеров, а также незначительный уровень генетической дивергенции между этими образцами могут служить подтверждением мнения, что *A. mantegazzianus* Passer. – не самостоятельный вид, а разновидность *A. caudatus* L.

Популяции Кармен и Багряный, относящиеся к виду *A. cruentus* L., на обеих дендрограммах расходились в разные кластеры, не создавая отдельной видовой группы: Кармен – в кластер, образованный образцами вида *A. hypochondriacus* L., Багряный – образцами вида *A. hybridus* L. Данный факт может свидетельствовать о наличии в геноме *A. cruentus* L. локусов, специфических для указанных видов. Это, в свою очередь, может характеризовать *A. cruentus* L. как переходную форму между *A. hybridus* L. и другими зерновыми видами амаранта и служить подтверждением монофилетической теории их происхождения (Sauer, 1976).

Различия топологии полученных деревьев связаны, скорее всего, с разной дифференцирующей способностью использованных маркерных систем. ISSR-маркеры выявляли большую специфичность и позволили более четко распределить изучаемые коллекционные образцы в кластеры в соответствии с их видовой принадлежностью, морфологическими особенностями и уровнем генетической дивергенции. Следовательно, данная маркерная система более эффективна для генетических и филогенетических исследований амаранта по сравнению с RAPD-технологией.

Полученные нами результаты свидетельствуют о генетической близости зерновых видов амаранта и подтверждают монофилетическую теорию их происхождения, предложенную J.D. Sauer (1976), согласно которой вид *A. hybridus* L. – прародитель зерновых видов амаранта, *A. cruentus* L. – продукт первичной доместикации от *A. hybridus* L. в Центральной Америке. Появление видов *A. caudatus* L. и *A. hypochondriacus* L. автор связывает с многократным переопылением, соответственно, *A. cruentus* L. и *A. quitensis* L. – на юге, а также *A. cruentus* L. и *A. powellii* L. – на севере. Вид *A. cruentus* L. – некое переходное звено эволюции зерновых видов амаранта, что отображено в полученных нами филогенетических деревьях. Большинство ученых, занимающихся разработкой проблемы филогенеза амаранта, придерживаются этой теории (Chan, 1997; Ranade et al., 1997; Mallory et al., 2008; Stefunova, 2008; Ray, Roy, 2009).

Таким образом, RAPD- и ISSR-анализ коллекции амаранта позволил выявить высокий уровень полиморфизма изучаемого растительного материала. Получено подтверждение монофилетической гипотезы происхождения зерновых видов амаранта, установлена незначительная филогенетическая их дивергенция. Детектированы уникальные и мономорфные локусы ДНК, которые могут быть использованы для разработки специфических генетических маркеров, в частности для паспортизации сортов, что особенно важно при идентификации растительного материала и контроле генетической изменчивости растений. На основании полученных результатов доказано, что *A. mantegazzianus* Passer. – подвид *A. caudatus* L.

Установлена большая информативность ISSR-маркеров по сравнению с RAPD для филогенетических исследований, оценки генетического разнообразия и скрытой изменчивости популяций амаранта.

Полученные результаты позволяют дополнить информацию по частной генетике амаранта.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Alekseeva E.I., Vlasova A.B., Yukhimuk A.N. Physicochemical characterization of amaranth varieties and their genetic differentiation. Trudy BGU = Proceedings of the Belarusian State University. 2010;5(2):127-133. (in Russian)

Chan K.F. Phylogenic relationships and genetic diversity detected by RAPD and isozyme analysis of crop and weedy species of amaranthus. M. Phil. Thesis. 1997. Available at http://hdl.handle.net/10722/32162.

Costea M., DeMason D. Stem morphology and anatomy in *Amaranthus* L. (Amaranthaceae) – taxonomic significance. J. Torr. Bot. Soc. 2001;128:254-281.

Faseela K.V., Salikutty J. Molecular characterization of amaranthus landraces and assessment of interspecific relationships among Amaranthus spp. (L.) using RAPD markers. Indian J. Genet. 2007;67:12-17.

Fatinah A.A., Arumingtyas E.L., Mastuti R. Genetic diversity study among six genera of Amaranth Family found in Malang based on RAPD marker. J. Tropical Life Sci. 2012;2(3):81-86.

Goptsiy T.I. Amarant: biologija, vyroshhuvannja, perspektyvy vykorystannja, selekcija [Amaranth: biology, cultivation, prospects of use, and breeding]. Kharkiv, 1999. (in Ukrainian)

Labajova M., Senkova S., Ziarovska J., Razna K., Bezo M., Stefunova V., Zelenakova L. The Potential of ISSR markers in Amaranth gamma-radiance mutants genotypying. J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci. 2011;1(4):507-521.

Mallory M.A., Hall R.V., McNabb A.R., Pratt D.B., Jellen E.N., Maughan P.J. Development and characterization of microsatellite markers for the grain amaranths. Crop Sci. 2008;48:1098-1106.

Mandal N., Das P.K. Intra- and iterspecific genetic diversity in grain amaranthus using random amplified polymorphic DNA markers. Plant Tissue Cult. 2002;12:49-56.

Matveeva T.V., Pavlova O.A., Bogomaz D.I., Lutova L.A., Demkovich A.E. Molecular markers for plant species identification and phylogenetics. Ekologicheskaya genetika = Ecological Genetics. 2011;IX(1):32-43. (in Russian)

Maughan P.J., Smith S.M., Fairbanks D.J., Jellen E.N. Development, characterization, and linkage mapping of single nucleotide polymorphisms in the grain amaranths (Amaranthus sp.). Plant Gen. 2011;4:92-10.

Mujica A., Jacobsen S.E. The genetic resources of Andean grain amaranth (*Amaranthus caudatus* L., *A. cruentus* L. and *A. hypochondriacus* L.) in America. Plant Genet. Res. Newslett. 2011;133:41-44.

Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res. 1980;8(19):4321-4325.

Nei M., Li W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. PNAS USA. 1979;76:5269-5273.

Park Y.-J., Nishikawa T. Rapid identification of Amaranthus caudatus and Amaranthus hypochondriacus by sequencing and PCR–RFLP analysis of two starch synthase genes. Genome. 2012;55:622-628.

Park Y.-J., Nishikawa T., Matsushima K., Minami M., Nemoto K. A rapid and reliable PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) marker for the identification of Amaranthus cruentus species. Breed. Sci. 2014;64:422-426. DOI 10.1270/jsbbs. 64.422.

Ranade S.A., Kumar A., Goswamt M., Farooqui N., Sane P.V. Genome analysis of Amaranth: determination of inter- and intra-species variation. J. Biosci. 1997;22(4):457-464.

Ray T., Roy S.C. Physical localization of highly nutritional protein coding *AmA1* gene in amaranths through molecular cytogenetic tools. Caryologia. 2008;61(3):216-224.

Ray T., Roy S.C. Genetic diversity of Amaranthus species from the Indo-Gangetik plains revealed by RAPD analysis leading to the development of ecotype-specific SCAR marker. J. Hered. 2009;100(3):338-347.

Razna K., Ziarovska J., Labajova M. Genome changes in mutant lines of *Amaranthus* as detected by microsatellite-directed PCR. J. Agricult. Biol. Sci. 2012;7(11):877-884.

Riggins C.W., Peng Y., Stewart C.N. Jr, Tranela P.J. Characterization of *de novo* transcriptome for waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) using GS-FLX 454 pyrosequencing and its application for studies of herbicide target-site genes. Soc. Chem. Industr. 2010;66:1042-1052.

Sauer J.D. Grain amaranth. Ewolution of crop plants. London: Simmonds NW, Longman Group Ltd, 1976;4-7.

Sivolap Y.M. Ispol'zovanie PTsR-analiza v genetiko-selektsionnykh issledovaniyakh: Nauchno-metodicheskoe rukovodstvo [Guidelines for using PCR analysis in genetics and breeding]. Kyiv, Agrarna nauka Publ., 1998. (in Russian)

Stefunova I.V. Geneticka analyza laskavca (*Amaranthus* L.) DNA markermi: Autoref. diz. Nitra. 2008.

Stefunova V., Bezo M., Ziarovska J., Razna K. Detection of the genetic variability of Amaranthus by RAPD and ISSR markers. Pak. J. Bot. 2015;47(4):1293-1301.

Xu F., Sun M. Comparative analysis of phylogenetic relationships of grain amaranths and their wild relatives (*Amaranthus*; *Amaranthaceae*) using internal transcribed spacer, amplified fragment length polymorphism, and double-primer fluorescent intersimple sequence repeat markers. Mol. Phylogen. Evol. 2001;21(3):372-387.

Zheleznov A.V., Zheleznova N.B., Burmakina N.V., Yudina R.S. Amarant: nauchnye osnovy introduktsii [Amaranth: scientific foundations of introduction]. Novosibirsk: Geo Publ., 2009. (in Russian)