
... ГЕНЕТИКА ... GENETICS ...

УДК: 577.21:631.526.32:635.657

Изучение изменчивости микросателлитных локусов сортов нута из разных стран методами молекулярного дисперсионного (AMOVA) и Q-факторного анализов
Г.Е.Акинина

*Харьковский национальный аграрный университет имени В.В.Докучаева (Харьков, Украина)
desperado1983@bk.ru*

Описана изменчивость 118 сортов нута из разных стран мира с помощью индекса полиморфности (PIC) и индекса генетического разнообразия Nei (D). Генетическая дифференциация сортов нута оценена с помощью анализа молекулярной дисперсии (AMOVA). Анализ молекулярной дисперсии показал наличие микросателлитных локусов, которые вносят наибольший вклад в дифференциацию разных образцов нута. Пространственная визуализация дивергенции сортов нута осуществлена с помощью Q-факторного анализа. Обсуждаются особенности группирования популяций сортов из разных стран.

Ключевые слова: *Cicer arietinum L.*, микросателлиты, изменчивость, AMOVA, Q-факторный анализ.

Вивчення мінливості микросателітних локусів сортів нута з різних країн методами молекулярного дисперсійного (AMOVA) і Q-факторного аналізів
Г.Є.Акініна

Описана мінливість 118 сортів нута з різних країн за допомогою індексу поліморфності (PIC) і індексу генетичного різноманіття Nei. Генетична диференціація сортів нута оцінена за допомогою аналізу молекулярної дисперсії (AMOVA). Аналіз молекулярної дисперсії показав наявність микросателітних локусів, які вносять найбільший внесок в диференціацію різних зразків нута. Просторова візуалізація дивергенції сортів здійснена за допомогою Q-факторного аналізу. Обговорюються особливості групування популяцій сортів з різних країн.

Ключові слова: *Cicer arietinum L.*, микросателіти, мінливість, AMOVA, Q-факторний аналіз.

Study of microsatellites loci variability in chickpea cultivars from different countries by methods of molecular variance (AMOVA) and Q-factor analyses
G.Ye.Akinina

Variability of microsatellites loci of chickpea cultivars from different countries by polymorphic information content (PIC) and Nei index of genetic polymorphism was described. Genetic differentiation of chickpea varieties was estimated by analysis of molecular variance (AMOVA). The analysis of molecular variance showed occurrence of microsatellites loci, which make the most contribution into differentiation of different chickpea samples. Spatial visualization of divergence of chickpea varieties was realized by Q-factor analysis. The features of grouping populations of cultivars were discussed.

Key words: *Cicer arietinum L.*, microsatellites, variability, AMOVA, Q-factor analysis.

Введение

В последние годы в странах СНГ, в том числе и Украине, возрос интерес к возделыванию нута (*Cicer arietinum L.*) (Соколов, Січкара, 2010). Это обусловлено не только сбалансированной питательной ценностью нута, но и повышенной засухоустойчивостью по сравнению с другими зернобобовыми культурами (Jomová et al., 2009). В связи с этим изучение генетического разнообразия образцов нута разного происхождения является особенно актуальным.

Для получения полной информации о генетической структуре ресурсов растений необходимо проводить оценку генотипов не только по морфологическим признакам, но и с привлечением разных ДНК-маркеров. Анализ генетических ресурсов растений по молекулярным маркерам позволяет выявлять скрытую изменчивость и тем самым целенаправленно подходить к более точной дифференциации и идентификации коллекционных образцов, в том числе и выявлению ценных

генотипов. Это также позволяет оптимизировать структуру коллекционного материала, т.е. при регистрации образца сравнивать его с имеющейся базой данных.

Для оценки генетических ресурсов нута привлекают различные молекулярные маркеры, среди которых наиболее приемлемые – микросателлиты (Чесноков, 2005; Semagn et al., 2006; Kalia et al., 2011). Прежде всего, это связано с тем, что по микросателлитным локусам идентифицируется высокий уровень изменчивости, что позволяет изучать сельскохозяйственные культуры со строгим самоопылением и соответственно низким уровнем внутри- и межпопуляционной изменчивости. Так, с использованием этой маркерной системы удалось дифференцировать сорта нута и оценить наибольшие генетические коллекции нута в ICRISAT (Индия) и ICARDA (Сирия) (Upadhyaya et al., 2008).

Одной из проблем, с которыми сталкивается исследователь при изучении разнообразия генетических коллекций растений, является анализ большого массива данных. При этом, как правило, основным и широко используемым статистическим методом классификации данных является кластерный анализ, позволяющий структурировать коллекционные образцы (Ким и др., 1989). Однако существенным недостатком кластерного анализа является иерархический алгоритм, который изначально предполагает существование некоей структуры между изучаемыми объектами, хотя они могут быть совершенно не связаны между собой (Кафанов и др., 2004). Альтернативным подходом, одним из методов классификации, который не предполагает существование иерархии между объектами, является Q-факторный анализ. Основным отличием Q-факторизации от классического факторного анализа является то, что он проводится на основе корреляционной матрицы между объектами, а не переменными (Rozalia, 2008). Показано эффективное использование Q-факторного анализа для изучения изменчивости биологических объектов, а также для уточнения и подтверждения результатов кластерного анализа (Ким и др., 1989; Wiesemuller, Rothe, 2006).

Кроме того, еще одним широко используемым методом для изучения генетической дифференциации организмов является анализ молекулярной дисперсии (AMOVA). Преимуществами и отличиями AMOVA для анализа генетических данных от классического дисперсионного анализа (ANOVA) является то, что при анализе молекулярной дисперсии могут использоваться различные эволюционные модели без видоизменения базовой структуры анализа, а также метод пермутаций, который не требует предположения нормального распределения в исходных данных. В связи с этим целью нашей работы явилось изучение изменчивости сортов нута из коллекции Национального центра генетических ресурсов растений Украины (НЦГРРУ) по микросателлитным локусам методами AMOVA и Q-факторного анализа.

Материалы и методы

Объектами исследования были сорта нута Европы (Украина, Россия, Молдова, Испания, Италия, Венгрия, Чехия), Азии (Индия, Иран, Узбекистан) и Америки (США, Канада), полученные из НЦГРРУ (г. Харьков), всего 118 образцов. Репрезентативные выборки сортов нута из каждой страны составили 9–12 образцов. Сорта нута из Италии, Венгрии, Чехии из-за немногочисленности в коллекции были объединены в общую группу – другие европейские страны (ДЕС).

Оценка дивергенции сортов нута проводилась по 13 микросателлитным локусам, описанным другими авторами как полиморфные (Hüttel et al., 1999; Sethy et al., 2006; Upadhyaya et al., 2008).

ДНК выделяли из смеси 6 семян СТАВ методом (Ausubel et al., 1987). Полиморфизм микросателлитных локусов изучали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием программы амплификации, предложенной Hüttel et al. (1999) с модификациями. Продукты амплификации разделяли методом электрофореза в 3% агарозном геле с бромистым этидием в боратном буфере с низкой ионной силой (Brody et al., 2004). В качестве маркеров молекулярного веса использовали DNA ladders 50 bp и pUC 19/MspI DNA Marker. Полученные гели фотографировали. Для определения количества и размеров продуктов амплификации применяли программу Totallab 120 (<http://www.totallab.com>).

Разнообразие сортов нута оценивали по индексу полиморфности (PIC) и индексу разнообразия Nei (D), которые рассчитывали в программе Excel с помощью надстройки Microsat. Генетическую дифференциацию популяций сортов нута из разных стран оценивали с помощью анализа молекулярной дисперсии (AMOVA) в программе Arlequin 3.5.1.2 (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35>). Рассчитывали молекулярную дисперсию между популяциями сортов нута из разных стран (V_a), а также между отдельными сортами во всей выборке (V_b). Для оценки изменчивости сортов нута по отдельным и всем локусам использовали коэффициент Fst по Wright, рассчитанный на основе частот генотипов сортов нута по изученным микросателлитным локусам, проводя 1000 пермутаций исходного массива

данных. Матрицу попарных дистанций между популяциями сортов нута рассчитывали по Slatkin (Fst) после 1000 пермутаций (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35>).

Для оценки и пространственной визуализации дивергенции популяций сортов нута из разных стран проводили Q-факторный анализ в программе Statistica 6.0. Вращение главных факторов осуществляли с помощью «варимакс»-критерия.

Результаты и обсуждение

При амплификации 13 микросателлитных локусов в сортах нута выявлено 68 аллельных вариантов. Среднее количество аллелей на один локус составило $5,15 \pm 2,58$. Два микросателлитных локуса (CaSTMS25 и NCPGR41) из 13 были мономорфными, остальные – полиморфные. Максимальные значения индекса полиморфности (PIC) отмечались в сортах нута по локусам CaSTMS10 (PIC=0,80) и NCPGR57 (PIC=0,73). Несмотря на то, что нут является строгим самоопылителем (Sethy et al., 2006), были выявлены гетерогенные образцы – 2 сорта из Индии по локусу NCPGR 50, 2 образца из Индии и Канады по локусу NCPGR 90 и 2 сорта из Испании по локусу NCPGR 94. На внутрисортном уровне в этих образцах идентифицированы не только гомозиготы, но и гетерозиготы. Частота гетерозигот в общей выборке сортов составила $0,006 \pm 0,0014$.

По разнообразию микросателлитных локусов наибольшим уровнем полиморфизма отличались сорта нута из Ирана ($D=0,50 \pm 0,29$) и США ($D=0,45 \pm 0,29$), наименее полиморфными были сорта из Испании ($D=0,25 \pm 0,24$) и Канады ($D=0,24 \pm 0,24$).

Генетическая дифференциация между популяциями сортов нута, оцененная с помощью анализа молекулярной дисперсии (AMOVA), составила 38%. Дисперсия между отдельными образцами в общей изученной выборке сортов нута составила 61% (табл. 1). При оценке молекулярной дисперсии по каждому из изученных микросателлитных локусов выявлено, что максимальные межпопуляционные различия были обусловлены изменчивостью локусов NCPGR 21 и NCPGR57 при дисперсии 62 и 56% соответственно. Кроме того, изменчивость этих же локусов описывала наименьшую долю межсортных различий по сравнению с другими изученными микросателлитными локусами ($V_b=38$ и 44% соответственно) (табл. 1). По-видимому, это объясняется тем, что аллельные варианты и частота их встречаемости по этим локусам максимально специфичны для каждой отдельной популяции сортов нута. Вместе с тем, равномерное распределение аллельных вариантов во всей выборке сортов нута не позволяет выявлять четкие межсортные отличия по этим локусам. Напротив, присутствие уникальных или редких аллельных вариантов в сортах нута по

Таблица 1.

Результаты анализа молекулярной изменчивости (AMOVA) микросателлитных локусов сортов нута

Переменные	Между популяциями				Между сортами во всей выборке				Индекс фиксации, F_{st}
	SS	df	s^2	% дисперсии (V_a)	SS	df	s^2	% дисперсии (V_b)	
CaSTMS10	72,07	9	0,17	39	130,05	494	0,26	61	0,39
CaSTMS14	41,87	9	0,10	45	58,53	494	0,12	55	0,45
NCPGR 21	91,21	9	0,22	62	64,78	482	0,13	38	0,62
NCPGR 50	56,00	9	0,13	35	121,02	490	0,25	65	0,35
NCPGR51	33,26	9	0,08	32	79,40	494	0,16	68	0,32
NCPGR52	17,70	9	0,04	31	44,50	488	0,09	69	0,31
NCPGR55	1,23	9	0,00	16	6,67	494	0,01	84	0,16
NCPGR57	95,55	9	0,23	56	87,74	490	0,18	44	0,56
NCPGR81	66,33	9	0,15	41	110,80	492	0,23	59	0,41
NCPGR90	37,80	9	0,09	24	135,83	484	0,28	76	0,24
NCPGR94	19,76	9	0,04	14	125,98	492	0,26	86	0,14
По всем локусам	532,8		1,25	39	965		1,97	61	0,38

локусам NCPGR94 и NCPGR55 определяет их максимальную межсортовую дифференцирующую способность ($V_b=86$ и 84% соответственно). Так, по локусу NCPGR55 выявлен уникальный аллельный вариант 195 пн и редкий аллельный вариант 215 пн (частота встречаемости (p) = $1,19\%$). По локусу CPGR94 в изученных сортах нута встречаются редкие аллели – 170 пн (частота встречаемости $0,80\%$) и 200 пн (частота встречаемости $1,2\%$). При этом в сортах нута по вышеописанным локусам преобладают один или два аллельных варианта.

При оценке матрицы дистанций по Slatkin между популяциями сортов нута из разных стран выявлено, что максимальная дивергенция наблюдается между сортами нута из Испании и Канады ($F_{st}=0,49296$), сортами из Испании и Ирана ($F_{st}=0,47142$). Минимальная дифференциация отмечалась между популяциями сортов нута из России и ДЕС ($F_{st}=0,12918$), а также России и Украины ($F_{st}=0,14810$) (табл. 1). В целом, можно констатировать, что все изученные сорта нута отличались значительным уровнем изменчивости, оцененной с помощью F-статистики ($F_{st}=0,38$).

Для пространственной визуализации дивергенции сортов нута из разных стран, а также подтверждения результатов кластерного анализа, описанных в наших предыдущих работах (Акинина, Попов, 2010), проводили Q-факторный анализ. В ходе анализа нами было выделено 2 главных фактора, которые описывали $71,2\%$ общей дисперсии частот аллелей в сортах нута. Первый фактор имеет максимальные нагрузки на сорта из Украины, России, Молдовы, Испании. Значительные нагрузки первого фактора также имели сорта из ДЕС, США и Канады. Второй фактор оказывает максимальное влияние на сорта из Узбекистана, Ирана, Индии (табл. 2).

Таблица 2.

Матрица факторных нагрузок на выборки сортов нута из разных стран, полученная после вращения главных факторов

Страна	Фактор 1	Фактор 2
Украина	0,853946	0,268646
Россия	0,816385	0,204971
Молдова	0,845152	0,308441
Испания	0,804482	0,094247
Индия	0,288474	0,802326
Иран	0,156594	0,821520
Узбекистан	0,261839	0,858550
Канада	0,582583	0,550310
США	0,689524	0,315707
ДЕС	0,726261	0,406490
Общая дисперсия	4,275781	2,841677
Доля общей дисперсии	0,427578	0,284168

Таким образом, в результате Q-факторного анализа в двумерном пространстве четко выделяются две диаметрально противоположные группы популяций сортов нута – это образцы нута из Украины, России, Молдовы и Испании (первая группа) и вторая группа – азиатские страны (Узбекистан, Иран, Индия). Сорта нута ДЕС, США и Канады занимают промежуточное положение между группами европейских и азиатских сортов нута. При этом сорта из Канады тяготеют к азиатской группе, а сорта из ДЕС и США – к европейской (рис. 1). Таким образом, сорта нута географически близкорасположенных стран находились рядом в пространстве двух главных факторов. Это, вероятно, связано с особенностями селекции в отдельных странах и селективной значимостью определенных аллельных вариантов микросателлитных локусов.

Итак, в результате наших исследований оценена изменчивость микросателлитных локусов сортов нута из разных стран с помощью индексов генетического разнообразия. Анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) позволил выявить локусы, которые описывают максимальные отличия между популяциями и отдельными сортами нута. С помощью F-статистики выявлен значительный уровень дифференциации популяций сортов нута из разных стран ($F_{st}=0,38$). Q-факторный анализ позволил оценить и графически представить дивергенцию между популяциями сортов нута. Кроме того, результаты Q-факторного анализа сохраняли основные тенденции группирования сортов нута из

разных стран, полученные нами ранее в ходе кластерного анализа популяций сортов нута из разных стран по изменчивости микросателлитных локусов.

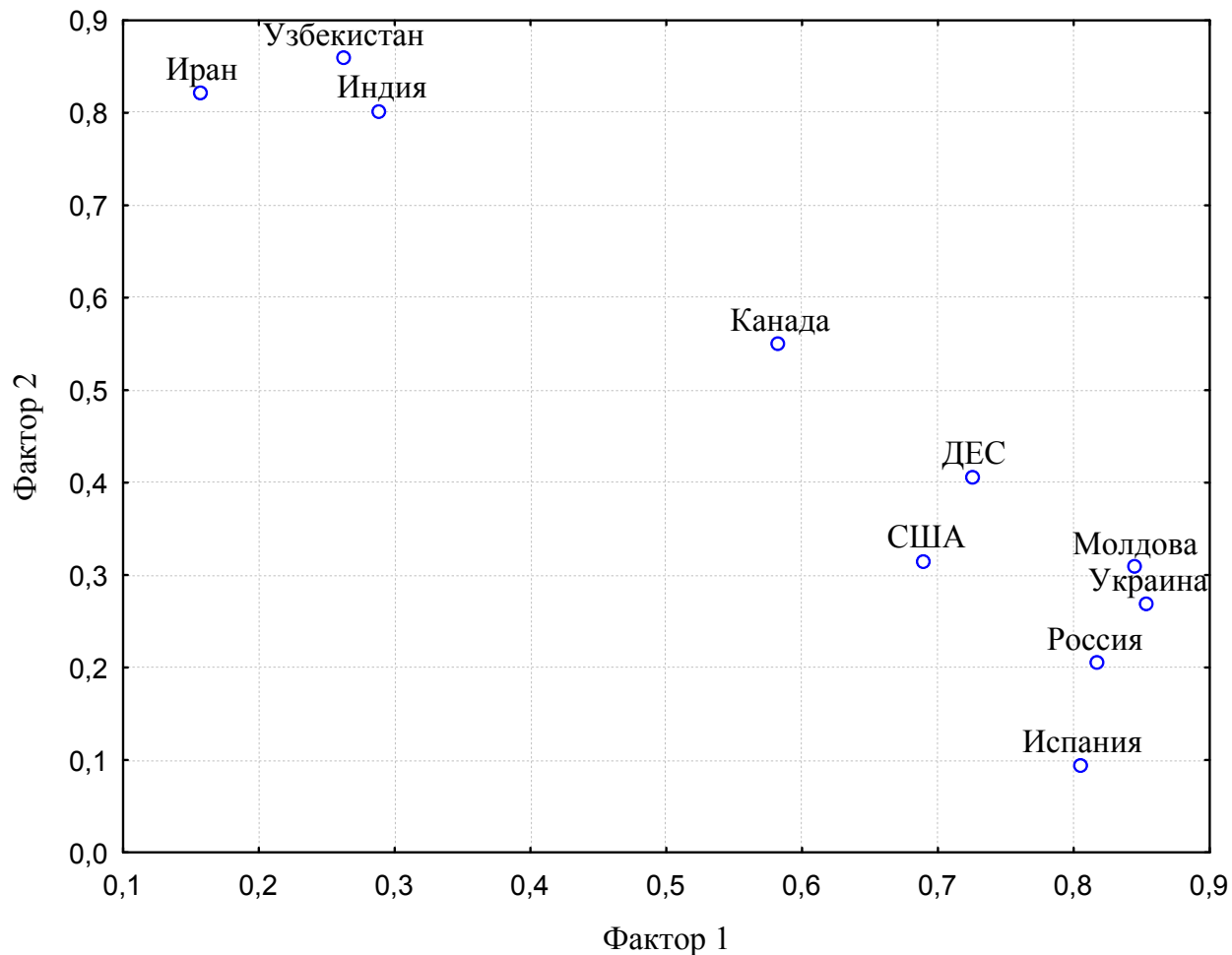


Рис. 1. Расположение выборок сортов нута из разных стран в двухфакторном пространстве, полученном методом Q-факторизации с варимакс-вращением

Список литературы

- Акинина Г.Е., Попов В.Н. Разнообразие микросателлитной ДНК в сортах нута селекции разных стран мира // Тезисы IV Межд. школы молодых ученых по молекулярной генетике «Геномика и биология клетки». – Москва-Звенигород, 2010. – С. 31–33. /Akinina G.Ye., Popov V.N. Raznoobraziye mikrosatellitnoy DNK v sortakh nuta seleksii raznykh stran mira // Tezisy IV Mezhd. shkoly molodykh uchenykh po molekulyarnoy genetike «Genomika i biologiya kletki». – Moskva-Zvenigorod, 2010. – S. 31–33./
- Кафанов А.И., Борисовец Е.Э., Волвенко И.В. О применении кластерного анализа в биогеографических классификациях // Журнал общей биологии. – 2004. – Т.65, №3. – С. 250–265. /Kafanov A.I., Borisovets Ye.E., Volvenko I.V. O primeneniі klasterного analiza v biogeograficheskikh klassifikatsiyakh // Zhurnal obshchey biologii. – 2004. – T.65, №3. – S. 250–265./
- Ким Дж.-О., Мьюллер У., Клекка У.Р. и др. Факторный, дискриминантный и кластерный анализ. – М.: Финансы и статистика, 1989. – 215с. /Kim Dzh.-O., M'yuller U., Klekka U.R. i dr. Faktorny, diskriminantnyy i klasterный analiz. – M.: Finansy i statistika, 1989. – 215s./
- Соколов В.М., Сичкар В.І. Стан науково-дослідних робіт з селекції зернобобових культур в Україні / Збірник наукових праць СГІ-НЦНС. – Одеса, 2010. – Вип.15 (55). – 183с. /Sokolov V.M., Sichkar V.I. Stan naukovo-doslidnykh robіt z seleksii zernobobovykh kul'tur v Ukraini / Zbirnyk naukovykh prats' SGI-NCNS. – Odesa, 2010. – Vyp.15 (55). – 183s./
- Чесноков Ю.В. Молекулярные маркеры и управление генетическими ресурсами растений / Идентифицированный генофонд растений и селекция. – СПб.: ВИР, 2005. – С. 240–250. /Chesnokov Yu.V. Molekulyarnyye markery i upravleniye geneticheskimi resursami rasteniy / Identitsirovanny genofond rasteniy i selektsiya. – SPb.: VIR, 2005. – S. 240–250./

Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E. et al. Current protocols in molecular biology. – New York: John Wiley & Sons, 1987. – P. 4.3.1–4.3.3.

Brody J.R., Calhoun E.S., Gallmeier E. et al. Ultra-fast high-resolution agarose electrophoresis of DNA and RNA using low-molarity conductive media // *BioTechniques*. – 2004. – Vol.37, №4. – P. 598–602.

Huttel B., Winter P., Weising K. et al. Sequence-tagged microsatellite site markers for chickpea (*Cicer arietinum* L.) // *Genome*. – 1999. – Vol.42. – P. 210–217.

Jomová K., Benková M., Kraic J. Enrichment of chickpea genetic resources collection monitored by microsatellites // *Czech J. Genet. Plant Breed.* – 2009. – Vol.45, №1. – P. 11–17.

Kalia R.K., Rai M.K., Kalia S. et al. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants // *Euphytica*. – 2011. – Vol.177. – P. 309–334.

Rozalia G.M. Q-Factor Analysis (Q-Methodology) as data analysis technique. [Electronic resource]. (<http://steconomice.uoradea.ro/anale/volume/2008/v4-management-marketing/159.pdf>)

Semagn K., Bjørnstad Å., Ndjiondjop M.N. An overview of molecular marker methods for plants // *African Journal of Biotechnology*. – 2006. – Vol.5, №25. – P. 2540–2568.

Sethy N., Edwards B., Bhatia S. Development of microsatellite markers and analysis of intraspecific genetic variability in chickpea (*Cicer arietinum* L.) // *Theor. Appl. Genet.* – 2006. – Vol.112. – P. 1416–1428.

Upadhyaya H., Dwivedi S., Baum M. et al. Genetic structure, diversity, and allelic richness in composite collection and reference set in chickpea (*Cicer arietinum* L.) // *BMC Plant Biology*. – 2008. – 8: 106.

Wiesemuller B., Rothe H. Q-Factor Analysis as a tool for phylogenetic studies of morphometric data // *Anthrop. Anz.* – 2006. – Vol.64, №3. – P. 345–353.

Представлено: Р.Л.Богуславський / Presented by: R.L.Boguslavsky

Рецензент: Л.О.Красильнікова / Reviewer: L.A.Krasil'nikova

Подано до редакції / Received: 22.04.2011.