

- and *Elymus* species (Triticeae: Gramineae) // Genome. 2009. Vol. 52. № 4. P. 391–400.
- 6 Sun G., Komatsuda T. Origin of the Y genome in *Elymus* and its relationship to other genomes in Triticeae based on evidence from elongation factor G (EF-G) gene sequences // Mol. Phylogenet Evol. 2010. Vol. 56. № 2. 727–733. doi:10.1016/j.ympev.2010.03.037.
- 7 Lei Y.-X., Liu J., Fan X., Sha L.-N., Wang Y., Kang H.-Y., Zhou Y.-H., Zhang H.-Q. Phylogeny and molecular evolution of the *DMC1* gene in the polyploid genus *Roegneria* and its affinitive genera (Poaceae: Triticeae) // Bot. J. Linnean Society. 2018. Vol. 186. P. 129–142.
- 8 Liu Q., Liu L., Ge S., Fu L., Bai S.-Q., Lu X., Wang Q., Chen W., Wang F., Wang L., Yan X., Lu B.-R. Endo-allopolyploidy of autopolyploids and recurrent hybridization — a possible mechanism to explain the unresolved Y-genome donor in polyploid *Elymus* species (Triticeae: Poaceae) // J. Syst. Evol. 2020. doi: 10.1111/jse.12659. (early on-line publication).
- 9 Цвелёв Н.Н., Пробатова Н.С. Злаки России / М. Товарищество научных изданий КМК. 2019. 646 с.
- 10 Агафонов А.В., Асбаганов С.В., Шабанова (Кобозева) Е.В., Морозов И.В., Бондарь А.А. Геномная конституция и дифференциация субгеномов эндемичных сибирских и дальневосточных видов рода *Elymus* (Poaceae) по данным секвенирования ядерного гена *waxy* // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019. Т. 23. № 7. С. 817–826. doi: 10.18699/VJ19.555.
- 11 Agafonov A.V., Shabanova E.V., Emtseva M.V., Asbaganov S.V., Morozov I.V., Bondar A.A., Dorogina O.V. Phylogenetic and taxonomic relationships between morphotypes related to *Elymus caninus* (Poaceae) based on sequence of a nuclear gene *GBSSI* (*waxy*) and sexual hybridization // J. Syst. Evol. 2023. doi: 10.1111/jse.13006 (early on-line publication).

DOI 10.18699/GPB2024-03

Молекулярный анализ козлятника восточного (*Galega orientalis* Lam.) с использованием SSR- и SRAP-маркеров

Антонов А.А. *, н.с.; Шамустакимова А.О., н.с.; Клименко И.А., к. с.-х. н., в.н.с.

Федеральный научный центр кормопроизводства и агроэкологии имени В.Р. Вильямса, МО, Лобня, Россия

*email: antonov4B@yandex.ru

*Представлены результаты исследований по оценке межсортового ДНК-полиморфизма козлятника восточного (*Galega orientalis* Lam.) с помощью комбинаций праймеров, разработанных к SSR- и SRAP-маркерам. Испытанная техника маркирования оказалась эффективной для установления межсортовых различий. Определены маркеры, выявляющие сортоспецифичные фрагменты ДНК. Полученные данные можно использовать для оценки генетического разнообразия, ДНК-идентификации, отбора генетически дивергентного материала для использования в селекции новых сортов козлятника восточного.*

Ключевые слова: козлятник восточный, ПЦР-анализ, полиморфизм ДНК, микросателлитные маркеры, SRAP-маркеры.

Molecular analysis of fodder galega (*Galega orientalis* Lam.) on the base of SSR and SRAP markers

*Antonov A.A. *, Shamustakimova A.O., Klimenko I.A.*

Federal Williams Research Center of Forage Production & Agroecology, Moscow region, Lobnya, Russia

**email: antonov4B@yandex.ru*

*The results of researches on evaluation the inter-varietal DNA polymorphism in fodder galega (*Galega orientalis* Lam.) using primer combinations, developed for SSR and SRAP markers, are presented in this study. The tested technique of marking had demonstrated the effectiveness for estimation the distinctions between varieties. Variety-specific DNA markers have been determined. The data obtained can be useful for genetic diversity assessment, for varieties DNA identification and selection of genetically divergent material for application in fodder galega breeding.*

Key words: fodder galega, PCR analysis, DNA polymorphism, microsatellite markers, SRAP markers.

В последние годы в производстве кормов для животных все больше используется козлятник восточный (*Galega orientalis* Lam.). Это связано с его высокой продуктивностью, кормовой ценностью, экологической пластичностью, долголетием и зимостойкостью. В посевах козлятник сохраняется 8–10 лет и более. Сбор зеленой массы в среднем за первые три года пользования составляет 30–35 т/га, семян – 300 кг/га, содержание сырого протеина может достигать 25–30 %. Козлятник, как и другие бобовые травы, обладает способностью обогащать почву биологическим азотом и улучшать структуру пахотного слоя [1, 2].

По состоянию на 2024 год в Госсортреестре РФ зарегистрировано 17 высокопродуктивных сортов козлятника восточного. Однако явно ощущим недостаток информации, связанной с изучением генетических особенностей этой перспективной культуры с использованием современных методов ДНК-анализа, что необходимо для сохранения, рационального использования имеющихся ресурсов и создания новых сортов с ценными биологическими и кормовыми свойствами.

Цель наших исследований заключалась в оценке межсортового ДНК-полиморфизма козлятника восточного с применением комбинаций из специфичных (SSR – *simple sequence repeat*) и произвольных (SRAP – *sequence related amplified polymorphism*) маркеров.

Материалы и методы

Семена 9 отечественных сортов козлятника восточного – Вест, Гале, Кривич, Юбиляр, Талисман, Ялгинский, Еля-Ты, Горноалтайский 87, Тюменский – были получены в ЦКП «Биологические коллекции кормовых растений»

(ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса») и из коллекции генофонда ВИР им. Н.И. Вавилова. Геномную ДНК для анализа выделяли из «балк-образцов» – суммарных навесок растительной ткани 30 проростков каждого сорта – с помощью модифицированного SDS-метода [3]. Финальная концентрация растворов ДНК в ПЦР составляла 30 нг/мкл.

Для изучения межсортовой генетической изменчивости использовали 8 комбинаций, составленных из SSR- и SRAP-маркеров; амплификация осуществлялась в соответствии с условиями, предложенными в работе Анежа с соавторами [4]. Статистическую обработку провели с помощью программ Image Lab, PopGene [5] и надстройки MS Excel «GenAlex». Значения индекса информативности праймера (PIC) вычисляли по специальной формуле [6].

Результаты и обсуждение

В настоящее время для молекулярно-генетического анализа разных видов сельскохозяйственных культур успешно применяют сочетания праймеров, разработанных к различным системам маркеров (REMAP-, TRAP-, AP-SRAP-техники). Такой подход оказался достаточно эффективным для малоизученных таксономических групп, а также полезен, как источник локус-специфичных маркеров при работе с близкородственным материалом, характеризующимся невысоким уровнем ДНК-полиморфизма. Основные области применения: изучение генетического разнообразия, филогенетические исследования, маркирование видов, сортов и форм [7–9].

В нашем исследовании межсортовой ДНК-полиморфизм козлятника восточного изучали с помощью комбинирования микросателлитных (SSR) маркеров, разработанных для анализа структуры генома клевера лугового и размещенных в базе данных Red Clover Marker Database, и SRAP-маркеров, предложенных в работе Li G. и Quiros C.F. [10, 11].

По результатам анализа выявлено 3 информативные комбинации (37,5 %), с которыми получены воспроизводимые полиморфные ПЦР-продукты (табл. 1).

В общей сложности выявлено 74 ампликона размером от 131 до 883 пар нуклеотидов. Из них полиморфными оказались 40 (54,1 %). В среднем с каждой комбинацией праймеров было получено 24,7 полос спектра на один образец ДНК. Процент полиморфизма составил в среднем 48,3. Обнаружены и сортоспецифичные продукты амплификации. Так, с комбинацией праймеров RCS1307(F)–EM5 выявлены уникальные фрагменты ДНК для сорта Еля-Ты размером 131 и 323 п.н. Для этого же сорта с ME1–RCS1307(R) получены ампликоны 352, 477, 600, 883 п.н., а для сортов Юбиляр и Еля-Ты – размером 326 и 489 п.н. соответственно с сочетанием праймеров ME3–RCS1307(R).

Таблица 1 – Информативные комбинации SSR- и SRAP-маркеров для анализа генетического полиморфизма между сортами козлятника восточного

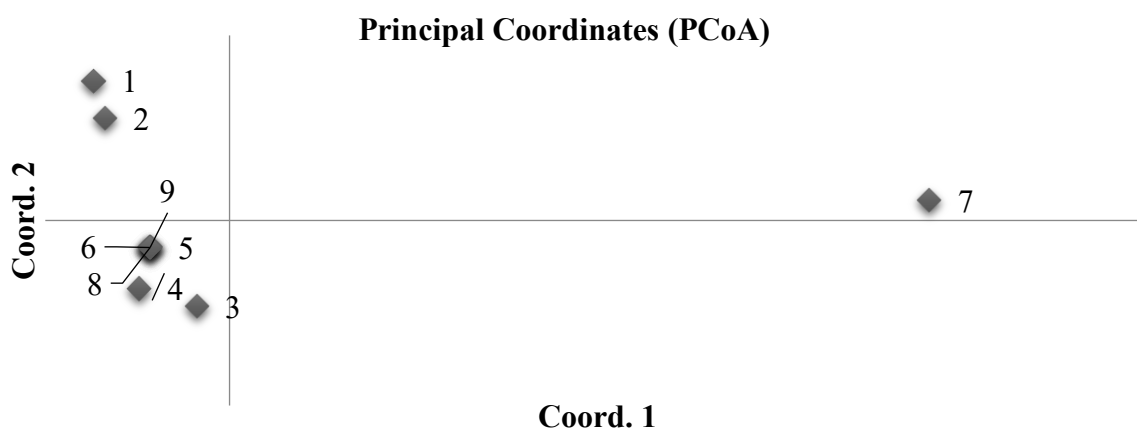
Комбинация мар- керов	Последовательность нуклеотидов (п.н.)	Литературный источник
RCS1307(F)–EM5	CCCTTCTAGCCTAGCAACCA / GACTGCGTACGAATTAAC	[10/11]
ME1–RCS1307(R)	TGAGTCCAAACCGGA / GCGGAAAAGATTCAGCCTAA	[11/10]
ME3–RCS1307(R)	TGAGTCCAAACCGGAAT / GCGGAAAAGATTCAGCCTAA	[11/10]

На основании результатов анализа определены показатели информативности используемых ДНК-маркеров (табл. 2). Эффективное число аллелей в среднем составило 1,28 и колебалось от 1,25 (ME1–RCS1307(R)) до 1,33 (с RCS1307(F)–EM5). Среднее значение индекса разнообразия по Нею – 0,21 с вариациями в диапазоне от 0,18 (ME3–RCS1307(R)) до 0,4 (RCS1307(F)–EM5). Величина индекса Шеннона в среднем равнялась 0,35. Значения данных показателей свидетельствуют о невысоком уровне межсортного ДНК-полиморфизма, что, вероятно, обусловлено использованием близкородственного исходного материала в различных учреждениях России. Однако значения PIC оказались достаточно высоки (в среднем 0,71). Это указывает на эффективность применяемой техники маркирования для изучения генетического полиморфизма козлятника восточного.

Таблица 2 – Показатели эффективности комбинаций праймеров для анализа козлятника восточного

№	Маркер	Эффективное число аллелей (Ne)	Индекс разнообразия по Нею (He)	Индекс Шеннона (I)	PIC
1	RCS1307(F) –EM5	1,33	0,24	0,40	0,70
2	ME1–RCS1307(R)	1,25	0,20	0,35	0,77
3	ME3–RCS1307(R)	1,26	0,18	0,29	0,67
Среднее	-	1,28	0,21	0,35	0,71

Применение метода PCoA-анализа для изучаемого материала показало (см. рисунок), что наиболее вероятным оказывается распределение сортов по трем кластерам: обособленно расположился сорт Еля-Ты, в общей группе – все остальные, среди которых выделялись сорта Юбилар и Талисман селекции Псковского НИИСХ-филиала ФНЦ лубяных культур. Значения первых двух координат составили 65 и 21 % соответственно. Можно предположить, что анализируемые сорта (за исключением Еля-Ты) имеют общее происхождение.



Результаты PCoA-анализа сортов козлятника восточного.
Сорта: 1 – Юбиляр, 2 – Талисман, 3 – Кривич, 4 – Гале, 5 – Вест, 6 – Ялгинский,
7 – Еля-Ты, 8 – Тюменский, 9 – Горноалтайский 87

По результатам проведенного исследования можно заключить, что экспериментальная техника, основанная на использовании комбинации систем SSR- и SRAP-маркеров, достаточно эффективна для анализа генома козлятника восточного. Она позволяет выявить генетический полиморфизм и степень родства селекционных достижений, в перспективе – повысить точность отбора родительских форм для скрещивания, а также служить для маркирования хозяйственно ценных признаков. Комбинации маркеров RCS1307(F)–EM5, ME1–RCS1307(R) и ME3–RCS1307(R) можно использовать для идентификации сортов Еля-Ты и Юбиляр. Однако для повышения дифференцирующего потенциала данной техники маркирования необходимо расширение выборки анализируемых образцов и комбинаций, используемых праймеров.

Список литературы

- 1 Бушуева В.И., Тарануха Г.И. Галега восточная. Минск: Экоперспектива, 2008. 204 с.
- 2 Золотарев В.Н., Коровина В.Л. Сорт козлятника восточного (*Galega orientalis* Lam.) с маркерным признаком // Адаптивное кормопроизводство. 2021. № 1. С. 6–14.
- 3 Идентификация и паспортизация сортов кормовых трав (клевера лугового, люцерны изменчивой, посевной и хмелевидной) на основе ДНК-маркеров: методические рекомендации // И.А. Клименко [др.]. М.: ООО «Угреша Т», 2020. 35 с.
- 4 Aneja B. et al. Sequence related amplified polymorphism (SRAP) analysis for genetic diversity and micronutrient content among gene pools in mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] // Physiology and molecular biology of plants. 2013. V. 19. № 3. P. 399–407.
- 5 Yeh F. C. et al. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis // Molecular biology and biotechnology centre, University of Alberta, Canada. 1997. V. 10. P. 295–301.
- 6 Чесноков Ю.В., Артемьева А.М. Оценка меры информационного полиморфизма генетического разнообразия // Сельскохозяйственная биология. 2015. № 5. С. 571–578.
- 7 Kalendar R., Schulman A.H. Transposon-based tagging: IRAP, REMAP, and iPBS // Molecular plant taxonomy: methods and protocols. 2014. V. 1115. № 12. P. 233–255.
- 8 Hu J. et al. Application of the TRAP technique to lettuce (*Lactuca sativa* L.) genotyping // Euphytica. 2005. V. 144. P. 225–235.

- 9 Zhang X. et al. Arbitrarily primed sequence-related amplified polymorphism (AP-SRAP) // African Journal of Biotechnology. 2013. V. 12. № 29. P. 4588–4593.
- 10 Sato S. et al. Comprehensive structural analysis of the genome of red clover (*Trifolium pratense* L.) // DNA research. 2005. V. 12. № 5. P. 301–364.
- 11 Li G., Quiros C.F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica // Theoretical and applied genetics. 2001. V. 103. P. 455–461.

DOI 10.18699/GPB2024-04

Влияние регуляторов роста на корнеобразование ежевики *in vitro*

*Апарина В.А.**, м.н.с.; *Потешкина А.А.*, м.н.с.; *Колошина К.А.*, н.с.;
Пискарев В.В., к.с.-х. н., зав. лаб.

СибНИИРС – филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия

**email: aparina.viktoriya@yandex.ru*

*Исследование проведено с целью оптимизации состава питательной среды на этапе укоренения для оптимального развития микрорастений ежевики. Объектом исследования служил сорт ежевики Натчез. Экспланты культивировали *in vitro* на модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга. Для стимуляции ризогенеза были использованы регуляторы роста ИУК и ИМК в концентрации 1 мл/л. Экспланты ежевики сорта Натчез при выращивании на среде MS, дополненной ИМК, формируют крепкую систему придаточных и боковых корней, в сравнении с применением ИУК в такой же концентрации.*

*Ключевые слова: ежевика, *in vitro*, MS, ризогенез, ИМК.*

The influence of growth regulators on blackberry root formation *in vitro*

*Aparina V.**, junior researcher, *Poteshkina A.*, junior researcher, *Koloshina K.*, research fellow, *Piskarev V.*, head of laboratory

SibRIPP&B – Branch of ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia

**email: aparina.viktoriya@yandex.ru*

*The study was conducted in order to optimize the composition of the nutrient medium at the rooting stage for the optimal development of blackberry microplants. The object of the study was the Natchez blackberry variety. Explants were cultured *in vitro* on a modified Murashige and Skuga nutrient medium. Growth regulators IAA and IBA at a concentration of 1 ml/l were used to stimulate rhizogenesis. Natchez blackberry explants, when grown on MS medium supplemented with IBA, form a strong system of adventitious and lateral roots, in comparison with the use of IBA in the same concentration.*

*Keywords: blackberry, *in vitro*, MS, rhizogenesis, IBA.*