

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«РОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
МСХА имени К.А. ТИМИРЯЗЕВА»
(ФГБОУ ВО РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева)

На правах рукописи

МАВЛЮТОВ ЮЛИАН МУРАТОВИЧ

**РАЗРАБОТКА АДАПТИРОВАННЫХ МЕТОДОВ
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДЛЯ
ИДЕНТИФИКАЦИИ И ДНК-ПАСПОРТИЗАЦИИ СОРТОВ
МНОГОЛЕТНИХ ЗЛАКОВЫХ ТРАВ**

4.1.2 Селекция, семеноводство и биотехнология растений

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель –
Елена Александровна Вертикова,
доктор сельскохозяйственных наук,
профессор

Москва – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1. Ботаническая, биологическая и хозяйственная характеристика злаковых трав	11
1.1.1. Основные направления селекции кормовых злаковых трав	12
1.1.2. Райграс пастбищный (<i>Lolium perenne</i> L.)	14
1.1.3. Райграс однолетний (<i>Lolium multiflorum</i> Lam.)	16
1.1.4. Фестулолиум (× <i>Festulolium</i> F. Aschers. et Graebn.)	17
1.2. Использование ДНК-маркеров в селекционно-генетических исследованиях многолетних злаковых трав	19
1.2.1. Методы, основанные на блот-гибридизации, ДНК-чип технологиях и секвенировании.....	21
1.2.2. Методы, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР)	24
1.3. Изучение генетического полиморфизма злаковых трав для использования в практической селекции и семеноводстве	30
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	39
2.1. Объекты исследования	39
2.2. Микросателлитные (SSR) маркеры для анализа сортов многолетних злаковых трав.....	42
2.3. SCoT-маркеры для анализа сортов многолетних злаковых трав .	45
2.4. Методы оценки внутрисортного ДНК-полиморфизма многолетних злаковых трав.....	46
2.5. Методы статистической обработки данных.....	46
2.6. Методы валидации полученных данных	47
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	49
3.1. Оптимизация способов выделения ДНК	49
3.2. Модификация условий ПЦР для оценки межсортового и внутрисортного полиморфизма	56

3.3. Анализ сортов райграса пастбищного с использованием SSR-маркеров	61
3.3.1. Отбор информативных маркеров для дифференциации сортов райграса пастбищного	61
3.3.2. Анализ внутрисортного ДНК-полиморфизма сортов райграса пастбищного	65
3.3.3. Изучение особенностей генетической структуры коллекции сортов райграса пастбищного по результатам анализа с использованием SSR-маркеров	70
3.4. Анализ сортов райграса пастбищного с использованием SCoT-маркеров	74
3.4.1. Отбор информативных маркеров для дифференциации сортов райграса пастбищного	74
3.4.2. Изучение особенностей генетической структуры сортов райграса пастбищного по результатам анализа с использованием SCoT-маркеров.....	76
3.5. PCoA-анализ сортов райграса пастбищного на основе данных, полученных при генотипировании с использованием SSR- и SCoT-маркеров	78
3.6. Верификация результатов анализа, полученных с использованием SSR- и SCoT-маркеров	80
3.7. Молекулярно-генетические формулы сортов райграса пастбищного (<i>Lolium perenne</i> L.), разработанные на основе данных, полученных с использованием SSR- и SCoT-маркеров	86
3.8. Анализ сортов райграса однолетнего с использованием SSR-маркеров	91
3.8.1. Отбор информативных маркеров для дифференциации сортов райграса однолетнего	91
3.8.2. Изучение особенностей генетической структуры сортов райграса однолетнего по результатам анализа с использованием SSR-локусов.....	94
3.9. Анализ сортов райграса однолетнего с использованием SCoT-маркеров	96
3.9.1. Отбор информативных маркеров для дифференциации сортов райграса однолетнего	96
3.9.2. Изучение особенностей генетической структуры сортов райграса однолетнего по результатам анализа с использованием SCoT-маркеров.....	98

3.10. РСоА-анализ по результатам генотипирования сортов райграса однолетнего с использованием SSR- и SCoT-маркеров.....	99
3.11. Составление молекулярно-генетических формул для сортов райграса однолетнего по результатам анализа с использованием SSR- и SCoT-маркеров	101
3.12. Анализ сортов фестулолиума с использованием SSR-маркеров	103
3.12.1. Отбор информативных маркеров для дифференциации сортов фестулолиума	103
3.12.2. Анализ внутрисортного ДНК-полиморфизма сортов фестулолиума	105
3.12.3. Изучение особенностей генетической структуры сортов фестулолиума по результатам анализа с использованием SSR-маркеров	109
3.13. Анализ сортов фестулолиума с использованием SCoT-маркеров	110
3.13.1. Отбор информативных маркеров для дифференциации сортов фестулолиума	110
3.14. Молекулярно-генетические формулы сортов фестулолиума, разработанные на основе данных, полученных с использованием SSR- и SCoT-маркеров	112
3.15. Разработка молекулярно-генетических паспортов для сортов райграса и фестулолиума	114
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	116
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ ...	118
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	119
ПРИЛОЖЕНИЯ	119

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Многолетние злаковые травы являются важнейшим компонентом сенокосов и пастбищ. Широкое использование данных культур обусловлено их ценными биологическими особенностями: высокой пластичностью, долголетием, способностью к вегетативному возобновлению, зимостойкостью, и устойчивостью к вредителям и болезням (Косолапов и др., 2012). Злаковые травы служат основой для получения дешевого и разнообразного корма в рационах жвачных животных (зелёная трава, сено, силос, сенаж). Некоторые виды применяют для создания газонов различного типа и рекультивации деградированных земель. Помимо высокой хозяйственной ценности, злаковые травы имеют существенное экологическое значение, поскольку обогащают почву органическими веществами, предотвращают эрозийные процессы, а также способствуют оздоровлению окружающей среды (Сапрыкин и др., 2020; Костенко и др., 2016; Асямов и др., 2016).

Определяющее влияние на продуктивность и устойчивость кормовых агроэкосистем оказывают культура и сорт (Костенко и др., 2016). В настоящее время в Государственном реестре селекционных достижений, допущенных к использованию на территории Российской Федерации, находится более 400 сортов злаковых трав, представленных 47 видами (Государственный реестр селекционных достижений..., 2023). На основе наиболее распространенных культур в России создана система экологически и географически дифференцированных сортов злаковых трав, обладающих высокой продуктивностью и устойчивостью к экологическим стрессам (Косолапов и др., 2013).

До настоящего времени генетические особенности большинства российских сортов злаковых трав не изучались с использованием современных молекулярных методов. Их дифференциация и идентификация

основывается на морфологических различиях. Такой подход вызывает определенные трудности, обусловленные большой вариабельностью признаков злаковых трав, сложностью генетической системы и высокой степенью пластичности при взаимодействии генотипа и условий окружающей среды. Морфологически схожие сорта многолетних злаковых трав могут отличаться высокой степенью генетической гетерогенности из-за их перекрестноопыляемой природы и самонесовместимости (Сапрыкин и др., 2020).

С целью повышения эффективности сортовой идентификации сельскохозяйственных культур в последние годы успешно применяются молекулярные ДНК-маркеры. Они выгодно отличаются от морфологических признаков возможностью автоматизации и осуществления анализа вне зависимости от фазы развития растений и условий окружающей среды (Хлесткина, 2015; Клименко и др., 2022). Сортовая идентификация с использованием ДНК-маркеров основана на анализе высокополиморфных областей генома и последующем документировании результатов оценки аллельного состава (Малышев и др., 2006). Полученные в ходе тестирования данные могут использоваться для определения уникальности и однородности сорта, подбора родительских форм для скрещиваний, контроля гибридизации и дифференциации исходного материала.

Для изучения полиморфизма между видами и сортами злаковых трав успешно применяются различные типы ДНК-маркеров. Одними из наиболее эффективных являются микросателлитные локусы (*SSR - Simple Sequence Repeats*), основанные на анализе простых повторяющихся повторов (Сухарева, Кулуев, 2018). С их помощью изучали полиморфизм образцов райграса однолетнего (Nie et al., 2019), райграса пастбищного (Liu et al., 2018), ежи сборной (Yan et al., 2016). Помимо микросателлитов для изучения генетических особенностей злаковых трав активно используется система *SCoT (Start Codon Targeted Polymorphism)*, выявляющих вариабельность консервативных последовательностей, фланкирующих стартовый кодон ATG

(Collard, Mackill, 2009). Данные маркеры успешно применяли для анализа целого ряда злаковых культур (Safari et al. 2019; Kondratskaya et al., 2019; Tabaripour, Keshavarzi, 2021).

Внедрение методов молекулярного маркирования в практику анализа ценных отечественных сортов злаковых трав обеспечит их сохранность, значительно повысит эффективность регистрации и авторской защиты селекционных достижений.

Цели и задачи исследования

Цель настоящей работы заключалась в разработке оптимизированных методов ДНК-анализа для идентификации и генетической паспортизации сортов многолетних злаковых трав с использованием систем SSR и SCoT-маркеров на основе ПЦР технологии.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Разработка элементов технологии генотипирования для идентификации сортов многолетних злаковых трав, включая выбор метода экстракции ДНК, оптимизацию условий амплификации с применением SSR-локусов и SCoT-маркеров, а также определение эффективного способа детекции и верификации результатов анализа.
2. Определение набора информативных SSR- и SCoT-маркеров для сортовой дифференциации образцов райграса пастбищного (*Lolium perenne* L.), райграса однолетнего (*Lolium multiflorum* Lam.) и фестулолиума (*Festulolium* F. Aschers. et Graebn).
3. Анализ межсортового и внутрисортового ДНК-полиморфизма сортов многолетних злаковых трав с помощью молекулярных маркерных систем.
4. Изучение особенностей генетической структуры и филогенетических связей в коллекции сортов райграса и фестулолиума с использованием ДНК-маркеров.
5. Составление молекулярно-генетических формул сортов многолетних злаковых трав на основе систем SSR- и SCoT-маркирования.

6. Создание генетических паспортов ряда сортов многолетних злаковых трав.

Научная новизна работы

С учетом высокой внутрипопуляционной гетерогенности злаковых трав впервые предложен метод генетической идентификации сортов райграса пастбищного, райграса однолетнего и фестулолиума с использованием репрезентативной навески растительной ткани из 30 генотипов от каждого образца.

Установлен набор ДНК-идентификационных SSR- и SCoT-маркеров, пригодных для определения сортовой принадлежности.

На основе анализа межсортового и внутрисортового ДНК-полиморфизма сортов райграса и фестулолиума установлены филогенетические взаимоотношения образцов и изучены особенности генетической структуры исследуемых коллекций.

Составлены ДНК-паспорта отечественных сортов райграса и фестулолиума, содержащие молекулярно-генетическую формулу, а также информацию о происхождении, основных морфобиологических свойствах и регионах возделывания.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработка адаптированных методов генотипирования для изучения генетического разнообразия и ДНК-идентификации многолетних злаковых трав имеет большое прикладное и теоретическое значение. Эти исследования позволяют получить новую информацию о закономерностях изменчивости в конкретной популяции, сорте, линии, генотипе в процессе репродукции, обогащают знаниями в области филогенетики и структуры геномов.

Использование молекулярно-генетических методов повышает эффективность авторской защиты селекционных достижений, сокращает затраты на регистрацию новых сортов при оценке их соответствия критериям отличимости, однородности и стабильности (ООС-тест). Данные, полученные в ходе анализа образцов злаковых трав, имеют практическую значимость для

селекционного процесса и находят применение для характеристики исходного материала, подбора родительских форм, контроля гибридизации и обнаружения хозяйственно ценных признаков.

Положения, выносимые на защиту

- Использование SSR- и SCoT-маркеров для анализа суммарных навесок растительной ткани («балк-образцов»), состоящих из 30 генотипов от каждого образца злаковых трав, позволяет повысить эффективность дифференциации и сортовой идентификации высокогетерогенных популяций злаковых трав.
- Изучена генетическая структура и филогенетические взаимоотношения в анализируемых коллекциях злаковых трав. По результатам анализа молекулярной вариации (AMOVA) установлена высокая внутрисортовая генетическая изменчивость, превышающая в 4 раза различия между сортами.
- На основе индивидуальных молекулярно-генетических формул составлены генетические паспорта отечественных сортов райграса пастбищного, райграса однолетнего и фестулолиума, которые могут использоваться для ДНК-идентификации, контроля сортовой чистоты и соответствия семенного материала.

Апробация результатов работы

Результаты исследований были представлены и одобрены на конференциях различного уровня: Третья Международная научно-практическая конференция «Клеточная биология и биотехнология растений», г. Минск, Беларусь, 24-27 мая 2022 г., Вторая Международная научно-практическая конференция «Геномика и современные биотехнологии в размножении, селекции и сохранении растений», г. Ялта, 13-15 октября 2021 г., Вторая всероссийская с международным участием научная конференция «Экономическое и фитосанитарное обоснование интродукции кормовых растений», Московская область, пос. Большие Вяземы, 17-20 июня 2021 г.,

Всероссийская научная конференция с международным участием «Многофункциональное адаптивное кормопроизводство», Московская область, г. Лобня, 20-23 июня 2023 г.

Публикации результатов исследований

Результаты диссертации опубликованы в 12 научных работах, из них 2 – в журналах, рекомендованных ВАК РФ, 4 – в журналах, индексируемых в Scopus/WoS, 5 – в других научных изданиях, а также получено свидетельство о государственной регистрации «Базы данных нуклеотидных последовательностей, идентифицирующих сорта кормовых культур» (№ 2023622067 от 22 июня 2023 г.).

Личный вклад автора

Результаты исследований получены автором лично и в совместной работе с сотрудниками лаборатории молекулярно-генетических исследований кормовых культур Федерального научного центра кормопроизводства и агроэкологии имени В.Р. Вильямса (ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса») по выполнению тематики плана государственного задания (FGGW-2022-0007) «Использовать адаптированные методы молекулярно-генетического анализа кормовых культур для создания новых форм, сортов и гибридов с улучшенными хозяйственно ценными признаками».

Структура и объём диссертационной работы

Диссертационная работа изложена на 142 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, списка литературы и приложений. Работа содержит 29 таблиц и 33 рисунка. Список использованной литературы включает 152 источника, в том числе 78 – на иностранном языке.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Ботаническая, биологическая и хозяйственная характеристика злаковых трав

Многолетние злаковые травы являются основными растениями в природных луговых фитоценозах средней полосы, севера и степной зоны России (Костенко и др., 2016). Они играют важную роль в развитии животноводства и увеличении производства животноводческой продукции, в реализации программ ландшафтного земледелия и рационального использования естественных ресурсов планеты. Широкое распространение многолетних злаковых трав обусловлено их ценными биологическими свойствами – экологической пластичностью, высокой урожайностью, долголетием, зимостойкостью и способностью к вегетативному возобновлению (Сапрыкин и др., 2020). Правильный подбор сортов и надлежащий уход за ними позволяет получать дешевый, разнообразный, полноценный корм (зеленый корм, сено, силос, белково-витаминная мука) (Косолапов и др., 2012). Более 80 % валового урожая лугопастбищных хозяйств в России обеспечивают злаковые травы, являясь основой для большинства заготавливаемых грубых кормов (Косолапов и др., 2013). Многие виды многолетних злаковых трав при посеве в чистом виде или в травосмеси также применяются для борьбы с процессами опустынивания и защиты почв от разнообразных эрозий (Костенко и др., 2016). Кроме кормового значения ряд культур (овсяница красная, мятлик луговой, райграс пастбищный и др.) активно используется для создания газонов, при залужении откосов дорог, рекультивации деградированных земель (Асямов и др., 2016; Сапрыки и др., 2020).

Наличие у многих ботанических видов злаковых трав большого количества форм и подвидов позволяет адаптировать их к произрастанию в условиях конкретного региона, вывести сорта одного вида, но разного типа использования (Костенко и др., 2016). Так, для полевого травосеяния

предпочтительны тимофеевка луговая, кострец безостый, овсяница луговая, овсяница тростниковая, ежа сборная, райграс пастбищный, райграс многоукосный, житняк гребневидный, житняк узкоколосый, ломкоколосник ситниковый, пырей бескорневищный, райграс высокий. Для лугового травосеяния – все перечисленные виды, а также овсяница красная, мятлик луговой, мятлик болотный, лисохвост луговой, лисохвост вздутый, полевица гигантская, полевица побегоносная, полевица тонкая, пырей сизый, овсяница восточная, бекмания обыкновенная, двукисточник тростниковый (Косолапов др., 2015)

К наиболее распространенным в России злаковым травам относится кострец безостый, тимофеевка луговая, овсяница луговая, райграс пастбищный, фестулолиум, а также ежа сборная. Второстепенными видами принято считать лисохвост луговой, житняки, пырейники, пырей ползучий, пырей бескорневищный, мятлик луговой, двукисточник тростниковый, вейники, овсяница тростниковая, полевицы (Косолапов и др., 2013)

Всего в Государственном реестре селекционных достижений, допущенных к использованию на территории Российской Федерации, находится более 400 сортов многолетних злаковых трав, представленных 47 видами («Государственный реестр селекционных достижений...», 2023).

1.1.1. Основные направления селекции кормовых злаковых трав

Целенаправленное развитие луговодства и полевого кормопроизводства в стране обусловило усиление селекционной работы по выведению сортов многоукосного и пастбищного типа, обладающих комплексом хозяйственно-ценных признаков (Новоселова и др., 2005). Направления селекции многолетних злаковых трав определяется как общими, так и специфическими задачами, определенными разнообразием почвенно-климатических условий и характером использования травостоя. Зимостойкие, раннеспелые сорта с быстрым отрастанием весной и после укосов, а также обладающие высоким

урожаем кормовой массы в течение двух-трех лет, устойчивой по годам урожайностью семян и пригодные для ранней подкормки, особенно ценны для полевого травосеяния. В луговом травосеянии используются сорта, обладающие долголетием и высокой конкурентной способностью при длительном пастбищном и сенокосном использовании в травосмеси на суходольных и пойменных низинных землях, а также на осушенных торфяниках. Кроме того, данные сорта должны обладать устойчивостью к вытаптыванию и стравливанию, быстрым темпом отрастания, различаться по скороспелости и ритму роста (Костенко и др., 2016; Косолапов и др., 2012). Главными направлениями селекции многолетних злаковых трав являются увеличение кормовой и семенной продуктивности, повышение зимостойкости и долголетия растений, создание экологически дифференцированных сортов, устойчивых к патогенам, экологическим стрессам (Косолапов и др., 2013; Samroux et al., 2011; Скалозуб, Клочкова, 2021).

Селекция многолетних злаковых трав, в основном, базируется на различных типах искусственного отбора (экотипический, массовый позитивный, групповой биотипический, индивидуально-семейственный). (Сапрыкин и др., 2020). Однако также широко используется метод гибридизации, гетерозиса, создание синтетических и сложногобридных популяций, индуцированный мутагенез и экспериментальная полиплоидия (Косолапов и др., 2012; Уразова, Литвинчук, 2017; Косолапов, Пилипко, 2018; Boller et al., 2010).

Использование наиболее подходящего коллекционного материала в качестве исходного позволяет быстро создавать специализированные сорта. Основным источником для селекции многолетних злаковых трав служат отечественные и зарубежные селекционные и местные сорта, а также дикорастущие формы (Пыльнев и др., 2005; Косолапов и др., 2018) (рис. 1).

Ботанический вид	Сорт	Регион допуска	Назначение сорта	Использованные генетические ресурсы и методы	Оригинатор
Мятлик луговой	Дар	все	газоны	две дикорастущих формы, два сорта, сложно гибридная популяция	ВНИИ кормов
Овсяница красная	Сигма	все	газонно-кормовой	четыре дикорастущих формы из Европы и Поволжья	ВНИИ кормов
	Диана	все	газонно-кормовой	дикорастущие формы из Центрально-Черноземной зоны. поликросс	Воронежская опытная станция, ВНИИ кормов
	Дипа	все	газоны	сопряженная растительно-микробная селекция	ВНИИ кормов
Лисохвост луговой	ВИК 15	все	сенокосы, пастбища	два образца из московской и ивановской областей	ВНИИ кормов
	Кварта	все	газоны, пастбища	долголетний отбор по скорости отрастания	ВНИИ кормов
Овсяница луговая	Бинара	все	газоны	тетраплоид, из самоопыленной линии	ВНИИ кормов
	Карат	все	газонно-кормовой	тетраплоид, гибридизация дикорастущих местных форм и российских сортов	ВНИИ кормов
Райграс пастбищный	Феникс	северо-западный и центральный	сенокосы	сгп на основе долголетних и зимостойких форм	ВНИИ кормов
	ВИК 22	все	газоны	диплоид на основе тонкостебельных форм	ВНИИ кормов
	Воронежский	все	газоны пастбища	тетраплоид на основе жаростойких форм	Воронежская опытная станция
	Агат	северо-западный, центрально-черноземный	сенокосы	тетраплоид из местных диплоидов и образцов ВИР	ВНИИ кормов
Двукосточник тростниковый	Белрос 76	Республика Беларусь	сенокосный	многократный отбор из местных форм Московской области	РУП ИЗиС НАН Республики Беларусь
	Чара	все	газоны, пастбища	гибридизация сорта ВИК 2 и образцов из коллекций ВИР	ВНИИ кормов
	Моршанская 97	все	газоны, сенокосы	многократный отбор и гибридизация среди форм из Тамбовской области	Моршанская опытная станция
Фестулолиум	Альба	все	газоны, пастбища	отбор по жаростойкости среди форм из ВНИИ кормов	Воронежская опытная станция
	Аллегро	все	сенокосы	гибрид райграса многоукосного и овсяницы луговой	ВНИИ кормов
	Фест	все	сенокосы	гибрид райграса многоукосного и овсяницы тростниковой	ВНИИ кормов
Кострец безостый	Усходни	Республика Беларусь	сенокосы	отбор среди гибридов из ВНИИ кормов	РУП ИЗиС НАН Республики Беларусь
	Удалец	проходит ГСИ	сенокосы	отбор среди гибридов из ВНИИ кормов	Пензенский НИИСХ
Тимофеевка луговая	ВИК 911	проходит ГСИ	сенокосы	отбор среди гибридов между дикими формами	ВНИИ кормов

Рисунок 1 – Результаты селекции многолетних злаковых трав в 2001-2018 гг. в ФНЦ «ВНИИ кормов имени В.Р. Вильямса» и в организациях-партнерах (Косолапов и др., 2018).

1.1.2. Райграс пастбищный (*Lolium perenne* L.)

Пастбищный или многолетний райграс (*Lolium perenne* L.) является низовым рыхлокустовым многолетним злаком, хромосомный набор $2n=14$, однако, распространены и улучшенные тетраплоидные сорта (Золотарев и др., 2009; Guan et al., 2017). *Lolium perenne* L. относится к перекрестноопыляемым видам с высокой степенью самонесовместимости, контролируемой 2-3 локусами, имеющими множество аллелей (Huff, 1997; Guthridge et al., 2001; Костенко и др., 2016). К ценным хозяйственным свойствам данной культуры относится высокая урожайность сухого вещества (до 11 т/га), семян (до 0,8 т/га) и хорошая отавность. Кроме того, райграс пастбищный отличается высоким содержанием протеина и водорастворимых углеводов в сухом веществе. Также он обладает повышенной устойчивостью к вытаптыванию, уплотнению почвы и интенсивному стравливанию. Однако из-за неглубокого

залегания узла кущения от поверхности почвы райграсс пастбищный имеет недостаточную зимостойкость. Помимо этого, сообщается о его невысокой устойчивости к засухе (Золотарев и др., 2009).

Многолетний райграсс широко используют при создании культурных пастбищ и сенокосов в северо-западных, западных и центральных регионах России. Его допустимо высевать в полевых севооборотах вместе с клевером луговым, люцерной и другими бобовыми травами. Кроме того, его также применяют для создания газонов. На сеянных пастбищах многолетний райграсс имеет небольшое долголетие: 3-4 года при фуражном использовании и 1-2 года - при семенном. Однако при благоприятных климатических условиях на пастбищах вместе с клевером ползучим могут сохраняться многие годы. Растения этого вида хорошо развиваются на умеренно влажных, плодородных суглинистых, глинистых и супесчаных почвах (Зотов и др., 2007).

Сорта пастбищного райграсса кормового назначения подразделяются на пастбищные и укосные. Для первых характерна высокая устойчивость основных хозяйственно-биологических признаков и более поздние сроки цветения. Вторые отличаются относительно ранним сроком цветения (Золотарев и др., 2009).

К основным направлениям селекции пастбищного райграсса относится выведение более продуктивных долголетних сортов пастбищного и укосного типа, с повышенной зимостойкостью и веснотойкостью, устойчивостью к фузариозу, снежной плесени, мучнистой росе, ржавчине и неблагоприятным условиям окружающей среды (Костенко и др., 2016).

В России доля райграсса пастбищного в общей структуре посевов многолетних злаковых трав составляет около 6 % (Кошен и др., 2016). Большинство сортов получены с использованием методов популяционной генетики, в частности, широко применялись способы создания синтетических гибридных популяций и методы полиплоидии.

По состоянию на 2023 год в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных на территории России, внесено 123 сорта райграса пастбищного.

1.1.3. Райграс однолетний (*Lolium multiflorum* Lam.)

Райграс однолетний, или вестервольдский (*Lolium multiflorum* Lam. var. *westerwoldicum* Wittm.) представляет из себя рыхлокустовой раннеспелый злак верхнего типа, являющийся разновидностью многоукосного (итальянского райграса). Хромосомный набор $2n=14$. Наряду с райграсом пастбищным, райграс однолетний относится к перекрестноопыляемым видам (Золотарев и др., 2010; Золотарев и др., 2009; Дьяченко, Постевая, 2013). Данный вид характеризуется хорошей поедаемостью животными, быстрым ростом и повышенной питательной ценностью: содержит мало клетчатки и больше сырого протеина, а также безазотистых экстрактивных веществ. Зелёная масса однолетнего райграса отличается высоким содержанием сахаров (12-14 %). Повышенная биологическая пластичность однолетнего райграса позволяет выращивать его как в одновидовых посевах, так и в составе сложных кормовых травосмесей. Помимо использования на зелёный корм, сено, сенаж и силос однолетний райграс применяется при создании культурных пастбищ, вместе с многолетними травами в качестве покровной культуры (Кравцов и др., 2019). Также однолетний райграс за счет мощного развития корневой системы оказывает положительное влияние на механические, физические и биологические свойства почвы. Отмечается его благоприятное влияние на влагоёмкость почвы и её нитрофицирующую способность (Золотарев и др., 2010; Дьяченко, Постевая, 2013).

При благоприятных условиях райграс однолетний может формировать до четырех укосов (200-500 ц/га зелёной массы) за счет интенсивного и непрерывного побегообразования (Теличко, 2018). Урожайность семян варьирует от 10-15 ц/га. Выращивание райграса однолетнего охватывает регионы России с достаточным количеством осадков (лесная и лесостепная

зона европейской части России, таёжная зона Западной Сибири, Дальний восток). Он хорошо растет на глинистых и суглинистых окультуренных дерново-подзолистых почвах, на осушенных разложившихся торфяниках (Золотарев и др., 2010).

Селекционная работа по выведению новых сортов однолетнего райграса направлена на увеличение кормовой и семенной продуктивности, повышение качества корма, а также создание сортов устойчивых к болезням (Косолапов и др., 2013).

По состоянию на 2023 год в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных на территории России, внесено 29 сортов однолетнего райграса.

1.1.4. Фестулолиум (\times *Festulolium* F. Aschers. et Graebn.)

Фестулолиум (\times *Festulolium* F. Aschers. et Graebn.) – многолетний рыхлокустовой злак, обладающий озимым типом развития. Выведен на основе межродовой гибридизации различных видов овсяниц и райграса (Переpravо и др., 2012; Калиничев, 2021). Растения фестулолиума характеризуются способностью к интенсивному отрастанию, полученной от райграсов, а также устойчивостью к неблагоприятным факторам, унаследованной от овсяниц. Взаимодополняемость характеристик райграсов и овсяниц позволяет исправить имеющиеся недостатки с помощью гибридизации (Привалов, Клыга, 2022; Лукашов, Исаков, 2016).

Растения фестулолиума отличаются высокой продуктивностью и питательностью, интенсивным побегообразованием, отавностью, отзывчивостью на удобрения, а также хорошей поедаемостью (Переpravо и др., 2012). Урожайность семян составляет не менее 0,5 т/га (Калиничев, 2021). При этом такие характеристики, как величина урожайности и качество зеленой массы и сухого вещества, поедаемость, усвояемость корма, зимостойкость, морозостойкость, устойчивость к засухе и болезням различаются в зависимости от морфотипа фестулолиума (Привалов, Клыга, 2022). Так, сорта

райграсового морфотипа отличаются интенсивным побегообразованием и ростом, особенно во второй половине вегетационного сезона, а также высокими темпами увеличения индекса листовой поверхности (Золотарев, Переправо, 2018). Для сортов овсяничного типа характерна повышенная стрессоустойчивость, а также больший выход сухого вещества и сырого протеина (Привалов, Клыга, 2022; Машьянов, Ганичева, 2015).

Фестулолиум может использоваться на корм при разных режимах — пастбищном, сенокосном, в полевых севооборотах в смеси с бобовыми культурами для получения зеленой массы и для приготовления консервированных кормов (Золотарев, 2022). Для растений данной культуры характерен высокий процент (до 20 %) содержания сахаров в сухом веществе на протяжении всего развития растений (Калиничев, 2021; Образцов и др., 2021). Кроме того, в 1 кг сухого вещества фестулолиума содержится около 0,96 корм. ед., 11,3-22,0 % сырого протеина, 3,4-5,7 % сырого жира, 18,2-25,8 % сырой клетчатки, а также от 9,1 до 11,7 МДж обменной энергии (Образцов и др., 2017).

Возделывание фестулолиума в бинарных и многокомпонентных бобово-злаковых травосмесях при сенокосном режиме использования в годы с достаточным количеством осадков обеспечивает формирование 3–4 укосов за вегетацию с урожайностью 11,7–12,5 т/га сухого вещества и высоким качеством корма (Привалов, Клыга, 2022). Благоприятные условия для возделывания фестулолиума на семена и кормовые цели складываются в Центральном, Центрально-Черноземном и Северо-Западном регионах России (Привалов, Каримов, 2016).

Основные направления селекции фестулолиума включают: создание широкого спектра гибридного материала; изучение коррелятивных связей между метамерной структурой растений и селективируемыми параметрами; изучение биосинтеза органических компонентов корма у генотипов, совместимости и наследуемости признаков; создание сортов с улучшенными селективируемыми параметрами (Косолапов и др., 2015).

По состоянию на 2023 год в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных на территории России, внесено 22 сорта фестулолиума.

1.2. Использование ДНК-маркеров в селекционно-генетических исследованиях многолетних злаковых трав

Одним из эффективных способов ускорения процесса создания новых сортов, повышения точности оценки исходного и селекционного материала, а также оптимизации системы госсортоиспытания при регистрации новых селекционных достижений является применение современных молекулярно-биологических подходов (Чесноков, Косолапов, 2016; Хлестикна, 2015). Методы молекулярного маркирования позволяют улучшать работу, связанную с поиском и рациональным использованием генетических ресурсов, оценивать разнообразие исходного материала, осуществлять подбор родительских форм и контроль результатов гибридизации (Клименко и др., 2019).

У культурных растений в качестве молекулярных маркеров используют полиморфные варианты запасных белков и изоферментов, а также фрагменты ДНК (Анисимова и др., 2018). В отличие от морфологических признаков проявление этих маркеров не зависит от внешних условий, и они характеризуются более высоким уровнем полиморфизма (Сулимова, 2004). Для селекционно-генетических исследований особую значимость приобрели молекулярные ДНК маркеры, позволяющие анализировать нуклеотидные последовательности на уровне генов, а не на уровне их продуктов, как в случае применения белкового полиморфизма (Сулимова, 2004; Хлесткина, 2015; Анисимова и др., 2018).

В соответствии с методической основой реализации маркерного подхода молекулярные маркеры можно разделить на три основные группы:

- 1) Маркеры, основанные на молекулярно-генетической блот-гибридизации, а также разработанные на основе ДНК-чип технологий.
- 2) Маркеры, основанные на методах полимеразной цепной реакции (ПЦР).
- 3) Маркеры, основанные на методах секвенирования (Чесноков, 2018; Loera-Sanchez et al., 2019).

При выборе молекулярных маркеров подходящего типа для успешного решения конкретных задач необходимо учитывать их преимущества и недостатки, возможность автоматизации процесса анализа, финансовые затраты, а также особенности изучаемой культуры (рис. 2) (Amar et al., 2011; Сухарева, Кулуев, 2018; Хлесткина, 2011; Хлесткина, 2015; Чесноков, 2018).

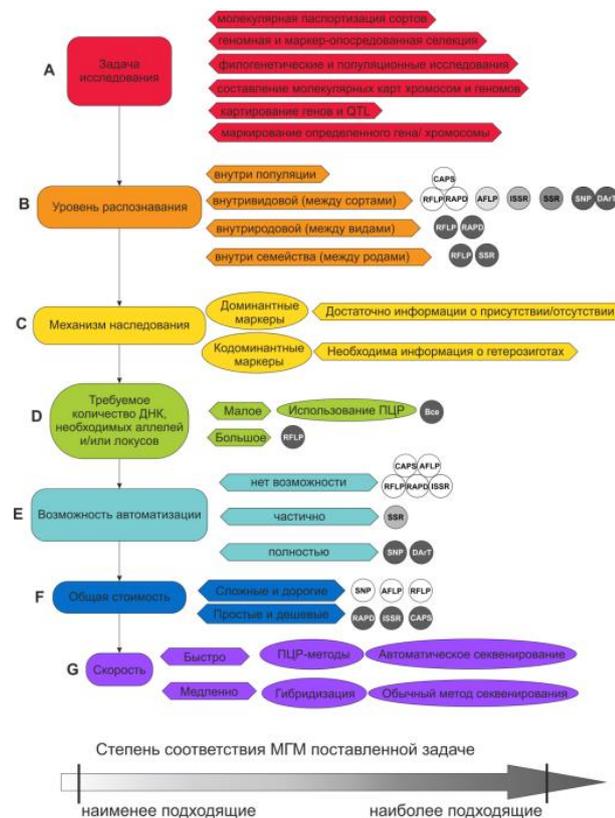


Рисунок 2 – Алгоритм выбора подходящей системы ДНК-маркирования, предложенный Сухаревой и Кулуевым, 2018.

Различные типы ДНК-маркеров широко используются для изучения многолетних злаковых трав. В литературных источниках сообщается об их успешном применении с целью изучения генетического разнообразия, составления молекулярных карт хромосом, картирования генов и QTL (локусов количественных признаков), отбора образцов с нужными признаками диагностики болезней, а также идентификации отдельных видов и сортов.

1.2.1. Методы, основанные на блот-гибридизации, ДНК-чип технологиях и секвенировании

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (Botstein et al., 1980). Данный метод основан на рестрикции геномной ДНК, электрофоретическом разделении рестрикционных фрагментов, перенос этих фрагментов с геля на мембрану (Саузерн) и затем гибридизацию с радиоактивной или флуоресцентной пробой (Багирова, Игнатова, 2012). К преимуществам RFLP-анализа относится высокая воспроизводимость результатов, кодоминантный тип наследования маркеров.

В научной практике RFLP-маркеры активно используются для анализа многолетних злаковых трав, начиная с 90-х гг. С их помощью осуществлено построение генетических карт сцепления райграса пастбищного и однолетнего (Bert et al., 1999; Jones et al., 2002; Warnke et al., 2004), овсяницы луговой (Chen et al., 1998; Alm et al., 2003). Маркеры данного типа применялись для выявления генетического разнообразия образцов овсяницы тростниковой и луговой, а также райграса однолетнего (Xu et al., 1994; Yamada, Kishida, 2003). В исследовании Busti с соавторами приводятся данные об идентификации 12 сортов овсяницы тростниковой, представленных «балк-образцами», содержащими 100 растений от каждого изучаемого образца с использованием техники RFLP-маркирования. По результатам анализа, авторам удалось

обнаружить сортоспецифичные фрагменты для 7 исследуемых сортов (Busti et al., 2004).

В настоящее время RFLP-маркеры считаются устаревшей технологией, из-за сложностей реализации анализа, сопряженной с большими затратами времени и ресурсов (Mammadov et al., 2012; Сухарева, Кулуев, 2018).

Перспективным направлением селекционно-генетических исследований является использование технологий, основанных на применении ДНК-чипов, таких как монолокусные SNP-маркеры (Single Nucleotide Polymorphism, полиморфизм единичных нуклеотидов) и мультилокусные DArT-маркеры (Diversity Array Technology, маркеры ДНК-чип технологии для изучения разнообразия) (Хлесткина, 2011; Новоселова, Бакулина, 2020; Шейкина, 2022). В отличие от анализа RFLP, данные технологии маркирования имеют высокую пропускную способность, которая проявляется в возможности исследования большого числа локусов и генотипов в рамках одного эксперимента без потери экономической эффективности (Новоселова, Бакулина, 2020).

Технология DArT, основанная на использовании ДНК-чипов, позволяет проводить анализ тысяч полиморфных локусов без предварительной информации о целевом геноме (Сухарева, Кулуев 2018). Данные маркеры успешно использовались для картирования видов *F. pratensis*, *F. arundinacea*, *F. glaucescens*, *L. perenne* и *L. multiflorum*. в работе Корецкú с соавтрами в 2009 году (Корецкú et al., 2009). Также сообщается о построении карты сцепления для райграса пастбищного, основанной на 297 DArT-маркерах (Tomaszewski et al., 2012). Данная техника в сочетании с SNP- и SSR-локусами использовалась для анализа генетического разнообразия образцов райграса пастбищного (Liu et al., 2018). По результатам исследования DArT-маркеры оказались наиболее воспроизводимы и эффективны для анализа «балк-образцов» различного размера.

В последнее время метод SNP широко используется для изучения аллельного полиморфизма видов и сортов кормовых многолетних злаковых трав. Однонуклеотидные замены относятся к наиболее распространенным

формам генетической изменчивости среди представителей одного вида (Mammadov et al., 2012). Кроме того, кодоминантный тип наследования данных маркеров позволяет эффективно различать гомозиготные и гетерозиготные аллели (Сухарева, Кулуев, 2018; Хлесткина, 2011). Для выявления SNP могут быть применены различные автоматические методы, например, ДНК-микропанели (microarrays), секвенирование, связанное с рестрикционным сайтом (restriction site associated DNA sequencing, RAD-seq) или метод генотипирования путем секвенирования (genotyping by sequencing) (Ganal et al., 2009; Blackmore et al., 2015). Благодаря этому, данная технология обладает высокой производительностью (Loera-Sanchez et al., 2019).

В работе Blackmore et al., 2015 сообщается об использовании SNP-маркеров для оценки генетического разнообразия 716 образцов райграса пастбищного, собранных в различных европейских регионах. С помощью 2185 SNP-маркеров авторам удалось оценить генетическую изменчивость изучаемой коллекции, а также обнаружить корреляцию географического происхождения с генетической структурой (Blackmore et al., 2015). Успешное применение маркеров данного типа для анализа генетического разнообразия образцов многолетних злаковых трав также описано в публикациях Liu с коллегами (Liu et al., 2018). Кроме того, SNP-маркеры использовались для составления карт генетического сцепления райграса пастбищного в статье Velmurugan с соавторами (Velmurugan et al., 2016).

В настоящий момент методы молекулярного маркирования с применением ДНК-чипов и секвенирования являются наиболее информативными. Однако их широкое распространение ограничивает необходимость использования специализированного и дорогостоящего оборудования, а также высокая стоимость анализа (Сухарева, Кулуев, 2018).

1.2.2. Методы, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) позволяет быстро и с минимальными затратами времени и ресурсов получить более 10 миллионов копий определенной последовательности ДНК, первоначально представленной одной или несколькими молекулами (Сулимова, 2004). В настоящее время ДНК-маркеры на основе ПЦР являются наиболее распространенной и доступной техникой, применяемой в селекционно-генетических исследованиях (Хлесткина, 2015; Сухарева, Кулуев, 2018).

Выявление полиморфизма с использованием методов, основанных на ПЦР, может осуществляться с применением в амплификации произвольных и специфических праймеров (Kumar, 1999, Шейкина, 2022). Использование ДНК-маркеров на базе произвольных праймеров не требует предварительной информации о нуклеотидной последовательности целевого генома (Шейкина, 2022; Кулуев и др., 2018). Из молекулярных маркеров данной подгруппы для анализа злаковых трав активно используются RAPD-, SRAP-, SCoT-, ISSR- и AFLP-маркеры.

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) – полиморфизм длины амплифицированных фрагментов. Данный метод основан на использовании ферментов рестрикции (как правило, EcoRI и MseI) с целью разрезания геномной ДНК. Затем образованные 3'-концы лигируются с адаптерами. Далее осуществляются две последовательные ПЦР-реакции. В первой используют комплементарные адаптерам EcoRI и MseI затравки, а во второй праймеры, содержащие на 3'-конце некомплементарные адаптерам дополнительные основания (Сухарева, Кулуев, 2018).

Основными преимуществами AFLP-маркеров является высокий уровень выявляемого полиморфизма и воспроизводимость результатов. Недостатки - доминантный тип наследования маркеров, относительная сложность и высокая стоимость анализа (Чесноков, 2018).

Для исследования образцов многолетних злаковых трав AFLP-маркеры использовались в ряде зарубежных исследований. Так, Roldan-Ruiz с

соавторами в 2000 году оценивал возможность применения данной системы для выявления различий на генетическом уровне между растениями райграса разных видов (Roldan-Ruiz et al., 2000). По результатам анализа авторам удалось обнаружить высокий уровень полиморфизма (83 %), однако различия между сортами газонного и кормового выявлены не были.

Для генотипирования образцов райграса активно использовались RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) – маркеры или случайно амплифицированная полиморфная ДНК. Данная технология молекулярного маркирования базируется на ПЦР-амплификации случайных сегментов геномной ДНК с одним праймером произвольной нуклеотидной последовательности (Сухарева, Кулуев, 2018). RAPD-маркеры характеризуются универсальностью и простотой применения, а также низкой себестоимостью в сравнении с другими маркерными системами. Однако RAPD-технология имеет и ряд недостатков. Во-первых, в зависимости от праймеров и условий реакции не всегда воспроизводятся результаты ПЦР; во-вторых, RAPD-маркеры, как правило, ведут себя как доминантные, и их гетерозиготное состояние не отличается от гомозиготного (Календарь, Глазко, 2002).

С помощью RAPD-маркеров Bolaric с соавторами при анализе 22 европейских сортов райграса пастбищного получил данные, позволившие провести кластеризацию сортового материала в зависимости от хозяйственного назначения (Bolaric et al., 2005). Ранее, в 1997 году, Huff анализировал по 10 растений от 18 популяций райграса многолетнего с применением системы RAPD-маркирования. По итогам кластеризации анализируемый материал сгруппировался в соответствии с происхождением (Huff, 1997).

ISSR-маркеры (Inter Simple Sequence Repeats) – межмикросателлитные последовательности. Разработаны в качестве альтернативы RAPD-маркерам. Данный метод основан на амплификации последовательностей, ограниченных двумя микросателлитными повторами в присутствии праймера,

комплементарного к последовательности данного микросателлита (4–12 единицам повтора) и несущих на одном из концов последовательность из двух-четырех произвольных нуклеотидов (так называемый «якорь»). Такие праймеры позволяют амплифицировать фрагменты ДНК, находящиеся между микросателлитными последовательностями (Матвеева и др., 2011). По результатам анализа удастся получить большое число ПЦР-фрагментов, представленных на электрофореграмме дискретными полосами (Грушецкая и др., 2013).

Для использования межмикросателлитных маркеров не требуется предварительная информации о геноме. Кроме того, данный метод отличается хорошей воспроизводимостью, дешевизной и простотой в применении. Маркеры ISSR успешно используют для выявления межвидовой и внутривидовой генетической изменчивости, идентификации групп растений различного таксономического класса, а в ряде случаев и для индивидуального генотипирования (Грушецкая и др., 2013). Одним из недостатков данной группы маркеров считается их доминантный тип наследования (Сухарева, Кулуев, 2018).

В настоящее время ISSR-маркеры являются одной из наиболее используемых систем молекулярного маркирования в филогенетических исследованиях. С их помощью Tabaripour и Keshavarzi успешно проанализировали генетическую изменчивость и определили структуру коллекции из 50 образцов райграса из разных видов. Данный тип маркеров позволил дифференцировать анализируемые образцы в соответствии с методом их получения (Tabaripour, Keshavarzi, 2021). Кроме этого, в исследовании Mohammadi с соавторами сообщается об успешном использовании ISSR-маркеров для оценки генетического разнообразия образцов райграса пастбищного и других культур, относящихся к злаковым травам (Mohammadi et al. 2022).

Особый интерес в настоящий момент представляет маркерная система SRAP (Sequence-Related Amplified Polymorphism), основанная на

амплификации открытых рамок считывания (Open reading Frame, OR), или интрон-экзонных областей генома. Длина SRAP-праймеров, используемых для этого метода, составляет 17–18 нуклеотидов. Коровая последовательность содержит 13–14 оснований, включающих неспецифический участок из 10–11 нуклеотидов на 5'-конце, а также GC-богатый регион в прямом праймере и AT-богатый – в обратном. Варибельность продуктов ПЦР достигается за счет использования обратного праймера, нацеленного на некодирующую область генома, обладающую низкой консервативностью (Li, Quiros, 2001). Система SRAP-маркеров позволяет выявлять высокий уровень полиморфизма, а также получать надежные и воспроизводимые результаты. Одним из ограничений их использования может быть доминантный тип наследования (Robarts, Wolfe, 2014).

Данные маркеры успешно использовались в ряде исследований по изучению образцов райграса. В работе Huang с соавторами сообщается о применении SRAP-маркеров для изучения генетического разнообразия 20 образцов из вида *Lolium multiflorum* Lam. Авторам удалось выявить высокий уровень межсортового полиморфизма (89,2 %), а также осуществить кластеризацию изучаемого материала в соответствии с происхождением и фенотипическими характеристиками (Huang et al., 2014). В 2008 году маркеры данной группы применялись для оценки генетического разнообразия и определения филогенетических взаимоотношений между 60 образцами ежи сборной (*Dactylis glomerata* L.) из 4 континентов. По результатам кластеризации на основе проведенного анализа изучаемые образцы сгруппировались в соответствии с географическим происхождением, а также морфологическими особенностями (Zeng et al., 2008).

В последние годы для дифференциации и идентификации видов и сортов злаковых трав успешно применяется технология SCoT-маркирования (Start Codon Targeted Polymorphism). Высокую варибельность данных маркеров обеспечивает особая структура праймеров размером 18 нуклеотидов, разработанных для амплификации последовательностей в геноме,

фланкирующих стартовый кодон ATG (Collard, Mackill, 2009). Механизм амплификации данных маркеров представлен на рисунке 3.

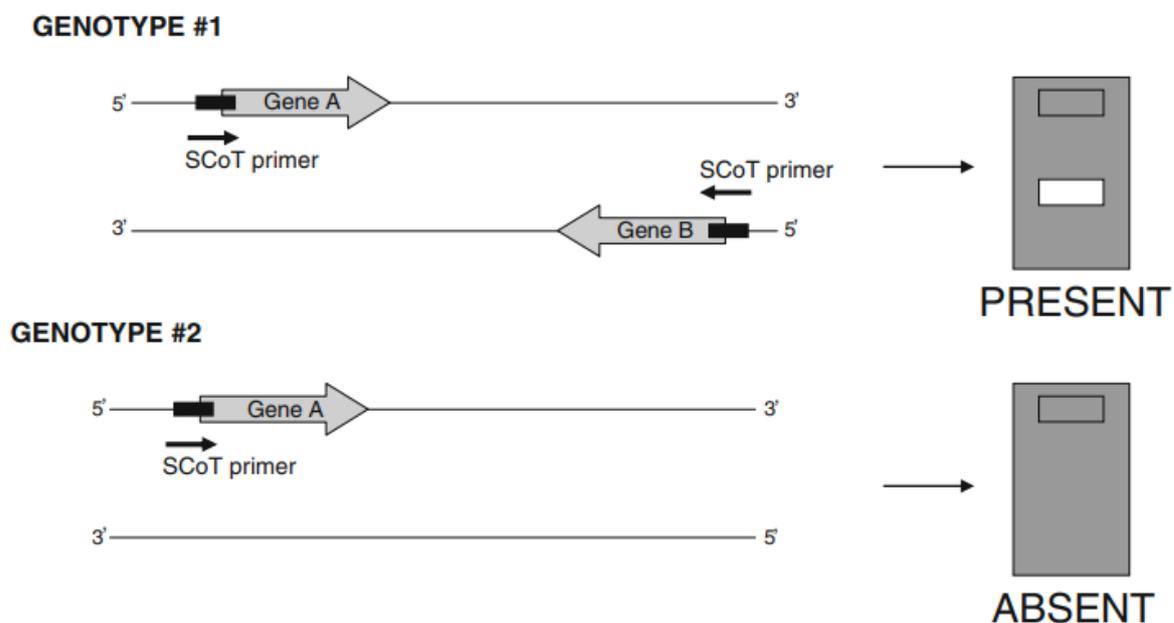


Рисунок 3 – Механизм амплификации ДНК-матрицы при использовании SCoT-маркеров (Collard, Mackill, 2009).

Основные достоинства SCoT-маркеров: для синтеза праймеров не требуется предварительная информация об исследуемой последовательности, маркеры нацелены на функциональные участки генома, получаемые результаты отличаются высокой воспроизводимостью (Mulpuri et al., 2013). Среди недостатков маркеров этой группы можно выделить их доминантную природу (Collard, Mackill, 2009).

В 2021 году Tabaripour и Keshavarzi применяли маркерную систему SCoT для оценки генетической изменчивости образцов, относящихся к 5 разным видам райграса: *L. rigidum*, *L. multiflorum*, *L. perenne*, *L. persicum*, *L. temulentum*. По результатам анализа AMOVA (Analasis of Molecular Variance) и определения генетической структуры, используя выборку, состоящую из 10 генотипов от каждого вида, авторам удалось дифференцировать изучаемый материал, а также обнаружить ряд общих аллелей у представителей разных

видов (Tabaripour, Keshavarzi, 2021) (рис. 4). В работе Farshadfar сообщается о применении 15 SCoT-праймеров для дифференциации девяти представителей райграса однолетнего и девяти образцов из вида райграса пастбищного. Анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) позволил выявить уровень внутривидовой изменчивости, составивший 51 %, тогда как изменчивость между видами была несколько ниже и составляла 49 % (Farshadfar et al., 2018). Об эффективности использования SCoT-маркеров в качестве инструмента анализа образцов многолетних злаковых заявляет Yan с соавторами по итогам изучения генетического разнообразия ежи сборной (Yan et al., 2016). Маркеры данного типа также успешно применялись для выявления филогенетических отношений между 19 видами рода *Bromus* L. (Safari et al., 2019) и идентификации генотипов фестулолиума и райграса пастбищного (Kondratskaya et al., 2022).

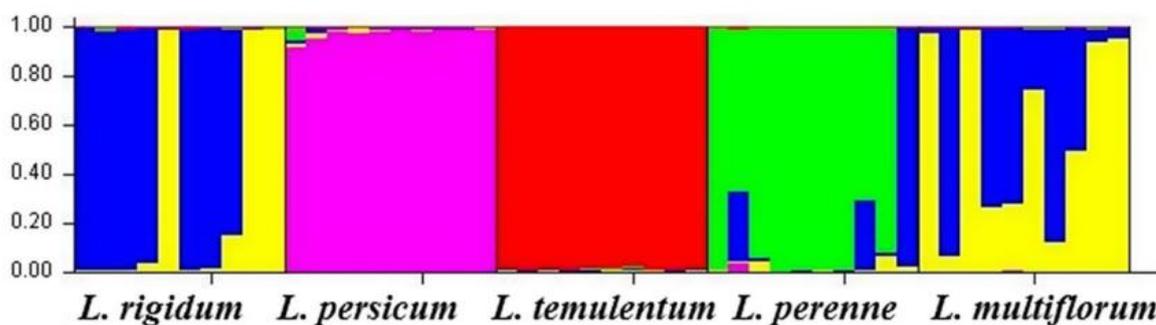


Рисунок 4 – Генетическая структура видов *Lolium* по результатам анализа с помощью SCoT-маркеров (Tabaripour, Keshavarzi, 2021).

Микросателлиты, или SSR-маркеры (Simple Sequence Repeat) – простые, повторяющиеся последовательности ДНК, полиморфизм которых основан на варьировании длины повтора, что, в свою очередь, обусловлено различиями в числе единиц повтора (Tautz, Renz, 1984; Хлесткина, 2011). Данный тип маркеров характеризуется высоким полиморфизмом, кодоминантным типом наследования, информативностью и воспроизводимостью результатов анализа (Хавкин, 2003; Рамазанова и др., 2008). Благодаря этим свойствам, SSR-локусы широко используются для оценки генетического разнообразия

растений на межвидовом и внутривидовом уровне, для молекулярно-генетической характеристики генотипов природных популяций и образцов в составе мировых коллекций (Боронникова, 2009; Karim et al., 2009; Liu et al., 2018).

Однако у SSR-анализа есть и недостатки: для разработки маркеров необходимо наличие информации о нуклеотидных последовательностях генома (Канукова и др., 2019).

Микросателлитные маркеры широко используются для изучения генетической изменчивости образцов многолетних злаковых трав. Так, Fu с соавторами успешно применили 15 SSR-маркеров для выявления полиморфизма между 21 сортом овсяницы тростниковой (*F. arundinacea* Schreb) (Fu et al., 2016). По результатам анализа авторы определили взаимосвязи между сортами, а также генетическую структуру изучаемой коллекции. Об успешном использовании микросателлитных маркеров для идентификации сортов и селекционных образцов многолетних злаковых трав сообщается также в работе Momotaz с соавторами в 2004 году (Momotaz et al., 2004). Кроме того, данный тип маркеров применялся для анализа сортов ежи сборной (Xie et al., 2012), тимофеевки луговой (Tanhuanpää, Manninen, 2012), райграса однолетнего (Nie et al., 2019; Peter-Schmid et al., 2008), райграса пастбищного (Studer et al., 2012; Bolaric et al., 2005; Liu et al., 2018).

1.3. Изучение генетического полиморфизма злаковых трав для использования в практической селекции и семеноводстве

Методика проведения испытаний на отличимость, однородность и стабильность (ООС-теста) при регистрации новых сортов злаковых трав, разработанная Международным союзом UPOV (Union internationale pour la protection des obtentions végétales) или УПОВ базируется на оценке морфофизиологических признаков (длина и ширина листьев, интенсивность зеленой окраски, высота и ширина растений, длина соцветия и т.д.) (Pasquali

et al., 2022). Непрерывное появление новых сортов затрудняет и ограничивает проведение ООС-теста из-за больших объёмов испытаний (Yu et al., 2022). Усложняет задачу и влияние условий окружающей среды (температура, освещенность, количество осадков, состав почвы и т.д.), а также перекрестноопыляемая природа многолетних злаковых культур, приводящая к высокой внутривидовой гетерогенности (Loera-Sanchez et al., 2019, Nie et al., 2019). Данные факторы увеличивают затраты на проведение ООС-тестов, снижают их точность и затрудняют обеспечение защиты авторских прав селекционеров (Wang et al., 2016).

Новые возможности для повышения эффективности оценки селекционных достижений появились с внедрением в практику современных ДНК-маркеров (Клименко и др., 2020). В сравнении с традиционными морфологическими признаками они имеют ряд преимуществ: высокий уровень полиморфизма, равномерное распределение по геному, надежность, возможность автоматизации процесса анализа, результаты которого не зависят от условий окружающей среды и фазы развития растения (Клименко и др., 2022). Данные, полученные с помощью анализа ДНК, наряду с информацией о родословной и ключевых полигенных признаках агрономического значения, можно использовать для составления генетических паспортов, позволяющих определить уникальность образцов, а также провести анализ однородности семенного материала (Малышев и др., 2006; Клименко и др., 2020).

Помимо применения в сортоиспытании молекулярно-генетическая характеристика сортов, форм и гибридов имеет практическое значение для использования в селекционном процессе. С помощью ДНК-маркеров можно получить дополнительную информацию о внутривидовой и внутрисортной генетической разнообразии, осуществить контроль гибридизации, подобрать родительские формы для скрещиваний, а также идентифицировать и локализовать хромосомные локусы, с экспрессией которых связан количественный или качественный эффект (Чесноков и др., 2014; Клименко и др., 2023).

В России, как и во всем мире, переходят к использованию современных методов ДНК-анализа в селекционных программах, в системе регистрации новых сортов и коммерческого распространения семян (Клименко и др., 2023). На текущий момент сообщается о разработке генетических паспортов для ряда важнейших сельскохозяйственных культур. Так, Артюхова с соавторами составляли генетические паспорта для сортов и образцов люпина из разных видов с использованием ISSR- и RAPD-маркеров (Артюхова и др., 2010). Исходя из результатов исследования, авторы пришли к выводу о непригодности RAPD-маркеров для использования в качестве инструмента идентификации образцов люпина из-за низкого уровня обнаруженного полиморфизма. На основе индивидуальных спектров ISSR-маркеров авторами составлены генетические паспорта, позволяющие идентифицировать каждый из изучаемых сортов. Разработанные Артюховой с соавторами ДНК-паспорта представлены в виде формул, содержащих буквы латинского алфавита, соответствующие названию маркера, нижний индекс, характеризующий молекулярный размер ПЦР-фрагмента, а также верхний индекс, свидетельствующий о наличии или отсутствии соответствующего продукта

Базанов с соавторами использовал 11 SSR-маркеров с целью разработки генетических паспортов для 11 сортов льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L) (Базанов и др., 2020). На основе результатов генотипирования авторами составлены молекулярно-генетические формулы (генетические паспорта) для включенных в анализ образцов, которые состояли из латинской буквы, соответствующей SSR-локусу, а также нижнего индекса, обозначающего размер аллеля. Кроме того, на основе кластерного анализа выявлены различия сортов по продолжительности вегетационного периода.

Для идентификации сортов картофеля, выведенных в Ленинградском НИИСХ «Белогорка», также применялись микросателлитные локусы (Клименко и др., 2021). В качестве растительного материала использованы номенклатурные стандарты сортов, представленные гербарными образцами, которые могут служить эталоном, обеспечивающим возможность

верификации данного сорта и проверку его подлинности. Генетические паспорта на основе SSR-локусов содержали информацию об аллельном составе образца, количестве и размере ПЦР-фрагментов. Об успешном осуществлении генетической паспортизации сортов и сортообразцов картофеля с помощью SSR-маркеров также сообщает Колобова с соавторами (Колобова и др., 2017).

Доминантные мультилокусные ISSR- и RAPD-маркеры использовались Кондрацкой с соавторами для молекулярно-генетической характеристики межродовых гибридов житняка гребенчатого (*Agropyron Cristatum* L.) с райграсом пастбищным (*Lolium perenne* L.) (Кондрацкая и др., 2018). В своей работе авторы использовали препараты ДНК, полученные с помощью коммерческого набора реактивов из семян единичных генотипов сортообразцов в трёхкратной биологической повторности, а также контрольный вариант, состоящий из суммарной навески («балк-образец») трёх генотипов. Для детекции ПЦР-продуктов Кондрацкая с соавторами применяли агарозный гель, а также генетический анализатор Bioanalyzer-2100 («Agilent Technologies», США). По результатам проведенного анализа сортообразцов злаковых трав авторам статьи удалось дифференцировать все исследованные генотипы, а также составить генетические паспорта с информацией об использованных маркерах и о полученных размерах ПЦР-продуктов.

Одним из преимуществ описанного авторами подхода является использование нескольких систем маркирования, нацеленных на амплификацию различных по своей природе участков генома, что повышает общую разрешающую способность метода (Матвеев и др., 2011). Однако его использование с целью различения и идентификации культурных сортов злаковых трав может способствовать получению ненадёжных результатов, ввиду недостаточно репрезентативной выборки генотипов для анализа каждого образца. Согласно ранее проведенным исследованиям, для учета аллелей с частотой встречаемости 25 % следует включать в анализ не менее 10 генотипов от каждой популяции (Loera-Sanchez et al., 2019).

В другой публикации Кондрацкая с соавторами описывают методику паспортизации новых форм многолетних злаковых трав (Kondratskaya et al., 2022). Авторы приводят сведения об использовании метода на основе СТАВ-буфера для экстракции ДНК из растительного материала и семян образцов злаковых трав. Кондрацкая с соавторами демонстрируют молекулярно-генетические паспорта гибридов райграса, составленные на основе результатов мультилокусного маркирования тотальной ДНК с использованием SCoT- и SRAP-маркеров. В них авторы также представляют информацию о наименовании используемых маркеров и соответствующих размерах, полученных с ними ПЦР-продуктов для каждого отдельного образца. В приведенной работе отсутствует информация о биологической повторности и количестве используемых образцов для паспортизации каждого гибрида. Кроме того, принадлежность и размер полученных продуктов амплификации не подтвердились с использованием высокоточных методов анализа.

В 2023 году Кулуев с соавторами сообщили об оценке генетического разнообразия сортообразцов кормовых культур из видов *Dactylis Glomerata* L., *Agropyron Pectiniforme* Roem. Et Schult и *Phleum Pratense* L. с помощью микросателлитных маркеров (Кулуев и др., 2023). В качестве растительного материала авторы использовали суммарные навески проростков, содержащие по 5 генотипов от каждого сортообразца. Для выделения геномной ДНК применяли коммерческий набор DNA Purification Kit («Thermo Fisher Scientific», Литва). В анализе использовали пять SSR-локусов для каждой из изучаемых культур. Детекцию результатов маркирования осуществляли с помощью 10 % полиакриламидного геля и его последующей визуализации в документирующей системе Gel Doc™ EZ Imager («Bio-Rad», США). По результатам исследования Кулуев с соавторами привели изображения полученных электрофореграмм и пришли к заключению об эффективности использования микросателлитных локусов в качестве инструмента генетической паспортизации сортообразцов ежи сборной, тимофеевки

луговой и житняка гребенчатого. Авторы определили набор полиморфных маркеров, пригодных для анализа отечественных сортообразцов злаковых трав.

Применение в работе высокоспецифичных и полиморфных SSR-маркеров для анализа каждой из злаковых культур позволило авторам данной статьи эффективно различить изучаемые сортообразцы. Однако, как и в случае предыдущего исследования, данный метод может быть недостаточно достоверным из-за малого объёма выборки для анализа. Кроме того, канцерогенность используемого авторами полиакриламидного геля и трудоемкость его приготовления снижают эффективность метода.

Генетические паспорта на основе различных маркерных систем разработаны для отечественных сортов риса (Супрун, Ковалев, 2015), сои (Рамазанова, Коломыцева, 2020), свёклы (Налбандян и др., 2021), подсолнечника (Гучетль и др., 2015). В настоящее время отсутствуют адаптированные молекулярно-генетические методы, позволяющие достоверно различать и идентифицировать отечественные сорта злаковых трав. В основном, для их изучения используются подходы, основанные на фенотипических признаках (Мавлютов и др., 2023).

По характеру цветения большинство видов многолетних злаковых трав – перекрестноопыляющиеся анемофильные растения, обладающие высоким генетическим разнообразием внутри популяций (Новоселова и др., 2005). При проведении молекулярно-генетического анализа таких культур необходимо использовать достаточно репрезентативную выборку генотипов от каждого образца и маркерную систему с высоким дискриминационным потенциалом (Bolaric et al., 2005; Liu et al., 2018; Конарев, Перчук, 2018). По данным проведенных ранее исследований, применение в работе 30 растений от каждой из анализируемых популяций позволяет учесть аллели, встречающиеся с частотой не менее 10 % с вероятностью $p = 0,95$ (Crossa, 1989; Forster et al., 2001, Muylle et al., 2005; Liu et al., 2018). На практике из-за технических ограничений в исследованиях многолетних злаковых трав с использованием

ДНК-маркеров, размер анализируемой выборки варьирует от 10 до 30 растений на сорт или популяцию, что позволяет выявлять аллели, присутствующие с частотой от 25 % до 10 % (Loera-Sanchez et al., 2019).

Bolaric с соавторами при исследовании 22 культурных сортов *Lolium perenne* L. с использованием доминантных RAPD-маркеров определяли минимальный размер выборки индивидуальных генотипов от каждого образца, пригодный для достоверной дифференциации изучаемых популяций (Bolaric et al., 2005). С целью решения данной задачи авторы формировали начальную выборку из 60 растений от каждого из трех изучаемых сортов райграса пастбищного. Используя данные дисперсии средних значений квадратов евклидовых расстояний, для различных размеров выборки выявляли минимальное количество необходимых для анализа генотипов (20 от каждого из исследуемых сортов) (рис. 5). При этом увеличение размера выборки с 20 до 35 генотипов для сорта приводило к незначительному уменьшению дисперсии значений выборки.

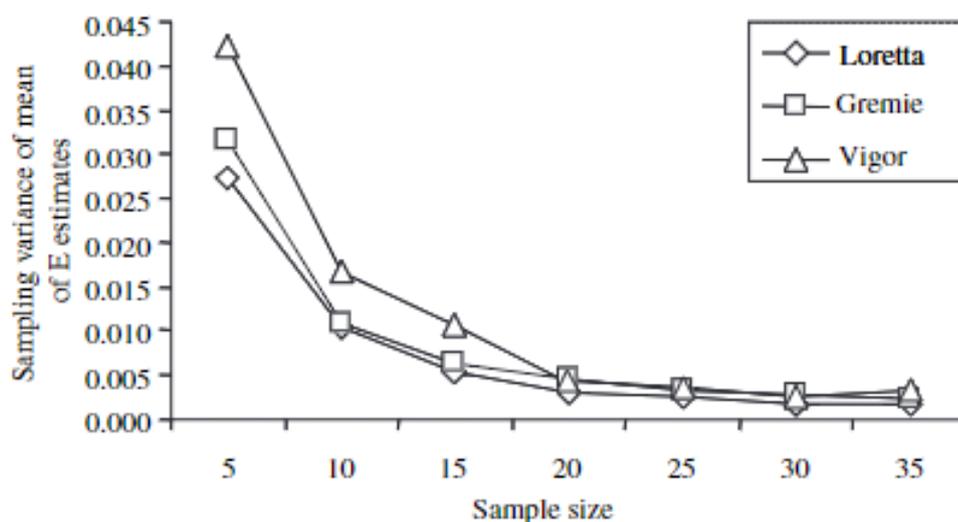


Рисунок 5 – График выборочной дисперсии средних значений квадратов евклидовых расстояний для различных размеров выборки при анализе трех сортов райграса пастбищного с использованием RAPD-маркеров (Bolaric et al., 2005).

Ранее, Kubik с соавторами изучали генетическое разнообразие семи сортов райграса пастбищного с помощью микросателлитных маркеров, используя по 30 генотипов от каждого сорта. По результатам исследования, авторы предложили использовать не менее 15 SSR-локусов и не менее 20 генотипов от каждого образца для осуществления достоверной сортовой идентификации (Kubika et al., 2001). В том же году, в исследовании Kölliker с соавторами, при анализе генетического разнообразия образцов белого клевера (*Trifolium repens* L.) с помощью AFLP-маркеров сообщили об успешном использовании в качестве растительного материала суммарной навески («балк-образец»), состоявшей из 20 генотипов от каждого из исследуемых сортов (Kölliker et al., 2001). Применение «балк-стратегии» позволило обнаружить 90 % аллелей, выявленных при скрининге индивидуальных генотипов. Кроме того, распределение сортов белого клевера по результатам генотипирования с использованием «балк-образцов» и индивидуальных генотипов оказалось аналогичным.

Guthridge с соавторами при анализе генетической изменчивости популяций райграса пастбищного с помощью AFLP-маркеров также использовали в качестве растительной ткани «балк-образцы», состоящие из 20 генотипов от каждой из 6 анализируемых популяций (Guthridge et al., 2001). Кластерный анализ по результатам генотипирования распределил образцы райграса согласно особенностям происхождения, в соответствии с результатами, полученными с использованием индивидуальных генотипов.

Оценку влияния различного числа генотипов, включенных в суммарную навеску, на достоверность результатов исследования осуществляли Liu с соавторами при анализе образцов *Lolium perenne* L. с использованием трех систем ДНК-маркирования (SNP- и SSR- и DArT-маркеры) (Liu et al., 2018). Авторы анализировали 1, 12, 24, 48 и 100 индивидуальных растений на каждую популяцию. По результатам исследования, количество индивидуальных генотипов, составляющих «балк-образец», пригодное для

достоверной дифференциации и идентификации популяций райграса, составляло 24.

Nie с соавторами проводили идентификацию шести тетраплоидных сортов райграса однолетнего с использованием SSR-маркеров. По результатам исследования авторы пришли к выводу, что наиболее эффективной стратегией идентификации гетерогенных сортов с помощью микросателлитных маркеров, является использование в качестве растительного материала 10 «балк-образцов» от каждого сорта, включающих в себя 10 генотипов. При идентификации образцов райграса в данной работе учитывались аллели, встречающиеся у изучаемых сортов с частотой не ниже 40 % (Nie et al., 2019).

Об успешном использовании стратегии «балк-анализа» для исследования кормовых культур с помощью ДНК-маркеров сообщается также в исследовании по генотипированию люцерны (Herrmann et al., 2009), овсяницы тростниковой (Fu et al., 2016) ежи сборной (Jiang et al., 2013), клевера лугового (Клименко и др., 2020).

Применение суммарных навесок или «балк-образцов» в исследованиях перекрестноопыляющихся видов позволяет значительно сократить затраты на проведение масштабного анализа индивидуальных генотипов и получить достоверные и воспроизводимые результаты (Forster et al., 2001). Помимо этого, использование суммарной навески устраняет влияние редких аллелей на конечные результаты (Fu et al., 2016).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объекты исследования

Работа выполнялась на базе лаборатории молекулярно-генетических исследований кормовых культур Федерального научного центра кормопроизводства и агроэкологии имени В.Р. Вильямса (ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса») с 2019 по 2023 годы. Объектом исследования служили 25 сортов многолетних злаковых трав, в том числе 10 сортов райграса пастбищного (*Lolium perenne* L.), 5 сортов райграса однолетнего (*Lolium multiflorum* Lam. var. *westerwoldicum* Wittm.) и 10 сортов фестулолиума (× *Festulolium* F. Aschers. et Graebn.) (табл. 1). Семенной материал был предоставлен центром коллективного пользования «Биологические коллекции кормовых растений» ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса».

Таблица 1 – Коллекция сортов райграса пастбищного, райграса однолетнего и фестулолиума, их происхождение и уровень ploидности

№ п/п	Название сорта	Вид/гибрид	Учреждение-оригинатор	Pлоидность
1	Агат	Райграс пастбищный (<i>Lolium perenne</i> L.)	ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса»	4n*
2	Дуэт		ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса»	4n*
3	ВИК 66		ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса»	4n*
4	Карат		ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса»	4n*
5	Феникс		ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса»	4n*
6	ВИК 22		ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса»	2n*

7	Ленинградский 809		ФГБНУ «ФИЦ картофеля имени А.Г. Лорха»	—
8	Вея		Калининградский НИИСХ - филиал ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса»	—
9	Веймар		ФГБНУ «Федеральный научный центр лубяных культур»	2n**
10	Быль		ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса» ФИЦ Коми НЦ УрО РАН	4n**
11	Рапид	Райграс однолетний	ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса»	4n*
12	Московский 74	(вестервольд ский) (<i>Lolium</i>	ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса»	2n*
13	Roznovsky	<i>multiflorum</i> Lam. var. <i>westerwoldicu</i>	Чехия (оригинатор не зарегистрирован)	2n***
14	Sprint	<i>m</i> Wittm.)	Дания (оригинатор не зарегистрирован)	2n****
15	Изорский		ФГБНУ «ФИЦ картофеля имени А.Г. Лорха»	2n*****
16	Аллегро			4n*

17	Пилигрим	Фестулолиум (× <i>Festulolium</i> F. Aschers. et Graebn.)	ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса»	4n**
18	Айвенго			4n**
29	ВИК-90			4n*
20	Фест		ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса» ООО «Грин Дир»	4n*
21	Кафес		ФГБНУ «ФИЦК им. А.Г. Лорха»	4n**
22	Синта		Уральский федеральный аграрный научно- исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук	4n**
23	Аэлита			8n*****
24	Дебют			4n**
25	Изумрудный		Уральский федеральный аграрный научно- исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук ЗАО «НПФ “Российские семена”»	6n*****

*Косолапов и др., 2019; **«Государственный реестр селекционных достижений...», 2022; ***Fojtik, 1994; ****Vostan et al., 2022; *****Дьяченко и др., 2016; *****Золотарев и др., 2009.

2.2. Микросателлитные (SSR) маркеры для анализа сортов многолетних злаковых трав

Для анализа сортов фестулолиума, райграса пастбищного и однолетнего использовали микросателлитные маркеры (табл. 2), отобранные на основе информации из литературных источников (Wang et al., 2009; Studer et al., 2008; Lauvergeat et al., 2005; Kubik et al., 2001). SSR-локусы под номерами с 7 по 14 (см. табл. 2) разрабатывались на основе библиотеки экспрессирующихся целевых сиквенсов (EST, Expressed Sequence Tags), связанных с различными аннотированными генами.

Таблица 2 – Характеристика микросателлитных маркеров

№	SSR-локус	Последовательность праймеров(5'-3') F/R	Мотив	Температура отжига праймеров (Tm), °C	Аннотированный ген (Studer et al., 2008)	Ссылка на литературный источник
1	LPSSRh01h06	ATTGACTGGCTTCCGTGTT/ CGCGATTGCAGATTCTTG	[CA]9	53,8	-	Wang et al., 2009
2	LPSSRh03b01	ACACTCCACTAGGATTTCT/ CTGAATTTGGCTAGTATAAA	[GT]10	46,3	-	
3	LPSSRk12d11	GCAAGAGCTAGGTCTCGACAACAA/ TGGGGAGGACAAGGCCATAAACAA	[GCA]8	63,1	-	
4	LPSSRk02e08	TCTGAAAGCCCGAGTGAGCG/ CGACTGTGGCAGGGATGACG	[CTT]7	61,8	-	
5	LPSSRk03b03	GGGAATCTGGCAGAAGTATCACGT/ GAAGATCTGGCCAAGTCTAATCCG	[CA]6	62,0	-	
6	LPSSRk15h05	GGCACTTTATTGCTTTGGTTAGTC/ AAATCCTTAGATTGGTCGGTCATG	[TA]4[CTA]6	58,9	-	
7	G02_025	GAGTTTGAAGATCCCCGTGA/ GCCATGATGCAGAAGAAGGT	[TGG]5	60	Alternative splicing regulator [<i>Triticum aestivum</i>]	Studer et al., 2008
8	G03_039	GCTCCAGGACTTCTTCAACG/ GCTGCTCGTACTGCTCGTAG	[CTG]4	60	HSP70 [<i>Triticum aestivum</i>]	
9	G03_089	TCACCAACACCACACTCCTC/ GCTGCTCGTACTGCTCGTAG	[CTCC]4	60	Katanin [<i>Oryza sativa (japonica cultivar-group)</i>]	
10	G04_092	GGACTTGCAAAGTCAATCAGC/ CTCGAACTGGTTCCCGAATA	[GTGC]4	60	MAP KINASE [<i>Avena sativa</i>]	
11	G05_044	GACCGATTGGAACCAACAAC/ CGATGCTTTCAGCGGTTAAT	[CTC]4	60	Nitrogen fixation protein, putative, expressed [<i>Oryza sativa (japonica cultivar-group)</i>]	

12	G05_046	TACCTCCAGCAACAGCTTCA/ TTCTGAAACTGGCTGCAATG	[GCA]5	60	Putative auxin response transcription factor(ARF6) [<i>Oryza sativa</i> (<i>japonica</i> cultivar-group)]	
13	G07_058	AAGGAGCTCCAGCAAGATGA/ GGGGGAGAGGCTTCAATAAC	[GCC]4	60	Salt-stress root protein RS1/plasma membrane polypeptidelike [<i>Oryza sativa</i> (<i>japonica</i> cultivar-group)]	
14	G01_002	CAAGACCAAACCGAGAGAGG/ TCTCCTCCTCGACTTCCAGA	[AG]7	60	-	
15	AJ872206	GTGCAGCAGTTTGAATTGGA/ AGCATCGGGAGCTATGAATG	[GA]14	55	-	Lauvergeat et al., 2005
16	AJ872214	AGGTGTCCTGTTGCTTTGGA/ TTTACCCCCAGGGATCAAAT	[TG]7	55	-	
17	AJ872228	CCAAGTAGACAAAGGGGATTG/ GGAGAGCACCATTCATCCAT	[TGA]8	55	-	
18	AJ872232	CTTGTCGTCCTTGTGGGAG/ ATATTCTGGATCGTGGCGTT	[CA]5[GA]2	55	-	
19	LP165	CCATCACCTCCACTAT/ AGCTCGCAGTCTGTTG	[CT]14	55	-	Kubik et al., 2001
20	M4136	AGAGACCATACCAAGCC/ TCTGGAAGATTTCCTTG	GATT[GA]12 GT[GA]15	55	-	

2.3. SCoT-маркеры для анализа сортов многолетних злаковых трав

Для генотипирования сортов фестулолиума, райграса пастбищного, райграса однолетнего использовали параймеры, разработанные к набору из 25 SCoT-маркеров, определенных на основании ранее проведенных исследований, где они указаны как информативные для анализа злаковых культур (табл. 3) (Collard, Mackill, 2009; Jiang et al., 2014; Kondratskaya et al., 2019; Safari et al., 2019).

Таблица 3 – Последовательности используемых SCoT-маркеров

№	Название	Последовательность (5'-3')
1	SCoT 01	CAACAATGGCTACCACCA
2	SCoT 02	CAACAATGGCTACCACCC
3	SCoT 20	ACCATGGCTACCACCGCG
4	SCoT 23	CACCATGGCTACCACCAG
5	SCoT 31	CCATGGCTACCACCGCCT
6	SCoT 06	CAACAATGGCTACCACGC
7	SCoT 13	ACGACATGGCGACCATCG
8	SCoT 21	ACGACATGGCGACCCACA
9	SCoT 32	CCATGGCTACCACCGCAC
10	SCoT 15	ACGACATGGCGACCGCGA
11	SCoT 28	CCATGGCTACCACCGCCA
12	SCoT 11	AAGCAATGGCTACCACCA
13	SCoT 26	ACCATGGCTACCACCGTC
14	SCoT 08	CAACAATGGCTACCACGT
15	SCoT 07	CAACAATGGCTACCACGG
16	SCoT 63	ACCATGGCTACCACGGGC
17	SCoT 60	ACAATGGCTACCACCACA
18	SCoT 59	ACAATGGCTACCACCATC

19	SCoT 22	AACCATGGCTACCACCAC
20	SCoT 36	GCAACAATGGCTACCACC
21	SCoT 35	CATGGCTACCACCGGCC
22	SCoT 40	CAATGGCTACCACTACAG
23	SCoT 44	CAATGGCTACCATTAGCC
24	SCoT 17	ACCATGGCTACCACCGAG
25	SCoT 29	CCATGGCTACCACCGGCC

2.4. Методы оценки внутрисортного ДНК-полиморфизма многолетних злаковых трав

Одним из важных этапов генетической паспортизации сорта является оценка его однородности. С этой целью осуществлено генотипирование 30 индивидуальных проростков для отдельных сортов исследуемой коллекции злаковых трав с использованием наиболее полиморфных SSR- и SCoT-маркеров. На основании числа выявленных ДНК-спектров рассчитано количество биотипов, присутствующих в изучаемых образцах. Для распределения генетической изменчивости на внутрисортную и межсортовую использован метод AMOVA (Analysis of Molecular Variance), реализованный в программном обеспечении GenAlEx 6.2 (Peakall, Smouse, 2006).

2.5. Методы статистической обработки данных

По результатам определения размеров ПЦР-продуктов формировали бинарные матрицы, где присутствие фрагментов амплификации обозначали как «1», а отсутствие – «0». В анализе учитывали только четкие и воспроизводимые ампликоны.

Для вычисления значений эффективного числа аллелей (N_e), показателя гетерозиготности (H_e), а также осуществления PCoA-анализа и реализации алгоритма AMOVA (Analysis of Molecular Variance) использовали

программное обеспечение GenAlEx 6.2 (Peakall, Smouse, 2006). Показатели информативности праймеров (PIC), разрешающей способности (Rp), дискриминационной силы (D) и маркерный индекс (MI) определяли с помощью онлайн-ресурса IMEC (<https://irscope.shinyapps.io/iMEC/>).

Дендрограмму на базе генетических дистанций между исследуемыми образцами составляли с помощью программы DARwin 6.0.21 (Perrier, Jacquemoud-Collet, 2006). При этом использовали оценку достоверности результатов с помощью бутстреп-анализа на основании 10000 реплик. Изучение генетической структуры многолетних злаковых трав осуществляли в программе STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al., 2000; Falush et al., 2003), где устанавливали значения гипотетических популяций (K) от 1 до 10, а также задали 10000 повторов burn-in period и 10000 итераций MCMC (Markov Chain Monte Carlo). По результатам анализа определяли оптимальное количество кластеров с помощью метода Evanno (Evanno et al., 2005) и онлайн-ресурса Structure Harvester (Earl, VonHoldt, 2012).

Для составления генетических паспортов изучаемых образцов многолетних злаковых трав использованы сведения об их аллельном разнообразии (молекулярно-генетические формулы), выявленном с использованием SSR- и SCoT-маркеров, происхождении, основных морфобиологических свойствах, а также регионах возделывания.

2.6. Методы валидации полученных данных

С целью валидации полученных результатов, ПЦР-продукты, полученные в результате амплификации изучаемых образцов с микросателлитными маркерами, были клонированы с использованием вектора pAL2-T (ЗАО «Евроген», Россия) и секвенированы на генетическом анализаторе ABI PRISM 3130XL («Applied Biosystems, Inc.», США) с использованием набора Big Dye terminator v.3.1 cycle sequencing kit («Applied Biosystems, Inc.», США). Данные секвенирования анализировали с помощью программы Ugene (Okonechnikov et al., 2012), а затем выравнивали в алгоритме

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Отдельные сортоспецифичные продукты ПЦР, полученные по результатам анализа со SCoT-маркерами, вырезали из агарозного геля и очищали на колонках, используя набор Cleanup Standart (ЗАО «Евроген», Россия), а затем очищенные ампликоны также клонировали с помощью вектора pAL2-T (ЗАО «Евроген», Россия) и секвенировали для установления первичной последовательности нуклеотидов. Полученные последовательности также были проанализированы с помощью программного обеспечения Ugene и впоследствии выровнены с использованием алгоритма BLAST.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Оптимизация способов выделения ДНК

Проведение молекулярно-генетического анализа с использованием многолетних злаковых трав является сложным и трудоемким процессом из-за ряда факторов. Один из важнейших аспектов - это получение качественных образцов геномной ДНК. Растения, относящиеся к этим культурам, содержат большое количество белков, полисахаридов и фенольных соединений, ингибирующих ПЦР (Anderson et al., 2018; Клименко и др., 2021). Определенные трудности обусловлены и спецификой используемого растительного материала. Для анализа межсортового ДНК-полиморфизма в нашем исследовании применялись суммарные навески («балк-образцы»), содержащие часть растительной ткани 30 семидневных проростков от каждого изучаемого образца. При изучении внутрисортового генетического полиморфизма использовались препараты ДНК, полученные из ткани проростков индивидуальных генотипов (не менее 30 для каждого образца).

В предварительных экспериментах для экстракции ДНК опробованы 3 методики, основанные на разных лизирующих буферах (SDS - додецилсульфат натрия и СТАВ - цетилтриметиламмония бромид) (табл. 4) или на применении коммерческого набора реагентов «ДНК-Экстран-3» (ООО «Синтол», Россия), предназначенного для выделения геномной ДНК из разнообразного биологического материала: крови, культур бактериальных и животных клеток, свежих, замороженных или высушенных тканей животных и растений. При сравнении различных методов ДНК-экстракции использовались «балк-образцы» и индивидуальные генотипы различных культур из злаковых трав (райграс пастбищный, райграс однолетний, фестулолиум, овсяница луговая, овсяница тростниковая, овсяница красная).

Таблица 4 – Показатели концентрации геномной ДНК, выделенной из «балк-образцов» проростков злаковых трав различными методами

№	Название метода	Средняя концентрация образцов, нг/мкл	Ссылка на источник метода
1	Модифицированный метод на основе SDS-буфера	298,3	Клименко и др., 2021
2	«ДНК-Экстран-3» (Синтол, Россия) с заменой буфера	258,3	ООО «Синтол», Россия
3	Метод на основе СТАВ-буфера №1 (рН 7,5)	42,7	Porebski et al., 1997
4	Метод на основе СТАВ-буфер №2 (рН 5.3)	22,7	

При сравнении каждой из методик оценивали качество и количество, получаемой геномной ДНК. С этой целью осуществляли её разделение в 1,2%-м агарозном геле, а также измеряли концентрацию и чистоту препаратов на спектрофотометре UV-vis Nabi («MicroDigital Co., Ltd.», Корея). В дополнение к этому, качество выделенной ДНК оценивали в ПЦР-анализе с применением различных систем маркирования (SSR- и SCoT-маркеры).

По результатам экспериментальных испытаний наилучшие результаты по качеству и количеству выделенной ДНК, как из суммарной навески растительной ткани, так и из индивидуальных проростков, показал протокол, основанный на базовом методе хлороформ-фенольной экстракции с

использованием SDS-лизирующего буфера (Клименко и др., 2021) с внесенными нами модификациями (рис. 6).

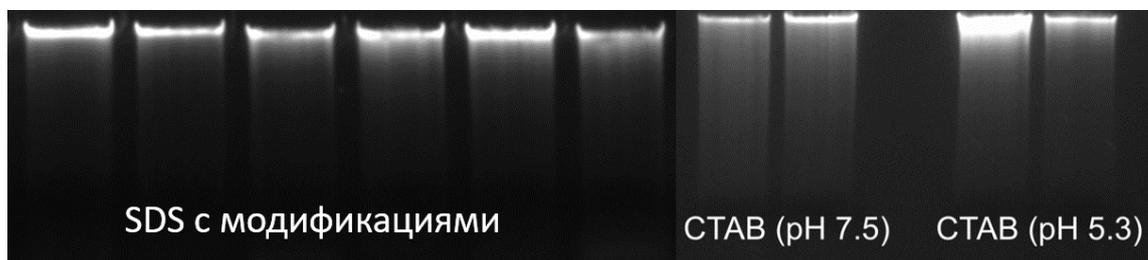


Рисунок 6 – Электрофореграмма геномной ДНК, выделенной из «балк-образцов» злаковых трав с помощью модифицированного SDS- и СТАВ-методов.

При использовании модифицированного SDS-метода нет необходимости в применении токсичных компонентов (хлороформ, изоамиловый спирт, фенол), объем буфера рассчитывается на конкретную навеску растительной ткани, используется доступный и относительно недорогой набор реагентов. Описание протокола приведено ниже.

Растворы и реактивы для ДНК-экстракции: SDS-экстракционный буфер (200 mM трис HCl pH 7,5; 250 mM NaCl; 25 mM ЭДТА; 0,5 % SDS); фермент РНКаза (ЗАО «Синтол», Россия); 5 М ацетат аммония; изопропанол; ЭДТА; этиловый спирт 70 %, охлажденный до $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$; TE буфер (0,1 М Трис-HCl, 1 mM ЭДТА, pH 8,0).

1. Подготовка для каждого сорта суммарной навески растительной ткани, состоящей из 30 проростков семян;
2. Определение объема лизирующего (SDS) буфера на один образец из расчета 300 мкл на 30 мг растительной ткани с учетом общего веса проростков в выборке. Помещение навески проростков в предварительно промаркированную керамическую ступку;

3. Добавление небольшого количество SDS-буфера из объема, рассчитанного на конкретный образец, растирание ткани в ступке с помощью пестика;
4. Гомогенизация растительной ткани с оставшимся объемом SDS-буфера до получения однородной суспензии;
5. Перенос 300 мкл лизата в 1,5 мл пробирки;
6. Добавление в каждую пробирку по 3 мкл РНКазы и перемешивание на вортексе;
7. Инкубирование смеси в течение 1 часа в термостате при температуре 60 °С;
8. Охлаждение пробирок на льду в течение одной минуты;
9. Добавление по 100 мкл 5М ацетата аммония в каждую пробирку, их перемешивание на вортексе в течение 20 секунд;
10. Центрифугирование смеси в течение пяти минут при 13000 оборотах;
11. Перенос супернатанта в полном объеме в чистые 1,5 мл пробирки;
12. Добавление 300 мкл изопропанола и перемешивание пробирок переворачиванием несколько раз;
13. Центрифугирование смеси при 13000 оборотах в течение пяти минут;
14. Слив супернатанта и промакивание пробирок на фильтровальной бумаге;
15. Добавление 300 мкл 70%-ного этилового спирта и перемешивание пробирок переворачиванием несколько раз;
16. Центрифугирование в течение двух минут при 13000 оборотах. Удаление супернатанта и промакивание пробирок на фильтровальной бумаге;
17. Сушка открытых пробирок при 37 °С в течение 15 минут до полного испарения спирта;

18. Растворение высушенного осадка в 50 мкл ТЕ буфера, перемешивание на вортексе и прогревание пробирок в термостате при 65 °С в течение пяти минут.

Электрофореграмма полученных ДНК-проб из «балк-образцов» с использованием модифицированного SDS-метода приведена на рисунке 7.

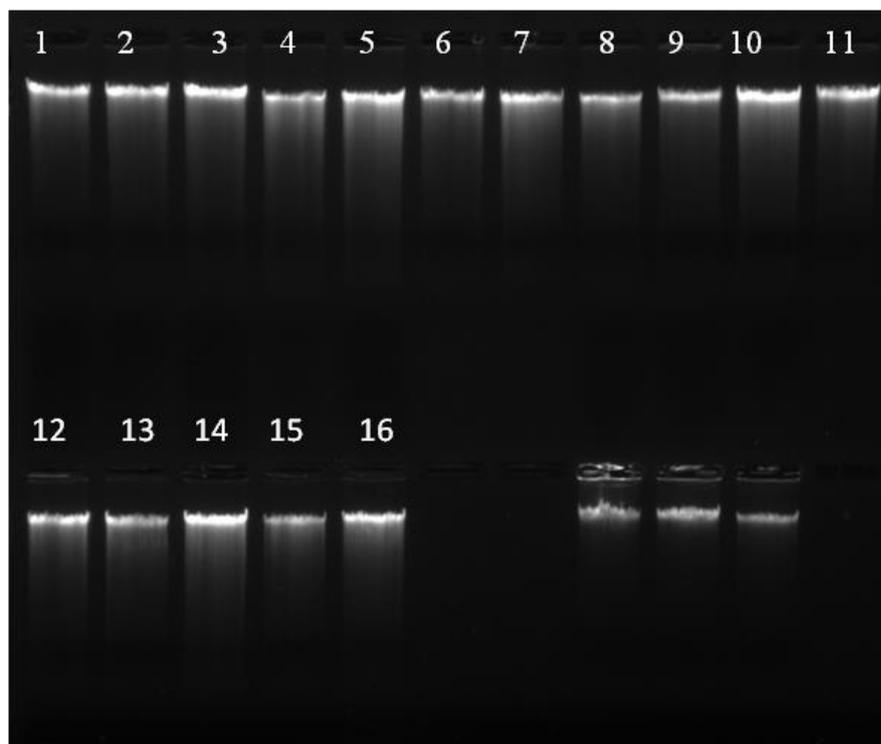


Рисунок 7 – Электрофореграмма геномной ДНК суммарных навесок («балк-образцов») сортов райграса пастбищного и райграса однолетнего, где 1 – Агат; 2 – ВИК-66; 3 – Выль; 4 – Вея; 5 – ВИК-22; 6 – Веймар; 7 – Дуэт; 8 – Карат; 9 – Ленинградский 809; 10 – ВИК-66; 11 – Феникс; 12 – Sprint; 13 – Изорский; 14 – Raznovsky; 15 – Московский 74; 16 – Рапид.

Выделение геномной ДНК из индивидуальных растений осуществлялось по аналогичному протоколу с некоторыми модификациями. Так, гомогенизация единичных проростков выполнялась с помощью стальных шариков в пробирках на гомогенизаторе Tissue Lyser LT («Qiagen», ФРГ). Конечный объем лизирующего (SDS) буфера составлял 300 мкл. На рисунке 8 изображена электрофореграмма геномной ДНК, полученная из образцов индивидуальных проростков семян фестулолиума.

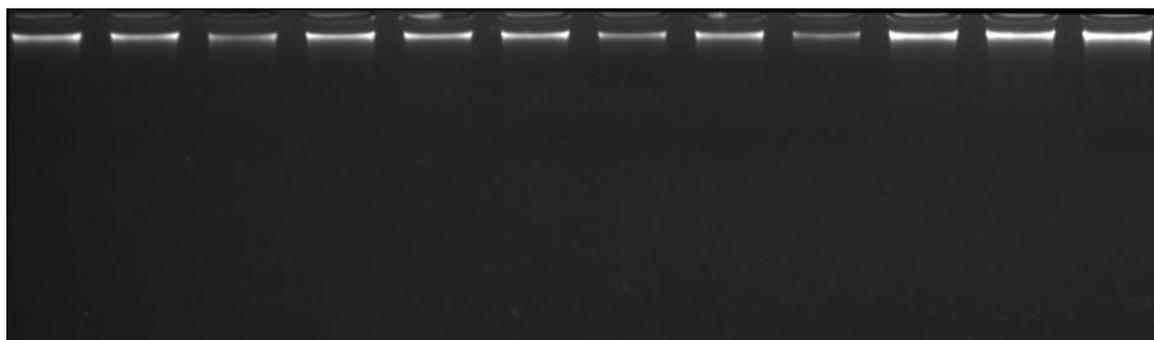


Рисунок 8 – Электрофореграмма образцов геномной ДНК, полученной из индивидуальных проростков фестулолиума сорта Пилигрим.

Количественные показатели геномной ДНК, определенные с помощью спектрофотометра, приведены в таблице 5. Финальную концентрацию образцов перед использованием в ПЦР доводили до 30 нг/мкл, путём разбавления ТЕ буфером.

Таблица 5 – Концентрация и чистота геномной ДНК «балк-образцов» райграса пастбищного, райграса однолетнего и фестулолиума

№	Образец	Концентрация , (нг/мкл)	Показатель чистоты выделенной ДНК		Конечная концентрация , (нг/мкл)
			$\lambda 260/$ $\lambda 280$	$\lambda 260/$ $\lambda 230$	
Райграс пастбищный (<i>Lolium perenne</i> L.)					
1	Агат	157,5	1,93	1,50	30
2	Дуэт	179,9	1,89	1,24	30
3	ВИК 66	140,5	1,94	1,67	30
4	Карат	153,6	1,91	0,95	30
5	Феникс	195,0	1,90	1,56	30
6	ВИК 22	219,9	1,92	1,30	30

7	Ленинградский 809	127,3	1,92	1,40	30
8	Вея	151,9	1,94	1,57	30
9	Веймар	141,9	1,92	1,33	30
10	ВЫЛЬ	163,3	1,93	1,66	30
	Среднее	163,1	1,92	1,42	30
Райграс однолетний (<i>Lolium multiflorum</i> Lam.)					
11	Рапид	149,7	1,91	1,36	30
12	Московский 74	165,5	1,91	1,28	30
13	Roznovsky	165,5	1,91	1,59	30
14	Sprint	144,8	1,90	1,30	30
15	Изорский	142,0	1,90	1,36	30
	Среднее	153,5	1,91	1,38	30
Фестулолиум (\times <i>Festulolium</i> F. Aschers. et Graebn.)					
16	Аллегро	223,2	1,90	1,49	30
17	Пилигрим	237,3	1,90	1,59	30
18	Айвенго	178,3	1,90	1,23	30
19	ВИК-90	177,2	1,89	1,53	30
20	Фест	274,0	1,89	1,49	30
21	Кафес	200,4	1,90	1,34	30
22	Синта	213,6	1,90	1,69	30
23	Аэлита	308,3	1,89	1,29	30
24	Дебют	193,9	1,91	1,48	30
25	Изумрудный	250,1	1,90	1,83	30
	Среднее	225,6	1,90	1,50	30

Согласно спектрофотометрическому анализу геномной ДНК, полученной из «балк-образцов», значение отношения поглощений на длинах волн 260 и 280 нм ($\lambda_{260}/\lambda_{280}$), характеризующее чистоту препарата от

примесей белков и фенолов, в среднем составляло 1,91. Поглощение на длине волны 230 нм может быть вызвано загрязнением полисахаридами (Гучетль и др., 2021). В препаратах ДНК райграса и фестулолиума среднее значение показателя отношения длин волн 260 и 230 нм ($\lambda_{260}/\lambda_{230}$) равнялось 1,39. Средняя концентрация геномной ДНК составляла 163,1 нг/мкл для образцов райграса пастбищного, 153,5 нг/мкл для образцов райграса однолетнего и 225,6 нг/мкл для образцов фестулолиума. При этом средние значения концентраций ДНК-препаратов, полученных из отдельных генотипов, составляли 100 нг/мкл для образцов райграса пастбищного, 100 нг/мкл для райграса однолетнего и 30 нг/мкл для фестулолиума.

Таким образом, метод на основе SDS-лизирующего буфера с модификациями позволяет получить образцы геномной ДНК злаковых трав, пригодные для последующего применения в полимеразной цепной реакции.

3.2. Модификация условий ПЦР для оценки межсортового и внутрисортового полиморфизма

Оптимизация условий проведения ПЦР-анализа является одним из важных этапов создания адаптированных методов идентификации и паспортизации злаковых культур. В нашем исследовании с этой целью осуществлен подбор оптимальных температурных режимов амплификации с праймерами к используемым SSR и SCoT-маркерам, определен эффективный компонентный состав реакционных смесей, а также испытаны различные способы детекции продуктов ПЦР.

Так, для амплификации микростеллитных маркеров в реакционной смеси для проведения ПЦР объемом 20 мкл содержалось: 3 мкл 10×Taq Turbo buffer, 0,4 мкл 50x dNTP mix (10 mM каждого из дезоксирибонуклеотидов), 0,3 мкл Taq-ДНК полимеразы 5 е. а./мкл, 1 мкл образца ДНК 30 нг/мкл, а также по 1 мкл каждого праймера (10 мкМ) и 13,3 мкл деионизированной воды. Все реагенты производства компании ООО «Евроген Лаб» (Россия). ПЦР осуществлялась на приборе Bio-Rad T100 («Bio-Rad», США). Для

амплификации всех SSR-локусов использовалась программа ступенчатой ПЦР (Touchdown-PCR).

Условия ПЦР для SSR-локусов с 1-6 (см. табл. 2) были следующие: начальная денатурация при 94°C в течение 5 минут; 10 циклов, включающих денатурацию при 94°C в течение 1 минуты, отжиг (для локуса LPSSRh01h06 63,8°C, для локуса LPSSRh03b01 56,3°C, для локуса LPSSRk12d11 73,1°C, для локуса LPSSRk02e08 71,8°C, для локуса LPSSRk03b03 72,0°C, и для локуса LPSSRk15h05 68,9°C) в течение 1 минуты со снижением температуры на 1°C в каждом последующем цикле и элонгация при 72°C в течение 1 минуты; далее 30 циклов с наработкой целевого продукта, состоящих из денатурации при 94°C в течение 1 минуты, отжиг праймеров (температуры отжига соответствуют представленным в таблице 2) в течение 1 минуты и элонгации при 72°C в течение 1 минуты; финишная элонгация при 72°C в течение 5 минут. Для данного набора SSR-маркеров температура отжига подбиралась индивидуально с использованием онлайн-программы Tm Calculator (NEB Tm Calculator, <https://tmcalsculator.neb.com/#!/main>).

Программа амплификации для микросателлитных локусов с 7 по 14 (см. табл. 2) включала следующие этапы: начальная денатурация при 94°C в течение 1 минуты; двенадцать циклов, включающих денатурацию при 94°C в течение 1 минуты, отжиг при 72°C в течение 1 минуты со снижением температуры на 1°C в каждом последующем цикле, и элонгация при 72°C в течение 1 минуты; затем следовали тридцать основных циклов, включающих денатурацию при 94°C в течение 1 минуты, отжиг при 60°C в течение 1 минуты и элонгацию 72°C в течение 1 минуты; финишная элонгация при 72°C в течение 5 минут.

Для маркеров с 15 по 20 (см. табл. 2) режим амплификации состоял из следующих этапов: начальная денатурация при 94°C в течение 3 минут; десять циклов, включающих денатурацию при 94°C в течение 30 секунд, отжиг при 65°C в течение 30 секунд со снижением температуры на 1°C в каждом последующем цикле, и элонгация при 72°C в течение 30 секунд; затем

следовали тридцать основных циклов, включающих денатурацию при 94°C в течение 30 секунд, отжиг при 55°C в течение 30 секунд и элонгацию при 72°C в течение 30 секунд; финишная элонгация при 72 °С в течение 5 минут.

Полученные ПЦР-продукты разделяли в 1,6-процентном агарозном геле при 50 Вольт в течение 2 часов (рис. 9).

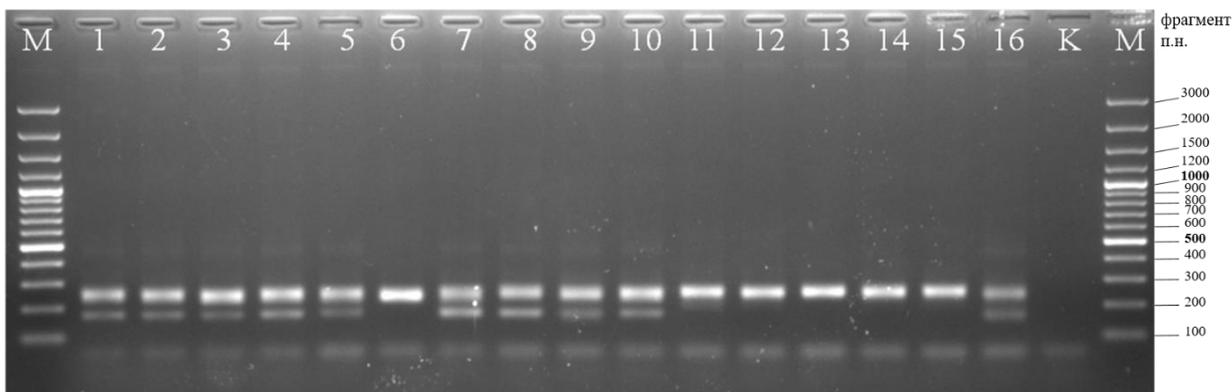


Рисунок 9 – Электрофореграмма продуктов амплификации образцов ДНК сортов райграса пастбищного и однолетнего с SSR-маркером AJ872206 (1,6 %-ный раствор агарозного геля), где М — маркер молекулярной массы 100 bp GeneRuler DNA Ladder («Thermo Fisher Scientific», США). 1–15 — сорта: Агат, Дуэт, ВИК 66, Карат, Феникс, ВИК 22, Ленинградский 809, Вея, Веймар, Выль, Рапид, Московский 74, Roznovsky, Sprint, Изорский; К — контроль (H₂O).

Размер полученных ПЦР-фрагментов определяли с использованием пакета программ Image Lab (версия 6.0.1) при сравнении с маркером молекулярного веса 100 bp Ladder GeneRuler («Thermo Fisher Scientific», США). Для последующего анализа отбирали комбинации, позволяющие выявлять отчетливые продукты амплификации со всеми исследуемыми образцами. ПЦР-продукты, полученные с данными SSR-праймерами, разделяли с применением автоматической системы капиллярного электрофореза Qsep₁ Plus («Bioptic Inc.», Тайвань) и программного обеспечения Q-Analyzer.

В предварительных экспериментах осуществлен подбор оптимального компонентного состава смеси для амплификации образцов злаковых трав с применением SCoT-маркеров. Протестировано три варианта состава реакционной смеси с различным соотношением концентраций используемых реагентов (табл. 6). Для оценки пригодности ПЦР-смеси оценивали четкость и воспроизводимость получаемых продуктов амплификации с использованием 3 SCoT-маркеров. Все применяемые при создании различных вариантов реакционной смеси реактивы были произведены компанией ООО «Евроген Лаб» (Россия). Для амплификации использовали термоциклёр T100 («Bio-Rad», США).

Таблица 6 – Состав компонентов в испытанных ПЦР-смесях для амплификации злаковых трав с использованием SCoT-маркеров

Вариант	Состав компонентов ПЦР-смеси	Общий объём ПЦР-смеси, мкл
А	3 мкл 10×Taq Turbo buffer, 1 мкл 50x dNTP mix (10 mM каждого из дезоксинуклеотидов), 0,2 мкл Taq-ДНК полимеразы 5 е. а./мкл, 0,1 мкл праймера (8 мкМ), 1 мкл ДНК (30 нг/мкл), 9 мкл деионизированной воды.	14,3
Б	1 мкл 10×Taq Turbo buffer, 0,5 мкл dNTP mix (10 mM каждого из дезоксинуклеотидов), 0,1 мкл Taq-ДНК полимеразы 5 е. а./мкл, 1 мкл праймера (8 мкМ), 1 мкл ДНК (30 нг/мкл), 6,4 мкл деионизированной воды.	10
В	2 мкл 10×Taq Turbo buffer, 0,4 мкл 50x dNTP mix (10 mM каждого из дезоксинуклеотидов), 0,2 мкл Taq-ДНК полимеразы 5 е. а./мкл, 1 мкл ДНК (30 нг/мкл), 1 мкл праймера (8 мкМ), 15,4 мкл деионизированной воды.	20

По итогам проведенного тестирования, вариант ПЦР-смеси «В» (см. табл. 6) продемонстрировал наилучшие результаты по четкости и воспроизводимости продуктов амплификации и был отобран в качестве основного для использования в последующем анализе образцов злаковых трав (рис. 10).

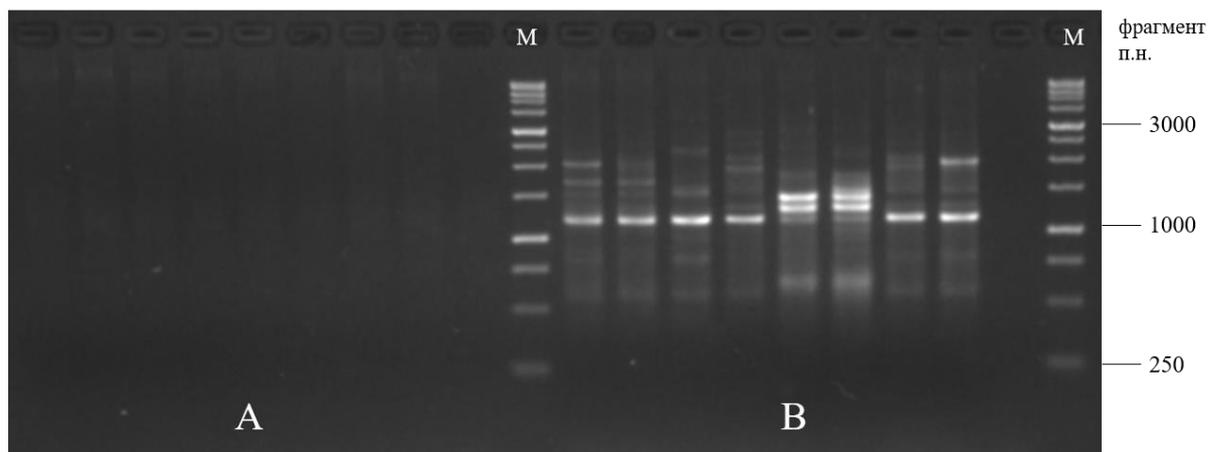


Рисунок 10 – Электрофореграмма продуктов амплификации образцов ДНК злаковых трав с маркером SCoT 02, полученных с использованием различных ПЦР-смесей, где А – вариант ПЦР-смеси «А» (см.табл. 6); В – вариант ПЦР-смеси «В»; М – маркер молекулярной массы 1 kb DNA Ladder (ЗАО «Евроген», Россия).

Условия ПЦР соответствовали рекомендованным авторами-разработчиками SCoT-маркеров (Collard, Mickel, 2009): 3 мин при 94 °С; 1 мин при 94 °С, 1 мин при 50 °С и 1 мин при 72 °С (35 циклов); 5 мин при 72 °С. Полученные ПЦР-продукты разделяли в 1,6%-ном агарозном геле при напряжении 50 Вольт в течение 2 часов, а затем с помощью программного обеспечения Image Lab (версия 6.0.1) определяли их размеры в сравнении с маркером молекулярного веса 1 kb DNA Ladder (ЗАО «Евроген», Россия) (рис. 11).

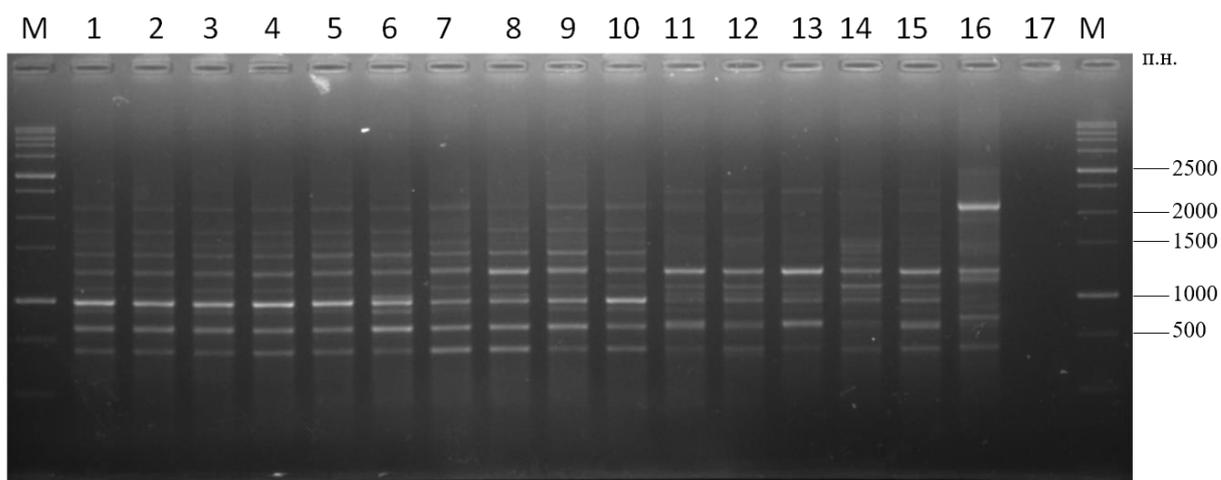


Рисунок 11 – Электрофореграмма продуктов амплификации образцов ДНК сортов райграса со SCoT-маркером **SCoT 32**, где М — маркер молекулярной массы 1 kb DNA Ladder (ЗАО «Евроген», Россия), 1–15 — сорта: Агат, Дуэт, ВИК 66, Карат, Феникс, ВИК 22, Ленинградский 809, Вея, Веймар, Вьль, Рапид, Московский 74, Roznovsky, Sprint, Изорский; 17 — контроль (H₂O).

Для проверки воспроизводимости результатов SSR- и SCoT-анализов проведены трехкратные повторности экспериментов с использованием в качестве матрицы образцов ДНК, полученных из различных выборок проростков сортов злаковых трав.

3.3. Анализ сортов райграса пастбищного с использованием SSR-маркеров

3.3.1. Отбор информативных маркеров для дифференциации сортов райграса пастбищного

Из общего числа протестированных микросателлитных локусов для последующего анализа отобрано 7 (35 %) информативных, позволяющих получить полиморфные, отчетливые и воспроизводимые ПЦР-продукты (табл. 7).

Таблица 7 – Характеристика информативных SSR-локусов, выделенных для анализа сортов райграса пастбищного

№	SSR-локус	Код маркера	Общее кол-во ПЦР-продуктов	Кол-во полиморфных ПЦР-продуктов	Процент полиморфизма	Диапазон размеров ПЦР-продуктов, п.н.
1	G05_044	A	14	14	100,0	449-575
2	G07_058	B	31	31	100,0	286-431
3	G03_089	C	5	5	100,0	300-334
4	G04_092	D	14	14	100,0	188-243
5	AJ872206	E	13	13	100,0	143-263
6	LPSSRh01h06	F	5	4	80,0	141-188
7	LPSSRk03b03	G	6	6	100,0	276-306
Сумма			88	87	98,9	-
Среднее			12,6	12,4	97,1	-

С использованием информативных SSR-маркеров в общей сложности выявлено 88 аллелей, из которых 28 (31,8 %) оказались уникальными для отдельных сортов (рис. 12). Средний уровень полиморфизма исследуемой выборки оказался высоким и составил 97,1 %. Данное значение, вероятно, обусловлено использованием в качестве растительного материала «балк-образцов», а также полиплоидной природой объекта исследования. Размер аллелей, определенный в нашем исследовании, находился в диапазоне от 141 до 575 п.н. Наибольшим количеством продуктов амплификации (31) выделялся маркер G07_058, тогда как наименьшим числом (5) характеризовались локусы G03_089 и LPSSRh01h06.

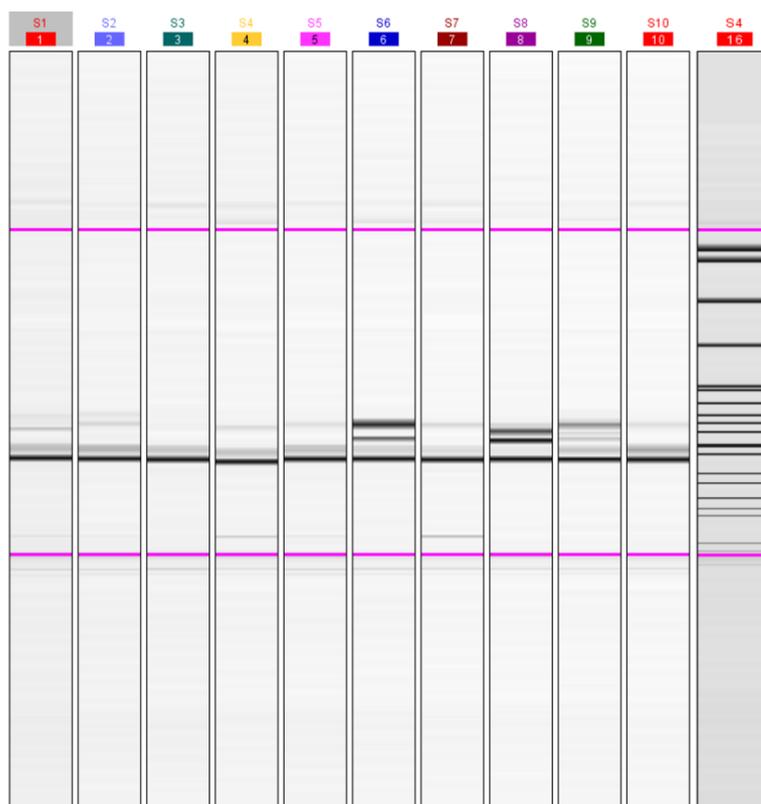


Рисунок 12 – Схема электрофореграммы продуктов амплификации образцов райграса пастбищного с SSR-локусом LPSSRh01h06 по результатам детекции с использованием системы капиллярного электрофореза Qsep₁ Plus: 1 – Агат; 2 – Дуэт; 3 – ВИК 66; 4 – Карат; 5 – Феникс; 6 – ВИК 22; 7 – Ленинградский 809; 8 – Вея; 9 – Веймар; 10 – Выль; 16 – Маркер молекулярной массы С109200.

По результатам SSR-анализа сортов райграса пастбищного определены показатели генетической изменчивости (табл. 8). Значение эффективного числа аллелей варьировало от 1,14 (для маркера LPSSRh01h06) до 1,51 (для маркера G04_092) и в среднем составляло 1,34. Максимальный показатель гетерозиготности равнялся 0,30 при использовании SSR-локуса G03_089, а минимальный (0,11) получен с маркером LPSSRh01h06.

Таблица 8 – Показатели эффективности SSR-локусов по результатам анализа сортов райграса пастбищного

Название маркера	Эффективное число аллелей (N_e)	Показатель гетерозиготности (H_e)	Показатель информативности примеров (PIC)	Показатель разрешающей способности маркера (R_p)
G05_044	1,26	0,20	0,28	6,0
G07_058	1,24	0,18	0,27	12,2
G03_089	1,51	0,30	0,37	2,4
G04_092	1,40	0,26	0,33	7,6
AJ872206	1,36	0,23	0,32	6,6
LPSSRh01h06	1,14	0,11	0,34	1,2
LPSSRk03b03	1,47	0,30	0,35	3,8
Среднее	1,34	0,23	0,32	5,7

Средние значения эффективного количества аллелей и уровня гетерозиготности, полученные в нашем исследовании, были значительно ниже, чем значения, определенные в работах других авторов при генотипировании образцов райграса с использованием SSR-маркеров (Pasquali et al., 2022). Вероятно, существенные различия в результатах анализа можно объяснить спецификой используемого в нашей работе материала и особенностями применения «балк-стратегии», которая не всегда дает возможность учета редких аллелей, встречающихся в популяции (Kölliker et al., 2001).

Величина меры информационного полиморфизма, характеризующая способность маркера выявлять различия на генетическом уровне, по результатам нашего анализа в среднем составляла 0,32 и варьировала от 0,27 (SSR локус G07_058) до 0,37 (SSR локус G03_089). Показатель разрешающей

способности праймеров, позволяющий выявлять полиморфизм у большого числа генотипов, при использовании микросателлитных маркеров в среднем составлял 5,7. Наибольшим значением данного показателя (12,2) характеризовался локус G07_058, наименьшим (1,2) – локус LPSSRh01h06.

В целом, используемые SSR-маркеры продемонстрировали достаточный дискриминационный потенциал для успешного использования при изучении генетического разнообразия сортов райграса пастбищного.

3.3.2. Анализ внутрисортного ДНК-полиморфизма сортов райграса пастбищного

Райграс пастбищный и райграс однолетний относятся к перекрестноопыляемым видам с гаметофитной системой смонесовместимости, контролируемой двумя локусами генов, каждый из которых имеет несколько аллельных вариантов (Huff, 1997). Данное свойство культур приводит к высокой генетической гетерогенности внутри их популяций. По этой причине важным этапом технологии паспортизации сортов из культур злаковых трав является оценка их однородности.

В настоящее время однородность сорта райграса пастбищного при проведении ОСС-тестов определяется относительно фактической однородности общеизвестного сорта. При этом изменчивость сорта-кандидата не должна превышать дисперсию общеизвестного сорта в 1,6 раза (Методика проведения испытаний на отличимость, однородность и стабильность..., 2011). Однако в методиках проведения тестов на отличимость, однородность и стабильность для злаковых трав отсутствует предельное значение по количеству биотипов, которое должно определяться у сорта-кандидата. Кроме того, нет общепринятой методики для способов определения однородности, основанных на молекулярно-генетических технологиях для перекрестноопыляемых видов. Ряд исследователей считают, что создание универсальной системы проведения ОСС-тестов для перекрестноопыляемых

видов злаковых трав с использованием молекулярных технологий является одной из важных и актуальных задач (Wang et al., 2016; Kubik et al., 2001; Roldán-Ruiz et al., 2000). Её разработка и внедрение может существенно снизить затраты на проведение ООС-тестов, повысить их точность, а также обеспечить более надежную защиту авторских прав для селекционеров.

Для определения однородности различных сортов злаковых трав в зависимости от выбранной системы маркеров, объема выборки и типа растительного материала исследователи используют разные методы. Например, методику присвоения или анализ молекулярной дисперсии между и внутри сортов (AMOVA) (Wang et al., 2016).

В нашем исследовании оценку однородности осуществляли для трёх сортов райграса пастбищного (Агат, Карат, Феникс), каждый из которых был представлен 30 генотипами. В качестве системы маркирования использовали микросателлитные локусы, определенные как полиморфные в предварительных экспериментах.

По результатам анализа для каждого сорта райграса пастбищного определяли общее количество выявленных ДНК-спектров или биотипов (табл. 9). Сорт Агат селекции ФНЦ «ВИК им В.Р. Вильямса» характеризовался наименьшим числом обнаруженных ДНК-профилей с использованием SSR-локусов, было выявлено 37 различных вариантов. Напротив, при амплификации образца геномной ДНК сорта Карат (оригинатор – ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса») обнаружено 46 ДНК-спектров. Сорт Феникс, также выведенный в ФНЦ «ВИК им В.Р. Вильямса», обладает 42 уникальными ДНК-профилями по исследованным локусам. Сорта Карат и Феникс имеют большее количество уникальных спектров ДНК, вероятно, вследствие использования метода сложногибридных популяций при их выведении. Данный метод основан на гибридизации разных популяций, представленных сортами, биотипами или клонами с определенными хозяйственно-ценными признаками или происхождением из разных географических регионов. Более однородный

по изучаемым локусам сорт Агат был выведен путём скрещивания сортов ВИК 66 и Дуэт, с последующим отбором по комплексу признаков.

Таблица 9 – Количество выявленных биотипов в выборке семян сортов райграса пастбищного

Название сорта/SSR-локус	Количество ДНК-спектров			Всего
	G03_089	G04_092	G07_058	
Агат	8	15	14	37
Карат	9	18	19	46
Феникс	8	26	8	42

Для изучения изменчивости генотипов райграса пастбищного использовался анализ молекулярной дисперсии (Analysis of Molecular Variance, AMOVA). Данный алгоритм основан на оценке генетических дистанций между особями, полученными из разных популяций или сортов. AMOVA позволяет определить долю общей генетической вариации между сортами (межсортовая дисперсия), и долю внутри популяций (внутрисортовая дисперсия) (Excoffier et al., 1992).

Анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) продемонстрировал более высокий уровень генетической изменчивости внутри сортов – 87 %, тогда как между сортами этот показатель составил 12 % (табл. 10).

Таблица 10 – Результаты анализа молекулярной дисперсии (AMOVA) общего генетического разнообразия трёх сортов райграса пастбищного

Источник разнообразия	Число степеней свободы (df)	Сумма квадратов (SS)	Доля в общей дисперсии		<i>P</i>
			абс. значения	%	
Между сортами	2	45,6	0,635	12	0,001
Внутри сортов	82	392	4,781	88	-
Всего	84	437,6	5,417	100	-

Полученные данные по соотношению степени внутривидовой и межсортовой генетической изменчивости, вероятно, обусловлены перекрестноопыляемой природой райграса (рис. 12). Также они соответствуют результатам проведенных ранее исследований, где большая часть дисперсии объяснялась различиями внутри популяций и сортов (Nie et al., 2019; Kubik et al., 2001).

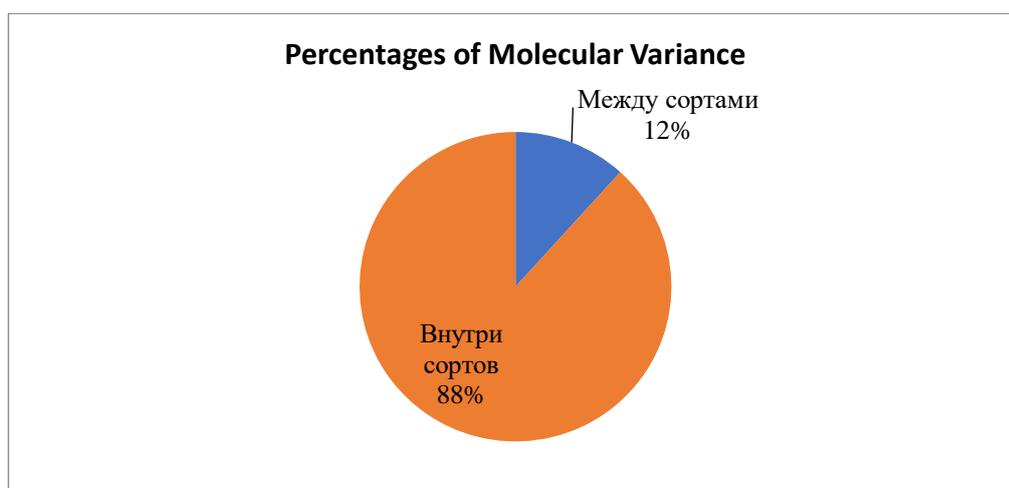


Рисунок 12 – Результаты анализа общего генетического разнообразия (AMOVA) сортов райграса пастбищного, представленные в виде диаграммы.

С помощью анализа главных координат (Principal Coordinate Analysis, PCoA) и программного пакета GenAlEx (версия 6.2) (Peakall, Smouse, 2006) визуализировали генетические взаимосвязи между исследуемыми образцами (рис. 12). Данный метод позволяет наглядно отобразить сходство или различие между объектами в пространстве наименьшего числа координат. Он используется для снижения размерности данных и выявления основных структур в наборах данных, которые могут быть не обнаружены при применении других алгоритмов анализа. По результатам анализа, значения первых двух координат PCoA графика составляли 15 % и 26 %. Таким образом, суммарно они объясняют 41 % общей молекулярной дисперсии.

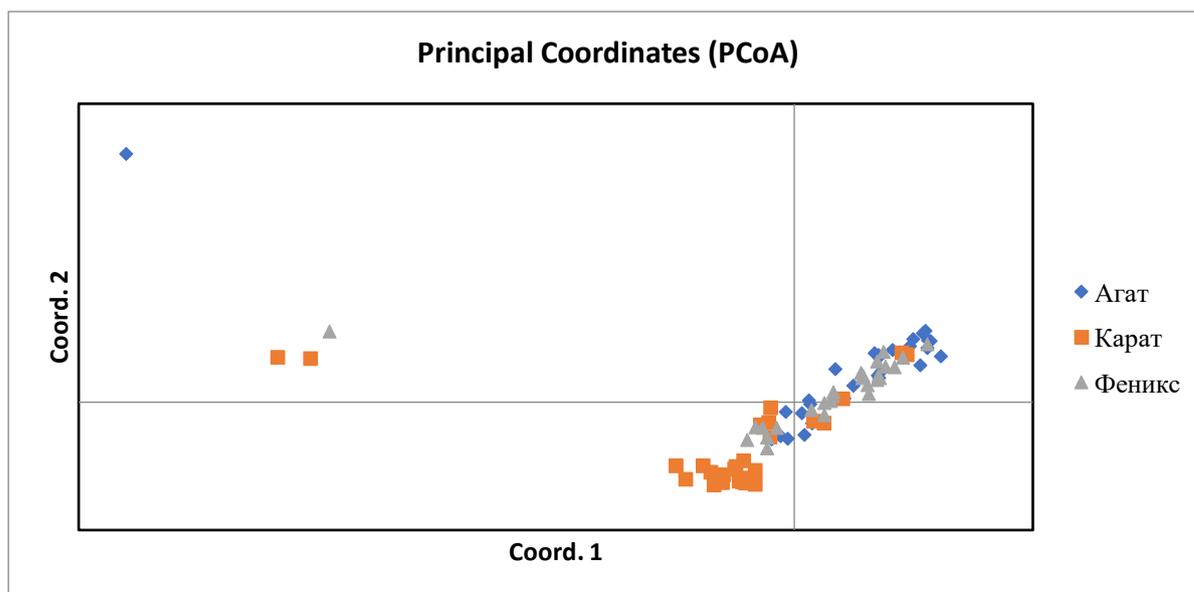


Рисунок 13 – PCoA-анализ результатов генотипирования сортов райграса пастбищного с использованием SSR-локусов. Цветовые коды соответствуют изучаемым сортам: синий – Агат; оранжевый – Карат; серый – Феникс.

На графике главных координат выраженных различий между исследованными сортами не наблюдается. Выявленное сходство, вероятно, является следствием их генетического родства и общей селекционной истории.

Таким образом, анализ однородности ценных отечественных сортов райграса пастбищного с использованием SSR-локусов продемонстрировал их сложную генетическую структуру, которая выражается в большом количестве присутствующих биотипов и высокой доле внутрисортовой изменчивости.

3.3.3. Изучение особенностей генетической структуры коллекции сортов райграса пастбищного по результатам анализа с использованием SSR-маркеров

Информация о составе аллелей и показатели генетических дистанций между исследованными сортами райграса пастбищного послужили основой для построения дендрограммы методом ближайших соседей (Neighbor-Joining, NJ) (рис. 14). Данный алгоритм используется для визуализации иерархической структуры данных. Метод ближайших соседей позволяет определить расстояние между кластерами путем измерения расстояния между ближайшими соседями в каждом кластере. Этот метод особенно полезен в случаях, когда количество кластеров заранее неизвестно (Saitou N., Nei M., 1987).

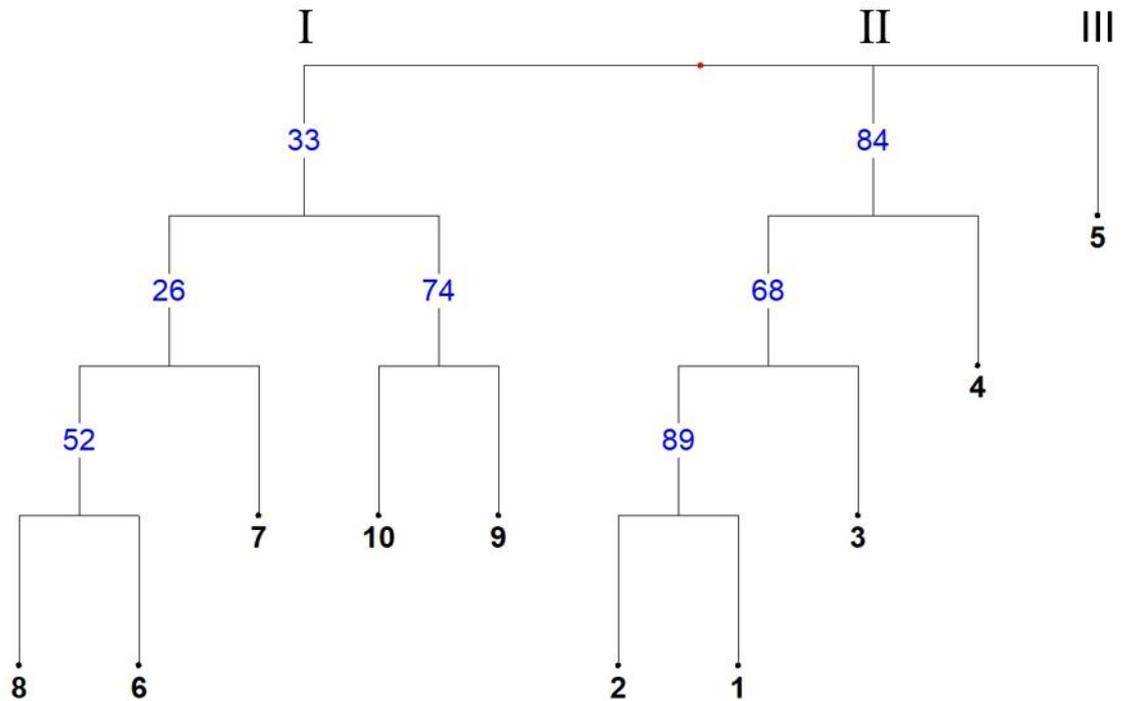


Рисунок 14 – Дендрограмма генетического сходства сортов райграса пастбищного по результатам анализа с применением SSR-маркеров: 1 – Агат; 2 – Дуэт; 3 – ВИК 66; 4 – Карат; 5 – Феникс; 6 – ВИК 22; 7 – Ленинградский 809; 8 – Вея; 9 – Веймар; 10 – Выль. Римскими цифрами обозначены соответствующие кластеры.

Дендрограмма на основе генетических дистанций (рис. 14) распределила исследуемые сорта по трём кластерам.

В первом кластере оказались образцы происхождения из разных географических регионов страны, но обладающие общим ценным признаком, – повышенной зимостойкостью. Так, с 52-процентной бутстреп-поддержкой в первой подгруппе первого кластера объединились сорта Вея и ВИК 22. Возможно, их генетическая близость обусловлена схожим географическим происхождением исходного материала, поскольку сорт Вея получен в Калининградском НИИСХ, а для селекции диплоидного сорта ВИК 22 использовались дикорастущие формы райграса из Прибалтики. Помимо них в данной подгруппе присутствует образец Ленинградский 809, полученный в ФГБНУ «ФИЦ картофеля имени А.Г. Лорха». Во второй подгруппе первого

кластера наблюдается объединение диплоидного сорта Веймар селекции ФГБНУ «Федеральный научный центр лубяных культур» и тетраплоидного сорта Выль, созданного селекционерами из ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса» и ФИЦ Коми НЦ УрО РАН (бутстреп-поддержка 74 %).

Во втором кластере дендрограммы расположились тетраплоидные образцы райграса пастбищного селекции ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса». Образцы Агат, Дуэт и ВИК 66 выделились в отдельную подгруппу с 68-процентной бутстреп-поддержкой. Вероятно, их генетическая близость обусловлена наличием общих источников исходного материала при селекции данных образцов. Так, сорта ВИК 66 и Дуэт выведены с использованием исходных дикорастущих форм из Карелии, Тамбовской и Ленинградской области. Сорт Агат получен на основе сорта ВИК 66 на искусственном инфекционном фоне путем отбора форм, наиболее устойчивых к основным заболеваниям и неблагоприятным условиям перезимовки. Помимо них в данном кластере с 84-процентной бутстреп-поддержкой оказался высокоурожайный и зимостойкий сорт Карат.

Генетически удаленным от исследуемых образцов оказался тетраплоидный сорт Феникс, выведенный из сложно-гибридных популяций методом отбора по признакам долголетия и зимостойкости.

Structure 2.3.4 - это программное обеспечение, используемое для анализа популяционных данных, а именно для филогенетических исследований и реконструкции популяционной истории (Pritchard et al., 2000; Falush et al., 2003). Она использует различные методы моделирования. Например, алгоритм Evanno, основанный на применении байесовского анализа для определения эволюционных моделей, которые наилучшим образом объясняют наблюдаемые данные (Evanno et al., 2005).

Анализ полученных нами результатов в данной программе методом Evanno с помощью онлайн-ресурса Structure Harvester показал, что наиболее вероятным оказывается разделение исследуемой коллекции райграса пастбищного на 6 кластеров ($K=6$) (рис. 15).

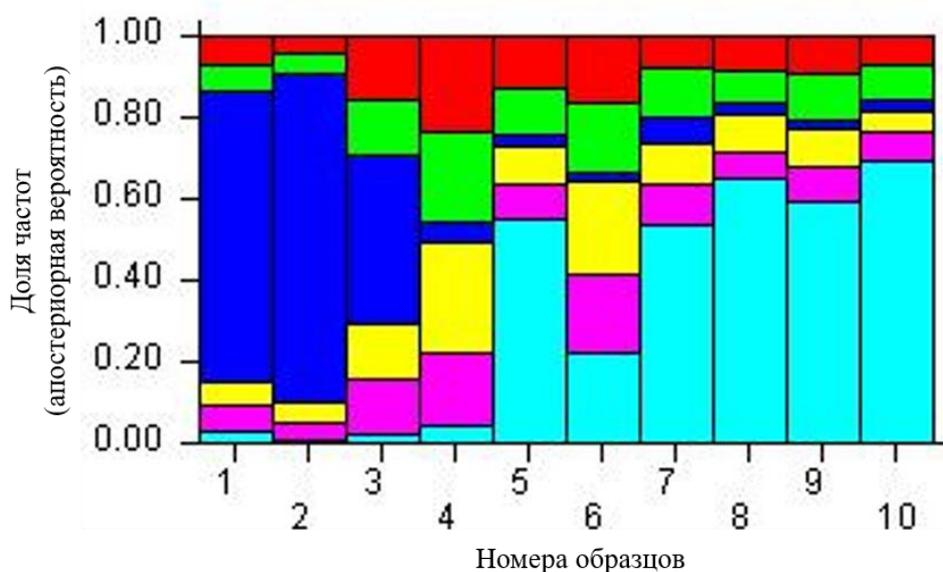


Рисунок 15 – Генетическая структура сортов райграса пастбищного по результатам генотипирования с использованием SSR-маркеров: 1 – Агат; 2 – Дуэт; 3 – ВИК 66; 4 – Карат; 5 – Феникс; 6 – ВИК 22; 7 – Ленинградский 809; 8 – Вея; 9 – Веймар; 10 – Выль. Цветовые коды соответствуют выявленным кластерам.

Как и при построении дендрограммы генетического сходства, в коллекции образцов райграса пастбищного наблюдается дифференциация сортов в соответствии с их происхождением и основными хозяйственно ценными признаками. При этом схожей генетической структурой обладают тетраплоидные образцы, полученные в ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса» (Агат, Дуэт, ВИК 66), а также зимостойкие сорта происхождения из разных географических регионов страны (Ленинградский 809, Вея, Веймар, Выль). Несколько отличались по генетической структуре сорта, полученные из сложно-гибридных популяций Карат и Феникс.

Таким образом, установлено, что предложенный нами набор SSR-маркеров обладает необходимым дискриминационным потенциалом для различения российских сортов райграса пастбищного.

3.4. Анализ сортов райграса пастбищного с использованием SCoT-маркеров

3.4.1. Отбор информативных маркеров для дифференциации сортов райграса пастбищного

Из 25 праймеров, разработанных для SCoT-маркеров и включенных в исследование, 8 оказались информативными, генерирующими отчетливые, полиморфные и воспроизводимые продукты амплификации (табл. 11).

Таблица 11 – Информативные SCoT-маркеры для анализа сортов райграса пастбищного

№	Название маркера	Общее кол-во ПЦР-продуктов	Кол-во полиморфных ПЦР-продуктов	Процент полиморфизма	Диапазон размеров ПЦР-продуктов, п.н.
1	SCoT 06	5	4	80,0	1500-2299
2	SCoT 13	4	1	25,0	1576-2348
3	SCoT 15	5	3	60,0	783-1265
4	SCoT 17	6	3	50,0	898-2234
5	SCoT 20	7	3	42,9	889-2443
6	SCoT 23	3	1	33,3	1450-1685
7	SCoT 32	6	1	16,7	424-957
8	SCoT 35	6	2	33,3	516-1473
Сумма		42	18	-	-
Среднее		5,3	2,3	44,0	-

Всего для 8 SCoT-маркеров удалось получить 42 ПЦР-продукта, из которых 13 (72,2 %) являлись сортоспецифичными. Уровень полиморфизма в среднем равнялся 44,4 %. Размер обнаруженных ПЦР-продуктов варьировал от 424 до 2443 п.н. Максимальным числом полиморфных фрагментов

амплификации (4) отмечен маркер SCoT 06. В среднем для одного SCoT-маркера получили 2,3 полиморфных фрагментов амплифицированной ДНК, из которых 1,6 являлись сортоспецифичными.

Показатель информативности праймеров находился в диапазоне от 0,22 (для маркера SCoT 06) до 0,37 (для маркера SCoT 35) (табл. 12). Максимальная разрешающая способность (1,4) определена для маркера SCoT 17, минимальная (0,2) – для маркеров SCoT 13 и SCoT 32. Средние значения эффективного числа аллелей и генного разнообразия по Нею составляли 1,14 и 0,09 соответственно.

Таблица 12 – Показатели информативности SCoT-маркеров для анализа сортов райграса пастбищного

Название маркера	Эффективное число аллелей (Ne)	Показатель гетерозиготности (He)	Показатель информативности праймеров (PIC)	Показатель разрешающей способности маркера (Rp)	Маркерный индекс (MI)
SCoT 06	1,140	0,113	0.22	1,2	0,014
SCoT 13	1,027	0,024	0.29	0,2	0,027
SCoT 15	1,065	0,058	0.30	0,6	0,023
SCoT 17	1,264	0,159	0.32	1,4	0,029
SCoT 20	1,178	0,115	0.33	1	0,028
SCoT 23	1,290	0,177	0.34	0,4	0,030
SCoT 32	1,018	0,016	0.35	0,2	0,022
SCoT 35	1,036	0,032	0.37	0,4	0,029
Среднее	1,14	0,09	0.22	0,7	0,025

Техника SCoT-маркирования оказалась эффективным инструментом для выявления полиморфизма между сортами райграса пастбищного. Полученные результаты могут быть использованы при разработке методов идентификации и паспортизации сортов, а информация о генетическом сходстве или различиях будет полезна при подборе родительских форм для селекционного процесса.

3.4.2. Изучение особенностей генетической структуры сортов райграса пастбищного по результатам анализа с использованием SCoT-маркеров

По результатам тестирования коллекции образцов райграса с помощью SCoT-маркеров осуществлен кластерный анализ на основе генетических дистанций с использованием метода ближайших соседей (Neighbor Joining method, NJ) (рис. 16).

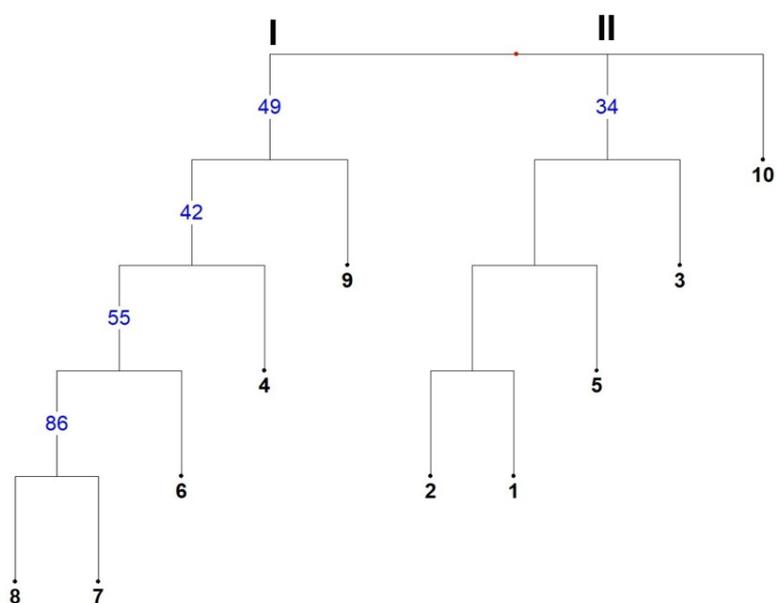


Рисунок 16 – Дендрограмма генетического сходства сортов райграса по результатам анализа с применением SCoT-маркеров: 1 – Агат; 2 – Дуэт; 3 – ВИК 66; 4 – Карат; 5 – Феникс; 6 – ВИК 22; 7 – Ленинградский 809; 8 – Вея; 9 – Веймар; 10 – Выль. Римскими цифрами обозначены соответствующие кластеры.

В результате кластеризации сортового материала выделены 2 отчетливые группы образцов с уровнем бутстреп-поддержки 49 и 34 % соответственно.

Первая группа – сорта Вея, Ленинградский 809, ВИК 22, Карат и Веймар. Среди них наиболее близкими с 86-процентной бутстреп-поддержкой оказались сорта Вея и Ленинградский 809. Вероятно, в исходном материале для селекции этих сортов присутствовали генетически близкие формы. В этом же кластере разместился диплоидный образец ВИК 22 (бутстреп-поддержка 55 %). Данный сорт характеризуется высокой внутрисортовой гетерогенностью, устойчивостью к частому и низкому скашиванию, поэтому пригоден для газонного использования.

Во второй группе объединились образцы райграса пастбищного селекции ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса» (Агат, Дуэт, ВИК 66, Феникс). Данные сорта являются тетраплоидными и большей частью получены методом полиплоидизации на основе дикорастущих или старинных местных диплоидных сортов.

Обособленным положением на ветвях генеалогического дерева характеризовался диплоидный сорт райграса пастбищного Веймар, выведенный в ФГБНУ «Федеральный научный центр лубяных культур» методом гибридизации сортов Моршанский 1, Вея и немецкого сортообразца (к-38941) с последующим отбором лучших биотипов.

Анализ результатов методом Evanno с помощью онлайн-ресурса Structure Harvester показал, что наиболее вероятным оказывается разделение исследуемой коллекции на 2 кластера (рис. 17). Структура частот аллелей распределилась, в основном, в соответствии с происхождением исследуемых сортов. При этом, как и при построении дендрограммы генетического сходства, в коллекции образцов райграса пастбищного выделялись сорта ВИК 22, Ленинградский 809, Вея, Веймар. На графике по результатам анализа также наблюдается значительное сходство аллельного состава у сортов,

выведенных в ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса» (Агат, Дуэт, ВИК 66, Карат, Феникс).

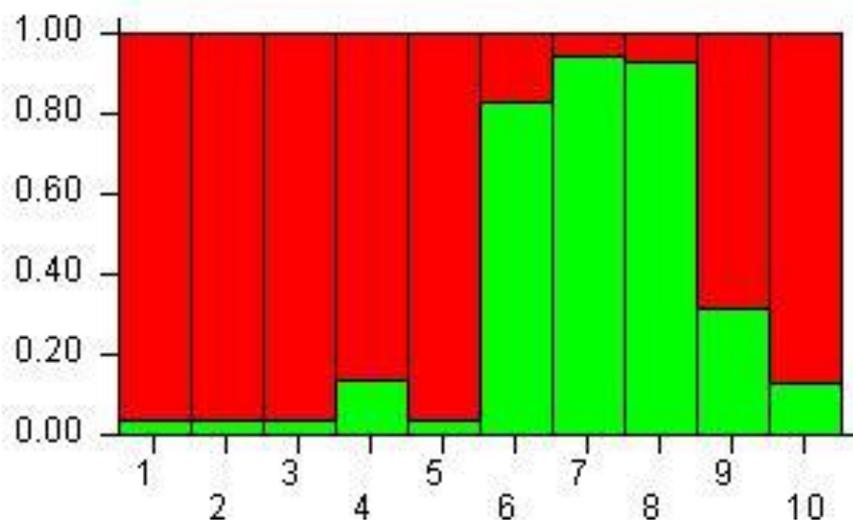


Рисунок 17 – Генетическая структура сортов райграса пастбищного по результатам генотипирования с использованием SCoT-маркеров: 1 – Агат; 2 – Дуэт; 3 – ВИК 66; 4 – Карат; 5 – Феникс; 6 – ВИК 22; 7 – Ленинградский 809; 8 – Вея; 9 – Веймар; 10 – Выль. Цветовые коды соответствуют выявленным кластерам.

По результатам анализа установлено, что SCoT-маркеры обладают необходимым дискриминационным потенциалом для дифференциации сортов райграса пастбищного отечественной селекции.

3.5. PCoA-анализ сортов райграса пастбищного на основе данных, полученных при генотипировании с использованием SSR- и SCoT-маркеров

На основе объединенных данных бинарных матриц (анализ с использованием SSR- и SCoT -маркеров) осуществлен анализ методом главных координат. PCoA-анализ отобразил в графической форме с минимальным искажением генетические взаимосвязи между образцами исследуемой коллекции райграса пастбищного (рис. 18).

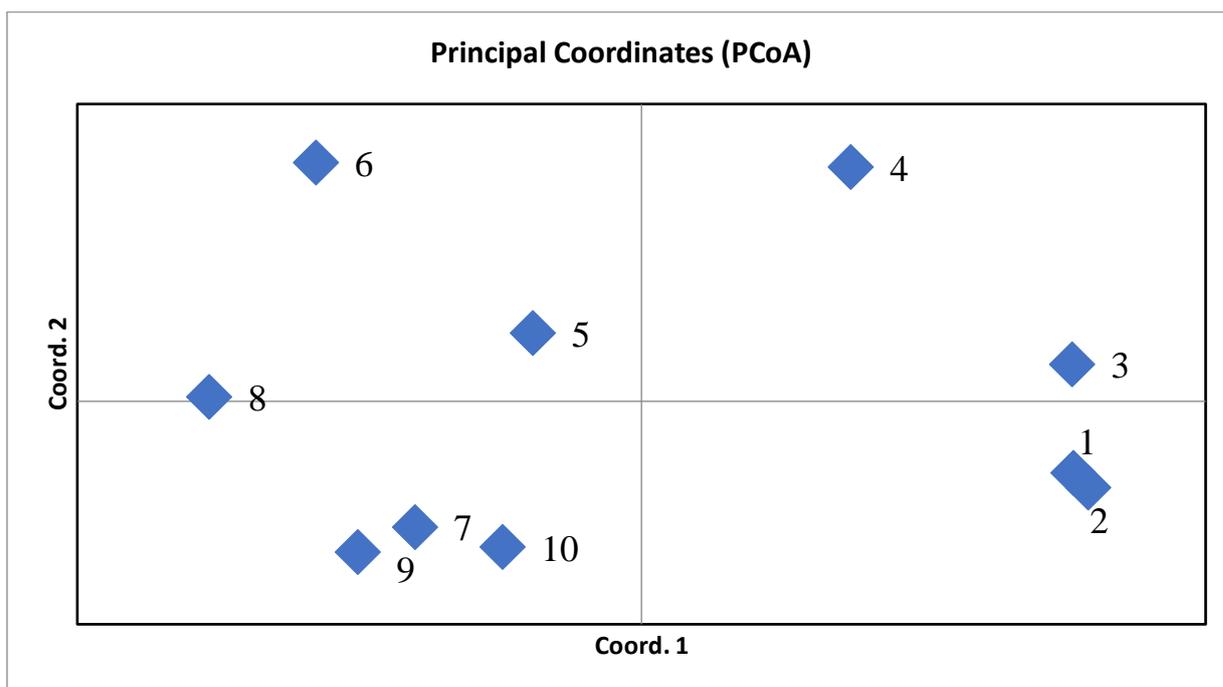


Рисунок 18 – Результаты PCoA-анализа на основе данных, полученных при генотипировании сортов райграса пастбищного с использованием SSR- и SCoT-маркеров: 1 – Агат; 2 – Дуэт; 3 – ВИК 66; 4 – Карат; 5 – Феникс; 6 – ВИК 22; 7 – Ленинградский 809; 8 – Вея; 9 – Веймар; 10 – Выль.

Значения первых двух координат многомерной диаграммы сходства составляли 25 % и 41 %. Таким образом, суммарно они объясняют 66 % общей молекулярной вариации. По результатам PCoA-анализа изучаемые сорта разделились на две условные группы. Первая объединила тетраплоидные сорта райграса пастбищного селекции ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса» (Агат, Дуэт, ВИК 66, Карат), что соответствовало результатам кластеризации при использовании SSR- и SCoT-маркеров по отдельности. Во второй группе оказались образцы с наименьшей генетической дистанцией между сортами Веймар, Ленинградский 809, Выль. Обособленно от остальных образцов на графике PCoA находятся сорта ВИК 22, Феникс и Вея.

Выявлено частичное соответствие результатов PCoA-анализа селекционному описанию используемого в исследовании материала. Информация о сходстве или различии генотипов полезна при выборе родительских форм для создания новых сортов с лучшими характеристиками.

С помощью полученных данных также возможно ускорить оценку исходного материала и контролировать результаты гибридизации, отбирая ценные генотипы на ранней стадии онтогенеза, без необходимости проводить трудоемкие и длительные полевые испытания.

3.6. Верификация результатов анализа, полученных с использованием SSR- и SCoT-маркеров

Для уточнения размеров уникальных ПЦР-продуктов, полученных с использованием SSR- и SCoT-маркеров, проведено выборочное секвенирование по Сэнгеру с предварительным клонированием с помощью вектора pAL2-T. С этой целью отобраны 4 ПЦР-продукта, полученные в результате скрининга коллекции сортов райграса пастбищного с использованием SSR-маркеров. Из них два продукта являются результатом амплификации ДНК райграса с SSR-маркерами, основанными на экспрессирующихся целевых последовательностях (EST, Expressed Sequence Tags), связанных с различными аннотированными генами (табл. 13). Анализ данных секвенирования продуктов SSR-маркеров в поисковой системе BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) продемонстрировал их совпадение с геномами райграса пастбищного *Lolium perenne* L. и райграса жесткого *Lolium rigidum* Gaudin (табл. 13).

Таблица 13 – Результаты «выравнивания» нуклеотидных последовательностей, полученных с помощью SSR-анализа райграса пастбищного в поисковой системе BLAST

Сорт	SSR-локус	Размеры полученных клонов, п.н.	Совпадение по базе данных NCBI
Агат	G03_089	320	<i>Lolium rigidum</i> katanin p60
		326	ATPase-containing subunit A-like 2 (LOC124661429), mRNA
Дуэт		300	<i>Lolium rigidum</i> katanin p60
		300	ATPase-containing subunit A-like 2 (LOC124661429), mRNA
Карат	LPSSRh01h06	142	<i>Lolium perenne</i> myosin-12
		142	(LOC127292861), mRNA
Феникс		142	<i>Lolium perenne</i> myosin-12
		142	(LOC127292861), mRNA

При «выравнивании» секвенированных последовательностей, полученных в результате анализа образцов с EST-SSR-маркерами, на соответствие с данными, представленными в статье Studer с соавторами наблюдалась частичная гомология с присутствием крупных вставок в полученных нами продуктах. Например, у сортоспецифичного фрагмента ДНК размером 320 п.н., обнаруженного при амплификации сорта райграса пастбищного Агат с EST-SSR маркером G03_089, при сравнении с соответствующей последовательностью ES700225/203 п.н. (Studer et al., 2008), выявлено наличие крупных вставок в локациях с 85 по 195 (рис. 19).

320 AgatSequence ID: **Query_403133** Length: **320** Number of Matches: **2**Range 1: 196 to 320 [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
204 bits(110)	2e-57	120/125(96%)	0/125(0%)	Plus/Plus
Query 79	GGATTTCAAGGGTTCTGGGAGTCCAAGTTCGGGGCAAGAAGGAGCCGGAGCAGAACGG	138		
Sbjct 196	GGATTTCAAGGGTTCTGGGAGTCCAAGTTCGGGGCAAGAAGGAGCCGGAGCAGGGACGG	255		
Query 139	GGAGCCCAACGGCAGCGTCAAGAAGCGGACCGCGATTGGCCATCTACGAGCAGTACGA	198		
Sbjct 256	GGAGCCCAACGGCAGCGTCAAGAAGCGGACCGCGATTGGCCATCTACGAGCAGTACGA	315		
Query 199	GCAGC 203			
Sbjct 316	GCAGC 320			

Range 2: 1 to 84 [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#) [▲ First Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
124 bits(67)	2e-33	79/84(94%)	4/84(4%)	Plus/Plus
Query 1	TCACCAACACCACACTCCTCCACCCGCTC-C---CTCCCTCCCTCCCACTCGCCCCGCTG	56		
Sbjct 1	TCACCAACACCACACTCCTCCACCCGCTCGCTCGCTCCCTCCCACTCGCCCCGCTG	60		
Query 57	CCGACCGGCGAATCGGAGCAATGG 80			
Sbjct 61	CCGACCGGCGAATCGGAGCAATGG 84			

Рисунок 19 – Сравнительный анализ последовательностей нуклеотидов, где «Query» – последовательность ES700225 по материалам работы Studer et al., 2008; «Sbjct» – выявленный нами уникальная последовательность при амплификации ДНК сорта Агат с EST-SSR-маркером G03_089 (320 п.н.).

Для секвенирования ПЦР-продуктов, полученных в результате анализа образцов ДНК райграса пастбищного с применением SCoT-маркеров, мы разработали и апробировали технику, основанную на их реамплификации, а затем выделении и очистке. С этой целью полученные ПЦР-продукты с уникальными профилями были использованы в повторной амплификации в качестве ДНК-матрицы при начальных условиях. Добавление данного этапа позволило существенно увеличить количество целевого продукта и усилить интенсивность его свечения при электрофоретической детекции. Так, на рисунке 20 приведена электрофореграмма продуктов амплификации образцов райграса пастбищного с маркером SCoT-35. На ней отчетливо выделяется уникальный ПЦР-фрагмент у образца под номером 6 (сорт ВИК 22).

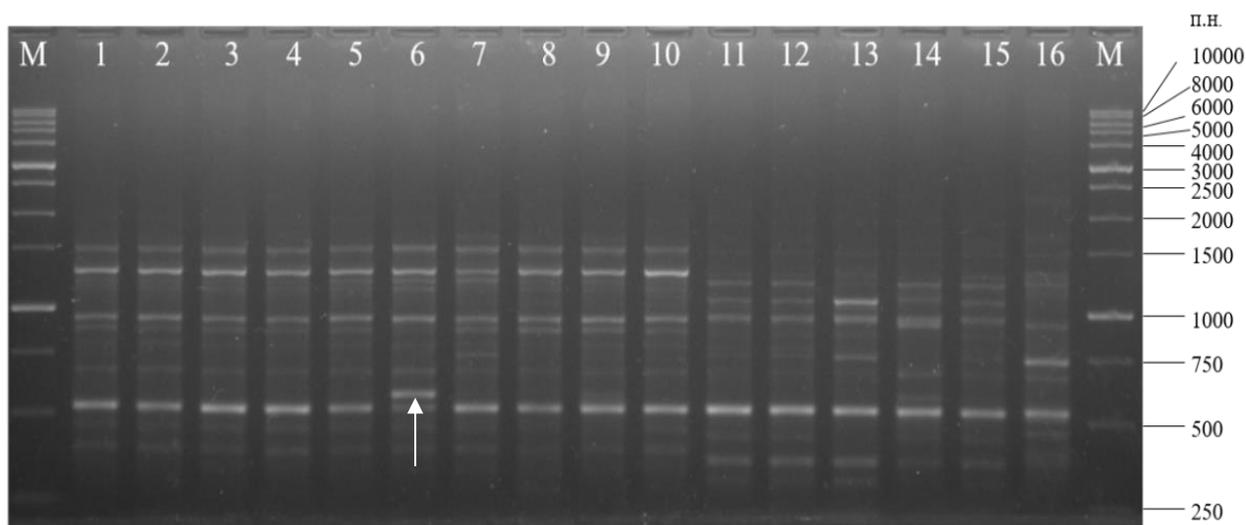


Рисунок 20 – Электрофореграмма продуктов ПЦР образцов райграса пастбищного и однолетнего с маркером **SCoT 35**, где 1) Агат; 2) Дуэт; 3) ВИК 66; 4) Карат; 5) Феникс; 6) ВИК 22; 7) Ленинградский 809; 8) Вея; 9) Веймар; 10) Выль; М – маркер молекулярной массы 1кВ DNA Ladder (ЗАО «Евроген», Россия). Стрелкой отмечен уникальный фрагмент.

Продукт амплификации, содержащий целевой фрагмент был повторно амплифицирован и детектирован с использованием электрофореза. Кроме того, для сравнительного анализа в дополнительной амплификации были задействованы образцы под номерами 4, 5, 7, 8 (рис. 21). Как видно из рисунка 20, повторная амплификация исходных продуктов позволила существенно увеличить интенсивность их свечения на электрофореграмме, что значительно облегчает процесс экстракции целевого фрагмента.

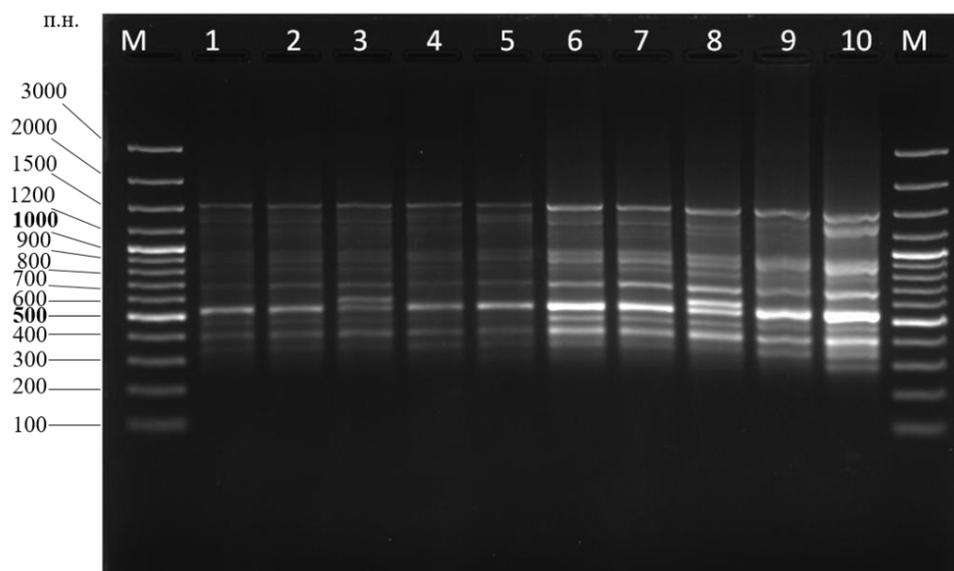


Рисунок 21 – Сравнительная электрофореграмма исходных и реамплифицированных ПЦР-продуктов образцов райграса с маркером **ScoT-35**, где под номерами 1-5 - представлены исходные продукты, под номерами 6-10 однократно реамплифицированные; М - маркер молекулярной массы 1кВ DNA Ladder (ЗАО «Евроген», Россия).

Целевой фрагмент из реамплифицированного ПЦР-продукта был выделен из агарозного геля и очищен с использованием коммерческого набора Cleanup Mini (ЗАО «Евроген», Россия) (рис. 22).

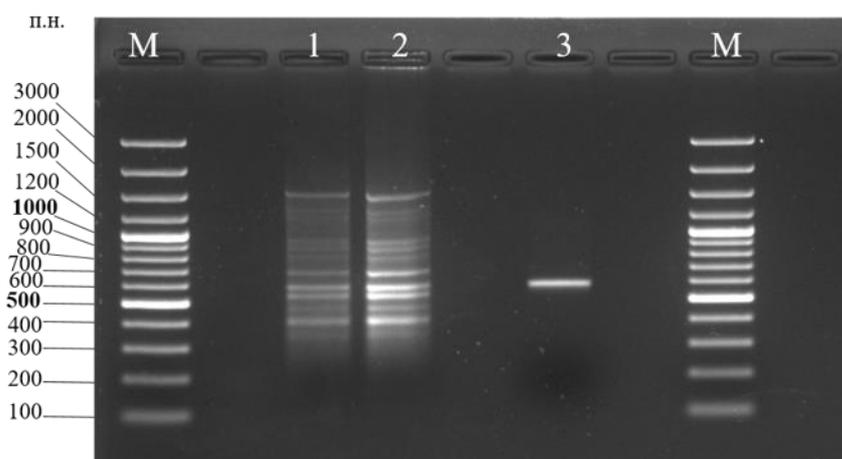


Рисунок 22 – Электрофореграмма результатов выделения и очистки уникального ПЦР-фрагмента реамплифицированного продукта образца ВИК-22 с маркером SCoT-35, где М – маркер молекулярной массы 1кВ DNA Ladder (ЗАО «Евроген», Россия); 1 – исходный ПЦР-продукт; 2 – реамплифицированный ПЦР-продукт; 3 – выделенный и очищенный из агарозного геля уникальный фрагмент.

Всего с использованием описанного метода выделено 2 уникальных фрагмента амплификации, позволяющих идентифицировать сорта Вея и ВИК 22. По результатам их секвенирования с предварительным клонированием получены последовательности, позволяющие установить природу данных фрагментов амплификации, а также уточнить их размеры. По результатам анализа в поисковой системе BLAST нуклеотидная последовательность, полученная с использованием маркера SCoT 35, совпадала с участком генома райграса пастбищного (*Lolium perenne* L.), кодирующим гипотетический белок (табл. 14). При этом вторая последовательность, амплифицированная с применением маркера SCoT 15, при выравнивании по базе данных Gen Bank ресурса NCBI, соответствовала геному бактерии *Stenotrophomonas rhizophila*. Данный вид относится к типичным представителям ризосферы и эндосферы – может населять все части растений. Ряд штаммов *Stenotrophomonas rhizophila*

представляют высокий биотехнологический интерес как стимуляторы роста растений, особенно на засоленных почвах (Гродницкая и др., 2023).

Таблица 14 – Результаты «выравнивания» в поисковой системе BLAST нуклеотидных последовательностей райграса пастбищного, полученных с помощью SCoT-маркеров

Сорт	SSR-локус	Размеры полученных клонов пн.	Совпадение по базе данных Gen Bank
ВИК 22	SCoT 35	581	<i>Lolium perenne</i> hypothetical protein gene, complete cds
		581	
Вея	SCoT 15	-	<i>Stenotrophomonas</i> <i>rhizophila</i>
		-	

Верификация, полученных результатов с использованием ДНК-секвенирования позволяет установить точный размер нуклеотидных последовательностей, а также повысить достоверность метода. Подход к созданию ДНК-паспортов сортов, основанный на комбинации методов с использованием двух систем молекулярного маркирования (SSR и SCoT) с последующим выборочным секвенированием для подтверждения выявленных генетических особенностей существенно повышает эффективность и достоверность результатов.

3.7. Молекулярно-генетические формулы сортов райграса пастбищного (*Lolium perenne* L.), разработанные на основе данных, полученных с использованием SSR- и SCoT-маркеров

Полученные с использованием SSR- и SCoT-маркеров данные по аллельному разнообразию сортов райграса пастбищного использованы для

составления молекулярно-генетических формул (табл. 15, 16). В них буквы латинского алфавита обозначают код маркера (см. табл. 7, 11), а нижний индекс соответствует размеру выявленного ПЦР-продукта в парах нуклеотидов. При составлении формул учитывались только отчетливые и воспроизводимые фрагменты амплификации.

Таблица 15 – Молекулярно-генетические формулы образцов райграса пастбищного, составленные по результатам анализа с использованием микросателлитных локусов

Сорт	Молекулярно-генетическая формула
Агат	A _{453, 487, 552} B _{303, 301, 312, 358, 384, 391, 428*} , 362 C _{300, 320, 326} D _{206, 223, 229, 243} E _{161, 211, 232} F ₁₄₂ G _{281, 306}
Дуэт	A _{462, 498, 575} B _{301, 312, 391, 362, 366, 395, 431} C _{300, 335} D _{206, 223, 229, 243} E _{161, 211, 232} F ₁₄₂ G _{281, 306}
ВИК 66	A _{462, 498, 569} B _{301, 358, 384, 297, 306, 352, 379, 417} C _{300, 335} D _{223, 206, 218, 240} E _{161, 211, 225} F ₁₄₂ G _{281, 306}
Карат	A _{458, 491, 557} B _{303, 297, 352, 379, 294, 346, 410} C _{300, 327, 335} D _{218, 214, 203, 234} E _{161, 211, 232, 225, 222} F ₁₄₂ G _{181, 301}
Феникс	A _{487, 552, 454} B _{294, 290, 372, 404} C _{300, 327} D _{218, 214, 199, 234} E _{161, 208, 225} F ₁₄₂ G _{301, 276}
ВИК 22	A _{458, 484, 546} B _{294, 290, 324, 336, 370, 401} C _{300, 327, 318} D _{206, 214, 199, 220, 231} E _{211, 225, 263} F _{142, 170, 188} G _{301, 276}
Ленинградский 809	A _{453, 484, 546} B _{362, 395, 290} C _{300, 335} D _{206, 229, 234, 189} E _{208, 217, 158} F ₁₄₂ G _{301, 276}
Вея	A _{484, 546, 449} B _{384, 290, 324} C _{300, 327} D _{206, 243, 214, 199, 234} E _{208, 225, 219, 158} F _{142, 170, 180} G _{276, 298}
Веймар	A _{487, 454, 546} B _{358, 286, 366, 297, 290, 336, 340, 390} C _{300, 335} D _{206, 240, 214, 199, 234} E _{143, 158, 214, 228} F _{142, 170, 153} G _{276, 298}
ВЫЛЬ	A _{487, 552, 454} B _{358, 286, 294, 340, 390, 333, 364} C _{300, 335} D _{206, 229, 199} E _{208, 225, 219, 158} F ₁₄₂ G _{276, 298}

*Примечание: жирным начертанием выделены уникальные для данного сорта аллели.

По результатам анализа райграса пастбищного с использованием SSR-локусов (см. табл. 15) уникальные аллели по отдельным маркерам удалось выявить для всех исследуемых сортов. Наряду с этим, для каждого из образцов обнаружены также сортоспецифичные сочетания аллелей (ДНК-профили) по совокупности использованных микросателлитных локусов.

С помощью SSR-локуса G07_058 удалось обнаружить максимальное количество сортоспецифичных аллелей (12), позволяющих идентифицировать 7 сортов пастбищного райграса. При этом с использованием локуса AJ872206 уникальных аллелей для отдельных сортов обнаружить не удалось. Наибольшим числом уникальных аллелей по 7 SSR-локусам характеризовался диплоидный сорт ВИК 22. По одному сортоспецифичному аллелю удалось обнаружить для сортов Ленинградский 809 и Вея.

Таблица 16 – Молекулярно-генетические формулы сортов райграса пастбищного, разработанные на основе SCoT-маркеров

№	Название сорта	Молекулярно-генетическая формула
1	Агат	A ₂₁₅₃ B _{1685, 1484} C _{2348,1801, 1576} D _{957, 865, 722, 550, 424} E _{1473, 1266, 931, 516} F _{1265, 1121}
2	Дуэт	A ₂₁₅₃ B _{1685, 1484} C _{2348,1801, 1576} D _{957, 865, 722, 550, 424} E _{1473, 1266, 931, 516} F _{1265, 1121}
3	ВИК 66	A ₂₁₅₃ B _{1685, 1484} C _{2348,1801, 1576} D _{957, 865, 722, 550, 424} E _{1473, 1266, 931, 516} F _{1265, 1121}
4	Карат	A ₂₁₅₃ B _{1685, 1484} C _{2348,1801, 1576} D _{957, 865, 722, 550, 424} E _{1473, 1266, 931, 516} F _{1265, 1121}
5	Феникс	A ₂₁₅₃ B _{1685, 1484} C _{2348,1801, 1576} D _{957, 865, 722, 550, 424} E _{1473, 1266, 931, 516} F _{1265, 1121}
6	ВИК 22	A _{2153, 1500} B _{1685, 1484} C _{2348,1801, 1576} D _{957, 865, 722, 658*} , 550, 424 E _{1473, 1266, 931, 566*} , 516 F _{1265, 1121, 846}
7	Ленинградский 809	A _{2299, 2153} B _{1685, 1450*} C _{2348,1801, 1576} D _{957, 865, 722, 550, 424} E _{1473, 1266, 931, 732} , 516 F _{1265, 1121}
8	Вея	A _{2299, 2153} B _{1685, 1484} C _{2348, 2016, 1801, 1576} D _{957, 865, 722, 550, 424} E _{1473, 1266, 931, 516} F _{1473, 1266, 931, 732, 516,}
9	Веймар	A _{2153, 2299, 1824} B _{1685, 1484} C _{2348,1801, 1576} D _{957, 865, 722, 550, 424} E _{1473, 1266, 931, 516} F _{1265, 1121}
10	Быль	A _{2153, 1517} B _{1685, 1484} C _{2348,1801, 1576} D _{957, 865, 722, 550, 424} E _{1473, 1266, 931, 516} F _{1265, 1121}

*Примечание: жирным начертанием выделены уникальные для данного сорта аллели

Для составления молекулярно-генетических формул сортов райграса пастбищного по результатам скрининга отобрано 6 SCoT-маркеров (SCoT 06, SCoT 23, SCoT 13, SCoT 32, SCoT 35, SCoT 15). С их помощью обнаружены уникальные ампликоны для 5 сортов – ВИК 22, Ленинградский 809, Вея, Веймар, Выль. При этом наибольшее количество уникальных локусов (3) удалось обнаружить с использованием маркеров SCoT 02 и SCoT 06. Как и в случае анализа с использованием SSR-маркеров, сорт ВИК 22 обладал наибольшим числом уникальных ПЦР-продуктов. Значительные генетические различия данного образца, вероятно, обусловлены его принадлежностью к группе сортов газонного назначения.

3.8. Анализ сортов райграса однолетнего с использованием SSR-маркеров

3.8.1. Отбор информативных маркеров для дифференциации сортов райграса однолетнего

Из 20 протестированных SSR-маркеров для последующего анализа отобрано 5 информативных, с которыми были получены полиморфные и воспроизводимые фрагменты амплифицированной ДНК для исследуемых образцов (табл. 17).

Таблица 17 – Характеристика информативных SSR-локусов, выделенных для анализа сортов райграса однолетнего

№	Название маркера	Код маркера	Общее кол-во ПЦР-продуктов	Кол-во полиморфных ПЦР-продуктов	Процент полиморфизма	Диапазон размеров ПЦР-продуктов, п.н.
1	G05_044	A	11	7	63,6	458-1144
2	G07_058	B	9	7	77,8	279-346
3	G04_092	C	15	11	73,3	188-249
4	AJ872206	D	4	4	100,0	185-232
5	LPSSRk03b03	E	7	6	85,7	264-351
Сумма			46	35	-	-
Среднее			9,2	7,0	80,1	-

Для 5 наиболее полиморфных SSR-локусов выявлено 46 аллелей, из которых 35 (76 %) оказались уникальными для отдельных сортов. При этом их размер варьировал от 185 до 1144 пн. Наиболее полиморфным оказался локус G04_092, в нем выявлено 11 аллелей. Наименьшим полиморфизмом характеризовался локус AJ872206 (обнаружено 4 аллели). Средний уровень полиморфизма по всем информативным локусам составлял 80,1 %.

По результатам SSR-анализа сортов райграса однолетнего определены также показатели генетической изменчивости (табл. 18). Значение эффективного числа аллелей находилось в диапазоне от 1,41 (для локуса G05_044) до 1,51 (для локуса G07_058) и в среднем составляло 1,42. Для локуса G07_058 выявлен максимальный показатель генетического разнообразия по Нею (0,30), а для локуса G04_092 – минимальный (0,20).

Таблица 18 – Показатели эффективности информативных SSR-маркеров, использованных для анализа сортов райграса пастбищного и однолетнего

Название маркера	Эффективное число аллелей (Ne)	Показатель гетерозиготности (He)	Показатель информативности праймеров (PIC)	Показатель разрешающей способности и маркера (Rp)	Дискриминационная сила (D)
G05_044	1,41	0,27	0,34	5,6	0,90
G07_058	1,51	0,30	0,36	4,8	0,65
G04_092	1,29	0,20	0,37	6,8	0,76
AJ872206	1,38	0,27	0,33	2,4	0,92
LPSSRk03b03	1,48	0,29	0,37	3,6	0,74
Среднее	1,42	0,27	0,36	4,6	0,79

Наибольшей величиной индекса полиморфизма (PIC) (0,37) характеризовались локусы G04_092 и LPSSRk03b03, наименьшей (0,33) – SSR-локус AJ872206. Разрешающая способность была максимальной при использовании праймеров к локусу G04_092 и составляла 6,8, тогда как минимальным значением данного показателя (2,4) характеризовался локус AJ872206. Показатели дискриминационной силы маркерной системы (D) варьировали от 0,65 с использованием локуса G07_058 до 0,92 – для AJ872206.

По результатам проведенного анализа, выбранные микросателлитные маркеры демонстрируют достаточный дискриминационный потенциал для их использования в качестве инструмента дифференциации образцов райграса однолетнего.

3.8.2. Изучение особенностей генетической структуры сортов райграса однолетнего по результатам анализа с использованием SSR-локусов

Генетические взаимоотношения между изучаемыми сортами райграса однолетнего анализировали с помощью NJ-дендрограммы методом «ближайших соседей» (рис. 23). В результате кластеризации сортового материала выделены 2 группы сортов.

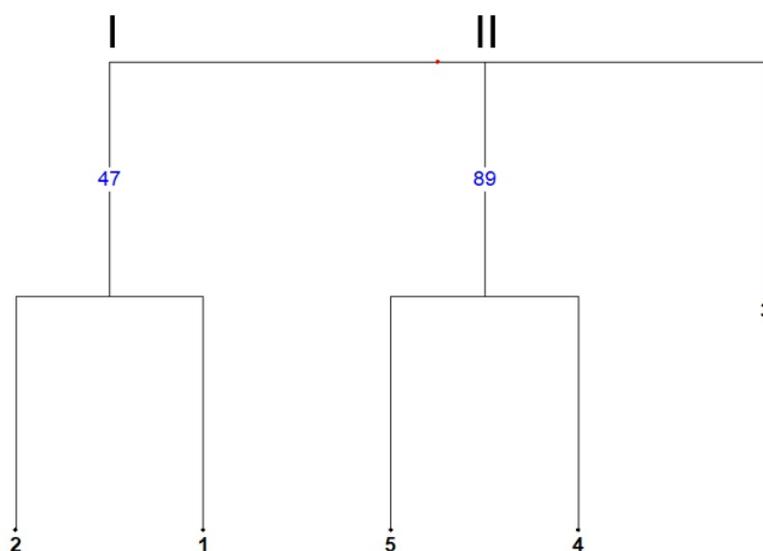


Рисунок 23 – Дендрограмма генетического сходства сортов райграса однолетнего по результатам анализа с использованием SCoT-маркеров: 1 – Рапид; 2 – Московский 74; 3 – Roznovsky; 4 – Sprint; 5 – Изорский.

В первой группе объединились сорта селекции ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса» Рапид и Московский 74. Их близость, вероятно, обусловлена селекционным происхождением сорта Рапид, выведенного методом полиплоидии и негативного массового отбора на продуктивность и качество из сорта Московский 74. Во второй группе оказались диплоидные сорта Изорский (оригинатор – ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса») и Sprint, выведенный селекционерами из Дании. Обособленно на дендрограмме расположился диплоидный чешский сорт Roznovsky.

На основе байесовской модели и метода Эванно в программе Structure определена генетическая структура изучаемых образцов райграса однолетнего (рис. 24), в соответствии с которой они разделились на два кластера (K = 2).

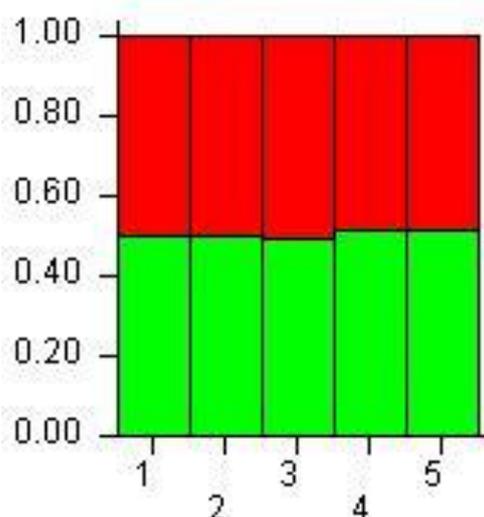


Рисунок 24 – Генетическая структура сортов райграса однолетнего по результатам анализа с использованием SCoT-маркеров: 1 – Рапид; 2 – Московский 74; 3 – Roznovsky; 4 – Sprint; 5 – Изорский.

По результатам проведенного анализа изучаемая коллекция характеризуется равномерной генетической структурой. Отчетливых различий между сортами однолетнего райграса выявить не удалось. Вероятно, это связано с использованием недостаточно разнообразной и обширной коллекции образцов в анализе. Кроме того, три сорта райграса из исследуемой выборки (Рапид, Московский 74, Изорский) были выведены в одном и том же учреждении - ФНЦ «ВИК им. В. Р. Вильямса», не исключено, что на основе общего исходного материала.

3.9. Анализ сортов райграса однолетнего с использованием SCoT-маркеров

3.9.1. Отбор информативных маркеров для дифференциации сортов райграса однолетнего

При оценке межсортового ДНК-полиморфизма образцов однолетнего райграса из 25 праймеров, разработанных к последовательностям SCoT-маркеров (см. табл. 3), выбрали 9 информативных, генерирующих отчетливые и воспроизводимые фрагменты амплификации (табл. 19).

Таблица 19 – Информативные SCoT-маркеры для анализа сортов райграса однолетнего

№	Название маркера	Код маркера	Общее кол-во ПЦР-продуктов	Кол-во полиморфных ПЦР-продуктов	Процент полиморфизма	Диапазон размеров ПЦР-продуктов, п.н.
1	SCoT 02	A	3	2	66,7	847-1052
2	SCoT 06	B	7	7	100,0	838-2336
3	SCoT 13	C	4	3	75,0	1642-2348
4	SCoT 15	D	4	3	75,0	821-1344
5	SCoT 17	E	5	5	100,0	2093-2320
6	SCoT 20	F	6	2	33,3	889-1654
7	SCoT 23	G	6	5	83,3	1334-2154
8	SCoT 35	H	9	8	88,9	502-1168
Сумма			44,0	35,0	-	-
Среднее			5,5	4,4	77,8	-

В общей сложности получено 44 ПЦР-продукта, из которых 35 оказались полиморфными. Уровень полиморфизма составил 77,8 %. Размер амплифицированных ДНК-фрагментов варьировал от 502 до 2348 п.н. Максимальным количеством ПЦР-продуктов и наиболее высоким уровнем

полиморфизма (100 %) отличался маркер SCoT 06. В среднем с использованием одного маркера получили более 5 ампликонов, из них 4,4 – полиморфных.

Эффективное число аллелей (N_e) находилось в диапазоне от 1,08 до 1,62 и в среднем составляло 1,42 на локус. Средние значения PIC и индекс показателя разрешающей способности маркера (R_p) равнялись 0,34 и 2,05 соответственно (табл. 20).

Таблица 20 – Показатели информативности SCoT-маркеров для анализа сортов райграса однолетнего

Название маркера	Эффективное число аллелей (N_e)	Показатель гетерозиготности (H_e)	Показатель информативности и примеров (PIC)	Показатель разрешающей способности маркера (R_p)
SCoT 02	1.62	0.32	0.27	1.2
SCoT 06	1.42	0.25	0.36	2.4
SCoT 13	1.18	0.14	0.36	1.2
SCoT 15	1.52	0.29	0.35	1.6
SCoT 17	1.49	0.30	0.35	2.8
SCoT 20	1.08	0.06	0.31	0.8
SCoT 23	1.57	0.31	0.36	2
SCoT 35	1.46	0.28	0.37	4.4
Среднее	1.42	0.24	0.34	2.05

Исходя из показателей информативности маркеров, включенных в анализ можно заключить, что данная техника является эффективной для изучения межсортового ДНК-полиморфизма сортов райграса однолетнего.

3.9.2. Изучение особенностей генетической структуры сортов райграса однолетнего по результатам анализа с использованием SCoT-маркеров

Для выявления генетических взаимосвязей между исследуемыми сортами однолетнего райграса составлена дендрограмма методом ближайших соседей (Neighbor-Joining, NJ) (рис. 25).

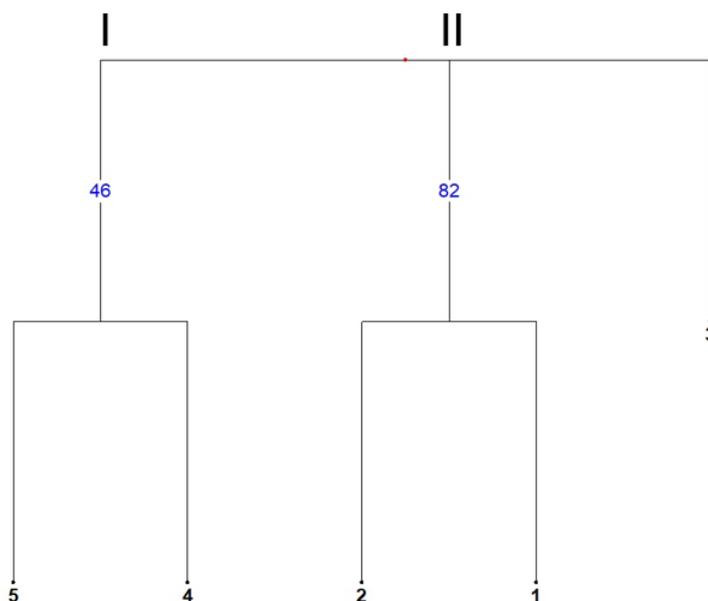


Рисунок 25 – Дендрограмма сходства сортов райграса однолетнего по результатам анализа с использованием SCoT-маркеров: **1** – Рапид; **2** – Московский 74; **3** – Roznovsky; **4** – Sprint; **5** – Изорский.

В результате кластеризации сортового материала выделены 2 группы образцов. В первой с 46%-ной бутстреп-поддержкой оказались сорт селекции ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса» Изорский, полученный из отбора местных форм райграса, произрастающего в Московской области, а также образец датской селекции Sprint. Вторая группа объединила тетраплоидный сорт Рапид, выведенный методом полиплоидии и негативного массового отбора на продуктивность и качество из сорта Московский 74, с образцом зарубежной селекции Raznovsky (бутстреп-поддержка 82 %). Сорт селекции ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса» Московский 74 оказался в отдельном кластере. Данный сорт

выведен методом отбора по комплексу признаков и используется на зеленый корм, для приготовления силоса, сена, сенажа и травяной муки.

Анализ результатов методом Evanno с помощью онлайн-ресурса Structure Harvester показал, что наиболее вероятным оказывается разделение исследуемой коллекции на 7 кластеров (рис. 26). Исходя из результатов анализа с использованием SCoT-маркеров, генетическая структура сортов райграса однолетнего оказалась схожей. Вероятно, отсутствие явной дифференциации связано с ограниченным числом образцов в изучаемой коллекции, а также недостаточным количеством маркеров, использованных в анализе.

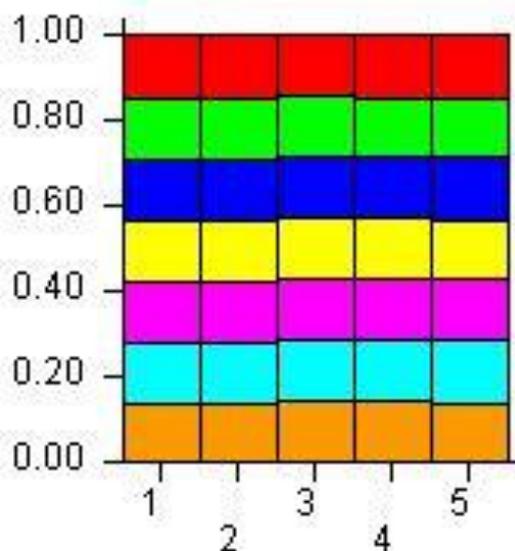


Рисунок 26 – Генетическая структура сортов райграса однолетнего по результатам генотипирования с использованием SCoT-маркеров: **1** – Рапид; **2** – Московский 74; **3** – Roznovsky; **4** – Sprint; **5** – Изорский.

3.10. PCoA-анализ по результатам генотипирования сортов райграса однолетнего с использованием SSR- и SCoT-маркеров

На основании полученной информации по результатам анализа сортов райграса однолетнего с использованием SSR- и SCoT-маркеров осуществлена оценка генетических взаимосвязей между изучаемыми образцами и

визуализация их распределения на координатной плоскости методом РСоА-анализа (рис. 27).

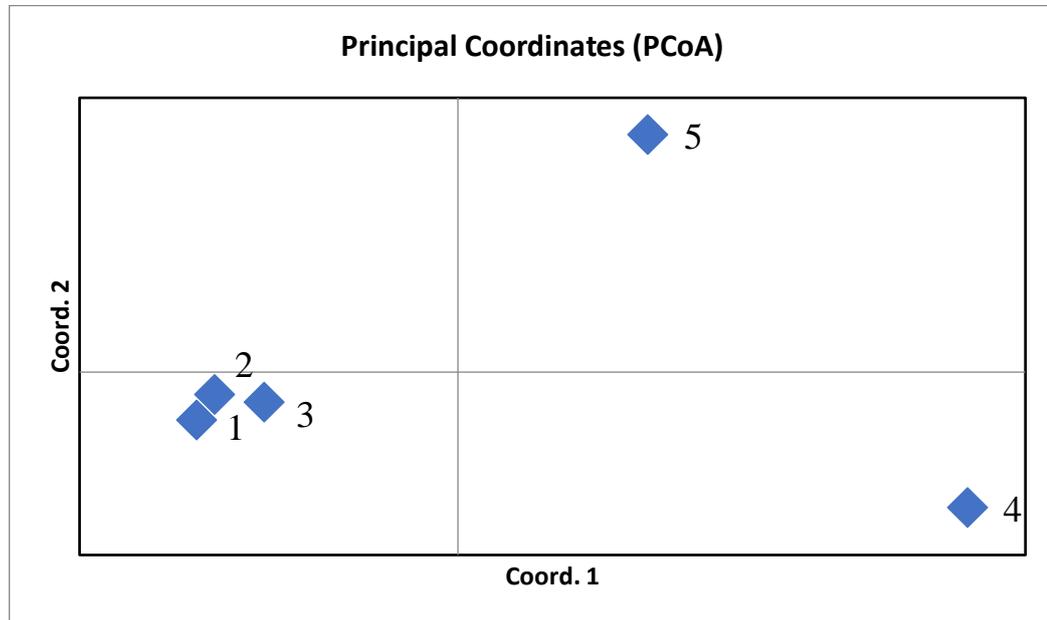


Рисунок 27 – РСоА-анализ результатов генотипирования сортов райграса однолетнего с использованием SCoT-маркеров и SSR-локусов: **1** – Рапид; **2** – Московский 74; **3** – Roznovsky; **4** – Sprint; **5** – Изорский.

Значения первых двух координат РСоА составляли 37,6 % и 27,4 %. Таким образом, суммарно они объясняют 65 % общей молекулярной вариации. На графике главных координат наблюдается объединение образцов селекции ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса» Рапид и Московский 74, обладающих общим происхождением. Генетически близким к данной паре оказался диплоидный сорт чешской селекции Roznovsky. Датский образец Sprint и отечественный сорт Изорский на графике РСоА расположились обособленно. В целом, распределение сортов райграса однолетнего на графике главных компонент соответствует их происхождению и основным хозяйственным признакам.

3.11. Составление молекулярно-генетических формул для сортов райграса однолетнего по результатам анализа с использованием SSR- и SCoT-маркеров

На основе ДНК-профилей, характерных для каждого изученного сорта, составлены молекулярно-генетические формулы (табл. 21, 22). В них буквой латинского алфавита обозначен ДНК-идентификационный маркер (см. табл. 17, 19), а нижним индексом – размер выявленного аллеля в парах нуклеотидов. Для некоторых сортов из Госреестра РФ разработаны индивидуальные генетические паспорта.

Таблица 21 – Молекулярно-генетические формулы сортов райграса однолетнего, составленные по результатам анализа с использованием SSR-локусов

Название сорта	Молекулярно-генетическая формула на основе SSR-локусов
Рapid	A _{472, 652, 984*} , 1052 B _{303, 286, 346, 309, 329} C _{206, 243, 199, 234, 188, 212, 226} D _{232, 185} E _{264, 277, 283, 351}
Московский 74	A _{472, 652, 958} B _{303, 386, 346, 309, 329, 280} C _{206, 229, 243, 199, 234, 188, 223} D ₂₂₈ E _{264, 283, 351, 274}
Roznovsky	A _{472, 652, 958} B _{303, 386, 309, 329, 343} C _{206, 243, 199, 234, 249} D ₂₂₈ E _{264, 283, 291, 345}
Sprint	A _{458, 472, 559, 739, 1052} B _{301, 286, 309, 329, 343} C _{206, 243, 218, 214, 203, 199, 234, 212, 223} D ₂₂₅ E _{283, 274}
Изорский	A _{467, 712, 1144} B _{301, 286, 306, 329, 279, 343} C _{206, 243, 218, 203, 199, 134, 226} D ₂₃₂ E _{264, 283, 274, 345}

*Примечание: жирным начертанием выделены уникальные для данного сорта аллели.

С использованием SSR-локусов удалось обнаружить уникальные аллели для каждого из изучаемых сортов однолетнего райграса. Наибольшим числом сортоспецифичных аллелей (7) характеризовался микросателлитный локус G05_044, тогда как наименьшее количество аллелей (1) выявлено при амплификации с маркером G07_058. Сорт райграса однолетнего Sprint выделялся 5 уникальными аллелями. Данное значение оказалось максимальным в рамках изучаемой выборки. Минимальное число сортоспецифичных аллелей (2) выявлено для сортов Московский 74 и Roznovsky. В среднем с применением одного SSR-локуса обнаружено 3,4 уникальных аллеля.

Таблица 22 – Молекулярно-генетические формулы сортов райграса однолетнего, составленные по результатам анализа с использованием SCoT-маркеров

Название сорта	Молекулярно-генетические формулы на основе SCoT-маркеров
Рапид	A _{847, 1052, 988} B _{1698, 1490, 1346, 1086, 838} C _{2348, 1801, 2110} D _{1121, 1344} E _{2234, 2122} F _{889, 1654, 1395, 1145} G _{1685, 2118, 1978, 1334} H _{931, 1168, 1048, 502}
Московский 74	A _{847, 1052, 988} B _{1698, 1490, 1346, 1086, 838} C ₂₃₄₈ D _{1265, 1121} E _{2234, 2122} F _{889, 1654, 1395, 1145} G _{1685, 2118, 1978, 1334} H _{931, 1168, 1048, 502}
Roznovsky	A _{847, 1052, 988} B _{1698, 1490, 1346, 838, 1225} C ₂₃₄₈ D _{1265, 1121, 1344} E _{2320, 2093} F _{889, 1654, 1395, 1145, 1038} G _{1685, 2118, 1978, 1334} H _{931, 502, 720, 1034}
Sprint	A _{847, 988} B _{1346, 838, 2336} C ₂₃₄₈ D _{1265, 1121, 821} E ₂₂₂₆ F _{889, 1654, 1395, 1145, 1263} G _{1685, 2154, 1876, 1334} H _{921, 1168, 1048, 502, 891}
Изорский	A ₈₄₇ B _{1698, 1490, 1346, 838} C _{2348, 2087} D _{1265, 1121} E _{2234, 2122} F _{889, 1654, 1395, 1145} G _{1685, 2118, 1978} H _{921, 1168, 502, 1025}

**Примечание: жирным начертанием выделены уникальные для данного сорта аллели.*

По результатам анализа «балк-образцов» райграса однолетнего, определены 8 полиморфных SCoT-маркеров, позволяющих идентифицировать отдельные сорта. Всего с их помощью удалось обнаружить 17 уникальных ПЦР-продуктов. Наибольшим количеством сортоспецифичных ампликонов (4) характеризовался маркер SCoT 35, тогда как с маркером SCoT 02 уникальных продуктов для отдельных сортов обнаружить не удалось.

По результатам анализа с использованием SCoT-маркеров, для 4 сортов райграса однолетнего удалось выявить сортоспецифичные ПЦР-продукты. При этом, как и в случае использования микросателлитных локусов, максимальным числом уникальных ампликонов (7) характеризовался сорт зарубежной селекции Sprint (Дания). Для отечественного сорта Московский 74 сортоспецифичные ампликоны обнаружить не удалось. Несмотря на это, молекулярно-генетическая формула данного сорта оказалась уникальной в рамках изучаемой выборки. Кроме того, уникальные ДНК-профили были обнаружены для отечественных сортов райграса однолетнего Изорский и Рапид.

3.12. Анализ сортов фестулолиума с использованием SSR-маркеров

3.12.1. Отбор информативных маркеров для дифференциации сортов фестулолиума

Анализ сортов фестулолиума осуществляли с помощью шести микросателлитных маркеров – LPSSRk02e08, G03_089, G01_002, AJ872206, AJ872228, LP165 (табл. 2), разработанных на основе информации о последовательностях геноме райграса пастбищного (*Lolium perenne* L.).

Из 6 протестированных SSR-локусов для последующего анализа с детекцией результатов методом капиллярного электрофореза отобрано 3 информативных локуса (G03_089, AJ872206, LP165), генерирующих отчетливые и воспроизводимые ампликоны (рис. 28).

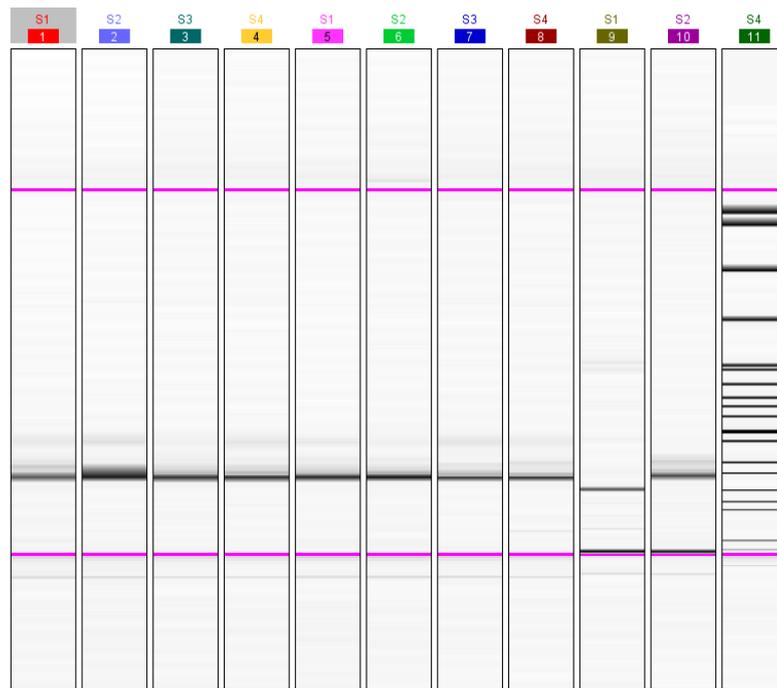


Рисунок 28 – Схема электрофореграммы продуктов амплификации образцов фестулолиума с SSR-локусом LP165 по результатам детекции с использованием системы капиллярного электрофореза Qsep₁ Plus: 1 – Аллегро; 2 – Пилигрим; 3 – Фест; 4 – Айвенго; 5 – Кафес; 6 – ВИК 90; 7 – Синта; 8 – Аэлита; 9 – Изумрудный; 10 – Дебют; 11 – Маркер молекулярной массы С109200.

В общей сложности с помощью отобранных SSR-маркеров удалось обнаружить 35 аллелей. Их размер варьировал от 86 до 331 п.н. Наибольшим числом ампликонов (24) характеризовался SSR-локус AJ872206. В среднем с использованием одного информативного маркера получили более 11 аллелей (табл. 23).

Таблица 23 – Характеристика информативных SSR-локусов для сортов фестулолиума

№ п/п	Локус	Код маркера	Число выявленных аллелей	Количество уникальных аллелей	Процент уникальных аллелей	Диапазон длин аллелей, п.н.
1	G03_089	A	9	2	22,2	220-331
2	AJ872206	B	24	5	20,8	171-245
3	LP165	C	2	1	50,0	86-100
Сумма		-	35	8	-	-
Среднее		-	11,7	2,7	31,0	-

Таким образом, установлено, что указанные SSR-маркеры пригодны для использования при изучении ДНК-полиморфизма отечественных сортов фестулолиума.

3.12.2. Анализ внутрисортного ДНК-полиморфизма сортов фестулолиума

Для изучения внутрисортного генетического разнообразия сортов фестулолиума применяли 2 SSR-локуса, определенные как полиморфные в предварительных экспериментах. Анализ проводили на основе трёх сортов из изучаемой коллекции: ВИК 90, Кафес и Пилигрим. Каждый из них был представлен тридцатью индивидуальными генотипами.

По результатам ДНК-типирования оценивали однородность сортов по количеству различающихся ДНК-профилей или биотипов (табл. 24). Так, наиболее однородным по изучаемым локусам оказался сорт Кафес, выведенный селекционерами ФГБНУ «ФИЦ картофеля имени А.Г. Лорха». При его генотипировании обнаружено 7 биотипов с использованием SSR-локуса G03_089 и 11 - с локусом LP165. При этом сорта селекции ФНЦ «ВИК им. В. Р. Вильямса» - ВИК 90 и Пилигрим - характеризовались наибольшим разнообразием по числу выявленных биотипов. Первый сорт получен в

результате отдаленной гибридизации райграса итальянского и овсяницы луговой. Второй выведен в результате многократного отбора на инфекционном фоне и обладает комплексом признаков, включая долголетие, высокую продуктивность, устойчивость к ржавчине и другим заболеваниям (Косолапов и др., 2015).

Таблица 24 – Количество выявленных биотипов в сортах фестулолиума по ДНК-спектрам, полученным с использованием SSR-локусов

Название сорта/SSR-локус	Количество выявленных биотипов		Всего
	G03_089	LP165	
ВИК 90	10	11	21
Кафес	7	11	18
Пилигрим	9	12	21

Для оценки изменчивости генотипов фестулолиума использовали анализ молекулярной дисперсии (Analysis of Molecular Variance, AMOVA). Показано, что как и при анализе сортов райграса пастбищного, 10 % от общей дисперсии обусловлено различиями между сортами, а большая часть (90 %) – различиями внутри сортов (табл. 25)

Таблица 25 – Результаты анализа молекулярной дисперсии (AMOVA) общего генетического разнообразия трёх сортов фестулолиума

Источник разнообразия	Число степеней свободы (df)	Сумма квадратов (SS)	Доля в общей дисперсии		P
			абс. значения	%	
Между сортами	2	19,375	0,272	10 %	0,001
Внутри сортов	78	184,353	2,364	90 %	-
Всего	80	203,728	2,636	100 %	-

Вероятно, высокие значения показателей внутрисортной дисперсии образцов фестулолиума связаны с перекрестным опылением и полиплоидией его сортов (см. рис. 29). Кроме того, полученные данные согласуются с результатами исследований, проведенных ранее, где большая часть дисперсии объяснялась различиями внутри популяций и сортов (Nie et al., 2019; Kubik et al., 2001).

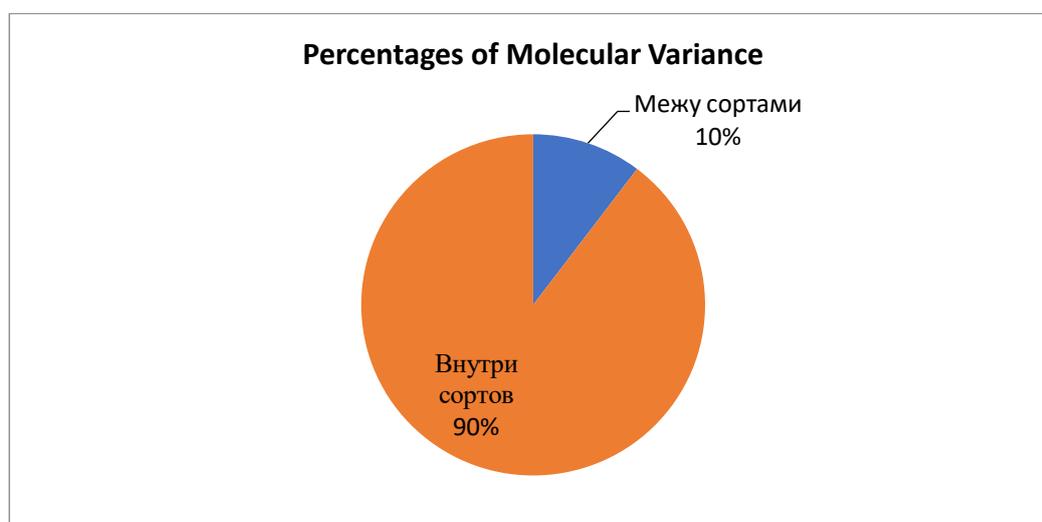


Рисунок 29 – Результаты анализа общего генетического разнообразия (AMOVA) сортов фестулолиума, представленные в виде диаграммы.

Анализ методом главных координат позволил визуализировать разницу между сортами и наличие генетических взаимосвязей между ними (рис. 30).

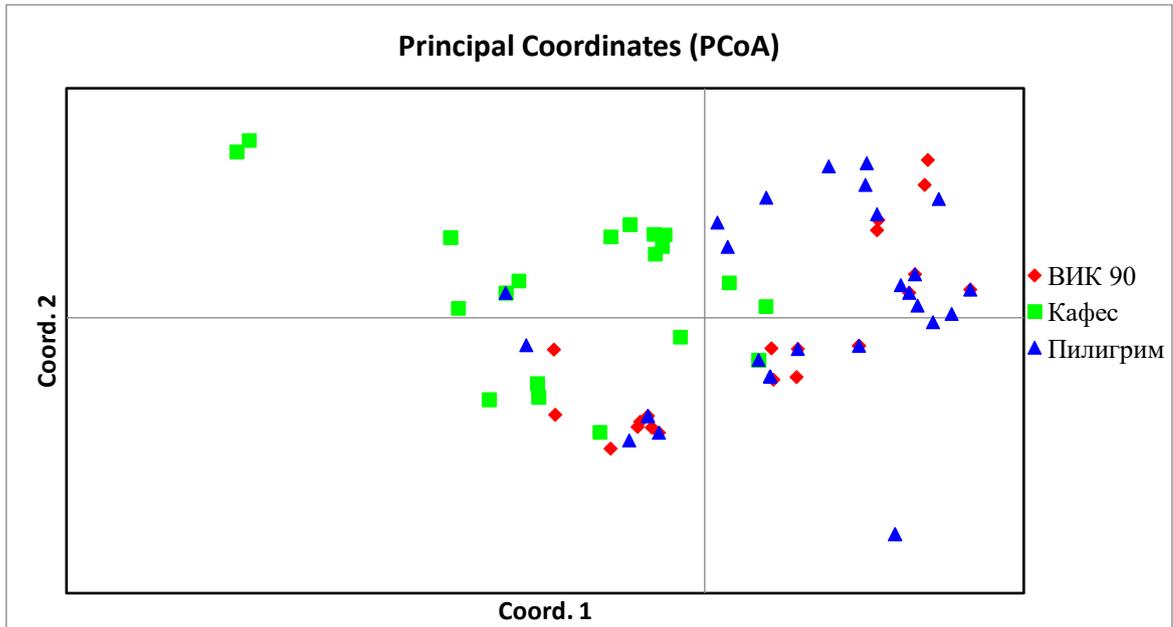


Рисунок 30 – PCoA-анализ результатов генотипирования сортов фестулолиума с использованием SSR-локусов. Цветовые коды соответствуют изучаемым сортам, где красный цвет – сорт ВИК 90; зеленый цвет – сорт Кафес; синий цвет – сорт Пилигрим.

Значения первых двух координат PCoA составляли 30 % и 43 %. Таким образом, суммарно они объясняют 73 % общей молекулярной вариации. Проведенный анализ наглядно демонстрирует разделение изучаемых сортов по происхождению. Так, сорта, выведенные селекционерами ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса» (ВИК 90 и Пилигрим), на графике расположились на минимальной генетической дистанции друг от друга. Тогда как генотипы, полученные из сорта Кафес (оригинатор – ФГБНУ «ФИЦ картофеля имени А.Г. Лорха»), находятся на некотором отдалении. На графике видно, что все изученные сорта фестулолиума имеют определенное сходство аллельного

состава, что может указывать на наличие общего селекционного материала, использованного при их создании.

В целом, распределение сортов фестулолиума, согласно данным анализа внутрисортного ДНК-полиморфизма, имеет сходство с результатами оценки межсортной генетической изменчивости, полученными на основе тестирования «балк-образцов» геномной ДНК.

3.12.3. Изучение особенностей генетической структуры сортов фестулолиума по результатам анализа с использованием SSR-маркеров

На основании генетических дистанций между исследуемыми образцами построена дендрограмма методом ближайших соседей (рис. 31).

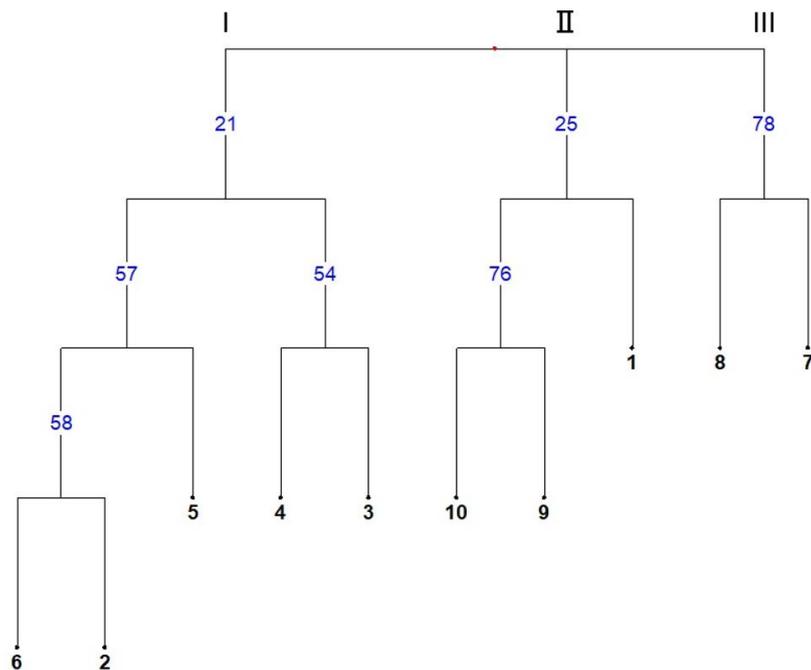


Рисунок 31 – Дендрограмма сортов фестулолиума по результатам анализа с микросателлитными маркерами: 1 – Аллегро; 2 – Пилигрим; 3 – Фест; 4 – Айвенго; 5 – Кафес; 6 – ВИК 90; 7 – Синта; 8 – Аэлита; 9 – Изумрудный; 10 – Дебют.

По результатам кластеризации сорта фестулолиума распределились по трём отчетливым кластерам. В первом сгруппировались образцы, обладающие райграсовым морфотипом: ВИК 90, Пилигрим, Айвенго и Фест селекции ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса», а также сорт Кафес, полученный в «ФИЦ картофеля имени А.Г. Лорха».

Во втором кластере наблюдается объединение сорта Дебют, близкого по своим морфо-биологическим признакам к *Lolium perenne* L. и сорта Изумрудный, отнесенного по морфотипу к овсянице тростниковой. Оба сорта разработаны селекционерами из Уральского федерального аграрного научно-исследовательского центра. Помимо Дебюта и Изумрудного в данном кластере с 25%-ной бутстреп-поддержкой расположился сорт райграсового морфотипа Аллегро селекции ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса».

В третьем кластере оказались сорта фестулолиума райграсового морфотипа Синта и Аэлита (бутстреп-поддержка 79 %), выведенные в Уральском Федеральном аграрном научно-исследовательском центре методом отдалённой гибридизации и полиплоидии.

В целом, результаты кластеризации на основе генетических дистанций распределили исследуемый материал в соответствии с происхождением и хозяйственно ценными признаками. Сгруппированные в единые кластеры сорта, несмотря на различное происхождение, с высокой вероятностью имеют общую генетическую основу. Данную информацию можно использовать в селекционных программах при создании генетически дивергентных комбинаций для скрещиваний.

3.13. Анализ сортов фестулолиума с использованием SCoT-маркеров

3.13.1. Отбор информативных маркеров для дифференциации сортов фестулолиума

Для скрининга сортов фестулолиума использованы 14 SCoT-маркеров (SCoT 02, SCoT 20, SCoT 23, SCoT 06, SCoT 13, SCoT 32, SCoT 15, SCoT 11,

SCoT 26, SCoT 07, SCoT 63, SCoT 60, SCoT 36, SCoT 08, SCoT 15), из них после предварительного анализа отобраны 3 информативных (SCoT 02, SCoT 13, SCoT 07), позволяющих выявлять полиморфизм и уникальные ДНК-профили для отдельных сортов в изучаемой выборке.

Всего с использованием SCoT-маркеров удалось получить 17 ПЦР-продуктов, из которых 15 (88,2 %) оказались полиморфными (табл. 26). В среднем, на каждый информативный маркер приходилось 7,5 полиморфных ампликона. Размер фрагментов амплификации варьировал от 800 до 2400 пар нуклеотидов. Средний уровень выявленного полиморфизма при анализе сортов фестулолиума с использованием SCoT-маркеров составлял 77,8 %.

Таблица 26 – Основные показатели информативности SCoT-маркеров по результатам анализа сортов фестулолиума

Код маркера	Название маркера	Общее кол-во ПЦР-продуктов	Кол-во полиморфных ПЦР-продуктов	Процент полиморфизма, %	Диапазон размеров ПЦР-продуктов, п.н.
А	SCoT 02	9	9	100.0	1201-1538
В	SCoT 13	5	5	100.0	824-2396
С	SCoT 07	3	1	33.3	922-1086
Сумма		17	15	-	-
Среднее		8,5	7,5	77,8	-

Среднее значение эффективного числа аллелей (N_e), показателя гетерозиготности (H_e), а также информативности маркеров (PI_C) в нашем исследовании равнялось 1,39, 0,24 и 0,37 соответственно (табл. 27). При этом показатель разрешающей способности маркера (R_p) оказался максимальным (1,8) при использовании праймера SCoT 02.

Таблица 27 – Показатели эффективности SCoT-маркеров при исследовании сортов фестулолиума

Название маркера	Эффективное число аллелей (Ne)	Показатель гетерозиготности (He)	Показатель информативности примеров (PIC)	Показатель разрешающей способности маркера (Rp)
SCoT 02	1,47	0,28	0,373	1,8
SCoT 13	1,37	0,23	0,369	1
SCoT 07	1,33	0,21	0,357	0,6
Среднее	1,39	0,24	0,37	1,13

В сравнении с результатами анализа образцов райграса SCoT-маркеры оказались менее эффективными при оценке генетического разнообразия сортов фестулолиума. Это, вероятно, связано с ограниченным количеством образцов в коллекции и близкородственным происхождением селекционного материала.

3.14. Молекулярно-генетические формулы сортов фестулолиума, разработанные на основе данных, полученных с использованием SSR- и SCoT-маркеров

Полученные данные о ДНК-профилях сортов фестулолиума были использованы для составления молекулярно-генетических формул (табл. 28, 29), где латинские буквы соответствуют SSR-локусу или SCoT-маркеру, а нижний индекс размеру выявленного ПЦР-продукта в парах нуклеотидов.

Таблица 28 – Молекулярно-генетические формулы по результатам генотипирования образцов фестулолиума с SSR-маркерами

Сорт	Молекулярно-генетическая формула на основе SSR-локусов
Аллегро	A _{331, 327, 300} B ₁₀₀ C _{214,197}
Пилигрим	A _{331, 300} B ₁₀₀ C _{245*} , 239, 232, 231, 218, 214, 197, 192, 188, 184, 178
Фест	A ₃₀₀ B ₁₀₀ C _{218, 212, 202, 197, 192, 184, 181}
Айвенго	A _{331, 300} B ₁₀₀ C _{239, 232, 228, 218, 212, 202, 197, 192, 184, 181}
Кафес	A _{331, 300} B ₁₀₀ C _{232, 231, 226, 220, 218, 208, 203, 188, 184, 181, 176, 170}
ВИК 90	A _{324, 300} B ₁₀₀ C ₂₄₃ , 239, 232, 231, 218, 203, 197, 192, 188, 184
Синта	A _{324, 300} B ₁₀₀ C _{223, 212, 197, 192, 181, 176}
Аэлита	A _{327, 300, 220} B ₁₀₀ C _{223, 212, 197, 192, 188, 181, 176, 170}
Изумрудный	A ₂₉₇ B ₈₆ C _{231, 228, 214, 212, 202}
Дебют	A _{324, 300} B ₁₀₀ C _{239, 228, 212, 208, 202, 197}

Примечание: жирным начертанием выделены сортоспецифичные ПЦР-продукты.

С помощью SSR-локуса G03_089 удалось выявить сортоспецифичные ПЦР-продукты для двух сортов: Аэлита и Изумрудный. SSR-локус AJ872206 позволил обнаружить пять сортоспецифичных ДНК-фрагментов для трёх сортов (Пилигрим, Кафес, ВИК 90). При амплификации с праймерами, разработанными к маркеру LP165, уникальный аллель выявлена для сорта Изумрудный.

Таким образом, по результатам анализа с SSR-маркерами уникальные аллели удалось выявить для пяти сортов фестулолиума (Пилигрим, Кафес, ВИК 90, Аэлита, Изумрудный). При этом сортоспецифичные ДНК-спектры по совокупности информативных микросателлитных маркеров обнаружены для всех анализируемых образцов.

Таблица 29 – Молекулярно-генетические формулы сортов фестулолиума, разработанные на основе SCoT-маркеров

Сорт	Молекулярно-генетические формулы на основе SCoT-маркеров
Аллегро	A _{2538, 2170, 1774, 1528, 1224} B _{2396, 1795} C ₉₂₂
Пилигрим	A _{2538, 2170, 1774, 1528, 1224} B _{2396, 1795} C ₉₂₂
Фест	A _{2538, 2170, 1774, 1528, 1224} B _{2396, 1795} C ₉₂₂
Айвенго	A _{2538, 2170, 1774, 1528, 1224} B _{2396, 1795, 1169} C ₉₂₂
Кафес	A _{2538, 2170, 1774, 1528, 1224} B _{2396, 1795} C ₉₂₂
ВИК 90	A _{2538, 2170, 1774, 1528, 1224} B _{2396, 1795} C ₉₂₂
Синта	A _{2538, 2170, 1774, 1528, 1224} B _{2396, 1795} C ₉₂₂
Аэлита	A _{2538, 2170, 1774, 1528, 1224} B _{2396, 1795} C ₉₂₂
Изумрудный	A _{1871, 1690, 1478, 1201} B _{1348, 824} C _{1086, 935}
Дебют	A _{2538, 2170, 1774, 1528, 1224} B _{2396, 1795} C ₉₂₂

Примечание: жирным начертанием выделены сортоспецифичные ПЦР-продукты.

По результатам выявленного аллельного разнообразия с использованием SCoT-маркеров выявлено 9 сортоспецифичных ДНК-фрагментов. При этом большинство из них (8) относится к сорту овсяничного морфотипа «Изумрудный». Кроме того, удалось обнаружить уникальный фрагмент для сорта фестулолиума «Айвенго», обладающего райграсовым морфотипом.

3.15. Разработка молекулярно-генетических паспортов для сортов райграса и фестулолиума

Молекулярные формулы послужили основой для создания генетических паспортов райграса пастбищного, райграса однолетнего и фестулолиума. Дополнительно в паспорт была включена информация по происхождению

сорта, регионам возделывания, основным морфобиологическим признакам и хозяйственно ценным свойствам. На рисунках 32 и 33 изображены образцы генетических паспортов райграса пастбищного, разработанные на основе SSR- и SCoT-маркеров.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПАСПОРТ РАЙГРАСА
ПАСТБИЩНОГО (*Lolium perenne* L.)

сорт **Агат**

Оригинатор: ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса»

Тип растения: тетраплоид

Особенности сорта:

Куст в начальный период развития промежуточный. Зеленая окраска листа средней интенсивности. Растение весной промежуточное, средней высоты. Тенденция к образованию соцветий отсутствует или очень слабая. Время выметывания во второй год среднее - позднее, растение при выметывании высокое. Флаговый лист длинный, средней ширины. Стебель длинный. Соцветие - длинное, колосков среднее количество - много. Средняя урожайность сухого вещества во 2 регионе - 44,4 ц/га, на 3,3 ц/га выше среднего стандарта, максимумная - 123,6 ц/га. Сухое вещество - 37,6%. Среднее содержание белка в сухом веществе во 2 регионе 8,23%, клетчатки - 27,7%. Сбор белка - 3,7 ц/га. Сорт превышает средний стандарт по содержанию и сбору белка. По данным заявителя, сорт характеризуется долголетием.

Зона возделывания:

Допущен к использованию с 2018 г. по Северо-Западному, Центральному и Уральскому регионам.



Молекулярно-генетическая формула:

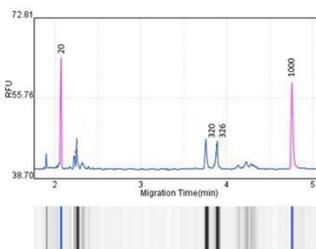
A_{453, 487, 552} **B**_{303, 301, 312, 358, 384, 391, 428*}, 362 **C**_{300, 320, 326} **D**_{206, 223, 229, 243} **E**_{161, 211, 232} **F**₁₄₂ **G**_{281, 306}

*A – G05_044; B – G07_038; C – G03_089; D – G04_092; E – AJ872206; F – LPSSR01h06; G – LPSSR03b03.

ДНК-идентификационные SSR-маркеры:

G07_058	G03_089
428	320/326*

*Примечание: жирным начертанием выделены аллели, верифицированные с использованием секвенирования.



ДНК-профиль сорта **Агат** по результатам амплификации с SSR-локусам **G03_089**.



Рисунок 32 – Образец генетического паспорта райграса пастбищного сорта **Агат**, разработанный на основе SSR-маркеров.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПАСПОРТ РАЙГРАСА
ПАСТБИЩНОГО (*Lolium perenne* L.)

сорт **ВИК 22**

Оригинатор: ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса»

Тип растения: диплоидный

Особенности сорта:

Куст в начальный период развития полупростостоячий, лист зелёный, средней длины, узкий. Тенденция к образованию соцветий в год посева отсутствует или очень слабая. Куст весной полупростостоячий, растение низкое. Время выметывания во второй год среднее, растение при выметывании низкое, средней ширины. Флаговый лист средней длины, узкий, отношение длины к ширине среднее. Самый длинный стебель очень короткий - короткий, вернее междоузлие средней длины. Соцветие короткое, средней плотности, колосков среднее количество. Основной колосок, исключая ость, короткий, его наружная колосковая чешуя средней длины. По данным заявителя, сорт зимостойкий, высокодекоративный, имеет повышенное побегообразование и продуктивное долголетие. Для газонного использования.

Зона возделывания: включён в Госреестр по Северному, Северо-Западному, Центральному, Волго-Вятскому, ЦФО, Северо-Кавказскому, Средневолжскому, Нижневолжскому, Уральскому, Западно-Сибирскому, Восточно-Сибирскому, Дальневосточному регионам с 2013 года.



Молекулярно-генетическая формула:

A₁₅₀₀**B**₁₄₈₄**D**₆₅₈, **E**₅₈₁**F**_{846*}

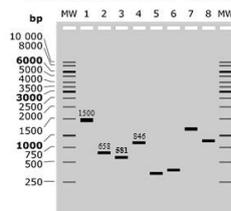
*A – SCoT 06; B – SCoT 23; D – SCoT 32; E – SCoT 35; F – SCoT 15.

ДНК-идентификационные SCoT-маркеры:

SCoT 06	SCoT 32	SCoT 35	SCoT 15
1500	658	581	846

*Примечание: жирным начертанием выделены фрагменты, подтвержденные секвенированием

ДНК-профиль сорта ВИК 22 по результатам электрофореза:



MW – маркер молекулярной массы; 1, 2, 3, 4 – сортоспецифичные ДНК-фрагменты



Рисунок 33 – Образец генетического паспорта райграса пастбищного сорта **ВИК 22**, разработанный на основе SCoT-маркеров.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Адаптированы методы генотипирования многолетних злаковых трав (райграса однолетнего, райграса пастбищного и фестулолиума) на основе систем SSR- и SCoT-маркирования.

Предложен эффективный и малозатратный способ оценки межсортового ДНК-полиморфизма с использованием «балк-образцов» из 30 генотипов от каждого сорта. Внесены существенные модификации в базовый SDS-метод ДНК-экстракции, что позволило получить образцы геномной ДНК высокого качества и с хорошим выходом из проростков злаковых трав.

Оптимизированы условия полимеразной цепной реакции с применением SSR- и SCoT-маркеров. В серии экспериментов определены необходимые режимы амплификации, компонентный состав реакционных смесей для маркеров разных типов и наиболее эффективные способы детекции результатов ПЦР.

2. На основе адаптированных методов анализа изучен межсортовой и внутрисортовой генетический полиморфизм образцов райграса и фестулолиума. Определен набор из 7 SSR-локусов и 8 SCoT-маркеров, информативных для различения и ДНК-идентификации сортов райграса пастбищного (*Lolium perenne* L.), из 5 SSR-локусов и 8 SCoT-маркеров для сортов райграса однолетнего (*Lolium multiflorum* Lam. var. *westerwoldicum* Wittm.), а также 3 SSR-локусов и 3 SCoT-маркеров для сортов фестулолиума (*Festulolium* F. Aschers. et Graebn.).

Наиболее информативными среди протестированных для всех исследуемых культур оказались следующие микросателлитные (SSR) локусы: G05_044, G07_058, G03_089, G04_092, AJ872206, LPSSRh01h06 и LPSSRk03b0. В дополнение к этому, также были отобраны SCoT-маркеры, такие как SCoT 02, SCoT 06, SCoT 13, SCoT 15, SCoT 17, SCoT 20, SCoT 23 и SCoT 35.

3. Изучены особенности генетической структуры изучаемых коллекций сортов злаковых трав и филогенетические взаимоотношения между

отдельными образцами. Установлено, что уровень внутрисортовой изменчивости в сортах-популяциях райграса и фестулолиума значительно выше, чем различия между сортами, и составляет более 80 %. Выявлены наиболее генетически дивергентные сорта, перспективные для использования в селекционных программах.

4. По результатам оценки ДНК-полиморфизма с использованием SSR- и SCoT-маркеров составлены молекулярно-генетические формулы изученных сортов. На основе уникальных для данных коллекций фрагментов амплифицированной ДНК разработаны генетические паспорта для 10 сортов райграса пастбищного, 5 сортов райграса однолетнего и 6 сортов фестулолиума. В паспорте, наряду с данными по аллельному составу сорта, содержится информация по его таксономической принадлежности, регионам возделывания, основным морфобиологическим признакам и хозяйственно ценным свойствам.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ПРЦ – полимеразная цепная реакция

SSR-маркеры (Simple Sequence Repeat) – простые, повторяющиеся последовательности ДНК

N_e – эффективное число аллелей

H_e – показатель гетерозиготности

PIC – показатель информативности праймеров

R_p – показатель разрешающей способности маркера

D – дискриминационная сила маркера

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Артюхова, А.В. Разработка метода паспортизации сортов люпина / А.В. Артюхова, С.Ю. Гришин, М.С. Князькина, М.И. Лукашевич, В.В. Заякин // Вестник Брянского государственного университета. – 2010. – № 4. – С. 81-84.
2. Асямов, В.С. Многолетние травы для создания газонов в условиях Западной Сибири / В.С. Асямов, А.Ф. Степанова, Н.А. Бондаренко // Вестник Омского государственного аграрного университета. – 2016. – № 2(22). – С. 66-71.
3. Багирова, С.Ф. Молекулярные методы в селекции растений / С.Ф. Багирова, С.И. Игнатова // Гавриш. – 2012. – № 2. – С. 33-38.
4. Базанов, Т.А. Генетический полиморфизм современных сортов льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) российской селекции с использованием SSR-маркеров / Т.А. Базанов, И.В. Ущাপовский, В.А. Лемеш, М.В. Богданова, Е.В. Лагуновская // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2020. – Т. 180. – № 4. – С. 81-87.
5. Боронникова, С.В. Молекулярное маркирование и генетическая паспортизация ресурсных и редких видов растений с целью оптимизации сохранения их генофондов / С.В. Боронникова // Аграрный вестник Урала. – 2009. – № 2. – С. 57-59.
6. Возделывание и использование новой кормовой культуры- фестулолиума-на корм и семена : учебное пособие / Н.И. Переправо [и др.]. – Москва : РГАУ-МСХА, 2012. – 28 с.
7. Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию Т.1. «Сорта растений»: [официальное издание: принят Министерством сельского хозяйства Российской Федерации 23 мая 2023 г.]. – М. : ФГБНУ «Росинформагротех», 2023. – 719 с.
8. Гродницкая, И.Д. Состав и фитопатогенные свойства бактерий, выделенных из пораженной бактериальной водянкой древесины сосны сибирской в прибайкалье / И.Д. Гродницкая, В.А. Сенашева, М.Ю.

- Трусова, О.Э. Пашкеева, Ю.Н. Баранчиков // Сибирский лесной журнал. – 2023. – № 1. – С. 70-84.
9. Грушецкая, З.Е. Использование ISSR-анализа для изучения внутри- и межвидового генетического полиморфизма различных таксонов высших растений / З.Е. Грушецкая, Т.В. Никитинская, С.В. Кубрак, О.В. Дзюбан, Л.В. Кухарева, В.Д. Поликсенова, В.В. Титок, В.А. Лемеш, В.И. Парфенов, Л.В. Хотылева // Вестник БГУ. Серия 2, Химия. Биология. География. – 2013. – № 3. – С. 50-56
10. Гучетль, С.З. Паспортизация новых линий и гибридов подсолнечника селекции ВНИИМК с помощью биохимических и молекулярных маркеров / С.З. Гучетль, Т.А. Челюстникова, Т.С. Антонова // Масличные культуры. – 2015. – № 3(163). – С. 31-37.
11. Дьяченко, В.В. Эффективность применение минеральных удобрений райграс однолетних в агроклиматических условиях Брянской области / В.В. Дьяченко, О.В. Постева // Вестник Брянской государственной сельскохозяйственной академии. – 2013. – № 3. – С. 4-10.
12. Дьяченко, О.В. Возделывание многолетних травосмесей как способ эффективного обеспечения кормопроизводства Брянской области / О.В. Дьяченко, А.В. Дронов, Е.И. Слёзко // Вестник Брянской государственной сельскохозяйственной академии. – 2016. – № 6(58). – С. 29-33.
13. Золотарев, В.Н. Культура райграса однолетнего (биология, селекция, семеноводство, использование в кормопроизводстве) : монография / В.Н. Золотарев, В.А. Катков, П.А. Чекмарев. – Москва : ФГБНУ «Росинформагротех», 2010. – 332 с.
14. Золотарев, В.Н. Результаты осеннего подкашивания травостоя фестулолиума райграсового морфотипа / В.Н. Золотарев, Н.И. Переправо // Вестник российской сельскохозяйственной науки. – 2018. – № 6. – С. 87-91.

15. Золотарев, В.Н. Хозяйственно-биологические характеристики фестулолиума сорта Фест и особенности возделывания / В.Н. Золотарев // Адаптивное кормопроизводство. – 2022. – № 2. – С. 35-48.
16. Зотов, А.А. Райграс пастбищный в луговом кормопроизводстве : монография / А.А. Зотов, А.Г. Кобзин, Г.А. Сабитов. – Тверь : Типография «Чудо», 2007. – 180 с.
17. Идентификация и паспортизация сортов кормовых трав (клевера лугового, люцерны изменчивой, посевной и хмелевидной) на основе ДНК-маркеров : методические рекомендации / И.А. Клименко [и др.]. – Москва : ООО «Угреша Т», 2020. – 35 с.
18. Календарь, Р.Н. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение / Р.Н. Календарь, В.И. Глазко // Физиология и биохимия культурных растений. – 2002. – Т. 34, № 4. – С. 279-296.
19. Калиничев, Е.А. Создание культурных пастбищ с использованием инновационной культуры фестулолиум / Е.А. Калиничев // Пищевые технологии будущего: инновации в производстве и переработке сельскохозяйственной продукции. – 2021. – С. 98-102.
20. Канукова, К.Р. ДНК-маркеры в растениеводстве / К.Р. Канукова, И.Х. Газаев, Л.К. Сабанчиева, З.И. Боготова, С.П. Аппаев // Известия Кабардино-Балкарского научного центра РАН. – 2019. – № 6 (92). – С. 220-232.
21. Клименко, И.А. Генетическая паспортизация российских сортов клевера лугового (*Trifolium Pratense* L.) на основе SSR-и SRAP-маркеров / И.А. Клименко, А.О. Шамустакимова, В.А. Душкин, Ю.М. Мавлютов, А.А. Антонов // Сельскохозяйственная биология. – 2023. – № 3. – С. 494-509.
22. Клименко, И.А. Изучение генетического полиморфизма российских сортов рапса и сурепицы с использованием SSR-и SRAP-маркеров / И.А. Клименко, В.Т. Воловик, А.А. Антонов, В.А. Душкин,

- А.О. Шамустакимова, Ю.М. Мавлютов // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2022. – Т. 26. – № 4. – С. 349-358.
23. Клименко, И.А. Изучение генетического разнообразия кормовых культур с помощью молекулярных ДНК-маркеров / И.А. Клименко, Н.Н. Козлов, А.О. Шамустакимова, В.А. Душкин // Адаптивное кормопроизводство. – 2019. – № 4 – С. 89-100.
24. Клименко, И.А. Эффективность SSR- и RawS-маркеров для оценки генетического полиморфизма сортов клевера лугового (*Trifolium pratense* L.) / И.А. Клименко, С.И. Костенко, Ю.М. Мавлютов, А.О. Шамустакимова // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2020. – Т. 181. – № 3. – С. 100-109.
25. Клименко, И.А. Эффективный способ выделения ДНК для ПЦР-анализа из «балк-образцов» проростков / И.А. Клименко, А.А. Антонов, В.А. Душкин, А.О. Шамустакимова, Ю.М. Мавлютов // Адаптивное кормопроизводство. – 2021. – Т. 6. – № 1. – С. 288-295.
26. Клименко, Н.С. Номенклатурные стандарты и генетические паспорта сортов картофеля, выведенные селекционерами Ленинградского НИИСХ «Белогорка» / Н.С. Клименко, Т.А. Гавриленко, И.Г. Чухина, Н.М. Гаджиев, З.З. Евдокимова, В.А. Лебедева // Биотехнология и селекция растений. – 2021. – Т. 3. – № 3. – С. 18-54.
27. Колобова, О.С. Генетическая паспортизация картофеля на основе мультиплексного анализа 10 микросателлитных маркеров / О.С. Колобова, О.П. Малюченко, Т.В. Шалаева, Е.П. Шанина, И.А. Шилов, Я.И. Алексеев, Н.С. Велишаева // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2017. – Т. 21. – № 1. – С. 124-127.
28. Конарев, А.В. Белковые маркеры-эффективный инструмент оценки состояния in-situ-и ex-situ-генетического разнообразия, качества семеноводства, а также сопровождения селекционного процесса у злаковых трав / А.В. Конарев, И.Н. Перчук // Современное состояние и

перспективы развития лугового кормопроизводства в XXI веке. – 2018. – С. 57-65.

29. Кондрацкая, И.П. Физиолого-биохимическая и молекулярно-генетическая характеристика межродового гибрида житняка гребенчатого (*Agropyron Cristatum* L.) с райграсом пастбищным (*Lolium Perenne* L.) / И.П. Кондрацкая, А.Н. Юхимук, В.А. Столепченко, О.В. Чижик, М.О. Беляй, П.П. Васько, В.Н. Решетников // Физиология растений и генетика. – 2018. – Т. 50. – № 5. – С. 371-382.

30. Косолапов В.М. Методические указания по селекции многолетних злаковых трав: методические указания / В.М. Косолапов, С.И. Костенко, С.В. Пилипко, В.С. Ключкова [и др.]. – Москва : РГАУ-МСХА, 2012. – 52 с.

31. Косолапов, В.М. Использование генетических ресурсов злаковых трав в селекции специализированных сортов / В.М. Косолапов, С.И. Костенко, С.В. Пилипко, В.С. Ключкова // Достижения науки и техники АПК. – 2018. – Т. 32, № 2. – С. 12-16.

32. Косолапов, В.М. Новые сорта кормовых культур-залог успешного развития кормопроизводства / В.М. Косолапов, С.В. Пилипко, С.И. Костенко // Достижения науки и техники АПК. – 2015. – Т. 29. – № 4. – С. 35-37.

33. Косолапов, В.М. Основные методы и результаты селекции многолетних трав / В.М. Косолапов, С.В. Пилипко // Кормопроизводство. – 2018. – № 2. – С. 23-26а.

34. Косолапов, В.М. Современные приоритеты селекции многолетних злаковых трав / В.М. Косолапов, С.И. Костенко, С.В. Пилипко, Н.Ю. Костенко // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2013. – № 1. – С. 19-21.

35. Костенко, С.И. Селекция многолетних злаковых трав для адаптивного кормопроизводства / С.И. Костенко, В.М. Косолапов, С.В. Пилипко, Е.С. Костенко // Кормопроизводство. – 2016. – № 8. – С. 35-38.

36. Кошен, Б. Райграс пастбищный и фестулолиум в луговом кормопроизводстве и озеленении : монография / Б. Кошен, А. Зотов, В. Золотарев. – Саарбрюккен, Германия : LAP LAMBERT, 2016. – 424 с.
37. Кравцов, В.В. Райграс однолетний для повышения кормопроизводства / В.В. Кравцов, В.А. Кравцов, Н.С. Лебедева, А.С. Капустин // Оренбургского государственного аграрного университета. – 2019. – № 1(75). – С. 44-45.
38. Кулуев, Б.Р. Методы ПЦР для выявления мультилокусного полиморфизма ДНК у эукариот, основанные на случайном праймировании / Б.Р. Кулуев, А.Х. Баймиев, Г.А. Геращенко, Д.А. Чемерис, В.В. Зубов, А.Р. Кулуев, А.Х. Баймиев, А.В. Чемерис // Генетика. – 2018. – Т. 54, № 5. – С. 495-511.
39. Кулуев, Б.Р. Оценка генетического разнообразия сортообразцов кормовых культур *Dactylis Glomerata* L., *Agropyron Pectiniforme* Roem. Et Schult и *Phleum Pratense* L., отобранных в условиях республики башкортостан / Б.Р. Кулуев, З.А. Бережнева, К.П. Гайнуллина, А.И. Габитова, А.А. Низаева // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. – 2023. – С. 32.
40. Лукашов, В.Н. Продуктивность и качество корма различных сортов фестулолиума на серых лесных почвах Калужской области / В.Н. Лукашов, А.Н. Исаков // Кормопроизводство. – 2016. – № 4. – С. 39.
41. Мавлютов, Ю.М. Изучение генетической структуры коллекции сортов райграса (*Lolium*) с использованием SSR- и SCoT-маркеров / Ю.М. Мавлютов, Е.А. Вертикова, А.О. Шамустакимова, И.А. Клименко // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. - 2023. – № 3(184). – С. 46-160.
42. Малышев, С.В. Идентификация и паспортизация сортов сельскохозяйственных культур (мягкой пшеницы, картофеля, томата, льна и свеклы) на основе ДНК-маркеров : методические рекомендации

- / С.В. Малышев, О.Ю. Убранович, Н.А. Картель. – Минск : ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», 2006. – 27.
43. Матвеева, Т.В. Молекулярные маркеры для видоидентификации и филогенетики растений / Т.В. Матвеева, О.А. Павлова, Д.И. Богомаз, Л.А. Демкович, А.Е. Лутова // Экологическая генетика. – 2011. – Т. 9, № 1. – С. 32-43.
44. Машьянов, М.А. Влияние состава содоминантов травосмеси на продуктивность и адаптивность разновидовых травостоев с доминированием фестулолиума в условиях северозапада России / М.А. Машьянов, В.В. Ганичева // Кормопроизводство. – 2015. – № 3. – С. 21-25.
45. Методика проведения испытаний на отличимость, однородность и стабильность райграс пастбищный, райграс многоукосный, райграс однолетний, райграс гибридный, райграс жёсткий (*Lolium spp.*) : [официальное издание: принят Министерством сельского хозяйства Российской Федерации 17 ноября 2011 г.]. – М. : ФГБНУ «Росинформагротех», 2011. – 9 с.
46. Налбандян, А.А. Микросателлитные маркеры в селекции сахарной свёклы / А.А. Налбандян, Т.П. Федулова, Н.Р. Михеева, А.В. Корниенко // Сахар. – 2021. – № 3. – С. 37-39.
47. Научные основы селекции и семеноводства многолетних трав в Центрально-Черноземном регионе России : научное издание / С.В. Сапрыкин [и др.]. – Воронеж : Воронежская областная типография, 2020. – 495 с.
48. Новоселова, Н.В. Молекулярные маркеры в селекции сортов ячменя, устойчивых к ионной токсичности (обзор) / Н.В. Новоселова, А.В. Бакулина // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. – 2020. – Т. 21, № 1. – С. 7-17.
49. Образцов, В.Н. Семенная и кормовая продуктивность фестулолиума в зависимости от подкормок травостоев минеральными

- удобрениями / В.Н. Образцов, Д.И. Щедрина, В.В. Кондратов // Актуальные вопросы применения удобрений в сельском хозяйстве. – 2017. – С. 166-170.
50. Образцов, В.Н. Фестулолиум в травосмесях с бобовыми травами / В.Н. Образцов, Д.И. Щедрина, С.В. Кадыров // Вестник Воронежского государственного аграрного университета. – 2021. – Т. 14, № 3(70). – С. 70.
51. Основные виды и сорта кормовых культур : научное издание / В.М. Косолапов [и др.]. – Москва : Издательство «Наука», 2015. – 543 с.
52. Привалов, Ф.И. Фестулолиум: достижения и приоритеты / Ф.И. Привалов, Е.Р. Клыга // Земледелие и растениеводство. – 2022. – № 1. – С. 18-21.
53. Привалова, К.Н. Фестулолиум (*Festulolium*)-новая кормовая культура в центральных областях лесной зоны / К.Н. Привалова, Р.Р. Каримов // Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования. – 2016. – № 12. – С. 443-446.
54. Рамазанова, С.А. Идентификация сортов сои российской селекции на основе анализа микросателлитных (SSR) локусов ДНК / С.А. Рамазанова, С.З. Гучетль, Т.А. Челюстникова, Т.С. Антонова // Масличные культуры. – 2008. – № 2(139). – С. 56-58.
55. Рамазанова, С.А. Оптимизация технологии генотипирования сои на основе анализа полиморфизма SSR-локусов ДНК / С.А. Рамазанова, А.С. Коломыцева // Масличные культуры. – 2020. – № 1(181). – С. 42-48.
56. Селекция и семеноводство многолетних трав : монография / А.С. Новоселова [и др.]. – Воронеж : Воронежская областная типография, 2005. – 376 с.
57. Селекция и семеноводство райграса : монография / В.Н. Золотарев [и др.]. – Астана : Типография ИП Жанадилова С.Т., 2009. – 320 с.
58. Скалозуб, О.М. Оценка исходного материала для селекции ежи сборной в условиях Приморского края / О.М. Скалозуб, Н.Л. Клочкова

// Вестник НГАУ (Новосибирский государственный аграрный университет). – 2021. – № 3. – С. 57-64.

59. Скрининг генетических ресурсов растений с использованием ДНК-маркеров: основные принципы, выделение ДНК, постановка ПЦР, электрофорез в агарозном геле : методические указания / И.Н. Анисимова [и др.]. – Санкт-Петербург : ВИР, 2018. – 47 с.

60. Сорты кормовых культур селекции ФГБНУ «Федеральный научный центр кормопроизводства и агроэкологии имени В.Р. Вильямса» : монография / В.М. Косолапов [и др.]. – Москва : ООО «Угрешская Типография», 2019. – 92 с.

61. Сулимова, Г.Е. ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и области применения / Г.Е. Сулимова // Успехи современной биологии. – 2004. – Т. 124, № 3. – С. 260-271.

62. Супрун, И.И. Апробация мультиплексного SSR-анализа для ДНК-паспортизации сортов риса / И.И. Супрун, В.С. Ковалев // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2015. – № 114. – С. 1417-1427.

63. Сухарева, А.С. ДНК-маркеры для генетического анализа сортов культурных растений / А.С. Сухарева, Б.Р. Кулуев // Биомика. – 2018. – Т. 10. – № 1. – С. 069-084.

64. Теличко, О.Н. Экономическая эффективность возделывания райграса однолетнего (*Lolium multiflorum*) при многоукосном использовании в Приморье / О.Н. Теличко // Аграрный вестник Приморья. – 2018. – № 1. – С. 19-23.

65. Уразова, Л.Д. Селекция многолетних злаковых трав в таежной зоне Западной Сибири / Л.Д. Уразова, О.В. Литвинчук // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2017. – Т. 47, № 2. – С. 51-58.

66. Хавкин, Э.Е. Молекулярная селекция растений: ДНК-технологии создания новых сортов сельскохозяйственных культур/ Э.Е. Хавкин // Сельскохозяйственная биология. – 2003. – Т. 38, №. 3. – С. 26-41.
67. Хлесткина, Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции / Е.К. Хлесткина // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2015. – Т. 17, № 4/2. – С. 1044-1054.
68. Хлесткина, Е.К. Молекулярные методы анализа структурно-функциональной организации генов и геномов высших растений / Е.К. Хлесткина // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2011. – Т. 15, № 4. – С. 757-768.
69. Частная селекция полевых культур : учебное пособие / В.В. Пыльнев [и др.] ; отв. ред. И.А. Фролова. – Москва : Колосс, 2005. – 552 с.
70. Чесноков, Ю. В. Статистический анализ и молекулярные маркеры в селекции растений на гетерозис / Ю.В. Чесноков, Н.В. Кочерина, А.М. Артемьева // Сельскохозяйственная биология. – 2014. – № 1. – С. 3-16.
71. Чесноков, Ю.В. Генетические маркеры: сравнительная классификация молекулярных маркеров / Ю.В. Чесноков // Овощи России. – 2018. – № 3. – С. 11-15.
72. Чесноков, Ю.В. Генетические ресурсы растений и ускорение селекционного процесса : монография / Ю.В. Чесноков, В.М. Косолапов. – Москва : Угрешская типография, 2016. – 172 с.
73. Шейкина, О.В. Применение молекулярных маркеров в лесном селекционном семеноводстве в России: опыт и перспективы (обзор) / О.В. Шейкина // Вестник Поволжского государственного технологического университета. Серия: Лес. Экология. Природопользование. – 2022. – № 2(54). – С. 64-79.
74. Alm, V. A linkage map of meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.) and comparative mapping with other *Poaceae* species / V. Alm, C. Fang, C.S.

- Busso, K.M. Devos, K. Vollan, Z. Grieg, O.A. Rognli // Theoretical and Applied Genetics. – 2003. – Vol. 108. – P. 25-40.
75. Amar, M.H. Exploitation of SSR, SRAP and CAPS-SNP markers for genetic diversity of Citrus germplasm collection / M.H. Amar, M.K. Biswas, Z. Zhang, W.W. Guo // Scientia Horticulturae. – 2011. – Vol. 128, № 3. – P. 220-227.
76. Anderson, C.B. Protocol: a versatile, inexpensive, high-throughput plant genomic DNA extraction method suitable for genotyping-by-sequencing / C.B. Anderson, B.K. Franzmayr, S.W. Hong, A.C. Larking // Plant Methods. – 2018. – Vol. 14. – P. 1-10.
77. Bert, P.F. A high-density molecular map for ryegrass (*Lolium perenne*) using AFLP markers / P.F. Bert, G. Charmet, P. Sourdille, M.D. Hayward, F. Balfourier // Theoretical and applied genetics. – 1999. – Vol. 99. – P. 445-452.
78. Blackmore, T. Genetic–geographic correlation revealed across a broad European ecotypic sample of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) using array-based SNP genotyping / T. Blackmore, I. Thomas, R. McMahon, W. Powell, M. Hegarty // Theoretical and Applied Genetics. – 2015. – Vol. 128. – P. 1917-1932.
79. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) [Электронный ресурс]. – URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. (дата обращения: 06.06.2023).
80. Bolaric, S. Genetic diversity in European perennial ryegrass cultivars investigated with RAPD markers / S. Bolaric, S. Barth, A.E. Melchinger, U.K. Posselt // Plant breeding. – 2005. – Vol. 124, № 2. – P. 161-166.
81. Boller, B. Fodder crops and amenity grasses / B. Boller, U.K. Posselt, F. Veronesi. – New York, NY, USA : Springer, 2010. – P. 437.
82. Bostan, C. Feed quality and productivity in some varieties of italian ryegrass-*Lolium Multiflorum* Lam. / C. Bostan, D. Rechitean, N.M. Istrate-

- Schiller, M.D. Bordean, A. Horablaga, P.N. Bostan, L. Cojocariu // Life science and sustainable development. – 2022. – Vol. 3, № 2. – P. 107-113.
83. Botstein, D. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms / D. Botstein, R.L. White, M. Skolnick, R.W. Davis // American journal of human genetics. – 1980. – Vol. 32, № 3. – P. 314.
84. Busti, A. RFLP markers for cultivar identification in tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) / A. Busti, M.E. Caceres, O. Calderini, S. Arcioni, F. Pupilli // Genetic Resources and Crop Evolution. – 2004. – Vol. 51. – P. 443-448.
85. Chen, C. Comparative RFLP mapping of meadow and tall fescue / C. Chen, D.A. Sleper, G.S. Johal // Theoretical and applied genetics. – 1998. – Vol. 97. – P. 255-260.
86. Collard, B.C.Y. Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants / B.C.Y. Collard, D.J. Mackill // Plant molecular biology reporter. – 2009. – Vol. 27. – P. 86-93.
87. Crossa, J. Methodologies for estimating the sample size required for genetic conservation of outbreeding crops / J. Crossa // Theoretical and Applied Genetics. – 1989. – Vol. 77. – P. 153-161.
88. DARwin software, version 5.0 : рабочая программа / авт.-сост. X. Pierrer, J.P. Jacquemoud-Collet // [<http://darwin.cirad.fr/Download/>]. – Режим доступа: <http://darwin.cirad.fr/Download/>
89. Earl, D.A. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method / D.A. Earl, B.M. Von Holdt // Conservation genetics resources. – 2012. – Vol. 4. – P. 359-361.
90. Evanno, G. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study / G. Evanno, S. Regnaut, J. Goudet // Molecular ecology. – 2005. – Vol. 14, № 8. – P. 2611-2620.

91. Excoffier, L. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data / L. Excoffier, P.E. Smouse, J.M. Quattro // *Genetics*. – 1992. – Vol. 131, № 2. – P. 479-491.
92. Falush, D. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies / D. Falush, M. Stephens, J.K. Pritchard // *Genetics*. – 2003. – Vol. 164, № 4. – P. 1567-1587.
93. Farshadfar, M., Application of SCoT marker to discriminate *Lolium perenne* and *Lolium multiflorum* species / M. Farshadfar, H. Shirvani, M. Amjadian, A. Yaghotipoor // *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*. – 2018. – Vol. 26, № 2. – P. 207-220.
94. Fojtik, A. Methods of grass improvement used at the Plant Breeding Station Hladke Zivotice / A. Fojtik // *Genetica Polonica*. – 1994. – Vol. 35. – P. 25-31.
95. Forster, J.W. Application of DNA profiling to an outbreeding forage species / J.W. Forster, E.S. Jones, R. Kölliker, M.C. Drayton, M.P. Dupal, K.M. Guthridge, K.F. Smith // Wallingford UK : CABI, 2001. – P. 299-320.
96. Fu, K. Insight into the genetic variability analysis and cultivar identification of tall fescue by using SSR markers / K. Fu, Z. Guo, X. Zhang, Y. Fan, W. Wu, D. Li, Y. Peng, L. Huang, M. Sun, S. Bai, X. Ma // *Hereditas*. – 2016. – Vol. 153. – P. 1-9.
97. Ganal, M.W., SNP identification in crop plants / M.W. Ganal, T. Altmann, M.S. Röder // *Current opinion in plant biology*. – 2009. – Vol. 12, № 2. – P. 211-217.
98. Guan, X. Genetic diversity and structure of *Lolium* species surveyed on nuclear simple sequence repeat and cytoplasmic markers / X. Guan, N. Yuyama, A. Stewart, C. Ding, N. Xu, T. Kiyoshi, H. Cai // *Frontiers in Plant Science*. – 2017. – Vol. 8. – P. 584
99. Guthridge, K.M. AFLP analysis of genetic diversity within and between populations of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) / K.M. Guthridge, M.P.

- Dupal, R. Kölliker, E.S. Jones, K.F. Smith, J.W. Forster // *Euphytica*. – 2001. – Vol. 122. – P. 191-201.
100. Herrmann, D. Sample size for diversity studies in tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*) based on codominantly coded SSR markers / D. Herrmann, S. Flajoulot, B. Julier // *Euphytica*. – 2010. – Vol. 171. – P. 441-446.
101. Huang, L.K. Genetic diversity and relationships in cultivars of *Lolium multiflorum* Lam. using sequence-related amplified polymorphism markers / L.K. Huang, X.Y. Jiang, Q.T. Huang, Y.F. Xiao, Z.H. Chen, X.Q. Zhang, J.M. Miao, H.D. Yan // *Genetics and Molecular Research*. – 2014. – Vol. 13, № 4. – P. 10142-10149.
102. Huff, D.R. RAPD characterization of heterogenous perennial ryegrass cultivars / D.R. Huff // *Crop science*. – 1997. – Т. 37, № 2. – P. 557-564.
103. IMEC [Электронный ресурс]. – URL: <https://irscope.shinyapps.io/iMEC/>. (дата обращения: 21.10.2022).
104. Jiang, L.F. Analysis of diversity and relationships among orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) accessions using start codon-targeted markers / L.F. Jiang, X. Qi, X.Q. Zhang, L.K. Huang, X. Ma, W.G. Xie // *Genetics and molecular research*. – 2014. – Vol. 13, № 2. – P. 4406-4418.
105. Jiang, L.F. Identification of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) cultivars by using simple sequence repeat markers / L.F. Jiang, X.Q. Zhang, X. Ma, L.K. Huang, W.G. Xie, Y.M. Ma, Y.F. Zhao // *Genetics and Molecular Research: GMR*. – 2013. – Vol. 12. – № 4. – P. 5111-5123.
106. Jones, E.S. An enhanced molecular marker based genetic map of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) reveals comparative relationships with other *Poaceae* genomes / E.S. Jones, N.L. Mahoney, M.D. Hayward, I.P. Armstead, J.G. Jones, M.O. Humphreys, I.P. King, T. Kishida, T. Yamada, F. Balfourier, G. Charmet, J.W. Forster // *Genome*. – 2002. – Vol. 45, № 2. – P. 282-295.
107. Karim, K., Genetic diversity in barley genetic diversity in local Tunisian barley based on RAPD and SSR analysis / K. Karim, A. Rawda,

C.M. Hatem // *Biological Diversity and Conservation*. – 2009. – Vol. 2, № 1. – P. 27-35.

108. Kölliker, R. Bulked AFLP analysis for the assessment of genetic diversity in white clover (*Trifolium repens* L.) / R. Kölliker, E.S. Jones, M.Z.Z. Jahufer, J.W. Forster // *Euphytica*. – 2001. – Vol. 121. – P. 305-315.

109. Kondratskaya, I. DNA markers as a means of assessing the genetic diversity and identification of grasses / I. Kondratskaya, A. Yukhimuk, O. Chizhik, V. Reshetnikov // *Agrofor International Journal*. – 2022. – Vol. 7, № 3.

110. Kondratskaya, I.P. The creating of inter-genetic hybrids of *Festulolium* of *Festuca arundinacea* morphotype with the use of post-genomic technologies and DNA-marking / I.P. Kondratskaya, A.N. Yukhimuk, V.A. Stolepchenko, O.V. Chizhik, Z.G. Kozlovskaya, P.P. Vasko, V.N. Reshetnikov // *Factors in experimental evolution of organisms*. – 2019. – Vol. 25. – P. 235-259.

111. Kopecký, D. Development and mapping of DArT markers within the *Festuca-Lolium* complex / D. Kopecký, J. Bartoš, A.J. Lukaszewski, J.H. Baird, V. Černoch, R. Kölliker, O.A. Rognli, H. Blois, V. Caig, T. Lübberstedt, B. Studer, P. Shaw, J. Doležel A. Kilian // *BMC genomics*. – 2009. – Vol. 10, № 1. – P. 1-11.

112. Kubik, C. Genetic diversity in seven perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) cultivars based on SSR markers / C. Kubik, M. Sawkins, W.A. Meyer, B.S. Gaut // *Crop science*. – 2001. – Vol. 41. – № 5. – P. 1565-1572.

113. Kumar, L.S. DNA markers in plant improvement: an overview / L.S. Kumar // *Biotechnology advances*. – 1999. – Vol. 17, № 2-3. – P. 143-182.

114. Lauvergeat, V. Sixty simple sequence repeat markers for use in the *Festuca-Lolium* complex of grasses / V. Lauvergeat, P. Barre, M. Bonnet, M. Ghesquiere // *Molecular Ecology Notes*. – 2005. – Vol. 5, № 2. – P. 401-405.

115. Li, G., Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping

and gene tagging in Brassica / G. Li, C.F. Quiros // Theoretical and applied genetics. – 2001. – Vol. 103. – P. 455-461.

116. Liu, S. DArT, SNP, and SSR analyses of genetic diversity in *Lolium perenne* L. using bulk sampling / S. Liu, U. Feuerstein, W. Luesink, S. Schulze, T. Asp, B. Studer, H.C. Becker, K.J. Dehmer // BMC genetics. – 2018. – Vol. 19. – №. 1. – P. 1-13.

117. Loera-Sanchez, M. DNA-based assessment of genetic diversity in grassland plant species: Challenges, approaches, and applications / M. Loera-Sánchez, B. Studer, R. Kölliker // Agronomy. – 2019. – Vol. 9, № 12. – P. 881.

118. Mammadov, J. SNP markers and their impact on plant breeding / J. Mammadov, R. Aggarwal, R. Buyyarapu, S. Kumpatla // International journal of plant genomics. – 2012. – Vol. 2012.

119. Mohammadi, R. ISSR markers efficiency to assess cool-season grass species genetic diversity and phylogenetic relationships / R. Mohammadi, S. Amiri, V. Montakhabi Kalajahi // Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences. – 2022. – Vol. 92, № 3. – P. 691-699.

120. Momotaz, A. Identification of cultivars and accessions of *Lolium*, *Festuca* and *Festulolium* hybrids through the detection of simple sequence repeat polymorphism / A. Momotaz, J.W. Forster, T. Yamada // Plant Breeding. – 2004. – Vol. 123, № 4. – P. 370-376.

121. Mulpuri, S. Start codon targeted (SCoT) polymorphism in toxic and non-toxic accessions of *Jatropha curcas* L. and development of a codominant SCAR marker / S. Mulpuri, T. Muddanuru, G. Francis // Plant science. – 2013. – Vol. 207. – P. 117-127.

122. Muylle, H. Identification of molecular markers linked with crown rust (*Puccinia coronata* f. sp. lolii) resistance in perennial ryegrass (*Lolium perenne*) using AFLP markers and a bulked segregant approach / H. Muylle,

- J. Baert, E. Van Bockstaele, B. Moerkerke, E. Goetghebeur, I. Roldán-Ruiz // *Euphytica*. – 2005. – Vol. 143. – P. 135-144.
123. Nie, G. Genetic variability evaluation and cultivar identification of tetraploid annual ryegrass using SSR markers / G. Nie, T. Huang, X. Ma, L. Huang, Y. Peng, Y. Yan, Z. Li, X. Wang, X. Zhang // *PeerJ*. – 2019. – Vol. 7. – P. e7742.
124. Okonechnikov, K. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit / K. Okonechnikov, O. Golosova, M. Fursov // *Bioinformatics*. – 2012. – Vol. 28, № 8. – P. 1166-1167.
125. Pasquali, E. Assessment of the genetic distinctiveness and uniformity of pre-basic seed stocks of italian ryegrass varieties / E. Pasquali, F. Palumbo, G. Barcaccia // *Genes*. – 2022. – Vol. 13, № 11. – P. 2097.
126. Peakall, R.O.D. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research / R.O.D. Peakall, P.E. Smouse // *Molecular ecology notes*. – 2006. – Vol. 6, № 1. – P. 288-295.
127. Peter-Schmid, M.K.I. Habitat and management affect genetic structure of *Festuca pratensis* but not *Lolium multiflorum* ecotype populations / M.K.I. Peter-Schmid, B. Boller, R. Kölliker // *Plant Breeding*. – 2008. – Vol. 127, № 5. – P. 510-517.
128. Porebski, S. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components / S. Porebski, L.G. Bailey, B.R. Baum // *Plant molecular biology reporter*. – 1997. – Vol. 15. – P. 8-15.
129. Pritchard, J.K. Inference of population structure using multilocus genotype data / J.K. Pritchard, M. Stephens, P. Donnelly // *Genetics*. – 2000. – Vol. 155, № 2. – P. 945-959.
130. Robarts, D.W.H. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers: A potential resource for studies in plant molecular biology / D.W.H. Robarts, A.D. Wolfe // *Applications in plant sciences*. – 2014. – Vol. 2, № 7. – P. 1400017.

131. Roldan-Ruiz, I. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.) / I. Roldan-Ruiz, J. Dendauw, E. Van Bockstaele, A. Depicker, M. De Loose // Molecular breeding. – 2000. – Vol. 6. – P. 125-134.
132. Roldan-Ruiz, I. Estimating genetic conformity between related ryegrass (*Lolium*) varieties. 2. AFLP characterization / I. Roldan-Ruiz, F.A. Van Eeuwijk, T.J. Gilliland P. Dubreuil, C. Dillmann, J. Lallemand, M. De Loose, C.P. Baril // Molecular Breeding. – 2000. – Vol. 6. – P. 593-602.
133. Safari, H. The study of inter-specific relationships of *Bromus* genus based on SCoT and ISSR molecular markers / H. Safari, A. Zebarjadi, D. Kahrizi, A.A. Jafari // Molecular biology reports. – 2019. – Vol. 46. – №. 5. – P. 5209-5223.
134. Saitou, N. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees / N. Saitou, M. Nei //Molecular biology and evolution. – 1987. – Vol. 4. № 4. – P. 406-425.
135. Sampoux, J.P. Breeding perennial grasses for forage usage: An experimental assessment of trait changes in diploid perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) cultivars released in the last four decades / J.P. Sampoux, P. Baudouin, B. Bayle, V. Beguier, P. Bourdon, J.F. Chosson, F. Deneufbourg, C. Galbrun, M. Ghesquière, D. Noël, W. Pietraszek, B. Tharel, A. Viguié // Field Crops Research. – 2011. – Vol. 123, № 2. – P. 117-129.
136. Studer, B. A transcriptome map of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) / B. Studer, S. Byrne, R.O. Nielsen, F. Panitz, C. Bendixen, M.S. Islam, M. Pfeifer, T. Lübberstedt, T. Asp //BMC genomics. – 2012. – Vol. 13, № 1. – P. 1-13.
137. Studer, B. Expressed sequence tag-derived microsatellite markers of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) / B. Studer, T. Asp, U. Frei, S. Hentrup, H. Meally, A. Guillard, S. Barth, H. Muylle, I. Roldán-Ruiz, P. Barre, C. Koning-Boucoiran, G. Uenk-Stunnenberg, O. Dolstra, L. Skøt, K.P. Skøt, L.B. Turner, M.O. Humphreys, R. Kölliker, N. Roulund, K. K. Nielsen, T. Lübberstedt // Molecular Breeding. – 2008. – Vol. 21. – P. 533-548.

138. Tabaripour, R. Interspecific molecular variation of *Lolium* L. based on ISSR, SCoT and ITS / R. Tabaripour, M. Keshavarzi // Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science. – 2021. – Vol. 45. – №. 4. – P. 1263-1272.
139. Tanhuanpää, P. High SSR diversity but little differentiation between accessions of Nordic timothy (*Phleum pratense* L.) / P. Tanhuanpää, O. Manninen // hereditas. – 2012. – Vol. 149, № 4. – P. 114-127.
140. Tautz, D. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes / D. Tautz, M. Renz // Nucleic acids research. – 1984. – Vol. 12, № 10. – P. 4127-4138.
141. Tomaszewski, C. Genetic linkage mapping in an F2 perennial ryegrass population using DArT markers / C. Tomaszewski, S.L. Byrne, A. Foito, S. Kildea, D. Kopecký, J. Doležel, J. Seymour, D. Stewart, S. Barth // Plant Breeding. – 2012. – Vol. 131. № 2. – P. 345-349.
142. Tm Calculator (NEB Tm Calculator) [Электронный ресурс]. – URL: <https://tcalculator.neb.com/#!/main> (дата обращения: 30.01.2022).
143. Velmurugan, J. An ultra-high density genetic linkage map of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) using genotyping by sequencing (GBS) based on a reference shotgun genome assembly / J. Velmurugan, E. Mollison, S. Barth, D. Marshall, L. Milne, C.J. Creevey, B. Lynch, H. Meally, M. McCabe, D. Milbourne // Annals of Botany. – 2016. – Vol. 118, № 1. – P. 71-87.
144. Wang, J. Assignment of individual genotypes to specific forage cultivars of perennial ryegrass based on SSR markers / J. Wang, M.P. Dobrowolski, N.O.I. Cogan, J.W. Forster, K.F. Smith // Crop Science. – 2009. – Vol. 49, № 1. – P. 49-58.
145. Wang, J. Forster J. W. Prospects for applications of genomic tools in registration testing and seed certification of ryegrass varieties / J. Wang, N.O.I. Cogan, J.W. Forster // Plant Breeding. – 2016. – Vol. 135, № 4. – P. 405-412.

146. Warnke, S.E. Genetic linkage mapping of an annual× perennial ryegrass population / S.E. Warnke, R.E. Barker, G. Jung, S. Sim, M.A. Rouf Mian, M.C. Saha, L.A. Brilman, M.P. Dupal, J.W. Forster // Theoretical and applied Genetics. – 2004. – Vol. 109. – P. 294-304.
147. Xie, W.G. Genetic variation and comparison of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) cultivars and wild accessions as revealed by SSR markers / W.G. Xie, X.F. Lu, X.Q. Zhang, L.K. Huang, L. Cheng // Genet. Mol. Res. – 2012. – Vol. 11. – P. 425-433.
148. Xu, W.W. Genetic diversity of tall fescue germplasm based on RFLPs / W.W. Xu, D.A. Sleper, G.F. Krause // Crop science. – 1994. – Vol. 34, № 1. – P. 246-252.
149. Yamada, T. Genetic analysis of forage grasses based on heterologous RFLP markers detected by rice cDNAs / T. Yamada, T. Kishida // Plant breeding. – 2003. – Vol. 122, № 1. – P. 57-60.
150. Yan, H. Genetic diversity and association of EST-SSR and SCoT markers with rust traits in orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) / H. Yan, Y. Zhang, B. Zeng, G. Yin, X. Zhang, Y. Ji, L. Huang, X. Jiang, X. Liu, Y. Peng, X. Ma, Y. Yan // Molecules. – 2016. – Vol. 21. – № 1. – P. 66.
151. Yu, Q. RAD-seq as an effective strategy for heterogenous variety identification in plants—a case study in Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum*) / Q. Yu, Y. Ling, Y. Xiong, W. Zhao, Y. Xiong, Z. Dong, J. Yang, J. Zhao, X. Zhang, X. Ma // BMC Plant Biology. – 2022. – Vol. 22, № 1. – P. 231.
152. Zeng, B. Evaluation of genetic diversity and relationships in orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) germplasm based on SRAP markers / B. Zeng, X.Q. Zhang, Y. Lan, W.Y. Yang // Canadian Journal of Plant Science. – 2008. – Vol. 88, № 1. – P. 53-60.

Приложение 1 – Молекулярно-генетический паспорт сорта райграса пастбищного Карат, разработанный на основе SSR-локусов

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПАСПОРТ РАЙГРАСА

ПАСТБИЩНОГО (*Lolium perenne* L.)

сорт **Карат**

Оригинатор: ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса»

Авторы сорта: Г.Ф. Кулешов, С.И. Костенко, В.С. Клочкова, Н.Ю. Костенко, Е.Е. Мапоженец.

Тип растения: тетраплоид

Особенности сорта:

Зимостойкость высокая, засухоустойчивость выше средней. Сбор сухого вещества — 8–9 т/га, урожайность семян — 500–600 кг/га. Отличается невысоким ростом и тонкостебельностью, выносит многократное скашивание. Слабо поражается болезнями и вредителями

Зона возделывания:

Допущен к использованию с 2004 года по всем регионам.



Молекулярно-генетическая формула:

A_{458, 491, 557} B_{303, 297, 352, 379, 294, 346, 410} C_{300, 327, 335}
D_{218, 214, 203, 234} E_{161, 211, 232, 225, 222} F₁₄₂ G_{181, 301}

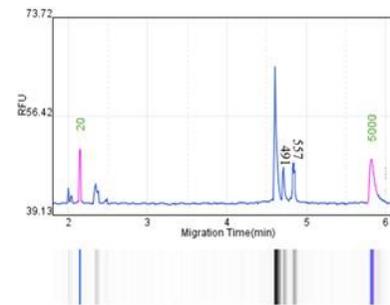
A – G05_044; B – G07_058; C – G03_089; D – G04_092;

E – AJS72206; F – LPSSRh01h06; G – LPSSRk03b03.

ДНК-идентификационные SSR-маркеры:

G05_044	G07_058	LPSSRh01h06
491, 557	346, 410	222

*Примечание: жирным начертанием выделены аллели, верифицированные с использованием секвенирования



ДНК-профиль сорта Карат по результатам амплификации с SSR-локусом G05_044.



Источники маркеров:

A, D, C, D – Studer B. et al. Expressed sequence tag-derived microsatellite markers of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) //Molecular Breeding. – 2008. – Т. 21. – С. 533-548.
E – Lauergeat V. et al. Sixty simple sequence repeat markers for use in the Festuca-Lolium complex of grasses //Molecular Ecology Notes. – 2005. – Т. 5. – №. 2. – С. 401-405.
F, G – Wang J. et al. Assignment of individual genotypes to specific forage cultivars of perennial ryegrass based on SSR markers //Crop Science. – 2009. – Т. 49. – №. 1. – С. 49-58.

Приложение 2 – Молекулярно-генетический паспорт сорта райграса однолетнего Рапид, разработанный на основе SSR-локусов

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПАСПОРТ РАЙГРАСА
ОДНОЛЕТНЕГО (*Lolium multiflorum* Lam. var. *westerwoldicum*
Wittm.)

сорт **Рапид**

Оригинатор: ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса»

Авторы: В.А. Катков, М.И. Рубцов, В.С. Гапеев.

Тип растения: тетраплоид

Особенности сорта:

Однолетний, раннеспелый. Куст малораскидистый, рыхлый, облиственность равномерная (38–44 %). Vegetационный период от начала весеннего отрастания до наступления укосной спелости — 44–47 дней, до полного созревания — 79 дней. Отрастает быстро, отличается высокой кустистостью, дает за вегетацию два-три укоса. Устойчив к вредителям и болезням. Пригоден к механизированной уборке. Питательная ценность корма высокая, отличается повышенным содержанием сахаров. Урожай сена — 80–90 ц/га, зеленой массы — 570 ц/га, семян — до 17 ц/га

Зона возделывания:

Включен в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию с 1984 г. по Северному, Северо-Западному и Центральному регионам.



Молекулярно-генетическая формула:

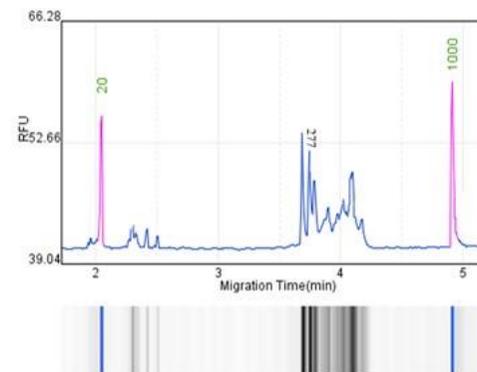
A_{472, 652, 984*}, 1052 B_{303, 286, 346, 309, 329}C_{206, 243, 199, 234, 188, 212, 226}D_{232, 185}E_{264, 277, 283, 351}

*A – G05_044; B – G07_058; C – G04_092; D – AJS72206;
E – LPSSRk03b03.

ДНК-идентификационные SSR-маркеры:

G05_044	G04_092	LPSSRk03b03
984	226	277

*Примечание: жирным начертанием выделены аллели, верифицированные с использованием секвенирования.



ДНК-профиль сорта Рапид по результатам амплификации с SSR-локусом LPSSRk03b03.



Источники маркеров:

A, D, C – Studer B. et al. Expressed sequence tag-derived microsatellite markers of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) // *Molecular Breeding*. – 2008. – Т. 21. – С. 533–548.
D – Luvvergeat V. et al. Sixty simple sequence repeat markers for use in the *Festuca-Lolium* complex of grasses // *Molecular Ecology Notes*. – 2005. – Т. 5. – №. 2. – С. 401–405.
E – Wang J. et al. Assignment of individual genotypes to specific forage cultivars of perennial ryegrass based on SSR markers // *Crop Science*. – 2009. – Т. 49. – №. 1. – С. 49–58.

Приложение 3 – Молекулярно-генетический паспорт сорта райграса однолетнего Айвенго, разработанный на основе SSR-локусов

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПАСПОРТ

ФЕСТУЛОЛИУМА (*X Festulolium* F. Aschers. et Graebn.)

сорт **Айвенго**

Оригинатор: ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса»

Авторы: В.Н. Золотарев, В.А. Катков, В.Л. Коровина, О.В. Трухан.

Тип растения: тетраплоид

Особенности сорта:

Форма роста растения полупрямостоячая. Лист средней длины и ширины. Растение после яровизации средней высоты и ширины. Время выметывания соцветий среднее. Флаговый лист средней длины и ширины. Длина самого длинного стебля, включая соцветие при полном выметывании, средней длины. Длина верхнего междоузлия средней длины. Длина соцветия средняя. Урожайность зеленой массы - 420,0 ц/га (+8,0 ц/га). Направление использования на зеленую массу.

Зона возделывания:

допущен к использованию с 2022 г. по всем регионам.



Молекулярно-генетическая формула:

$A_{2538, 2170, 1774, 1528, 1224} B_{2396, 1795, 1169} C_{922}$

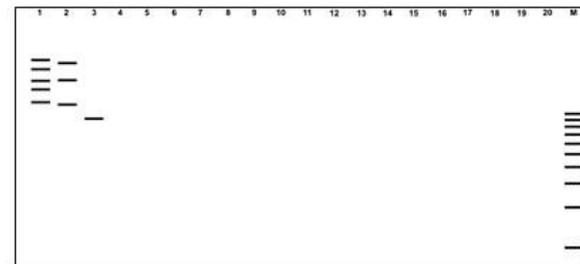
**A* – SCoT 02; *B* – SCoT 13; *C* – SCoT 07

ДНК-идентификационные SCoT-маркеры:

SCoT 13

1169 п.н.

*Примечание: жирным начертанием выделены аллели, верифицированные с использованием секвенирования.



ДНК-профиль сорта Айвенго по результатам амплификации со SCoT-маркерами SCoT 02 (1), SCoT 13 (2), SCoT 07 (3).

*Источник маркеров: Collard B. C. Y., Mackill D. J. Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants // Plant molecular biology reporter. – 2009. – Т. 27. – С. 86-93.

Приложение 4 – Образец «выравнивания» относительно генома *Lolium perenne* L. нуклеотидной последовательности уникального для сорта ВИК 22 ДНК-фрагмента, полученного с использованием праймера к маркеру SCoT 35

gramene	AACCAGGGGCCCATGAAGATTGCCGAATATCCGAAGTGGGCCTGCGCATTGGCGTTGAAG	60
scot35	AACCAGGGGTCCATGAAGATTGCCTAATATCTGAAGTGGGCTTGCACGTCGACGTTGGGG *****	60
gramene	AAGGAGACTCATACGAAGGAAAGTTACTTGATGGACATGGAAAGAAGACACGATACAACG	120
scot35	AAGAAGACTCATCCGAAGGAAAGATACTTGATGGACAAGGAAATAAGATATGATAGAAGG ***	120
gramene	AAACCTTAGACTATGATTCTTTGTACCTTAGTCGAGTCCGGACAGATCTCTCGAGACCTG	180
scot35	AAGATTTAGACTATTCTCTTTGTACCTTAGTCAAATCTGGACAGATCTCTCGAGACCTG **	180
gramene	GCCTGTTATATAAAGTCCAAAAGAGGATTTGCCGGAACCAACTTACACATAGAACCA	240
scot35	GCATGCTATATAAAGGCTAGGAGAGGATCTGCCGGAACCAACTTACACGCATAGAACCA **	240
gramene	CCACAAGATCAAACC TAGAGCATGGAACCC TTGCCTCTCGTCGAGTCCACCGTAGCCCAT	300
scot35	TTGCAAGATAAAAACC TAGAGCTTAGAACCC TTGCCTCTCGGTGAGATCACCGCAGCCCAT *****	300
gramene	CGGCTACCCCATTTGTAACCTTGATATACTTTCAATAATCAAGATCAGACAAGCAGGAAGTA	360
scot35	CGGCTACCCCATTTCTAACCCGGTATACTTTTCGATAATCGAGATCAGACAAGCAAGGAAGTA *****	360
gramene	AGGGTGTTACCTCATCGAGGGCCCCGAACCTGGGTAAATCTCTCTCCCGTTTGTTCGAT	420
scot35	AGGGTTTTACCTCATCGAGGGCCCCGGGCCTGGGTAAATCTCTCTCCCGTTTGTTCGGT *****	420
gramene	CACCAATGTCTCGTGCTAGCCTGCAG-----	446
scot35	TACCGATGTCTCGTGCTAGCCTGCAGCTGTAACCCCTAAGCCCCTCATGGTGTGCATTGC ***	480
gramene	-----	446
scot35	CGGGGAGCACCCCGACAGGTAGTGATAAGAAACTAAATAAGTTGCACATAAGGTCATA	540
gramene	-----	446
scot35	TTTTG	545