

 pismavavilov.ru

DOI 10.18699/letvjgb-2024-10-16

Оригинальное исследование

ДНК-идентификация сортов и видов козлятника (*Galega*) с применением SRAP-маркеров и рестрикционного анализа спейсера *trnH-psbA*

И.А. Клименко , А.А. Антонов , А.О. Шамустакимова , В.Н. Золотарев

Аннотация: Козлятник широко используется в качестве лекарственного растения и на корм скоту, в биологическом земледелии и для получения биогаза. К настоящему времени в России создано 18 высокопродуктивных сортов козлятника восточного (*Galega orientalis* Lam.). Активная селекционная работа продолжается, однако отсутствуют надежные методы определения сортовой и видовой принадлежности. Цель наших исследований состояла в изучении потенциала SRAP-маркеров и метода рестрикционного анализа спейсера *trnH-psbA* для ДНК-идентификации сортов и видов рода *Galega*. Исследования по оценке меж- и внутрисортного генетического полиморфизма проведены на выборке из российских сортов козлятника восточного, включенных в Госреестр селекционных достижений Российской Федерации. С использованием восьми комбинаций SRAP-праймеров получены 283 фрагмента амплифицированной ДНК, из которых 105 (37.1 %) оказались полиморфными. Эффективное число аллелей в среднем равнялось 1.37, показатель информационного содержания (PIC) – 0.787; средние значения индексов генетического разнообразия по Нею (He) и Шеннона (I) составили соответственно 0.25 и 0.41. Кластеризация образцов методом главных координат разделила их на три группы в зависимости от происхождения и хозяйственного назначения при возделывании в различных регионах. Для сортов Вест и Юбиляр, выделившихся уникальными, сортоспецифичными ампликонами, разработаны ДНК-паспорта. При амплификации с использованием практически всех комбинаций SRAP-праймеров выявлены существенные отличия в ДНК-профиле сорта Еля-Ты в сравнении с другими изучаемыми образцами. Для уточнения видовой принадлежности данного сорта был применен метод рестрикционного анализа ДНК-баркода *trnH-psbA*. Результаты исследования показали, что SRAP-маркеры можно успешно использовать для оценки генетического разнообразия и сортовой ДНК-идентификации козлятника восточного. Метод рестрикционного анализа спейсеров хлоропластной ДНК является эффективным подходом для различения видов в составе рода *Galega*.

Ключевые слова: козлятник восточный; *Galega orientalis* Lam.; генетическое разнообразие; SRAP-маркеры; ДНК-полиморфизм; генетический паспорт; ДНК-баркодирование; рестрикционный анализ.

Для цитирования: Клименко И.А., Антонов А.А., Шамустакимова А.О., Золотарев В.Н. ДНК-идентификация сортов и видов козлятника (*Galega*) с применением SRAP-маркеров и рестрикционного анализа спейсера *trnH-psbA*. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;10(3):141-150. DOI 10.18699/letvjgb-2024-10-16

Финансирование: Финансирование исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания по теме FGGW-2022-0007.

Original article

DNA-identification of Goat's rue (*Galega*) varieties and species using SRAP markers and restriction analysis of *trnH-psbA* spacer

I.A. Klimenko , A.A. Antonov , A.O. Shamustakimova , V.N. Zolotarev

Abstract: Goat's rue is well known for its medical and fodder value, as a crop for soil biologization and biofuel production. To present moment 18 varieties of *Galega orientalis* Lam., that characterized by high productivity, have been developed, however there are no reliable methods of varieties and species identification. The objectives of this study were to assess the potential of SRAP markers and method of *trnH-psbA* spacer restriction analysis for DNA-identification the varieties and species in genera *Galega*. Inter-varietal and intra-varietal DNA polymorphism was estimated for Russian fodder galega varieties from State Plant Cultivar Register of Russia. A total 283 bands were amplified by eight SRAP-primer combinations, of which 105 (37.1 %) were polymorphic. The average effective number of alleles evaluated as 1.37; polymorphic information content (PIC) – 0.787; average Nei's gene diversity (He) and Shannon's information

Федеральный научный центр кормопроизводства и агроэкологии им. В.Р. Вильямса, Лобня, Московская область, Россия
Federal Williams Research Center of Forage Production & Agroecology, Lobnya, Moscow region, Russia

 iaklimenko@mail.ru

© Клименко И.А., Антонов А.А., Шамустакимова А.О., Золотарев В.Н., 2024

index (I) were 0.25 and 0.41 accordingly. Clustering of accessions by method of principal coordinates analysis (PCoA analysis) revealed three groups in dependence of origin and destination at cultivation in the different regions. DNA certificates were developed for varieties Vest and Yubilyar, which had specific amplicons with unique sizes in DNA spectrum. The genetic divergence of the variety Elya-Ti in comparison with other varieties has been demonstrated. The method of restriction analysis of DNA-barcode *trnH-psbA* was employed to specify this variety species affiliation. The results of the research showed the effectiveness of SRAP markers for genetic diversity evaluation and varietal DNA identification of fodder galega. The method of chloroplast DNA spacer restriction analysis is efficient approach for species discrimination in genera *Galega*.

Key words: *Galega orientalis* Lam.; genetic diversity; SRAP markers; DNA polymorphism; genetic certificate; DNA-barcoding; restriction analysis.

For citation: Klimenko I.A., Antonov A.A., Shamustakimova A.O., Zolotarev V.N. DNA-identification of Goat's rue (*Galega*) varieties and species using SRAP markers and restriction analysis of *trnH-psbA* spacer. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;10(3):141-150. DOI 10.18699/letvjgb-2024-10-16 (in Russian)

Funding: This work was supported by State Budgetary Project FGGW-2022-0007.

Введение

Козлятник относится к семейству Бобовые (Fabaceae Lindl.), роду Галега (*Galega Tourn. ex L.*), который состоит из восьми видов. Наиболее распространены два из них: козлятник восточный (*Galega orientalis* Lam.) и козлятник лекарственный (*Galega officinalis* L.).

Козлятник восточный – многолетнее травянистое растение, имеющее прямые стебли высотой до 150 см, с соцветием в форме многоцветковой кисти. Характеризуется высоким содержанием протеина при сниженной концентрации антипитательных веществ, поэтому представляет ценность в качестве кормовой культуры. На корм используют зеленую массу и семена. Козлятник восточный может успешно применяться при рекультивации земель и в адаптивно-ландшафтных системах земледелия: он улучшает структуру почвы, предохраняет ее от эрозии и насыщает биологическим азотом; в странах ЕС выращивается для получения биогаза (Трузина, 2012; Вагунин и др., 2019; Золотарев, Коровина, 2021). Культура – перекрестноопыляемая, с диплоидным набором хромосом ($2n = 16$).

Селекционная работа с козлятником восточным началась в нашей стране в Москве, Московской области и Пермском крае сразу после Гражданской войны. К 50-м годам прошлого столетия интродукцией и улучшением хозяйственно ценных признаков и свойств занимались в Белоруссии, на Украине и в республиках Прибалтики бывшего СССР. Однако широкого внедрения в севообороты передовых хозяйств культура не получила вследствие узкого набора сортов и дефицита семян (Зубарев и др., 2016). Первый отечественный сорт Гале, выведенный селекционерами ВНИИ кормов совместно с Эстонским НИИ земледелия и мелиорации, зарегистрирован в 1988 г. К настоящему времени в Госреестр РФ включены 18 высокопродуктивных сортов козлятника восточного. Ведущими организациями-оригинаторами являются: ФГБНУ «Федеральный научный центр кормопроизводства и агроэкологии имени В.Р. Вильямса» (ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса») – сорта Вест, Гале; ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР)» – Надежда, Заполярный; ФГБНУ «Федеральный научный центр лубяных культур» (ФНЦ лубяных культур) – сорта Магистр, Юбиляр, Кривич и Талисман.

Для рационального использования и сохранения генетического разнообразия, ускорения процессов селекции

и решения вопросов по защите прав интеллектуальной собственности требуются надежные методы определения видовой и сортовой принадлежности. В последние три десятилетия для этих целей применяются молекулярные ДНК-маркеры на основе ПЦР-технологии. В отличие от традиционных фенотипических маркеров они стабильны, многочисленны, высокополиморфны, не зависят от условий окружающей среды. Однако данных по изучению межвидового и межсортового полиморфизма козлятника восточного с использованием генетических маркеров на сегодняшний день мало. Так, в ВИР проводились исследования по сортовой идентификации культуры с помощью белковых маркеров (Егги, Гаврилюк, 2015). Ученые из Китая в совместной работе со специалистами ВИР оценили генетическое разнообразие козлятника лекарственного (*Galega officinalis*) на основе ISSR- и SRAP-маркеров (Wang et al., 2012). В ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса» использовали ДНК-маркеры двух типов (RAPD и SRAP) для молекулярно-генетической характеристики сортов и перспективных селекционных образцов козлятника восточного (Клименко и др., 2016; Zolotarev et al., 2022).

В настоящее время в популяционной генетике и для ассоциативного анализа хозяйственно ценных признаков широко применяются SRAP-маркеры (sequence-related amplified polymorphism). Это относительно новый метод ДНК-типирования, основанный на амплификации интрон-экзонных областей (Li, Quiros, 2001). Изначально разработан для изучения генома представителей рода *Brassica*, но оказался высокоэффективным на разных культурах (Castonguay et al., 2010; Comlekcioglu et al., 2010; Alghamdi et al., 2012; Rhouma et al., 2017).

Цель наших исследований состояла в изучении потенциала SRAP-маркеров и метода рестрикционного анализа спейсера *trnH-psbA* для ДНК-идентификации сортов и видов рода *Galega*.

Материалы и методы

Растительный материал. Семена сортов козлятника восточного Вест, Кривич, Юбиляр, Еля-Ты, Горноалтайский 87, Ялгинский, Талисман, Тюменский были получены из ЦКП «Биологические коллекции кормовых растений» (ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса»), ВИР им. Н.И. Вавилова, а также любезно предоставлены селекционерами ФНЦ лубяных культур (г. Тверь).

Выделение геномной ДНК. Геномную ДНК для оценки межсортового генетического полиморфизма выделяли из суммарных образцов, включающих 30 семидневных проростков от каждого сорта, с помощью модифицированного SDS-метода (Клименко и др., 2021). Для определения однородности сортов – кандидатов на паспортизацию – провели анализ внутрисортовой генетической изменчивости с препаратами ДНК, выделенными из 10 индивидуальных генотипов каждого исследуемого образца. Качество и концентрацию полученных ДНК-проб определяли путем электрофореза в агарозном геле (агароза типа LE2, Amresco, США) и на спектрофотометре NanoNabi, Digital LtD (Южная Корея).

ПЦР-анализ с использованием SRAP-маркеров. Для выявления ДНК-полиморфизма использовали набор из восьми комбинаций SRAP-маркеров (Li, Quiros, 2001; Wang et al., 2012). Реакционная смесь для ПЦР объемом 20 мкл содержала: 10× Taq Turbo buffer – 3 мкл, 50 dNTP mix – 0.5 мкл, 5U Taq-ДНК полимеразу – 0.4 мкл, 1 мкл ДНК (30 нг/мкл), а также по 1 мкл каждого праймера (количественный состав компонентов указан в расчете на одну реакцию). Амплификация в термоциклере Bio-Rad C-1000 (США) проходила в соответствии с программой, предложенной авторами-разработчиками маркеров: начальная денатурация 5 мин при 94 °С; следующие 5 циклов: 1 мин – 94 °С, 1 мин – 35 °С, 2 мин при 72 °С; затем 35 циклов с чередованием температурных и временных параметров: 1 мин – 94 °С, 1 мин – 50 °С, 2 мин – 72 °С; финальная элонгация при 72 °С в течение 10 мин. Детектировали результаты ПЦР с помощью электрофореза в 1.6 % агарозном геле и определяли их размеры в сравнении с молекулярным маркером-стандартом 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США). Верификация размеров сортоспецифичных ампликонов проведена с помощью системы капиллярного электрофореза QSep1-Plus (BioOptic, Тайвань). Реактивы и праймеры для ПЦР синтезированы в ООО «Евроген-Лаб» (Россия).

ДНК-баркодирование с последующим рестрикционным анализом. Исследование по видовой идентификации образцов козлятника выполнено на основе метода ДНК-баркодирования (Kress et al., 2015; Kress, 2017). Использовали межгенные спейсеры хлоропластной ДНК *trnH-psbA* (Loera-Sánchez et al., 2020).

Состав реакционной смеси для ПЦР по количеству используемых компонентов был аналогичен составу при анализе со SRAP-маркерами. Программа амплификации включала: начальную денатурацию в течение 5 мин при 94 °С и последующие 50 циклов с меняющимся температурным и временным режимом (40 с при 94 °С, 1 мин при 54 °С, 40 с при 72 °С). Финальная элонгация продолжительностью 10 мин проходила при температуре 72 °С.

Анализ хлоропластных геномов для отбора маркеров и ферментов рестрикции проведен на основе информации, размещенной в базе данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и на сайте NEBcutter (www.nc2.neb.com).

Для расщепления продуктов ПЦР использовали шесть эндонуклеаз рестрикции с сайтами узнавания от 4 до 5 нуклеотидов: MboI, MseI, RsaI, TaqI, DdeI, HinfI. С этой целью 5 мкл продукта смешивали с 12 мкл воды, 2 мкл универ-

сального буфера SE ROSE, 1 мкл фермента и инкубировали в течение 1 ч при рабочей температуре каждой рестриктазы. Фрагменты рестрикции детектировали в 1.6 % агарозном геле, в качестве маркера молекулярного веса был взят Step 100 Long 100 bp («Биолабмикс», Россия). Реактивы для CAPS-анализа и ферменты рестрикции поставлены компанией «СибЭнзим» (Россия).

Статистическая обработка. Размеры продуктов амплификации определяли в программе Image Lab (приложение к системе Gel Doc™ XR+, Bio-Rad, США), сопоставляя с маркером-стандартом. На основании полученных данных формировали бинарные матрицы с использованием программы PopGene (Yeh et al., 1997) и вычисляли показатели генетического разнообразия: эффективное число аллелей, индекс Шеннона, генетические дистанции. Эффективное число аллелей служит наиболее распространенной мерой генетической изменчивости в популяции и представляет собой такое число аллелей, при одинаковой частоте которых ожидаемая гетерозиготность будет равна фактической. Генетическая дистанция впервые была определена М. Nei как разница между двумя объектами, описанная аллельными вариациями (Nei, Li, 1979). В популяционной генетике единицей генетического расстояния является число нуклеотидных замен или кодонов на один локус. Индекс Шеннона отражает степень полиморфизма полос ДНК в электрофоретическом профиле. Он позволяет измерять внутривидовую изменчивость (Чесноков, Косолапов, 2016).

Показатели информативности праймеров (PIC) рассчитывали с помощью специальной формулы:

$$PIC_j = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2,$$

где i – i -й аллель j -го маркера; n – число аллелей j -го маркера; P – частота аллелей.

Определяли частоту встречаемости каждого аллеля (для конкретной комбинации праймеров), а затем находили сумму квадратов частот встречаемости всех аллелей и вычитали полученное число из единицы (Чесноков, Артемьева, 2015).

Анализ генетических взаимосвязей с помощью метода главных координат (PCoA-анализ) осуществляли в надстройке MS Excel GenAlex 6.2 (Peakall, Smouse, 2006).

Результаты и обсуждение

ПЦР-анализ коллекции с использованием SRAP-маркеров
Геномная ДНК была выделена с помощью модифицированного SDS-метода (Клименко и др., 2021), который оказался более эффективным и менее затратным для «балк-стратегии» (Gilbert et al., 1999) по сравнению с традиционными подходами, в том числе основанными на применении коммерческих наборов. Результаты электрофореза и спектрофотометрии показали высокую концентрацию ДНК (более 80 нг/мкл в среднем) и степень чистоты образцов от примесей белковой и полисахаридной фракций. Для ПЦР концентрация нативных растворов была доведена до одинаковых значений – 30 нг/мкл.

В результате генотипирования с использованием восьми комбинаций SRAP-маркеров, которые в работе Z. Wang с коллегами (2012) успешно применялись для оценки гене-

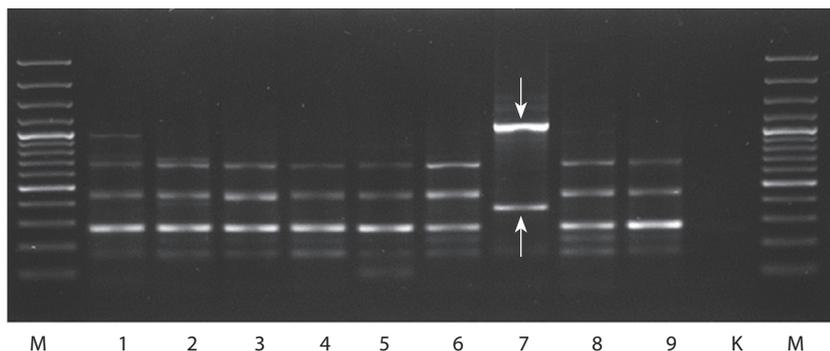


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК образцов козлятника восточного с комбинацией SRAP-праймеров ME3-EM4.

1 – Юбиляр, 2 – Талисман, 3 – Кривич, 4 – Гале, 5 – Вест, 6 – Ялгинский, 7 – Еля-Ты, 8 – Тюменский, 9 – Горноалтайский 87, К – контроль (вода), М – маркер-стандарт 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США)

Fig. 1. The electrophoregram of genomic DNA amplification in fodder galega with SRAP-primer combination ME3-EM4.

1 – Yubilyar, 2 – Talisman, 3 – Krivich, 4 – Gale, 5 – Vest, 6 – Yalginskiy, 7 – Elya-Ti, 8 – Tyumenskiy, 9 – Gornoaltayskiy 87, K – control, M – 100 bp DNA Ladder molecular weight marker (Thermo Fisher Scientific, USA)

тического разнообразия образцов козлятника лекарственного (*G. officinalis*), мы получили отчетливую и воспроизводимую амплификацию со всеми образцами изучаемой выборки (рис. 1). Из выявленных 283 продуктов ПЦР размером от 158 до 1651 пары нуклеотидов 105 оказались полиморфными, что составило 37.1 %. Для козлятника лекарственного этот показатель был равен 67.1 %, что, вероятно, обусловлено более высоким уровнем генетических вариаций у дикорастущих образцов козлятника в сравнении с культивируемыми сортами, имеющими чаще всего общие источники исходного материала, сходство в схемах и направлениях селекции.

При расчете показателей генетического разнообразия определено, что эффективное число аллелей в среднем составило 1.37 и варьировало от 1.25 (ME3-EM2 и ME3-EM4)

до 1.58 (ME1-EM5). Индекс разнообразия Нея менялся в диапазоне от 0.20 (ME3-EM2 и ME3-EM4) до 0.34 (ME1-EM5). Средняя величина индекса Шеннона равнялась 0.41; наименьшая (0.35) – с маркерами ME3-EM2 и ME3-EM4, наибольшая (0.51) – с ME1-EM5 (табл. 1). Значения этих показателей оказались сопоставимыми с выявленными при использовании ISSR-маркеров: 0.43 – для индекса Шеннона, 0.29 – для индекса разнообразия по Нею в среднем (Wang et al., 2012). При этом показатель информационного содержания (PIC), свидетельствующий об эффективности применяемых маркеров, был существенно выше в нашей работе (0.787) в сравнении со средними значениями, установленными при ISSR- (0.378) и SRAP-анализе (0.422) (Wang et al., 2012). Согласно полученным данным, наиболее информативной для оценки ДНК-полиморфизма козлятника восточного можно считать

Таблица 1. Показатели генетического разнообразия и эффективности SRAP-маркеров при анализе образцов козлятника восточного

Table 1. Parameters of the genetic diversity and effectiveness of SRAP markers at analysis of fodder galega

Комбинация маркеров	Среднее число ампликонов на сорт	Степень полиморфизма, %	Эффективное число аллелей (Ne)	Индекс разнообразия по Нею (He)	Индекс Шеннона (I)	Индекс информативности праймеров (PIC)
ME1-EM1	4.8	44.2	1.40	0.27	0.44	0.850
ME1-EM2	3.7	27.3	1.34	0.24	0.40	0.808
ME1-EM4	5.3	33.3	1.29	0.22	0.38	0.863
ME1-EM5	2.4	63.6	1.58	0.34	0.51	0.760
ME3-EM1	6.4	43.1	1.39	0.26	0.41	0.876
ME3-EM2	2.0	11.1	1.25	0.20	0.35	0.599
ME3-EM4	2.9	7.70	1.25	0.20	0.35	0.713
ME3-EM5	3.9	51.4	1.46	0.27	0.42	0.824
Общее	283	–	–	–	–	–
Среднее	3.93	35.2	1.37	0.25	0.41	0.787

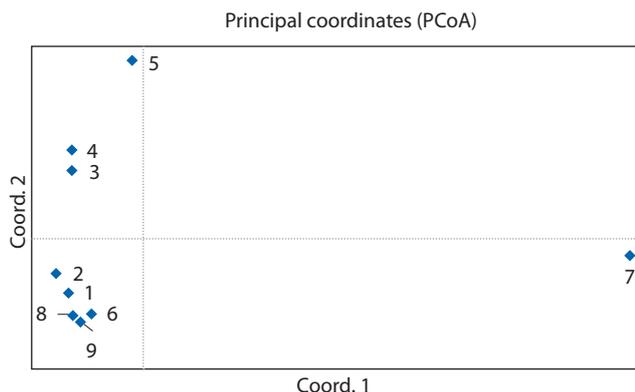


Рис. 2. Результаты PCoA-анализа сортов козлятника восточного на основании генотипирования с использованием SRAP-маркеров.

1 – Юбиляр, 2 – Талисман, 3 – Кривич, 4 – Гале, 5 – Вест, 6 – Ялгинский, 7 – Еля-Ты, 8 – Тюменский, 9 – Горноалтайский 87

Fig. 2. PCoA-analysis of fodder galega varieties based on genotyping using SRAP markers.

1 – Yubilyar, 2 – Talisman, 3 – Krivich, 4 – Gale, 5 – Vest, 6 – Yalginский, 7 – Elya-Ti, 8 – Tyumenskiy, 9 – Gornoaltayskiy 87

пару праймеров ME1-EM4 – значение PIC составило 0.863; наименьшее значение этого параметра определено при использовании ME3 и EM2 – 0.599 (см. табл. 1).

Достаточно умеренный уровень межсортового генетического полиморфизма, выявленный при анализе козлятника восточного, не характерен для перекрестноопыляемой культуры, но может быть обусловлен использованием близкородственного исходного материала при селекции в различных учреждениях России.

На основании данных бинарных матриц был проведен PCoA-анализ, с помощью которого представлены генетические взаимосвязи между образцами в графической форме (рис. 2).

Дисперсии первых двух координат составили 54 и 15 % соответственно, суммарно на них приходится большая часть от общей дисперсии. Сорта козлятника восточного разделились на три группы (см. рис. 2). Близкими генетическими дистанциями характеризовались Юбиляр и Талисман, созданные селекционерами Псковского НИИСХ – филиала ФНЦ лубяных культур и предназначенные для выращивания в Северо-Западном регионе, а также Ялгинский, Горноалтайский 87 и Тюменский. Оригинаторами последних трех сортов являются разные организации, однако выведены они по аналогичной селекционной схеме (методом массового отбора из образца, полученного из ВНИИ кормов) (Егги, Гаврилюк, 2015) и по своим биолого-физиологическим свойствам наиболее адаптированы для культивирования в условиях Волго-Вятского и Западно-Сибирского регионов России. В общую группу объединились среднеспелый сорт Кривич (селекция Псковского НИИСХ) и широко распространенный в нашей стране раносозревающий и зимостойкий сорт Гале. Значительно удаленным от других образцов оказался сорт Вест (селекция ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса»), выведенный из сортовых популяций Гале методами индивидуального отбора растений с маркерным признаком и оценкой по семенной продуктивности и зимостойкости. В

Таблица 2. Сорта козлятника восточного с уникальными по размерам продуктами амплификации

Table 2. Fodder galega varieties with unique in sizes amplification products

Название сорта	Комбинация SRAP-маркеров	Размер уникальных фрагментов амплификации, п. н.
Юбиляр	ME1-EM1	296
	ME1-EM2	539
	ME1-EM5	1010
	ME3-EM5	505, 826
Вест	ME1-EM1	178
	ME3-EM5	390
Талисман	ME1-EM1	352
Еля-Ты	ME1-EM2	286, 371, 533
	ME1-EM4	158, 243, 410, 641, 784, 939, 1250
	ME1-EM5	1133
	ME3-EM1	205, 263
	ME3-EM2	385, 660
	ME3-EM4	362, 1080
	ME3-EM5	329

отдельную группу, справа от оси ординат, выделился сорт Еля-Ты (ФГБУН ФИЦ «Коми научный центр Уральского отделения РАН»).

Анализ внутрисортовой генетической изменчивости для оценки однородности сортов козлятника восточного

На основе результатов SRAP-анализа для всех изучаемых образцов составлены молекулярно-генетические формулы (данные не приводятся). У сортов Юбиляр, Вест, Талисман, Еля-Ты выявлены сортоспецифичные ампликоны, в общей сложности – 26 (3.3 %), которые можно использовать для ДНК-идентификации (табл. 2).

Выделившиеся сорта исследовали по признаку генетической однородности для последующей разработки ДНК-паспортов. С этой целью провели оценку внутрисортового генетического полиморфизма с использованием геномной ДНК десяти индивидуальных, случайно отобранных генотипов каждого сорта (в стадии 8-дневных проростков) и трех наиболее полиморфных комбинаций SRAP-маркеров: ME1-EM1, ME1-EM2 и ME3-EM5. Примеры электрофореграмм представлены на рис. 3.

Установлено, что при использовании высокополиморфных SRAP-маркеров среднее значение выравненности для исследуемых сортов составило 56.6 % с наибольшим показателем у сорта Вест (63.6 %) и наименьшим – у сорта Юбиляр (53.3 %), который выделялся внутри выборки и более высоким числом генотипов со специфичным ДНК-профилем (в среднем 4.3). Полученные данные позволяют заключить, что по интрон-экзонным областям генома проанализированные сорта козлятника восточного достаточно вариабельны, что объяснимо особенностями репродуктивной системы. На основании результатов верификации размеров сортоспецифичных ДНК-фрагментов методом высо-

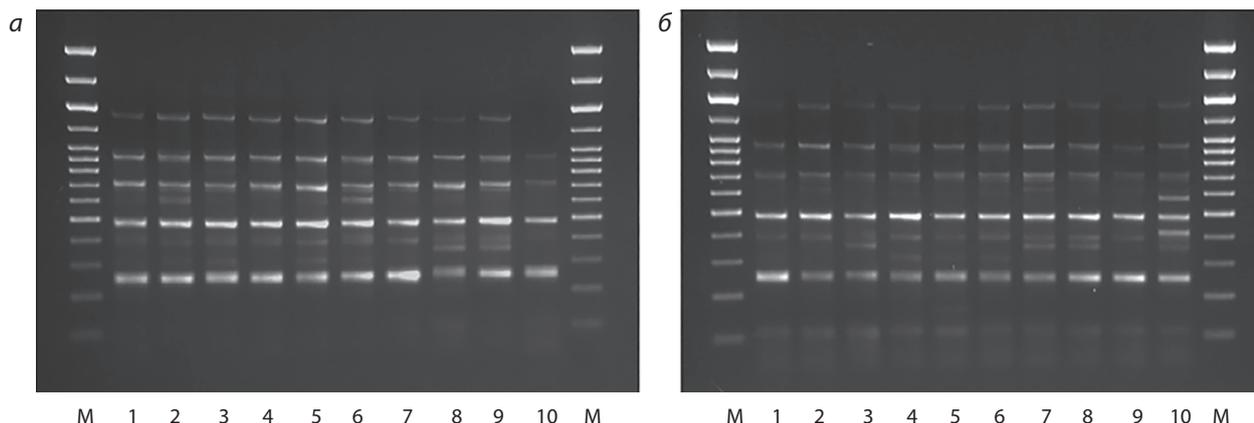


Рис. 3. Электрофореграммы SRAP-анализа по выявлению внутрисортного генетического полиморфизма козлятника восточного с комбинацией маркеров ME1-EM1.

1–10 – образцы ДНК генотипов сорта Юбилар (а) и сорта Вест (б). М – маркер-стандарт (Step 100 Long 100 bp, «Биолабмикс», Россия)

Fig. 3. The electrophoregrams of SRAP analysis on revealing of intra-variety genetic polymorphism in fodder galega with marker combination ME1-EM1.

1–10 – genomic DNA of Yubilyar variety (a) and Vest variety (b) genotypes. M – molecular weight marker (Step 100 Long 100 bp, Biolabmix, Russia)

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПАСПОРТ
КОЗЛЯТНИК ВОСТОЧНЫЙ (*Galega orientalis* Lam.)
сорт ВЕСТ**

Класс: двудольные
Категория: сорт
Оригинатор: ФНЦ «ВИК им. В.П. Вильямса»

**Молекулярно-генетическая формула,
разработанная на основе SRAP-маркеров**

A_{167,260,413,500,707} **B**_{315,419,581,700} **C**_{311,346,419,466,531,1200}
D_{412,445,884,165} **E**_{410, 729} **F**_{274,450,685} **G**_{253,395,424,1423}
* Комбинации SRAP-маркеров
A – ME1-EM1; B – ME1-EM2; C – ME1-EM4; D – ME3-EM1;
E – ME3-EM2; F – ME3-EM4; G – ME3-EM5
* DOI 10.11007/s001220100570



Особенности сорта

- пригоден для заготовки всех видов объемистых кормов
- цветок розовой окраски
- раннеспелый
- урожайность зеленой массы – 36.5 т/га
- содержание сырого протеина – 26–30 %

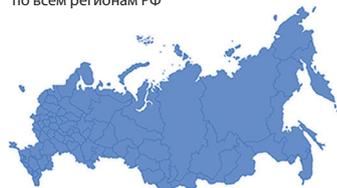
ДНК-идентификационные SRAP-маркеры

ME1-EM1	ME3-EM5
167	395



Зоны возделывания

допущен к использованию с 2014 г.
по всем регионам РФ



**ДНК-профиль по результатам капиллярного электрофореза
("QSep1+", Bioptic, Тайвань)**

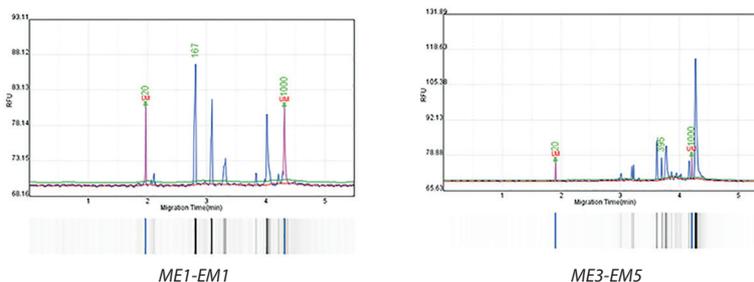


Рис. 4. Образец генетического паспорта козлятника восточного (сорт Вест)

Fig. 4. The sample of genetic certificate for fodder galega (cv. Vest)

коразрешающего капиллярного электрофореза для сортов Вест и Юбилар были разработаны молекулярно-генетические паспорта (рис. 4).

отличался по ДНК-профилю от других сортов и практически не имел общих с ними аллелей (см. рис. 1), поэтому в исследование включили анализ по уточнению видовой принадлежности данного образца. Сравнительную оценку провели с использованием ДНК-проб сортов Талисман, Гале (относящихся к виду козлятник восточный) и трех образцов дикорастущего козлятника лекарственного происхождения из ФГБНУ «Донецкий ботанический сад» (репродукции 2014,

Рестриционный анализ ДНК-баркода *trnH-psbA*

При генотипировании с разными комбинациями SRAP-маркеров козлятник восточный сорта Еля-Ты (семена получены из коллекции ВИР им. Н.И. Вавилова) существенно

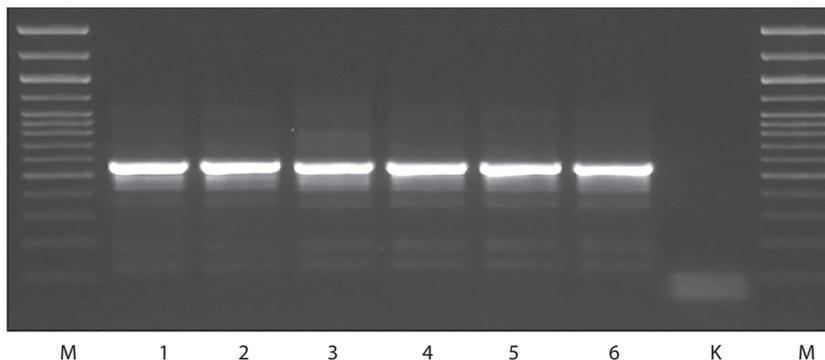


Рис. 5. Электрофореграмма продуктов амплификации образцов ДНК козлятника с маркером *trnH-psbA*. Козлятник восточный: 1 – Талисман, 2 – Гале; 3 – Еля-Ты; козлятник лекарственный: 4–6 – образцы репродукций 2019, 2014, 2023 гг.; К – контроль (вода); М – маркер молекулярного веса (Step 100 Long 100 bp, «Биолабмикс», Россия)

Fig. 5. The electrophoregram of galega genomic DNA amplification with marker *trnH-psbA*. *Galega orientalis* Lam.: 1 – Talisman, 2 – Gale, 3 – Elya-Ti; *G. officinalis*: 4–6 – the samples of different reproductions (2019, 2014, 2023); K – control, M – molecular weight marker (Step 100 Long 100 bp, Biolabmix, Russia)

2019 и 2023 гг.). Для ПЦР использовали межгенный спейсер хлоропластной ДНК:

Праймер	Последовательность праймера (5' → 3')	Литературный источник
<i>trnHf_05v2-psbA3_fv2</i>	GCR TGG TGG ATT CAC AAT CC / GTT ATG CAT GAA CGT AAY GCT C	Loera-Sánchez et al., 2020

Эти маркеры предназначены для идентификации родов, видов и семейств растений (Kress, 2017; Alongi et al., 2019; Loera-Sánchez et al., 2020).

Со всеми экспериментальными образцами получены идентичные по размеру ПЦР-продукты (рис. 5). Для выявления скрытого видоспецифичного полиморфизма последовательность *trnH-psbA* была проанализирована в хлоропластном геноме *G. orientalis* из GenBank (NC_069214) на наличие сайтов рестрикции.

После анализа в NEBcutter (www.nc2.neb.com) из 65 ферментов рестрикции мы выбрали шесть с сайтами узнавания от четырех до пяти нуклеотидов: Mbol, Msel, RsaI, TaqI, Ddel, HinfI (рис. 6). При анализе *in silico* последовательности *trnH-psbA* *G. orientalis* с помощью программы UGENE определены ожидаемые размеры продуктов рестрикции с указанным набором ферментов. Для *G. officinalis* (козлятника лекарственного) в базе данных GenBank отсутствуют аннотированные последовательности хлоропластного генома. Обработка ПЦР-продуктов, полученных с маркерами *trnHf_05v2* и *psbA3_fv2*, позволила выявить межвидовой полиморфизм при использовании четырех из шести выбранных рестриктаз: RsaI, Msel, Mbol, Ddel. Причем ДНК-профили сорта Еля-Ты и образцов козлятника лекарственного полностью совпадали (рис. 7). Вероятно, в анализируемых участках генома этих образцов присутствуют общие последовательности нуклеотидов, отличающие их от растений, относящихся к виду козлятник восточный. Полученные результаты позволяют предположить принадлежность сорта Еля-Ты к виду козлятник лекарственный.

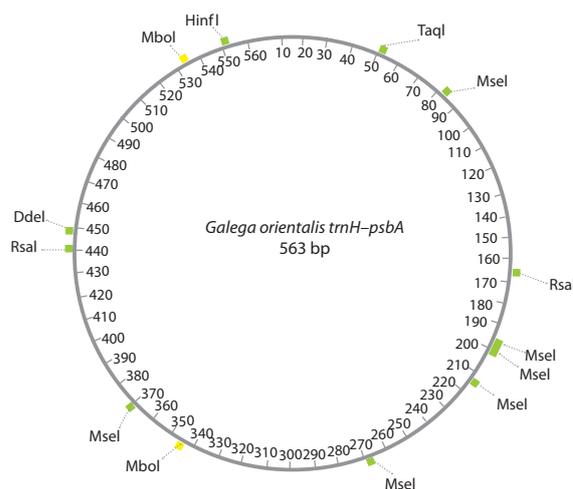


Рис. 6. Круговая диаграмма амплифицируемого ПЦР-фрагмента межгенного спейсера *trnH-psbA*.

Цветом обозначены сайты рестрикции и рестриктазы, использованные в анализе

Fig. 6. The diagram of PCR fragment of *trnH-psbA* spacer for amplification.

Restriction sites and restriction endonucleases were marked by color

Для проведения дополнительного теста на отличимость по морфологическим характеристикам семена сортов были высажены в сосуды в условиях тепличного комплекса. Сравнительная визуальная оценка 3-месячных растений показала выраженные различия по форме листочков (рис. 8). У растения сорта Еля-Ты они были продолговатыми, линейно-вытянутой, почти ланцетной формы, а у растений сортов Вест и Юбиляр – широкояйцевидные, типичные для вида козлятник восточный. Различия по такому важному морфологическому признаку, как форма листочка, имеющему наследственную природу, также косвенно указывают на иную видовую принадлежность сорта Еля-Ты.

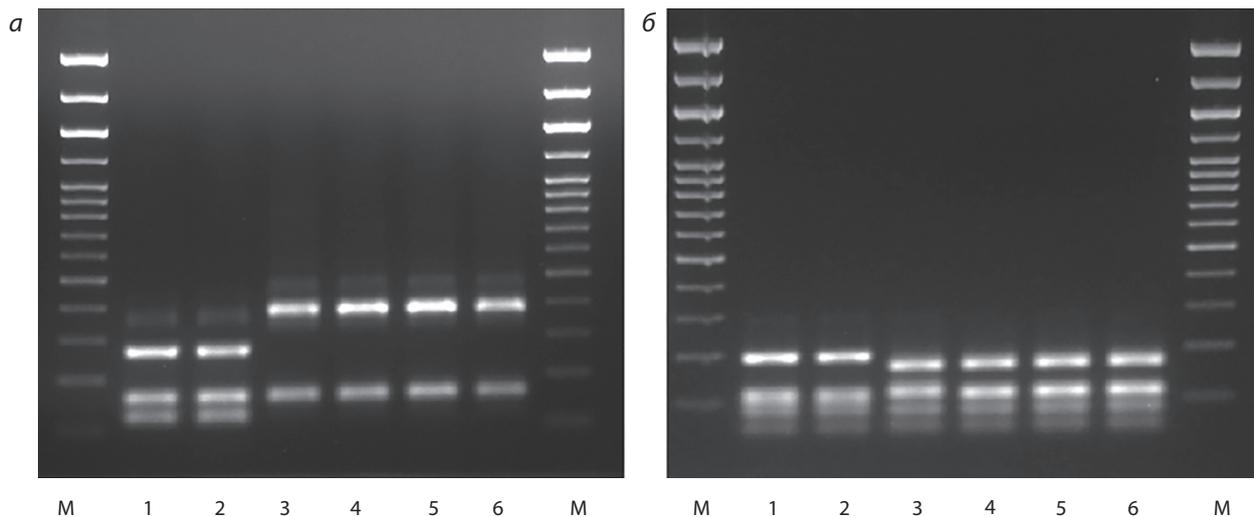


Рис. 7. Электрофореграммы продуктов рестрикции образцов козлятника: а – с рестриктазой RsaI; б – с рестриктазой MseI.

Козлятник восточный: 1 – Талисман, 2 – Гале; 3 – Еля-Ты; козлятник лекарственный: 4–6 – образцы репродукции 2019, 2014, 2023 гг.; М – маркер молекулярного веса (Step 100 Long 100 bp, «Биолабмикс», Россия)

Fig. 7. The electrophoregrams of galega restriction enzyme digests: a, with restriction endonuclease RsaI; b, with restriction endonuclease MseI.

Galega orientalis Lam.: 1 – Talisman, 2 – Gale, 3 – Elya-Ti; *G. officinalis*: 4–6 – the samples of different reproductions (2019, 2014, 2023); M – molecular weight marker (Step 100 Long 100 bp, Biolabmix, Russia)



Еля-Ты

Вест

Юбилар

Рис. 8. Сравнительный тест по видовой идентификации растений козлятника по признаку «форма листочков»

Fig. 8. Comparative test on specie identification of galega plants on leaflets shape

Заключение

По результатам проведенного исследования можно заключить, что SRAP-маркеры пригодны для ДНК-идентификации сортов козлятника восточного. Со всеми испытанными комбинациями праймеров получены выраженные и стабильные продукты амплификации с наличием полиморфных

фрагментов. Выделены маркеры, которые можно использовать для различия сортов галеги, включенных в Госреестр Российской Федерации. Так, парные комбинации ME1-EM1, ME1-EM2, ME1-EM5, ME3-EM5 выявляют сортоспецифичные ДНК-фрагменты размерами 296, 539, 1010, 505 и 826 пар нуклеотидов соответственно у сорта Юбилар. Маркер

ME1-EM1 можно считать ДНК-идентификационным для сорта Талисман, поскольку с ним получен уникальный в коллекции ампликон размером 352 п. н. Сорт Вест выделялся фрагментами амплификации 178 п. н. с комбинацией маркеров ME1-EM1 и 390 п. н. – с ME3-EM5. Несколько сортоспецифичных продуктов разных размеров получено для сорта Еля-Ты со всеми анализируемыми маркерами, кроме комбинации ME1-EM1.

Анализ по выявлению внутрисортного ДНК-полиморфизма показал, что исследуемые сорта козлятника восточного являются средневариабельными: показатель однородности составил в среднем 56.6 %, а количество генотипов с различающимися ДНК-спектрами – 3.5 на сорт.

В соответствии с многомерной диаграммой сходства, построенной на основе бинарных матриц (PCoA-анализ), изучаемые образцы разделились на две основные группы, что отражает близкородственное происхождение большинства сортов, созданных на основе сорта Гале. Наибольшая генетическая дистанция относительно другого материала выявлена для сорта Вест, который может служить перспективной формой при селекции новых сортов. Особым положением, значительно удаленным на диаграмме, характеризовался сорт Еля-Ты (селекция ФИЦ «Коми научный центр Уральского отделения РАН»).

При генотипировании практически со всеми SRAP-маркерами сорт Еля-Ты выделялся в выборке сортов, относящихся к виду козлятник восточный, специфичным ДНК-профилем. В результате рестрикционного анализа межгенного спейсера хлоропластной ДНК *trnH-psbA* выявлено его генетическое сходство с образцами другого биологического вида – козлятник лекарственный, что ставит под вопрос видовую принадлежность сорта Еля-Ты, заявленную оригинатором при его регистрации.

Таким образом, показана эффективность применения SRAP-маркеров и метода рестрикционного анализа межгенного спейсера хлоропластной ДНК *trnH-psbA* для различения сортов и видов козлятника. Полученная информация может быть использована в работах по геномике и филогенетике данной культуры, а также в прикладных целях: для разработки селекционных схем, для ДНК-идентификации образцов и контроля чистоты семенного материала.

Список литературы / References

Вагунин Д.А., Иванова Н.Н., Амбросимова Н.Н. Многолетние травостои на основе новых сортов козлятника восточного и интенсивных видов злаковых трав. *Международ. науч.-исслед. журн.* 2019;6(84):97-100. DOI 10.23670/IRJ.2019.84.6.021 [Vagunin D.A., Ivanova N.N., Ambrosimova N.N. Long-term plant formation on the basis of new varieties of eastern galega and intensive types of cereal grasses. *Mezhdunarodnyi Nauchno-issledovatel'skii Zhurnal = International Research Journal.* 2019;6(84):97-100. DOI 10.23670/IRJ.2019.84.6.021 (in Russian)]

Егги Э.Э., Гаврилюк И.П. Электрофорез белков семян для сортовой идентификации высокополиморфных культур на примере козлятника восточного (*Galega orientalis* Lam.). *Аграр. Россия.* 2015;11:14-20. DOI 10.30906/1999-5636-2015-11-14-20 [Eggi Eh.Eh., Gavrilyuk I.P. Seed protein electrophoresis for varietal identification of highly polymorphic crops on the example of oriental goatgrass (*Galega orientalis* Lam.). *Agrarnaya Rossiya = Agrarian Russia.* 2015;11:14-20. DOI 10.30906/1999-5636-2015-11-14-20 (in Russian)]

Золотарев В.Н., Коровина В.Л. Сорт козлятника восточного (*Galega orientalis* Lam.) с маркерным признаком. *Адапт. кормопроизводство.* 2021;1:6-14. DOI 10.33814/AFP-2222-5366-2021-1-6-14 [Zolotarev V.N., Korovina V.L. Eastern goat's rue variety (*Galega orientalis* Lam.) with a marker characteristic. *Adaptivnoe Kormoproizvodstvo = Adaptive Fodder Production.* 2021;1:6-14. DOI 10.33814/AFP-2222-5366-2021-1-6-14 (in Russian)]

Зубарев Ю.Н., Фалалеева Л.В., Субботина Я.В., Нечунаев М.А. Козлятник восточный – культура XXI века. *Перм. аграр. вестн.* 2016;4(16):4-9 [Zubarev Yu.N., Falaleeva L.V., Subbotina Ya.V., Nechunaev M.A. Oriental goatgrass – a crop of the XXI century. *Permskii Agrarnyi Vestnik = Perm Agrarian Journal.* 2016;4(16):4-9 (in Russian)]

Клименко И.А., Коровина В.Л., Козлов Н.Н. Использование RAPD-маркеров для идентификации сортообразцов и межвидовых гибридов кормовых культур. *Многофункциональное адапт. кормопроизводство.* 2016;12(60):11-18 [Klimenko I.A., Korovina V.L., Kozlov N.N. Identification of variety-samples and interspecies hybrids of forage crops using RAPD markers. *Mnogofunktsional'noe Adaptivnoe Kormoproizvodstvo = Multifunctional Adaptive Fodder Production.* 2016;12(60):11-18 (in Russian)]

Клименко И.А., Антонов А.А., Душкин В.А., Шамустакимова А.О., Мавлютов Ю.М. Эффективный способ выделения ДНК для ПЦР-анализа из «балк-образцов» проростков. *Адапт. кормопроизводство.* 2021;3:29-48. DOI 10.33814/AFP-2222-5366-2021-3-29-48 [Klimenko I.A., Antonov A.A. Dushkin V.A., Shamustakimova A.O., Mavlyutov Yu.M. Efficient method of DNA isolation from bulking samples of seedlings. *Adaptivnoe Kormoproizvodstvo = Adaptive Fodder Production.* 2021;3:29-48. DOI 10.33814/AFP-2222-5366-2021-3-29-48 (in Russian)]

Трузина Л.А. Эффективность возделывания травостоя козлятника восточного (*Galega orientalis* Lam.) в условиях Центрального района Нечерноземной зоны. *Кормопроизводство.* 2012;6:20-21 [Truzina L.A. Efficiency of cultivating eastern goats rue (*Galega orientalis* Lam.) in the central area of the Non-Chernozem zone. *Kormoproizvodstvo = Fodder Production.* 2012;6:20-21 (in Russian)]

Чесноков Ю.В., Артемьева А.М. Оценка меры информационного полиморфизма генетического разнообразия. *С.-х. биология.* 2015;5:571-578. DOI 10.15389/agrobiology.2015.5.571rus [Chesnokov Yu.V., Artem'eva A.M. Estimation of the measure of information polymorphism of genetic diversity. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya = Agricultural Biology.* 2015;5:571-578. DOI 10.15389/agrobiology.2015.5.571eng]

Чесноков Ю.В., Косолапов В.М. Генетические ресурсы растений и ускорение селекционного процесса. М.: Угрешская тип., 2016 [Chesnokov Yu.V., Kosolapov V.M. Plant Genetic Resources and Acceleration of the Breeding Process. Moscow: Ugreshskaya Tipografiya, 2016 (in Russian)]

Alghamdi S., Al-Faifi S., Migdadi H., Khan M., El-harty E., Ammar M. Molecular diversity assessment using sequence related amplified polymorphism (SRAP) markers in *Vicia faba* L. *Int. J. Mol. Sci.* 2012;13:16457-16471. DOI 10.3390/ijms131216457

Alongi F., Hansen A.J., Laufenberg D., Keane R.E., Legg K., Lavin M. An economical approach to distinguish genetically needles of limber from whitebark pine. *Forests.* 2019;10(12):1060. DOI 10.3390/f10121060

Castonguay Y., Cloutier J., Bertrand A., Michaud R., Laberge S. SRAP polymorphisms associated with superior freezing tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* spp. *sativa*). *Theor. Appl. Genet.* 2010;120(8):1611-1619. DOI 10.1007/s00122-010-1280-2

Comlekcioglu N., Simsek O., Boncuk M., Aka-Kacar Y. Genetic characterization of heat tolerant tomato (*Solanum lycopersicon*) genotypes by SRAP and RAPD markers. *Genet. Mol. Res.* 2010;9(4):2263-2274. DOI 10.4238/vol9-4gmr876

Gilbert J.E., Lewis R.V., Wilkinson M.J., Caligari P.D.S. Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections. *Theor. Appl. Genet.* 1999;98:1125-1131. DOI 10.1007/s001220051176

Kress W.J. Plant DNA barcodes: applications today and in the future. *J. Syst. Evol.* 2017;55(4):291-307. DOI 10.1111/jse.12254

- Kress W.J., García-Robledo C., Uriarte M., Erickson D.L. DNA barcodes for ecology, evolution, and conservation. *Trends Ecol. Evol.* 2015;30(1):25-35. DOI 10.1016/j.tree.2014.10.008
- Li G., Quiros C.F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theor. Appl. Genet.* 2001;103:455-461. DOI 10.1007/s001220100570
- Loera-Sánchez M., Studer B., Kölliker R. DNA barcode trnH-psbA is a promising candidate for efficient identification of forage legumes and grasses. *BMC Res. Notes.* 2020;13(1):35. DOI 10.1186/s13104-020-4897-5
- Nei M., Li W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979;76(10):5269-5273. DOI 10.1073/pnas.76.10.5269
- Peakall R.O.D., Smouse P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes.* 2006;6(1):288-295. DOI 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x
- Rhouma H.B., Taski-Ajdukovic K., Zitouna N., Sdouga D., Milic D., Trifi-Farah N. Assessment of the genetic variation in alfalfa genotypes using SRAP markers for breeding purposes. *Chil. J. Agric. Res.* 2017;77(4):332-339. DOI 10.4067/S0718-58392017000400332
- Wang Z., Wang J.-E., Wang X.-M., Gao H.-W., Dzyubenko N.I., Chapurin V.F. Assessment of genetic diversity in *Galega officinalis* L. using ISSR and SRAP markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* 2012;59(5):865-873. DOI 10.1007/s10722-011-9727-0
- Yeh F.C., Yang R.C., Boyle T.B.J., Ye Z.H., Mao J.X. POPGENE, the User-friendly Shareware for Population Genetic Analysis, Molecular Biology and Biotechnology Centre. University of Alberta, 1997
- Zolotarev V.N., Klimenko I.A., Kosolapov V.M., Korovina V.L., Antonov A.A. Marker-trait association for breeding fodder galega (*Galega orientalis* Lam.). *Russ. Agric. Sci.* 2022;48(4):270-275. DOI 10.3103/S1068367422040152

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 25.07.2024. После доработки 21.08.2024. Принята к публикации 26.08.2024.