

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2023

ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»

Научный руководитель: **Вертикова Елена Александровна**, доктор сельскохозяйственных наук, доцент, и.о. зав. кафедрой генетики, селекции и семеноводства ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»

Официальные оппоненты: **Гончарова Юлия Константиновна**, доктор биологических наук, зав. лабораторией генетики и гетерозисной селекции ФГБНУ «Федеральный научный центр риса»

Александров Олег Сергеевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточной инженерии растений ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова»

Защита состоится «27» февраля 2024 г. в 10:00 на заседании диссертационного совета 35.2.030.08, созданного на базе ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева», по адресу: 127434, г. Москва, ул. Прянишникова, д. 19, тел: 8 (499) 976-17-14.

Юридический адрес для отправки почтовой корреспонденции (отзывов): 127434, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке имени Н.И. Железнова ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева» и на сайте Университета www.timacad.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.

И.о. ученого секретаря
диссертационного совета
доктор сельскохозяйственных наук,
доцент



Е.Л. Маланкина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Многолетние злаковые травы являются важнейшим компонентом сенокосов и пастбищ. Широкое использование данных культур обусловлено их ценными биологическими свойствами: 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 обогащают почву органическими веществами, защищают ее от эрозии, 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, обладающих высокой продуктивностью и устойчивостью к экологическим стрессам (Косолапов и др., 2013).

В настоящее время для дифференциации и сортовой идентификации многолетних злаковых трав, в основном, используют морфологические признаки. Такой подход вызывает определенные трудности, обусловленные особенностями репродуктивной системы и высокой степенью пластичности данных культур (Сапрыкин и др., 2020). Вследствие перекрестноопыляемой самонесовместимой природы сорта являются высокогетерогенными

популяциями на генетическом уровне, обладая при этом выраженным морфологическим сходством.

В последние годы с целью повышения эффективности сортовой идентификации, для решения ряда правовых вопросов в области растениеводства и семеноводства успешно применяются молекулярные ДНК-маркеры. Они выгодно отличаются от морфологических признаков возможностью проведения анализа независимо от фазы развития растений и условий окружающей среды, способностью выявлять различия на уровне непосредственного носителя наследственной информации при обеспечении автоматизации процесса (Хлесткина, 2015; Клименко и др., 2022). Сортовая идентификация с использованием ДНК-маркеров основана на оценке аллельного состава в определенных областях генома с последующим документированием результатов (Малышев и др., 2006). Полученные данные могут использоваться для определения оригинальности и однородности сорта, подбора родительских форм для скрещиваний, контроля гибридизации и изучения филогенетических взаимосвязей в исследуемом материале.

Однако для большинства видов и сортов многолетних злаковых трав российской селекции не определены оптимальные системы молекулярного маркирования и наиболее эффективные способы сортовой идентификации. Исследования в этом направлении позволят получить новые знания о генетической структуре популяций, повысить эффективность регистрации и авторской защиты селекционных достижений.

Цель 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 (\times *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 внутривидовой 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 на практике 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 молекулярного анализа образцов злаковых трав, могут быть востребованы в селекционном процессе: для характеристики исходного материала, подбора родительских форм, контроля гибридизации и маркирования 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 варiances (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.

Благодарности. Автор выражает благодарность и.о. директора ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса» Разину Олегу Анатольевичу и научному руководителю организации Косолапову Владимиру Михайловичу за создание благоприятных условий для проведения исследований. Особая благодарность заведующей Клименко Ирине Александровне и всем сотрудникам лаборатории молекулярно-генетических исследований кормовых культур – за неоценимый вклад в получение экспериментальных данных и консультативную помощь в оформлении результатов исследования. Автор искренне благодарен научному руководителю Вертиковой Елене Александровне за ценные советы и наставления, поддержку и организационную помощь при подготовке диссертационной работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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.). Семенной материал был предоставлен центром коллективного пользования «Биологические коллекции кормовых растений» ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса».

SSR- и SCoT-маркеры для анализа межсортового и внутрисортного полиморфизма многолетних злаковых трав. Для анализа сортов фестулолиума, райграса пастбищного и райграса однолетнего использовали микросателлитные маркеры, отбор которых осуществлен на основе

информации из литературных источников (Wang et al., 2009; Studer et al., 2008; Lauvergeat et al., 2005; Kubik et al., 2001). Восемь SSR-локусов – из библиотеки экспрессирующихся целевых сиквенсов (EST, Expressed Sequence Tags), связанных с различными аннотированными генами. В исследовании также использовали праймеры, разработанные к набору из 25 SCoT-маркеров, выделенных на основании ранее проведенных исследований в качестве информативных для анализа злаковых культур (Collard, Mackill, 2009; Jiang et al., 2014; Kondratskaya et al., 2019; Safari et al., 2019).

Методы статистической обработки данных. По результатам анализа межсортового и внутрисортового полиморфизма определяли размеры ПЦР-продуктов и формировали бинарные матрицы, где присутствие фрагментов амплификации обозначали как «1», а отсутствие – «0». В анализе учитывали отчетливые и воспроизводимые ампликоны. Для вычисления значений эффективного числа аллелей (N_e), показателя гетерозиготности (H_e), проведения PCoA-анализа и определения значений молекулярной дисперсии AMOVA (Analasis of Molecular Variance) использовали программное обеспечение GenAlEx 6.2 (Peakall, Smouse, 2006). Показатели информативности праймеров (PIC), разрешающей способности (R_p), 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).

Методы валидации данных. С целью верификации размеров полученных ПЦР-продуктов, их клонировали с использованием вектора pAL2-T (ЗАО «Евроген», Россия) и секвенировали на генетическом анализаторе ABI PRISM 3130XL («Applied Biosystems, Inc.», США) с помощью набора Big Dye terminator v.3.1 cycle sequencing kit («Applied Biosystems, Inc.», США). Данные секвенирования анализировали, используя программу Ugene (Okonechnikov et al., 2012), а затем осуществляли поиск соответствий в алгоритме BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Оптимизация способов выделения ДНК

Важнейшим этапом анализа на основе ПЦР-технологии является получение качественных образцов геномной ДНК. Растения, относящиеся к группе многолетних злаковых трав, содержат большое количество белков, полисахаридов и фенольных соединений, ингибирующих ПЦР (Anderson et al., 2018; Клименко и др., 2021). В предварительных экспериментах испытали 3 метода ДНК-экстракции с использованием разных лизирующих буферов: SDS (додецилсульфат натрия), СТАВ (цетилтриметиламмония бромид) и способ, основанный на применении коммерческого набора реагентов «ДНК-Экстран-3» (ООО «Синтол», Россия). Наилучшие результаты по качеству и количеству выделенной ДНК, получены с помощью базового метода хлороформ-фенольной экстракции, существенно модифицированного в условиях лаборатории применительно к объекту исследований (ткань проростков) (Клименко и др., 2021).

2. Модификация условий ПЦР для оценки межсортового и внутрисортового полиморфизма

В серии экспериментов были определены оптимальный компонентный состав реакционной смеси для успешного проведения ПЦР с разными типами маркеров и температурный режим амплификации праймеров, а также наиболее эффективные способы детекции полученных результатов и методы статистической обработки данных.

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

3. Анализ внутрисортного ДНК-полиморфизма райграса и фестулолиума

Оценку однородности осуществляли для трёх сортов райграса пастбищного (Агат, Карат, Феникс) и трёх сортов фестулолиума (ВИК 90, Кафес, Пилигрим), каждый из которых был представлен 30 генотипами. В качестве маркеров использовали микросателлитные локусы, оказавшиеся полиморфными в предварительных экспериментах. По результатам анализа для каждого изучаемого сорта определяли общее количество выявленных ДНК-спектров или биотипов (табл. 1).

Таблица 1 – Количество выявленных биотипов в выборке семян сортов райграса пастбищного и фестулолиума

Название сорта/SSR-локус	Количество выявленных биотипов или ДНК-спектров				
	G03_089	G04_092	G07_058	LP165	Всего
Агат	8	15	14	-	37
Карат	9	18	19	-	46
Феникс	8	26	8	-	42
ВИК 90	10	-	-	11	21
Кафес	7	-	-	11	18
Пилигрим	9	-	-	12	21

Анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) позволил выявить высокий уровень генетической изменчивости внутри сортов – более 80 %, тогда как между сортами этот показатель составил менее 20 % (рис. 1, А, Б).

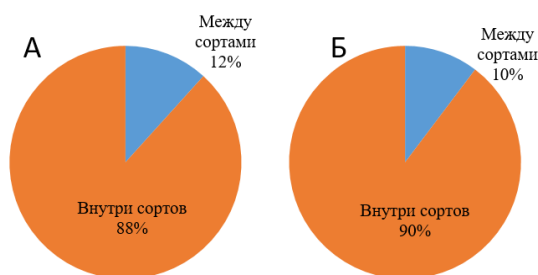


Рисунок 1 – Результаты анализа общего генетического разнообразия (AMOVA) сортов райграса пастбищного (А) и фестулолиума (Б), представленные в виде диаграмм.

С помощью анализа методом главных координат создан пространственный график, иллюстрирующий филогенетические взаимосвязи между изучаемыми образцами на основе данных, полученных при генотипировании индивидуальных проростков (рис. 2).

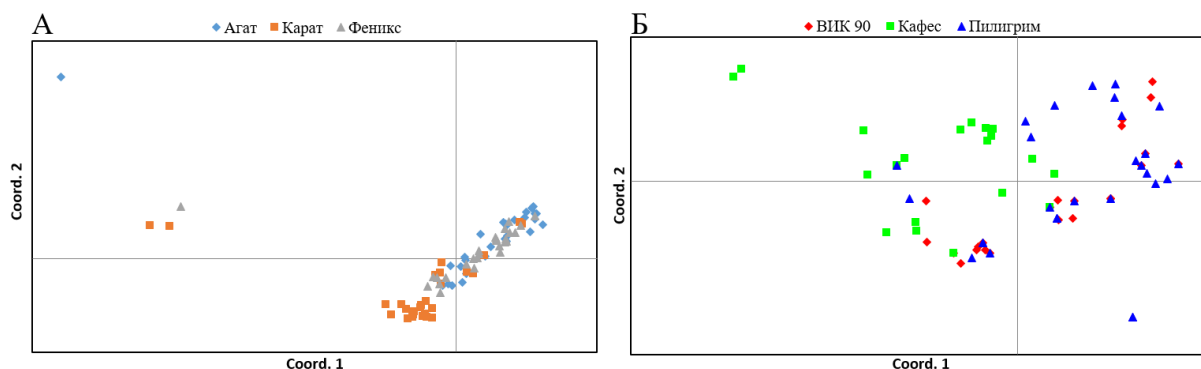


Рисунок 2 – РСоА-анализ результатов генотипирования сортов райграса пастбищного (А) и фестулолиума (Б) с использованием SSR-маркеров.

Цветовыми кодами обозначены изучаемые сорта.

На графике главных координат (рис. 2, А) выраженных различий между сортами райграса пастбищного не отмечено. Выявленное сходство, вероятно, является следствием их генетического родства и общей селекционной истории. Распределение сортов фестулолиума (рис. 2, Б) находилось в соответствии с их селекционным происхождением и результатами оценки межсортовой генетической изменчивости, полученными на основе тестирования «балк-образцов» геномной ДНК.

4. Анализ межсортового ДНК-полиморфизма райграса пастбищного с использованием SSR- и SCoT-маркеров

Из общего числа испытанных микросателлитных локусов для последующего анализа отобрано 7 (G05_044, G07_058, G03_089, G04_092, AJ872206, LPSSRh01h06, LPSSRk03b03) информативных, позволяющих получить полиморфные, отчетливые и воспроизводимые ПЦР-продукты. Выявлено 88 аллелей, из которых 28 (31,8 %) оказались уникальными для отдельных сортов. Средний уровень полиморфизма в исследуемой коллекции оказался высоким и составил 97,1 %. Вероятно, это обусловлено

использованием в анализе «балк-образцов» с широким разнообразием аллельных вариантов, а также полиплоидной природой объекта исследования. Размер аллелей находился в диапазоне от 141 до 575 п.н. Значение эффективного числа аллелей, показателя гетерозиготности и величины меры информационного полиморфизма в среднем составляли 1,34, 0,23 и 0,32 соответственно.

Для выявления генетических взаимосвязей между исследуемыми сортами и определения их генетической структуры составлена дендрограмма методом ближайших соседей (Neighbor-Joining, NJ), а также осуществлен анализ на основе байесовской модели (рис. 3, А, Б).

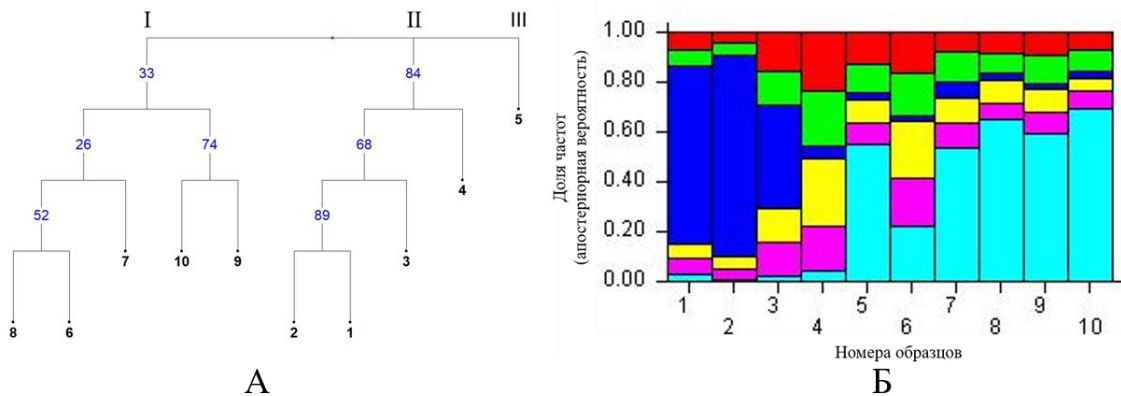


Рисунок 3 – Дендрограмма сходства (А) и генетическая структура (Б) сортов райграса пастбищного по результатам анализа с применением SSR-маркеров. 1-10 – сорта райграса пастбищного (Агат, Дуэт, ВИК 66, Карат, Феникс, ВИК 22, Ленинградский 809, Вей, Веймар, Виль). Цветовые коды и римские цифры соответствуют выявленным кластерам.

Дендрограмма (рис. 3, А) распределила исследуемые сорта по трём кластерам. В первом оказались образцы происхождения из разных географических регионов страны, но обладающие общим ценным признаком, – повышенной зимостойкостью. Во втором кластере дендрограммы расположились тетраплоидные образцы райграса пастбищного селекции ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса». Генетически удаленным от исследуемых образцов оказался тетраплоидный сорт Феникс, выведенный из сложно-гибридных

популяций методом отбора по признакам долголетия и зимостойкости. Анализ полученных результатов в программе Structure методом Evanno с помощью онлайн-ресурса Structure Harvester показал, что наиболее вероятным оказывается разделение исследуемой коллекции райграса пастбищного на 6 кластеров ($K=6$) (рис. 3, Б). 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.

Таким образом, установлено, что предложенный нами набор SSR-маркеров обладает необходимым дискриминационным потенциалом для различения российских сортов райграса пастбищного и может использоваться для определения сортовой принадлежности.

Из 25 праймеров, разработанных для SCoT-маркеров и включенных в исследование, 8 (SCoT 06, SCoT 13, SCoT 15, SCoT 17, SCoT 20, SCoT 23, SCoT 32, SCoT 35) оказались информативными, генерирующими отчетливые, полиморфные и воспроизводимые продукты амплификации. С их помощью удалось получить 42 ПЦР-продукта, из которых 13 (72,2 %) являлись сортоспецифичными. Уровень полиморфизма в среднем равнялся 44,4 %. Размер выявленных фрагментов ДНК варьировал от 420 до 2500 п.н. В среднем на один SCoT-маркер приходилось 2,3 полиморфных фрагментов, из них 1,6 – сортоспецифичных. Средние значения эффективного числа аллелей, генного разнообразия по Нею и показателя информативности праймеров составляли 1,14, 0,09 и 0,22 соответственно. В результате кластеризации сортового материала выделены 2 отчетливые группы образцов с уровнем бутстреп-поддержки 49 и 34 % соответственно. Образцы разделились в зависимости от селекционного происхождения (рис. 4, А). При анализе результатов методом Evanno с помощью онлайн-ресурса Structure Harvester, также получили 2 кластера (рис. 4, Б).

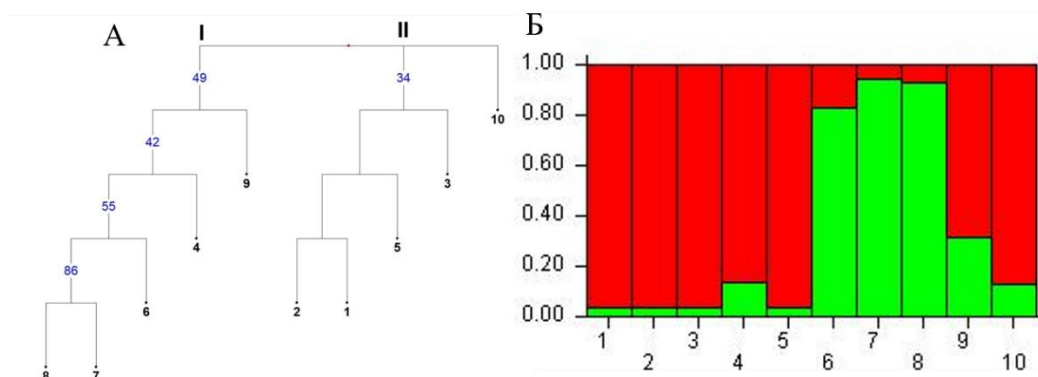


Рисунок 4 – Дендрограмма сходства (А) и генетическая структура (Б) сортов райграса пастбищного по результатам анализа с применением SCoT-маркеров.

1-10 – сорта райграса пастбищного (см. рис. 3).

На основе объединенных данных бинарных матриц, полученных с использованием SSR- и SCoT –маркеров, осуществлен анализ методом главных координат (рис. 5).

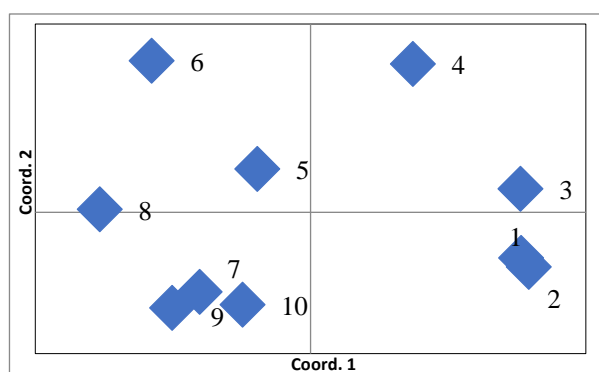


Рисунок 5 – Результаты PCoA-анализа на основе данных, полученных с использованием SSR- и SCoT-маркеров, где 1-10 сорта *Lolium perenne* L. (см. рис. 3).

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. В первой объединились тетраплоидные сорта райграса пастбищного селекции ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса» (Агат, Дуэт, ВИК 66, Карат). Среди образцов второй группы наименьшие генетические дистанции оказались между сортами Веймар, Ленинградский 809, Выль. Обособленно от остальных на графике расположились сорта ВИК 22, Феникс и Вея.

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.

5. Анализ межсортового ДНК-полиморфизма райграса однолетнего с использованием SSR- и SCoT-маркеров

Из 20 включенных в анализ SSR-маркеров выделены 5 информативных (G05_044, G07_058, G04_092, AJ872206, LPSSRk03b03). С их использованием удалось получить 46 аллелей, из которых 35 (76 %) оказались уникальными для отдельных сортов. При этом размер продуктов амплификации варьировал от 185 до 1144 п.н. Средний уровень полиморфизма по всем информативным локусам составлял 80,1 %. В среднем значения эффективного числа аллелей, показателя гетерозиготности, величины индекса полиморфизма (PIC), а также разрешающей способности составляли 1,14, 0,09, 0,32 и 0,7 соответственно.

В результате кластеризации (рис. 6, А) сортового материала выделены 2 группы сортов. В первой объединились сорта селекции ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса» Рапид и Московский 74. При этом сорт Изорский (оригинатор – ФНЦ «ВИК им. В.Р.) оказался во второй группе вместе с диплоидным сортом Sprint, выведенным в Дании. Обособленно на дендрограмме расположился чешский диплоидный сорт Roznovsky. Определена генетическая структура образцов райграса однолетнего (рис. 6, Б), в соответствии с которой они разделились на два кластера (K = 2). В целом, по результатам SSR-анализа изучаемая коллекция характеризуется равномерной генетической структурой. Отчетливых различий между сортами выявить не удалось.

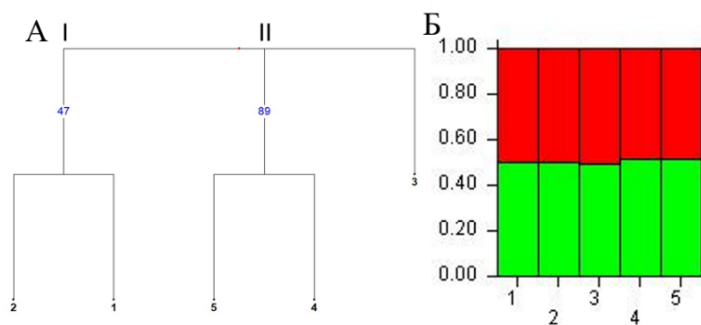


Рисунок 6 – Дендрограмма сходства (А) и генетическая структура (Б) сортов райграса однолетнего по результатам анализа с применением SSR-маркеров. 1-5 – сорта Рапид, Московский 74, Roznovsky, Sprint, Изорский.

При оценке межсортового ДНК-полиморфизма образцов райграса однолетнего из 25 праймеров, разработанных к последовательностям SCoT-маркеров, выбрали 8 информативных (SCoT 02, SCoT 06, SCoT 13, SCoT 15, SCoT 17, SCoT 20, SCoT 23, SCoT 35), генерирующих отчетливые и воспроизводимые фрагменты амплификации. С ними получено 44 ПЦР-продукта, из которых 35 оказались полиморфными. Уровень полиморфизма составил 77,8 %. Размер амплифицированных ДНК-фрагментов варьировал от 500 до 2400 п.н. В среднем при использовании 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.

В результате кластеризации сортового материала по результатам SCoT-анализа выделены 2 группы образцов (рис. 7, А). В первой с 46%-ной бутстреп-поддержкой оказались сорт Изорский, а также образец Sprint. Вторая группа объединила тетраплоидный сорт Рапид с образцом Raznovsky (бутстреп-поддержка 82 %). Сорт Московский 74 оказался в отдельном кластере. Анализ результатов в программе Structure (рис. 7, Б) распределил исследуемую коллекцию на 7 кластеров. В целом, генетическая структура сортов райграса однолетнего оказалась достаточно однородной. Вероятно, отсутствие явной дифференциации связано с ограниченным числом анализируемых образцов и количеством используемых маркеров.

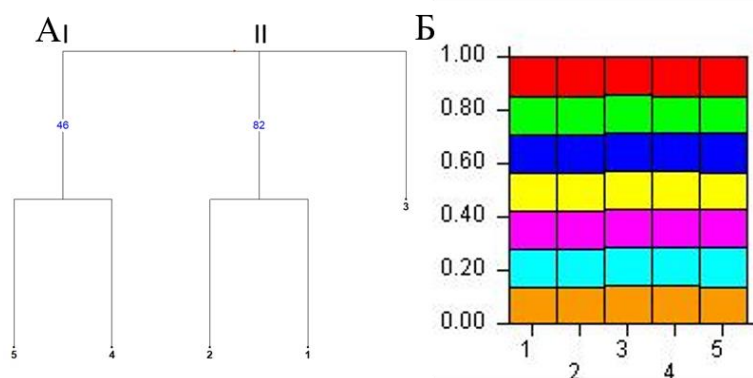


Рисунок 7 – Дендрограмма сходства (А) и генетическая структура (Б) сортов райграса однолетнего по результатам анализа с применением SCoT-маркеров. 1-5 – сорта райграса однолетнего (см. рис. 6).

6. Анализ межсортового ДНК-полиморфизма фестулолиума с использованием SSR- и SCoT-маркеров

Анализ сортов фестулолиума осуществляли с помощью шести микросателлитных маркеров – LPSSRk02e08, G03_089, G01_002, AJ872206, AJ872228, LP165, разработанных на основе информации о последовательностях генома райграса пастбищного. Для последующего анализа с детекцией результатов методом капиллярного электрофореза отобрано 3 информативных локуса (G03_089, AJ872206, LP165), генерирующих отчетливые и воспроизводимые ампликоны. В общей сложности удалось выявить 35 ПЦР-продуктов, размер которых варьировал от 86 до 331 п.н. В среднем с использованием одного информативного маркера получили более 11 аллелей.

На основании установленных генетических дистанций проведен кластерный анализ, разделивший образцы на 3 группы (рис. 8). В первой оказались сорта райграсового морфотипа: ВИК 90, Пилигрим, Айвенго и Фест селекции ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса», а также сорт Кафес, созданный в «ФИЦ картофеля имени А.Г. Лорха». Во второй группе объединились сорта Дебют (райграсовый морфотип) и Изумрудный (овсяничный морфотип). В третий кластер выделились сорта фестулолиума Синта и Аэлита (райграсовый морфотип), выведенные в УрФАНИЦ УрО РАН.

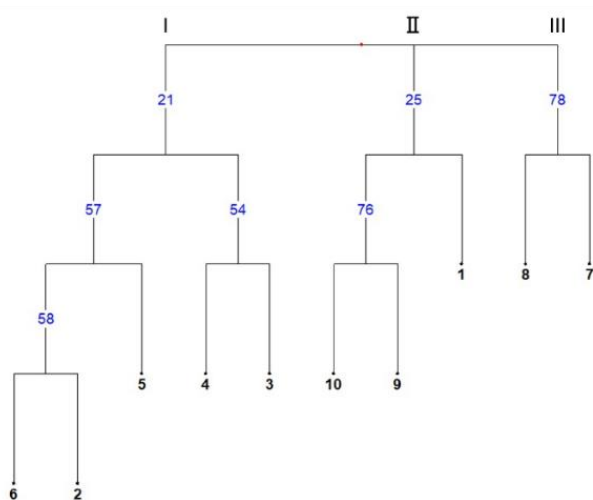


Рисунок 8 – Дендрограмма сортов фестулолиума по результатам анализа с микросателлитными маркерами. Сорта: 1 – Аллегро; 2 – Пилигрим; 3 – Фест; 4 – Айвенго; 5 – Кафес; 6 – ВИК 90; 7 – Синта; 8 – Аэлита; 9 – Изумрудный; 10 – Дебют.

Установлено, что отобранные SSR-маркеры пригодны для использования при изучении ДНК-полиморфизма отечественных сортов фестулолиума. В

результате кластеризации изучаемый материал распределился в соответствии с происхождением и хозяйственно ценными признаками. Сгруппированные в единые кластеры образцы, 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.

Для оценки межсортовой генетической изменчивости фестулолиума использовали также 14 SCoT-маркеров, из них 3 выявляли полиморфизм и генерировали сортоспецифичные ДНК-профили (SCoT 02, SCoT 13, SCoT 07). С их использованием получены 17 ПЦР-продуктов, из которых 15 (88,2 %) оказались полиморфными. В среднем на каждый информативный маркер приходилось 7,5 полиморфных ампликона. Размер ПЦР-продуктов варьировал от 800 до 2400 пар нуклеотидов. Средний уровень выявленного полиморфизма составлял 77,8 %. Средние значения эффективного числа аллелей (N_e), показателя гетерозиготности (H_e), а также информативности маркеров (PIC) равнялись 1,39, 0,24 и 0,37 соответственно.

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

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

Для уточнения размеров 4-х уникальных ПЦР-продуктов, полученных в коллекции сортов райграса пастбищного с использованием SSR-маркеров, проведено их секвенирование по Сэнгеру с предварительным клонированием с помощью вектора pAL2-T.

Для секвенирования ДНК-фрагментов, полученных в результате анализа образцов фестулолиума с применением SCoT-маркеров, мы адаптировали применительно к изучаемым культурам и апробировали технику, основанную на их реамплификации, а затем выделении из агарозного геля с последующей

очисткой. Таким методом валидированы размеры 2-х уникальных фрагментов амплификации, позволяющих идентифицировать сорта Вея и ВИК 22. Анализ данных секвенирования с помощью алгоритма BLAST показал высокую степень гомологии выявленных нуклеотидных последовательностей с генами или их фрагментами в геномах райграса пастбищного, райграса жесткого и генома одного из видов эндосферных бактерий (табл. 2).

Таблица 2 – Результаты «выравнивания» нуклеотидных последовательностей в поисковой системе BLAST

Сорт	Название маркера	Размеры полученных клонов, п.н.	Совпадение по базе данных NCBI
Агат	G03_089	320	<i>Lolium rigidum</i> katanin p60 ATPase-containing subunit A-like 2 (LOC124661429), mRNA
		326	
Дуэт		300	<i>Lolium rigidum</i> katanin p60 ATPase-containing subunit A-like 2 (LOC124661429), mRNA
		300	
Карат	LPSSRh01h06	142	<i>Lolium perenne</i> myosin-12 (LOC127292861), mRNA
		142	
Феникс		142	<i>Lolium perenne</i> myosin-12 (LOC127292861), mRNA
ВИК 22	SCoT 35	581	<i>Lolium perenne</i> hypothetical protein gene, complete cds
		581	
Вея	SCoT 15	-	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>
		-	

Использование высокоразрешающего метода секвенирования позволяет существенно повысить достоверность результатов по определению размеров сортоспецифичных ДНК-фрагментов для сортовой идентификации и генетической паспортизации.

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

Данные по аллельному разнообразию сортов райграса пастбищного, райграса однолетнего и фестулолиума использовали для составления молекулярно-генетических формул. Буквами латинского алфавита обозначали код маркера, а нижним индексом - размер выявленного ПЦР-продукта в парах нуклеотидов (табл. 3).

Таблица 3 – Молекулярно-генетические формулы образцов райграса пастбищного по результатам анализа с использованием микросателлитных (SSR) локусов и SCoT-маркеров

Сорт	Молекулярно-генетическая формула	
	SSR-маркеры**	SCoT-маркеры***
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}	A* ₂₁₅₃ B _{1685, 1484} C _{2348, 1801, 1576} D _{957, 865, 722, 550, 424} E _{1473, 1266, 931, 516} F _{1265, 1121}
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}	A ₂₁₅₃ B _{1685, 1484} C _{2348, 1801, 1576} D _{957, 865, 722, 550, 424} E _{1473, 1266, 931, 516} F _{1265, 1121}
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}	A ₂₁₅₃ B _{1685, 1484} C _{2348, 1801, 1576} D _{957, 865, 722, 550, 424} E _{1473, 1266, 931, 516} F _{1265, 1121}
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}	A ₂₁₅₃ B _{1685, 1484} C _{2348, 1801, 1576} D _{957, 865, 722, 550, 424} E _{1473, 1266, 931, 516} F _{1265, 1121}
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}	A ₂₁₅₃ B _{1685, 1484} C _{2348, 1801, 1576} D _{957, 865, 722, 550, 424} E _{1473, 1266, 931, 516} F _{1265, 1121}
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}	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}
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}	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}
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}	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,}
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}	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}
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}	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. ** G05_044 – A; G07_058 – B; G03_089 – C; G04_092 – D; AJ872206 – E; LPSSRh01h06 – F; LPSSRk03b03 – G.

***A – SCoT 06; B – SCoT 23; C – SCoT 13; D – SCoT 32; E – SCoT 35; F – SCoT 15.

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

Из общей коллекции изученных образцов райграса пастбищного, райграса однолетнего и фестулолиума выделены сорта-кандидаты на паспортизацию. Система отбора предполагала наличие уникального для сорта в анализируемой выборке ДНК-фрагмента. Молекулярные формулы послужили основой при разработке дизайна генетических паспортов, которые дополнили информацией по происхождению сорта, регионам возделывания, основным морфобиологическим признакам и хозяйственно ценным свойствам. В результате проведенных исследований по двум системам маркирования (SSR- и SCoT-маркеры) разработаны генетические паспорта многолетних злаковых трав: для 10 сортов райграса пастбищного, 5 сортов райграса однолетнего и 6

сортов фестулолиума. На рисунке 9 представлен образец ДНК-паспорта райграса пастбищного на основе SSR-маркеров.

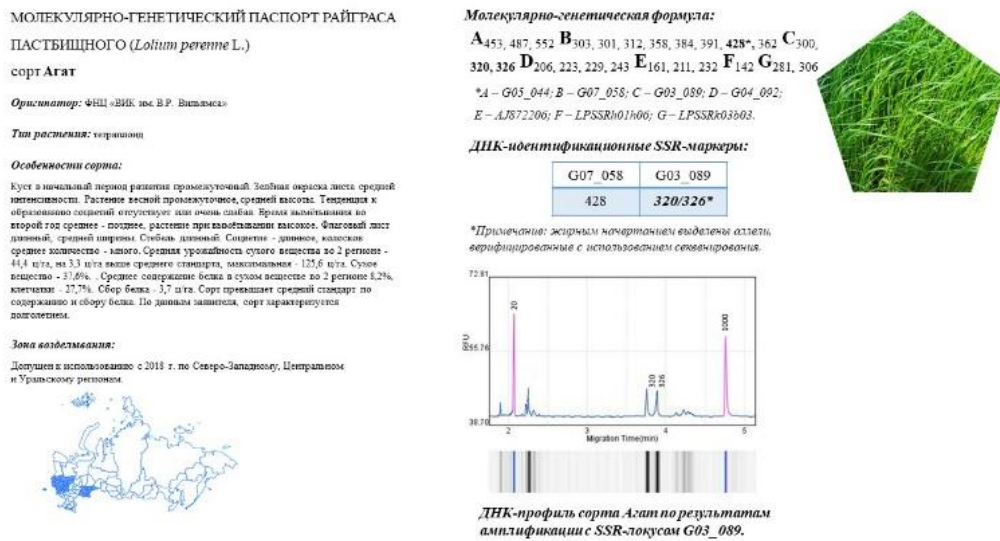


Рисунок 9 – Образец генетического паспорта райграса пастбищного сорта Агат, разработанный на основе SSR-маркеров.

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 LPSSRk03b03. 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы, опубликованные в изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. **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. - 184(3): 146-160.

2. **Мавлютов, Ю.М.** Идентификация российских сортов фестулолиума с использованием микросателлитных маркеров / **Ю.М. Мавлютов** // Вестник Омского ГАУ. - 2023. - 3(51). - 60–68.

Работы, опубликованные в изданиях, индексируемых в международных цитатно-аналитических базах данных:

1. **Mavlyutov, Y.** Genetic variability analysis of Russian cultivars of ryegrass (*Lolium*) based on SCoT markers / **Y. Mavlyutov**, S. Kostenko, A. Shamustakimova, I. Klimenko // Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. - 2022. - 20(1): - 1-8 (Scopus).

2. Клименко, И.А. Эффективность SSR- и PwS-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. - 181(3): - 100-109 (Scopus).

3. 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. - 26(4): 349-358. (Scopus, WoS).

4. Шамустакимова, А.О. Применение SRAP-маркеров для ДНК-идентификации российских сортов люцерны / А.О. Шамустакимова, **Ю.М. Мавлютов**, И.А. Клименко // Генетика. - 2021. - 57(5): - 536-543 (Scopus, WoS).

Авторское свидетельство, удостоверение автора и патенты:

1. Свидетельство о регистрации базы данных № 2023622067 Базы данных нуклеотидных последовательностей, идентифицирующих сорта кормовых культур / И.А. Клименко, А.О. Шамустакимова, **Ю.М. Мавлютов**, В.А. Душкин, А.А. Антонов, заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Федеральный научный центр кормопроизводства и агроэкологии имени В.Р. Вильямса. – заявка № 2023621245, дата поступления 28 апреля 2023 г.; дата гос. Регистрации в Реестре баз данных 22 июня 2023 г.

Работы, опубликованные в других научных изданиях:

1. **Мавлютов, Ю.М.** Применение SCoT-маркеров для оценки генетической изменчивости российских сортов овсяницы и фестулолиума / **Ю.М. Мавлютов**, В.Л. Коровина, И.А. Клименко // Экспериментальная биология и биотехнология. - 2022. - №3: - С. 53-63.

2. 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. - №3. - С.29.

3. **Мавлютов, Ю.М.** Дифференциация российских сортов фестулолиума с помощью SCoT-маркеров / **Ю.М. Мавлютов**, А.О. Шамустакимова, И.А. Клименко // Клеточная биология и биотехнология растений : тез. докл. III Междунар. науч.-практ. конф., Респ. Беларусь, Минск, 24–27 мая 2022 г. – 2022. – 52-52.

4. **Мавлютов, Ю.М.** Оценка генетического разнообразия сортов овсяницы (*Festuca*) с помощью SCoT-маркеров / **Ю.М. Мавлютов**, А.О. Шамустакимова, И.А. Клименко // Материалы II Международной научно - практической конференции «Геномика и современные биотехнологии в размножении, селекции и сохранении растений» (GenBio 2021) г. Ялта, 13 - 15 октября 2021 г. Республика Крым, Россия. – 2021. – 60-61.

5. **Mavlyutov, Y.M.** Application of SCoT markers for accessing of genetic diversity of gramineous forage grass species / **Y.M. Mavlyutov**, А.О. Shamustakimova, I.A. Klimenko // Top conference series: earth and environmental science, 2. Сер. «2nd All-Russian Conference with International Participation «Economic and Phytosanitary Rationale for the Introduction of Feed Plants»». – 2021. – Vol. 901. – №1. – P. 012038.