

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ И ИХ ДИКИХ РОДИЧЕЙ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ И ПРИКЛАДНЫХ ПРОБЛЕМ

Научная статья

УДК 57.577.21

DOI: 10.30901/2227-8834-2023-3-146-160



Изучение генетической структуры коллекции сортов райграса (*Lolium*) с использованием SSR- и SCoT-маркеров

Ю. М. Мавлютов^{1,2}, Е. А. Вертикова², А. О. Шамустакимова¹, И. А. Клименко¹

¹ Федеральный научный центр кормопроизводства и агроэкологии им. В.Р. Вильямса, Московская область, Россия

² Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва, Россия

Автор, ответственный за переписку: Юлиан Муратович Мавлютов, yulian92@mail.ru

Актуальность. С помощью современных молекулярно-генетических методов анализа можно существенно ускорить процесс создания новых сортов, упростить и повысить точность оценки исходного материала. В настоящей работе изучена эффективность использования техник SSR- и SCoT-маркирования для оценки генетической структуры коллекции образцов райграса пастбищного и однолетнего и определения набора сортоспецифичных маркеров для ДНК-идентификации.

Материалы и методы. Геномную ДНК выделяли из суммарной навески 30 проростков от каждого из 15 исследуемых образцов с помощью модифицированного SDS-метода. Для анализа сортов райграса использовали 20 SSR- и 22 SCoT-маркера. Определили показатели эффективности для информативных локусов. Генетические взаимосвязи между сортами оценили с помощью дендрограммы, составленной методом Neighbor-Joining (NJ), и путем анализа на основе байесовской модели.

Результаты. Для оценки генетического полиморфизма видов и сортов райграса были отобраны 7 SSR-локусов, для которых выявлено 110 аллельных вариантов (34 аллели оказались уникальными для отдельных сортов), и 9 SCoT-локусов, для которых выявлено 78 полиморфных фрагментов амплификации (28 из них являлись сортоспецифичными). Дендрограмма сходства и моделирование в программе Structure v.2.3.4 по результатам SSR- и SCoT-анализов распределили сорта согласно видовой принадлежности, уровню плоидности, происхождению и сходству по основным признакам. С помощью анализа главных координат (PCoA), проведенного на основе объединенных данных бинарных матриц, построена многомерная диаграмма генетических взаимосвязей между сортами райграса.

Заключение. Системы SSR- и SCoT-маркирования оказались достаточно эффективными для изучения генетического полиморфизма и различения видов и сортов райграса. Обнаружены уникальные ДНК-профили, которые можно использовать для генетической идентификации. Результаты исследования имеют практическую значимость при сортовой идентификации и в селекции сортов разного назначения.

Ключевые слова: райграс однолетний, райграс пастбищный, ДНК-полиморфизм, генетическая структура коллекции

Благодарности: работа выполнена в рамках государственного задания согласно тематическому плану ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса» по проекту № FGGW-2022-0007 «Использовать адаптированные методы молекулярно-генетического анализа кормовых культур для создания новых форм, сортов и гибридов с улучшенными хозяйственно ценными признаками».

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы.

Для цитирования: Мавлютов Ю.М., Вертикова Е.А., Шамустакимова А.О., Клименко И.А. Изучение генетической структуры коллекции сортов райграса (*Lolium*) с использованием SSR- и SCoT-маркеров. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2023;184(3):146-160. DOI: 10.30901/2227-8834-2023-3-146-160

IDENTIFICATION OF THE DIVERSITY OF CULTIVATED PLANTS AND THEIR WILD RELATIVES FOR SOLVING FUNDAMENTAL AND APPLIED PROBLEMS

Original article

DOI: 10.30901/2227-8834-2023-3-146-160

Genetic structure of the collection of ryegrass (*Lolium*) cultivars: a study based on SSR and SCoT markers

Yulian M. Mavlyutov^{1,2}, Elena A. Vertikova², Anastasia O. Shamustakimova¹, Irina A. Klimenko¹¹ Federal Williams Research Center of Forage Production and Agroecology, Moscow Province, Russia² Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia**Corresponding author:** Yulian M. Mavlyutov, yulian92@mail.ru

Background. Current molecular and genetic approaches make it possible to accelerate ryegrass breeding, simplify source material evaluation, and increase its accuracy. The efficiency of PCR-based SSR and SCoT marker techniques was studied in the context of evaluating the genetic structure of annual and perennial ryegrass accessions and defining DNA-identifying markers.

Materials and methods. Genomic DNA was isolated from the aggregate sample of 30 seedlings from each of the 15 analyzed cultivars according to the modified SDS DNA extraction protocol. In total, 20 SSR and 22 SCoT markers were used to assess genetic polymorphism. Basic parameters of the markers' informative efficiency were identified. Genetic relationships among the studied cultivars were analyzed on the basis of the Neighbor-Joining dendrogram and Bayesian model.

Results. To assess the genetic polymorphism of ryegrass species and varieties, 7 SSR loci were selected, for which 110 allelic variants were identified (34 alleles were unique for individual cultivars), and 9 SCoT loci, for which 78 polymorphic amplification fragments were identified, with 28 being cultivar-specific. The dendrogram of genetic similarity and modeling in the Structure v2.3.4 program according to the results of SSR and SCoT analyses distributed the cultivars by their traits according to their species, ploidy level, origin, and similarity. Based on PCoA, carried out using summarized data of SSR and SCoT analyses, a multidimensional diagram of genetic relationships among ryegrass cultivars was constructed.

Conclusions. The systems of SSR and SCoT markers appeared to be an efficient tool to reveal genetic polymorphism and identify differences among ryegrass species and cultivars. We found unique DNA profiles that can be used for genetic identification. The results of the study have practical significance in cultivar-specific identification and selection of cultivars for various purposes.

Keywords: annual ryegrass, perennial ryegrass, DNA polymorphism, genetic structure of the collection

Acknowledgements: the research was performed within the framework of the state task according to the theme plan of the Federal Williams Research Center of Forage Production and Agroecology, Project No. FGGW-2022-0007 "Using adapted methods of molecular and genetic analysis of forage crops for the development of new forms, cultivars and hybrids with improved useful agronomic characteristics".

The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work.

For citation: Mavlyutov Yu.M., Vertikova E.A., Shamustakimova A.O., Klimenko I.A. Genetic structure of the collection of ryegrass (*Lolium*) cultivars: a study based on SSR and SCoT markers. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2023;184(3):146-160. DOI: 10.30901/2227-8834-2023-3-146-160

Введение

Важнейшим фактором устойчивого развития сельского хозяйства и наращивания производства полноценной животноводческой продукции для обеспечения потребностей населения является создание стабильных кормовых агроэкосистем, которые включают природные кормовые угодья и многолетние травы на пашне. Для лугового и полевого травосеяния России определяющее значение имеют злаковые травы. Они составляют более 90% рациона животных при кормлении на сенокосах и пастбищах, служат источником сырья при заготовке сена и силоса. В системе земледелия многолетние злаковые травы повышают плодородие почв, обогащая их органическими веществами, способствуют укреплению агроландшафтов и улучшению экологической обстановки. Некоторые виды широко используются при залужении откосов дорог, газонов и стадионов (Kosolapov et al., 2013b).

Одним из наиболее распространенных видов злаковых трав в зоне достаточного увлажнения является райграсс (*Lolium* L.). При создании культурных пастбищ и сенокосов в северо-западных, западных и центральных регионах России в травосмесях используются в основном райграсс пастбищный, или райграсс многолетний (*L. perenne* L.), и райграсс однолетний (вестервольдский) (*L. multiflorum* Lam. var. *westerwoldicum* Wittm.). Растения этих видов хорошо развиваются на умеренно влажных, плодородных суглинистых, глинистых и супесчаных почвах, при благоприятных условиях могут давать высокие урожаи сухого вещества (более 80 ц с 1 га), отличаются хорошей отавностью и ценными кормовыми свойствами. Селекционная работа с райграссом направлена на выведение высокопродуктивных долговечных сортов с повышенной зимостойкостью и устойчивостью к болезням (Kosolapov et al., 2013a).

Существенно ускорить процесс создания новых сортов и в достаточно короткие сроки отследить наследование хозяйственно ценных признаков в потомстве позволяет применение в селекции современных молекулярно-биологических подходов. На основе методов ДНК-маркирования оптимизируют работу, связанную с поиском и рациональным использованием генетических ресурсов, проводят дифференциацию исходного материала, осуществляют подбор родительских форм и контроль результатов гибридизации (Klimenko et al., 2019). Широкое использование молекулярных маркеров в системе Государственного сортоиспытания поможет снизить затраты при оценке соответствия новых селекционных достижений критериям отличимости, однородности и стабильности (ООС-тест) (Kilchevsky, Khotyleva, 2012).

Особое значение методы ДНК-типирования приобретают в работе с перекрестноопыляемыми злаковыми культурами, характеризующимися высокой межсортной и внутрисортной гетерогенностью при значительной степени сходства по морфологическим признакам (Loera-Sánchez et al., 2019). Однако для успешного выполнения задач исследования необходимо учитывать преимущества и недостатки маркеров различных типов, техническую сторону проведения анализа, финансовые затраты и особенности изучаемой культуры (Amar et al., 2011; Sukhareva, Kuluev, 2018).

Для генотипирования популяций и образцов разных видов райграсса применяются как доминантные (RAPD, AFLP, SRAP, ISSR), так и кодоминантные маркеры (SSR и SNP) (Kubik et al., 2001; Wang et al., 2009; Liu et al., 2018;

Pasquali et al., 2022). В нашей работе при оценке генетической изменчивости сортов пастбищного и однолетнего райграсса использовали полиморфные микросателлитные локусы (SSR – *Simple Sequence Repeats*) и относительно новую систему SCoT-маркеров (*SCoT – Start Codon Targeted Polymorphism*), разработанных на основе выявления различий в коротких консервативных участках, фланкирующих ATG-стартовый кодон в генах растений (Collard, Mackill, 2009). Выбор SSR-локусов обусловлен их кодоминантной природой, многочисленностью и равномерным распределением по геному, а также высоким уровнем выявляемого полиморфизма. Преимуществом мультилокусных SCoT-маркеров является способность маркировать ДНК, ассоциированную с кодирующими участками генома. Для этого, как и в случае применения RAPD-маркеров, используются одиночные праймеры. Отличительные особенности SCoT-маркеров – большая длина используемых праймеров (18 нуклеотидов), обеспечивающая высокую воспроизводимость результатов, а также простота выполнения и доступность анализа. Основным недостатком маркеров этой группы считается их доминантная природа. Несмотря на это, в последние годы SCoT-маркеры все чаще используются для ДНК-типирования злаковых культур (Zeng et al., 2014; Jiang et al., 2014; Yan et al., 2016).

Цель исследования заключалась в изучении полиморфизма и генетической структуры коллекции образцов райграсса и оценке эффективности SSR- и SCoT-маркеров в качестве инструмента ДНК-идентификации сортов и видов.

Материалы и методы

Растительный материал и выделение ДНК.

Объектом исследования служили 15 сортов пастбищного и однолетнего райграсса разного эколого-географического происхождения, переданные для исследования Центром коллективного пользования «Биологические коллекции кормовых растений» Федерального научного центра кормопроизводства и агроэкологии имени В.Р. Вильямса» (ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса») (табл. 1). Геномную ДНК выделяли модифицированным SDS-методом из суммарной навески части растительной ткани («балк-образец») 30 семидневных проростков от каждого сорта (Klimenko et al., 2020). Конечная концентрация ДНК всех образцов была доведена до 30 нг/мкл.

SSR-анализ. Набор из 20 микросателлитных маркеров для генотипирования образцов райграсса составлен на основе анализа данных литературных источников (табл. 2).

В реакционной смеси для проведения ПЦР объемом 20 мкл содержалось: 3 мкл 10×Taq Turbo buffer, 0,4 мкл 50x dNTP mix (10 мМ каждого из дезоксинуклеотидов), 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 мМ) и 13,3 мкл деионизированной воды. Амплификацию матричной ДНК с праймерами осуществляли в термодиклере Bio-Rad T100 (Bio-Rad, США) по программам, предложенным в литературных источниках (см. табл. 2).

Размер полученных ПЦР-фрагментов предварительно определяли с использованием пакета программ Image Lab version 6.0.1 в сравнении с маркером молекулярного веса 100 bp Ladder GeneRuler (Thermo Fisher Scientific,

Таблица 1. Сорта райграса пастбищного и однолетнего, их происхождение и уровень плоидности**Table 1.** The studied perennial and annual ryegrass cultivars, their origin, and ploidy level

Сорт / Cultivar	Вид / Species	Происхождение (оригинатор) / Origin (originator)	Плоидность / Ploidy level
Агат	Райграс пастбищный (<i>Lolium perenne</i> L.)	ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса»	4n*
Дуэт		ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса»	4n*
ВИК 66		ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса»	4n*
Карат		ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса»	4n*
Феникс		ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса»	4n*
ВИК 22		ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса»	2n*
Ленинградский 809		ФГБНУ «ФИЦ картофеля имени А.Г. Лорха»	–
Вея		Калининградский НИИСХ – филиал ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса»	–
Веймар		ФГБНУ «Федеральный научный центр лужных культур»	2n**
Выль		ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса» ФИЦ Коми НЦ УрО РАН	4n**
Рapid	Райграс однолетний (вестервольдский) (<i>Lolium multiflorum</i> Lam. var. <i>westerwoldicum</i> Wittm.)	ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса»	4n*
Московский 74		ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса»	2n*
Roznovsky		Чехия	2n***
Sprint		Дания	2n****
Изорский		ФГБНУ «ФИЦ картофеля имени А.Г. Лорха»	2n*****

Примечание / Note: * Kosolapov et al., 2019; ** <https://reestr.gossortrf.ru>; *** Fojtík, 1994; **** Bostan et al., 2022; ***** Dyachenko et al., 2016

Таблица 2. SSR-маркеры для анализа сортов райграса**Table 2.** SSR markers for the PCR analysis of ryegrass cultivars

Название SSR- маркера / SSR marker name	Последовательность праймеров (5'-3') F/R / Primer sequence (5'-3') F/R	Температура отжига праймеров (T _m), °C / Annealing temperature (T _m), °C	Ссылка на литературный источник / Reference
LPSSRh01h06	ATTGACTGGCTTCCGTGTT/ CGCGATTGCAGATTCTTG	53,8	(Wang et al., 2009)
LPSSRh03b01	ACACTCCACTAGGATTTCT/ CTGAATTTGGCTAGTATAAA	46,3	
LPSSRk12d11	GCAAGAGCTAGGTCTCGACAACAA/ TGGGGAGGACAAGGCCATAAACAA	63,1	
LPSSRk02e08	TCTGAAAGCCCCGAGTGAGCG/ CGACTGTGGCAGGGATGACG	61,8	
LPSSRk03b03	GGGAATCTGGCAGAAGTATCACGT/ GAAGATCTGGCCAAGTCTAATCCG	62,0	
LPSSRk15h05	GGCACTTTATTTGCTTTGGTTAGTC/ AAATCCTTAGATTGGTCGGTCATG	58,9	

Таблица 2. Окончание

Table 2. The end

Название SSR-маркера / SSR marker name	Последовательность праймеров (5'-3') F/R / Primer sequence (5'-3') F/R	Температура отжига праймеров (T _m), °C / Annealing temperature (T _m), °C	Ссылка на литературный источник / Reference
G02_025	GAGTTTGAAGATCCCCGTGA/ GCCATGATGCAGAAGAAGGT	60	(Studer et al., 2008)
G03_039	GCTCCAGGACTTCTTCAACG/ GCTGCTCGTACTGCTCGTAG	60	
G03_089	TCACCAACACCACACTCCTC/ GCTGCTCGTACTGCTCGTAG	60	
G04_092	GGACTTGCAAAGTCAATCAGC/ CTCGAACTGGTTCCCGAATA	60	
G05_044	GACCGATTGGAACCAACAAC/ CGATGCTTTCAGCGGTTAAT	60	
G05_046	TACCTCCAGCAACAGCTTCA/ TTCTGAAACTGGCTGCAATG	60	
G07_058	AAGGAGCTCCAGCAAGATGA/ GGGGGAGAGGCTTCAATAAC	60	
G01_002	CAAGACCAAACCGAGAGAGG/ TCTCCTCCTCGACTTCCAGA	60	
AJ872206	GTGCAGCAGTTTGAATTGGA/ AGCATCGGGAGCTATGAATG	55	(Lauvergeat et al., 2005)
AJ872214	AGGTGTCCTGTTGCTTTGGA/ TTTACCCCCAGGGATCAAAT	55	
AJ872228	CCAACTAGACAAAGGGGATTG/ GGAGAGCACCATTATCCAT	55	
AJ872232	CTTGTCGTCCTTGTGTTGGGAG/ ATATTCTGGATCGTGGCGTT	55	
LP165	CCATCACCTCCACTAT/ AGCTCGCAGTCTGTTG	55	(Kubik et al., 2001)
M4136	AGAGACCATCACCAAGCC/ TCTGGAAGATTTTCCTTG	55	

США) после электрофореза в 1,6-процентном агарозном геле (50 V в течение 2 часов). Для последующего анализа отобрали 7 пар праймеров, позволяющих выявлять отчетливые продукты амплификации со всеми исследуемыми образцами при наличии полиморфизма. Ампликоны, полученные с данными SSR-праймерами, разделяли с применением автоматической системы капиллярного электрофореза Qsep₁ Plus (BioOptic Inc., Тайвань) и анализировали с помощью программного обеспечения Q-Analyzer.

Анализ с использованием SCoT-маркеров. SCoT-маркеры для генотипирования образцов райграса были выбраны на основе данных литературных источников (табл. 3).

Общий объем ПЦР-смеси составлял 20 мкл и содержал 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 (концентрации 30 нг/мкл), 1 мкл праймера (8 мкМ), 15,4 мкл деионизи-

рованной воды. ПЦР осуществлялась на приборе Bio-Rad T100 (Bio-Rad, США). Режим амплификации был следующий: 94°C - 3 мин; далее 35 циклов: 94°C - 1 мин, 50°C - 1 мин, 72°C - 1 мин; финальная элонгация при 72°C - 5 мин. Полученные ПЦР-продукты разделяли в 1,6-процентном агарозном геле при 50 V в течение 2 часов, а затем с помощью программного обеспечения Image Lab version 6.0.1 (Bio-Rad, США) определяли их размеры в сравнении с маркером молекулярного веса 1 kb DNA Ladder («Евроген», Россия).

Анализ данных. На основании полученных данных составляли бинарные матрицы, где присутствие фрагмента определенной длины обозначали как «1», а отсутствие - «0». В анализе учитывали только отчетливые и воспроизводимые ампликоны. Для вычисления значений эффективного числа аллелей (Ne) и показателя гетерозиготности, или генетического разнообразия по Нею (He), а также проведения PcoA-анализа применяли программное обеспечение GenAlEx 6.5 (Peakall, Smouse,

Таблица 3. SCoT-маркеры для ПЦР-анализа сортов райграса

Table 3. SCoT markers for the PCR analysis of ryegrass cultivars

Название / Marker name	Последовательность праймера (5'-3') / Primer sequence (5'-3')	Источник / Reference
SCoT 02	CAACAATGGCTACCACCC	(Collard, Mackill, 2009)
SCoT 20	ACCATGGCTACCACCGCG	
SCoT 23	CACCATGGCTACCACCAG	
SCoT 31	CCATGGCTACCACCGCCT	
SCoT 06	CAACAATGGCTACCACGC	
SCoT 13	ACGACATGGCGACCATCG	
SCoT 21	ACGACATGGCGACCCACA	
SCoT 32	CCATGGCTACCACCGCAC	
SCoT 15	ACGACATGGCGACCGCGA	
SCoT 17	ACCATGGCTACCACCGAG	
SCoT 35	CATGGCTACCACCGGCC	
SCoT 22	AACCATGGCTACCACCAC	
SCoT 28	CCATGGCTACCACCGCCA	
SCoT 11	AAGCAATGGCTACCACCA	
SCoT 26	ACCATGGCTACCACCGTC	
SCoT 08	CAACAATGGCTACCACGT	(Jiang et al., 2014)
SCoT 07	CAACAATGGCTACCACGG	
SCoT 36	GCAACAATGGCTACCACC	
SCoT 63	ACCATGGCTACCACGGGC	(Jiang et al., 2014)
SCoT 60	ACAATGGCTACCACCACA	
SCoT 59	ACAATGGCTACCACCATC	(Safari et al., 2019)
SCoT 40	CAATGGCTACCACTACAG	

2006). Показатели информативности праймеров (PIC), разрешающей способности (Rp) и значения маркерного индекса (MI) определяли с использованием онлайн-ресурса IMEC (Amiryousefi et al., 2018). Дендрограмму на основе генетических дистанций между исследуемыми образцами составляли с помощью программы DARwin 6.0.21 (Perrier, Jacquemoud-Collet, 2006). Использовали оценку достоверности результатов посредством бутстреп-анализа на основании 10 000 реплик. Для оценки генетической структуры изучаемых сортов применяли программу STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al., 2000; Falush et al., 2003) с установкой значений гипотетических популяций (K) от 1 до 10, а также вводом 10 000 повторов burn-in period и 10 000 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).

Результаты

SSR-анализ. Из 20 протестированных SSR-маркеров для последующего анализа отобрано семь информативных, с которыми были получены воспроизводимые продукты амплификации для всей коллекции образцов (табл. 4).

Для 7 наиболее полиморфных SSR-локусов выявлено 110 аллелей, из которых 34 (30,9%) оказались уникальными для отдельных сортов. При этом их размер варьировал от 140 до 652 пн. Наиболее полиморфным оказался локус G07_058, в нем выявлено 35 аллелей. Наименьшим полиморфизмом характеризовался локус LPSSRh01h06 (обнаружено 5 аллелей). С микросателлитным локусом – G07_058 – получили максимальное количество сортоспецифичных аллелей – 10, а с праймерами к маркерам LPSSRh01h06 и LPSSRk03b03 – минимальное (два).

Таблица 4. Информативные SSR-маркеры, отобранные для анализа сортов райграса**Table 4. List of informative SSR markers used for the analysis of ryegrass cultivars**

Название маркера / Marker name	Число полиморфных ПЦР-продуктов / Total number of polymorphic amplification fragments	Число уникальных фрагментов ДНК / Number of cultivar-specific fragments	Процент уникальных фрагментов, % / Ratio of cultivar-specific fragments (%)	Размер ПЦР-продуктов, пн / Size range of PCR products (bp)
G05_044	18	7	38,9	449–652
G07_058	35	10	28,6	279–431
G03_089	6	2	33,3	300–334
G04_092	19	4	21,1	188–249
AJ872206	15	7	46,7	143–263
LPSSRh01h06	5	2	40,0	140–188
LPSSRk03b03	12	2	16,7	264–351
Сумма Total	110	34	–	–
Среднее Mean	15,7	4,9	32,2	–

По результатам SSR-анализа сортов райграса пастбищного и однолетнего определены показатели генетической изменчивости (табл. 5). Значение эффективного числа аллелей находилось в диапазоне от 1,17 (для локуса G05_044) до 1,51 (для локуса G04_092) и в среднем составляло 1,35. Для локусов AJ872206 и G04_092 выявлен максимальный показатель генетического разнообразия по Нею (0,31), а для локуса G05_044 – минимальный (0,14).

Наибольшей величиной индекса полиморфизма (PIC) (0,37) характеризовался локус G03_089, наименьшей (0,20) – SSR-локус G05_044. При этом разрешающая способность была максимальной при использовании праймеров к локусу G07_058 и составляла 11,70, тогда

как минимальным значением данного показателя (2,10) характеризовался локус G03_089. Показатели маркерного индекса варьировали от 0,013 с использованием локуса G03_089 до 0,002 – для G05_044.

Для выявления генетических взаимосвязей между исследуемыми сортами и определения их генетической структуры составлена дендрограмма методом Neighbor-Joining (NJ) с помощью программы DARwin и осуществлен анализ на основе байесовской модели в программе Structure (рис. 1, а, б).

На дендрограмме (см. рис. 1, а), основанной на генетических дистанциях, наблюдается группировка изучаемых сортов по трем отчетливым кластерам. В первом кластере объединились сорта райграса пастбищного, где

Таблица 5. Показатели эффективности информативных SSR-маркеров, использованных для анализа сортов райграса пастбищного и однолетнего**Table 5. Parameters of the effectiveness of the informative SSR markers for analyzing annual and perennial ryegrass cultivars**

Название маркера / Marker name	Эффективное число аллелей (Ne) / Effective number of alleles (Ne)	Генетическое разнообразие по Нею (He) / Nei's gene diversity (He)	Показатель информативности праймеров (PIC) / Polymorphism information content (PIC)	Показатель разрешающей способности маркера (Rp) / Resolving power (Rp)	Маркерный индекс (MI) / Marker index (MI)
G05_044	1,17	0,14	0,20	6,40	0,002
G07_058	1,20	0,16	0,24	11,70	0,003
G03_089	1,45	0,28	0,37	2,50	0,013
G04_092	1,51	0,31	0,32	7,90	0,007
AJ872206	1,45	0,31	0,25	5,50	0,004
LPSSRh01h06	1,37	0,23	0,32	2,10	0,008
LPSSRk03b03	1,27	0,20	0,28	5,20	0,005
Среднее Mean	1,35	0,23	0,28	5,90	0,01

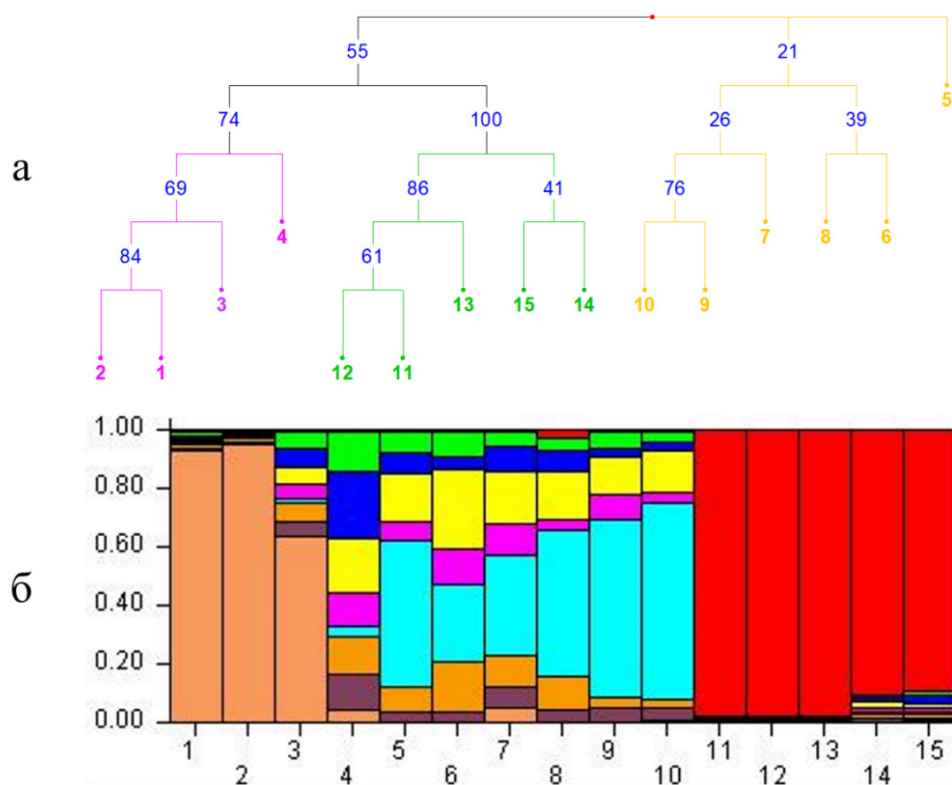


Рис. 1. Дендрограмма сходства (а) и генетическая структура (б) сортов райграса пастбищного и однолетнего по результатам SSR-анализа.

Цветовые коды соответствуют выявленным кластерам, цифровые – названиям сортов (см. табл. 1)

Fig. 1. Neighbor-Joining dendrogram (a) and genetic structure (b) of *Lolium perenne* L. and *L. multiflorum* Lam. var. *westerwoldicum* Wittm. cultivars based on the SSR analysis.
Color codes represent the identified clusters, and digital codes indicate the names of cultivars (see Table 1)

наиболее генетически близкими оказались 'Агат' и 'Дуэт' (84% уровень бутстреп-поддержки). В эту же группу вошли сорта 'ВИК 66' и 'Карат'.

Второй кластер состоит из сортов райграса однолетнего – 'Рapid', 'Московский 74' и 'Roznovsky' (с уровнем бутстреп-поддержки 86%), а также 'Изорский' и 'Sprint' (с бутстреп-поддержкой 37%).

В третьем кластере сгруппировались сорта райграса пастбищного, среди которых наибольшее сходство обнаружено между сортами 'Веймар' и 'Выль' (76-процентный уровень бутстреп-поддержки), а также 'ВИК 22' и 'Вея' (уровень бутстреп-поддержки – 39%). Обособленным положением на ветвях генеалогического дерева характеризовался сорт райграса пастбищного 'Феникс'.

Оценка генетической структуры коллекции сортов на основе байесовской модели методом Evanno выявила оптимальное количество кластеров ($K = 9$), характеризующее их филогенетические взаимосвязи (см. рис. 1, б). На графике распределения частот аллелей наблюдается соответствие группировки образцов результатам кластеризации с использованием NJ-дендрограммы. Однако выявлены и некоторые расхождения. Так, в составе коллекции райграса пастбищного выделяются сорта 'ВИК 66' и 'Карат'.

Анализ с использованием SCoT-маркеров. Из 22 праймеров на SCoT-маркеры, включенных в исследование, 9 оказались информативными, генерирующими отчетливые и воспроизводимые продукты амплификации (табл. 6).

Всего для 9 SCoT-маркеров удалось получить 78 полиморфных ПЦР-продуктов, из которых 28 (35,9%) являлись сортоспецифичными. Размер их варьировал от 424 до 2348 пн. Максимальным числом полиморфных фрагментов амплификации (14) отмечен маркер SCoT 35, с ним же выявлено наибольшее количество уникальных ампликонов. В среднем для одного SCoT-маркера получили 8 фрагментов полиморфной амплифицированной ДНК, из которых 3,1 являлись сортоспецифичными.

Показатель информативности праймеров находился в диапазоне от 0,28 (для маркера SCoT 06) до 0,37 (для маркеров SCoT 32, SCoT 02 и SCoT 20) (табл. 7). Максимальная разрешающая способность (5,6) определена для маркера SCoT 20, минимальная (1,07) – для SCoT 15. Средние значения эффективного числа аллелей и генного разнообразия по Нею составляли 1,38 и 0,23 соответственно.

Дендрограмма, составленная методом Neighbor-Joining, и результаты анализа генетической структуры исследуемых сортов, проведенного с использованием байесовской модели, приведены на рисунке 2, а, б.

В результате кластеризации (см. рис. 2, а) сортового материала выделены 2 отчетливые группы образцов с уровнем бутстреп-поддержки 44 и 61% соответственно. Первая группа – сорта райграса пастбищного ('Агат', 'Дуэт', 'ВИК 66', 'Феникс', 'Веймар', 'Выль', 'Карат'). Во втором кластере со 100-процентной бутстреп-поддержкой расположились сорта райграса однолетнего ('Рapid', 'Московский 74', 'Изорский', 'Roznovsky', 'Sprint') и образцы,

Таблица 6. Информативные SCoT-маркеры для анализа сортов райграса**Table 6. List of informative SCoT markers used for the analysis of ryegrass cultivars**

Название маркера / Marker name	Число полиморфных фрагментов амплификации / Total number of polymorphic amplification fragments	Число уникальных фрагментов ДНК / Number of cultivar-specific fragments	Процент уникальных фрагментов, % / Ratio of cultivar-specific fragments (%)	Размер ПЦР-продуктов, пн / Size range of PCR products (bp)
SCoT 06	12	5	41,7	838-2336
SCoT 23	7	3	37,5	1334-2154
SCoT 13	5	3	50,0	1576-2348
SCoT 32	6	1	12,5	424-957
SCoT 35	14	6	42,9	502-1473
SCoT 15	6	4	57,1	783-1344
SCoT 02	6	0	0,0	847-1963
SCoT 17	11	3	27,3	989-2320
SCoT 20	11	3	25,0	889-2443
Сумма Total	78	28	–	–
Среднее Mean	8,7	3,1	32,7	–

Таблица 7. Показатели информативности SCoT-маркеров для анализа сортов райграса**Table 7. Parameters of the effectiveness of the informative SCoT markers for analyzing annual and perennial ryegrass cultivars**

Название маркера / Marker name	Эффективное число аллелей (Ne) / Effective number of alleles (Ne)	Генетическое разнообразие по Нею (He) / Nei's gene diversity (He)	Показатель информативности праймеров (PIC) / Polymorphism information content (PIC)	Показатель разрешающей способности маркера (Rp) / Resolving power (Rp)	Маркерный индекс (MI) / Marker index (MI)
SCoT 06	1,27	0,19	0,28	4,40	0,005
SCoT 23	1,26	0,18	0,31	2,80	0,007
SCoT 13	1,36	0,20	0,36	1,60	0,012
SCoT 32	1,47	0,27	0,37	3,50	0,016
SCoT 35	1,38	0,23	0,31	4,90	0,007
SCoT 15	1,16	0,12	0,35	1,07	0,01
SCoT 02	1,63	0,34	0,37	3,60	0,02
SCoT 17	1,43	0,25	0,34	4,80	0,009
SCoT 20	1,46	0,27	0,37	5,60	0,014
Среднее Mean	1,38	0,23	0,34	3,59	0,01

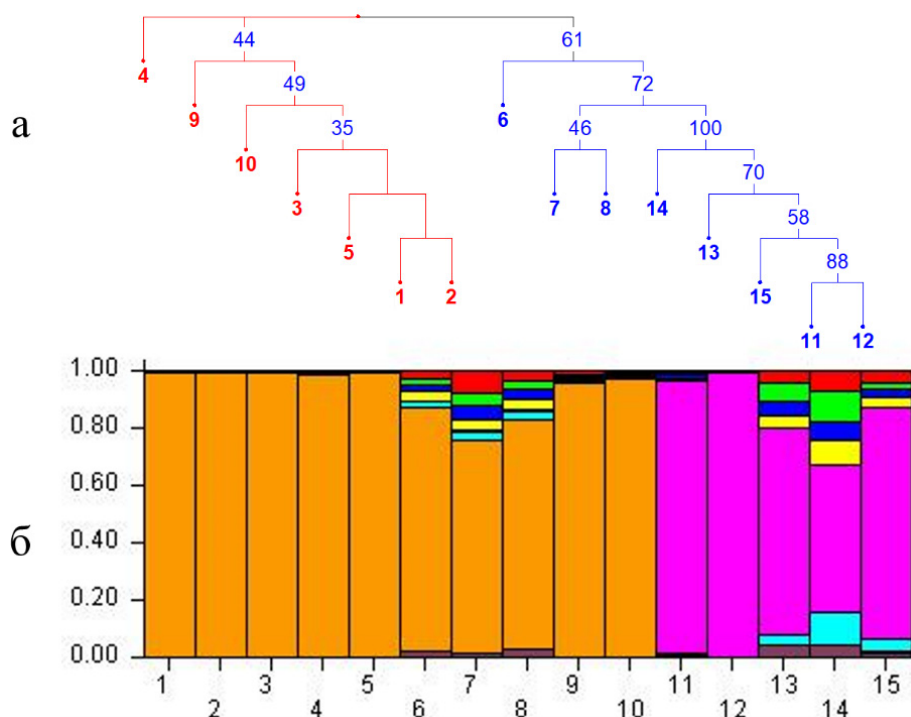


Рис. 2. NJ дендрограмма (а) и генетическая структура (б) сортов райграса пастбищного и однолетнего по результатам генотипирования с использованием SCoT-маркеров.

Цветовые коды соответствуют выявленным кластерам, цифровые – названиям сортов (см. табл. 1)

Fig. 2. Neighbor-Joining dendrogram (a) and genetic structure (b)

of *Lolium perenne* L. and *L. multiflorum* Lam. var. *westewoldicum* Wittm. cultivars based on the SCoT analysis.

Color codes represent the identified clusters, and digital codes indicate the names of cultivars (see Table 1)

относящиеся к виду райграс многолетний ('ВИК 22', Ленинградский 809' и 'Вея').

Анализ результатов методом Evanno с помощью онлайн-ресурса Structure Harvester показал, что наиболее вероятным оказывается разделение исследуемой коллекции на 8 кластеров (см. рис. 2, б). Структура частот аллелей распределилась в основном в соответствии с видовой принадлежностью исследуемых сортов. При этом, как и при построении дендрограммы генетического сходства, в коллекции образцов райграса пастбищного

выделялись сорта 'ВИК 22', 'Ленинградский 809', 'Вея'. Внутри группы, состоящей из образцов райграса однолетнего, обнаружена разнородность генетической структуры сортов 'Roznovsky', 'Sprint' и 'Изорский'.

На основе общих данных бинарных матриц (скрининг с использованием SSR- и SCoT-маркеров) проведен анализ методом главных координат (PCoA-анализ), который позволил в графической форме с минимальным искажением визуализировать генетические взаимосвязи между образцами исследуемой коллекции (рис. 3).

Principal Coordinates (PCoA)

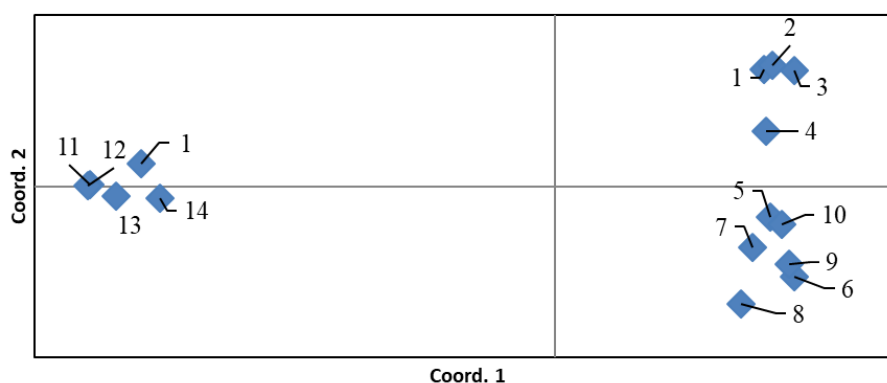


Рис. 3. Результаты PCoA-анализа сортов райграса на основе данных, полученных при генотипировании с использованием SSR- и SCoT-маркеров: 1 – 'Агат'; 2 – 'Дуэт'; 3 – 'ВИК 66'; 4 – 'Карат'; 5 – 'Феникс'; 6 – 'ВИК 22'; 7 – 'Ленинградский 809'; 8 – 'Вея 74'; 9 – 'Веймар'; 10 – 'Виль'; 11 – 'Рапид'; 12 – 'Московский 74'; 13 – 'Raznovsky'; 14 – 'Spirit'; 15 – 'Изорский'

Fig. 3. PCoA analysis of ryegrass cultivars based on using SSR and SCoT markers: 1 – 'Agat'; 2 – 'Duet'; 3 – 'VIK 66'; 4 – 'Karat'; 5 – 'Feniks'; 6 – 'VIK 22'; 7 – 'Leningradsky 809'; 8 – 'Veya'; 9 – 'Veymar'; 10 – 'Vyl'; 11 – 'Rapid'; 12 – 'Moskovsky 74'; 13 – 'Raznovsky'; 14 – 'Spirit'; 15 – 'Izorsky'

Значения первых двух координат многомерной диаграммы сходства составляли 44,4% и 10,2%. Таким образом, суммарно они объясняют 54,6% общей молекулярной вариации. По результатам PCoA-анализа изучаемые сорта разделились на три группы. Первая объединила сорта райграса однолетнего ('Рapid', 'Московский 74', 'Raznovsky', 'Spirit', 'Изорский'), что соответствовало результатам кластеризации при использовании SSR- и SCoT-маркеров по отдельности. Во второй группе оказались образцы райграса пастбищного с наименьшей генетической дистанцией между сортами 'Агат', 'Дуэт', 'ВИК 66'. Сорта 'Феникс', 'Виль', 'Веймар', 'ВИК 22', 'Ленинградский 809' и 'Вея' сгруппировались в обособленный кластер.

Обсуждение

Вследствие самонесовместимой перекрестноопыляемой природы райграса для его популяций характерен высокий уровень генетической гетерогенности (Huff, 1997; Forster et al., 2000; Guthridge, 2001; Kostenko et al., 2016). При проведении молекулярно-генетического анализа таких культур необходимо использовать достаточно репрезентативную выборку генотипов от каждого образца и маркерную систему, обладающую высоким дискриминационным потенциалом (Bolaric et al., 2005; Liu et al., 2018; Konarev, Perchuk, 2018).

В нашей работе при выделении ДНК для каждой повторности опыта использовали по 30 проростков от каждого сорта, что, по данным проведенных ранее исследований, в популяциях перекрестноопыляемых видов позволяет учесть аллели, встречающиеся с частотой не менее 10% (Crossa, 1989; Forster et al., 2001; Muylle et al., 2005; Liu et al., 2018).

При оценке межвидового и межсортового генетического разнообразия показателями, характеризующими эффективность маркера, могут служить выявляемые с его использованием число и частота встречаемости аллелей, ожидаемая гетерозиготность и индекс полиморфизма (PIC). Следует учитывать также меру воспроизводимости результатов и частоту возникающих при анализе ошибок генотипирования (Omasheva et al., 2013).

Среднее значение эффективного числа аллелей в нашем исследовании оказалось несколько выше для SCoT-праймеров и равнялось значению 1,38 (см. табл. 6). При этом показатель гетерозиготности в среднем по каждой из используемых систем приближался к 0,23, что оказалось значительно ниже значений, определенных в работе E. Pasquali с соавторами (Pasquali et al., 2022). Исследователи анализировали по 47 индивидуальных генотипов от каждого из 14 сортов райграса пастбищного с применением микросателлитных маркеров и обнаружили, что параметры эффективного числа аллелей и ожидаемой гетерозиготности составляли в среднем 19,9 и 0,65 соответственно. Вероятно, существенные различия в результатах анализа можно объяснить спецификой используемого в работе материала и особенностями применения «балк-стратегии», которая не всегда дает возможность учета редких аллелей, встречающихся в популяции (Sweeney, Danneberger, 1994; Kölliker et al., 2001).

Величина меры информационного полиморфизма, характеризующая способность маркера выявлять различия на генетическом уровне, оказалась выше для системы SCoT-маркирования и составила в среднем 0,34. При этом в работах по анализу генотипов *Dactylis glomerata* L. с помощью данной техники сообщается о значении меры информационного полиморфизма, равном

в среднем 0,904, что превышает показатели, полученные в нашей работе (Jiang et al., 2014).

Средние значения PIC, рассчитанные для SSR-маркеров в нашем исследовании, сопоставимы с величинами, определенными в работах других исследователей при генотипировании образцов злаковых трав. Так, Gang Nie с соавторами для оценки генетической изменчивости 6 сортов райграса однолетнего с использованием 29 микросателлитных маркеров определили среднее значение показателя информативности как 0,304 (Nie et al., 2019).

Показатель разрешающей способности праймеров, позволяющий выявлять полиморфизм у большого числа генотипов, оказался выше на 40% при использовании микросателлитных маркеров. Маркерный индекс, отражающий общую пригодность системы в качестве инструмента анализа конкретной культуры, был равнозначным у используемых маркеров (0,01), но значительно ниже значений этого показателя, приведенных в работе при анализе 24 генотипов овсяницы тростниковой с системой маркирования EST-SSR (Pirajmedin et al., 2020).

Результаты кластерного анализа (см. рис. 1, а; 2, а) на основе генетических дистанций позволили распределить исследуемые сорта в соответствии с их видовой принадлежностью, уровнем пloidности и основными хозяйственно ценными признаками. При этом дендрограмма, полученная при использовании данных SSR-анализа, дифференцировала образцы по видам. Так, в отдельную подгруппу выделились сорта, относящиеся к райграсу однолетнему. Обособленной группой расположились тетраплоидные образцы райграса пастбищного селекции ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса» ('Агат', 'Дуэт', 'ВИК 66' и 'Карат'). В общий кластер объединились сорта этого же вида, из разных географических регионов страны – 'Веймар', 'Виль', 'Ленинградский 809'. Они характеризуются общим ценным признаком – повышенной зимостойкостью. В этой же группе оказались тетраплоидный образец 'Вея' и диплоидный 'ВИК 22'. Возможно, их генетическая близость обусловлена схожим географическим происхождением исходного материала, поскольку сорт 'Вея' получен в Калининградском НИИСХ, а для селекции сорта 'ВИК 22' использовались дикорастущие формы райграса из Прибалтики. Генетически удаленным от исследуемых образцов оказался тетраплоидный сорт райграса пастбищного 'Феникс', выведенный из сложного гибридных популяций методом отбора по признакам долголетия и зимостойкости.

На дендрограмме, построенной по результатам анализа с использованием SCoT-маркеров, наблюдались две отдельно расположенные группы образцов (см. рис. 2, а). В первой объединились сорта райграса пастбищного, во второй – преимущественно однолетнего и три представителя другого вида. Среди них наиболее близкими с 46-процентной бутстреп-поддержкой оказались сорта 'Вея' и 'Ленинградский 809'. Вероятно, в исходном материале для селекции этих сортов присутствовали формы райграса однолетнего. В этом же кластере разместился диплоидный сорт 'ВИК 22' (бутстреп-поддержка 61%). При этом наиболее генетически близкими в группе райграса однолетнего оказались высокоурожайный сорт 'Рapid' и 'Московский 74' селекции ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса». Помимо них в данном подкластере присутствуют образцы зарубежной селекции 'Sprint' (Дания) и 'Raznovsky' (Чехия), а также отечественный диплоидный сорт 'Изорский'.

По итогам изучения генетической структуры сортового материала на основе байесовской модели и метода

Evanno определено наиболее вероятное число кластеров, которое при анализе с SSR-маркерами составило 9, а со SCoT-маркерами – 8 (см. рис. 1, б; 2, б). В обоих случаях наблюдалась четкая дифференциация сортов в зависимости от их видовой принадлежности. Микросателлитные маркеры выявляли большую гетерогенность сортов райграса пастбищного. Напротив, сорта, относящиеся к виду райграс однолетний, выделялись на графике по результатам амплификации со SCoT-праймерами. Это, вероятно, объясняется принципом действия праймеров, маркирующих различные участки генома.

Многомерная диаграмма генетических взаимосвязей (PCoA), полученная на основе объединенных результатов анализа с SSR- и SCoT-маркерами, распределила исследуемый материал на три группы. На графике главных координат, как и в случае использования микросателлитных локусов, наблюдается четкая дифференциация сортов по видам. Так, в первой группе расположились сорта райграса однолетнего ('Рапид', 'Московский 74', 'Raznovsky', 'Spirit', 'Изорский'). Вторая группа объединила сорта вида райграс пастбищный, полученные селекционерами ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса ('Агат', 'Дуэт', 'ВИК 66', 'Карат'). В третьей группе наиболее генетически близкими оказались диплоидные сорта 'Веймар' и 'ВИК 22', а также тетраплоидные 'Феникс' и 'Виль'. Кроме них в данной группе расположились зимостойкие образцы 'Ленинградский 809' и 'Вей'.

При оценке эффективности используемых маркеров учитывалась их способность выявлять уникальные аллели для отдельных сортов. Максимальным числом сортоспецифичных аллелей – 34 (30,9%) – характеризовались микросателлитные локусы. Полученное соотношение общего количества аллелей к уникальным несколько превышало эти показатели, определенные по результатам других исследований (Jones et al., 2001; Guo et al., 2016; Nie et al., 2019). При этом для всех образцов райграса пастбищного и однолетнего удалось обнаружить уникальные наборы аллелей (ДНК-профили), позволяющие их идентифицировать.

Заключение

На основании результатов исследования можно заключить, что SSR- и SCoT-маркеры имеют достаточный дискриминационный потенциал для успешного использования при изучении генетического разнообразия сортов райграса пастбищного и однолетнего. Установлено, что по величине затрат, трудоемкости и сложности проведения анализа используемые техники равноценны. Более информативными в качестве инструмента идентификации сортов оказались микросателлитные маркеры. С их помощью удалось обнаружить уникальные аллели для 14-ти образцов райграса, тогда как со SCoT-маркерами сортоспецифичные аллели выявлены для шести образцов.

Дендрограмма, построенная методом ближайших соседей (Neighbor-Joining – NJ), и моделирование в программе Structure v.2.3.4 по результатам оценки полиморфизма с использованием обобщенных данных анализа на основе SSR- и SCoT-маркеров позволили уточнить филогенетические взаимоотношения между сортами райграса и определить генетическую структуру анализируемой коллекции.

Многомерная диаграмма сходства (PCoA) на основе объединенных бинарных матриц с применением двух систем маркирования визуализировала генетические

дистанции между образцами, которые разделились по трем группам согласно видовой принадлежности, уровню пloidности, происхождению и сходству по основным признакам.

Совместное применение ДНК-маркеров разных типов для молекулярно-генетического анализа позволяет увеличить охват различающихся по своей природе участков генома, повышает вероятность выявления полиморфизма и точность оценки филогенетических связей внутри анализируемой группы образцов. Результаты изучения генетической структуры коллекции образцов райграса имеют практическое значение для селекции, сохранения и рационального использования генофонда этой ценной злаковой культуры.

References / Литература

- Amar M.H., Biswas M.K., Zhang Z., Guo W.W. Exploitation of SSR, SRAP and CAPS-SNP markers for genetic diversity of *Citrus* germplasm collection. *Scientia Horticulturae*. 2011;128(3):220-227. DOI: 10.1016/j.scienta.2011.01.021
- Amiryousefi A., Hyvönen J., Pocza P. iMEC: Online marker efficiency calculator. *Applications in Plant Sciences*. 2018;6(6):e01159. DOI: 10.1002/aps3.1159
- Bolaric S., Barth S., Melchinger A.E., Posselt U.K. Molecular genetic diversity within and among German ecotypes in comparison to European perennial ryegrass cultivars. *Plant Breeding*. 2005;124(3):257-262. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2005.01108.x
- Bostan C., Rechitean D., Istrate-Schiller C., Horablaga N.M., Bordean M.D., Bostan Pinisoara N. et al. Feed quality and productivity in some varieties of Italian ryegrass – *Lolium multiflorum* Lam. *Life Science and Sustainable Development*. 2022;3(2):107-113. DOI: 10.58509/lssd.v3i2.215
- 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;27(1):86-93. DOI: 10.1007/s11105-008-0060-5
- Crossa J. Methodologies for estimating the sample size required for genetic conservation of outbreeding crops. *Theoretical and Applied Genetics*. 1989;77:153-161. DOI: 10.1007/BF00266180
- Dyachenko O.V., Dronov A.V., Slezko E.I. Cultivation of perennial mixtures as an effective method of forage production in the Bryansk region. *VESTNIK of the Bryansk State Agricultural Academy*. 2016;6(58):29-33. [in Russian] (Дьяченко О.В., Дронов А.В., Слэзко Е.И. Возделывание многолетних травосмесей как способ эффективного обеспечения кормопроизводства Брянской области. *Вестник Брянской государственной сельскохозяйственной академии*. 2016;6(58):29-33).
- Earl D.A., VonHoldt B.M. Structure Harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*. 2012;4(2):359-361. DOI: 10.1007/s12686-011-9548-7
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*. 2005;14(8):2611-2620. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x
- Falush D., Stephens M., Pritchard J.K. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*. 2003;164(4):1567-1587. DOI: 10.1093/genetics/164.4.1567

- Fojtík A. Methods of grass improvement used at the Plant Breeding Station Hladké Životice. *Genetica Polonica*. 1994;35(A):25-31.
- Forster J.W., Jones E.S., Kölliker R., Drayton M.C., Dumsday J.L., Dupal M.P. et al. Development and implementation of molecular markers for forage crop improvement. In: G. Spandenberg (ed.). *Molecular Breeding of Forage Crops: Developments in Plant Breeding. Vol. 10. Proceedings of the 2nd International Symposium, Lorne and Hamilton, Victoria, Australia, November 19–24, 2000*. Dordrecht: Springer; 2000. p.101-133. DOI: 10.1007/978-94-015-9700-5_6
- Forster J.W., Jones E.S., Kölliker R., Drayton M.C., Dupal M.P., Guthridge K.M. et al. Application of DNA profiling to an outbreeding forage species. In: R.J. Henry (ed.). *Plant Genotyping: the DNA Fingerprinting of Plants*. Oxford: CABI; 2001. p.299-320. DOI: 10.1079/9780851995151.0299
- Guo Z.H., Fu K.X., Zhang X.Q., Zhang C.L., Sun M., Huang T. et al. SSRs transferability and genetic diversity of three allogamous ryegrass species. *Comptes Rendus Biologies*. 2016;339(2):60-67. DOI: 10.1016/j.crvi.2015.12.004
- Guthridge K.M., Dupal M.P., Kölliker R., Jones E.S., Smith K.F., Forster J.W. AFLP analysis of genetic diversity within and between populations of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Euphytica*. 2001;122:191-201. DOI: 10.1023/A:1012658315290
- Huff D.R. RAPD characterization of heterogenous perennial ryegrass cultivars. *Crop Science*. 1997;37(2):557-564. DOI: 10.2135/cropsci1997.0011183X003700020041x
- Jiang L.F., Qi X., Zhang X.Q., Huang L.K., Ma X., Xie W.G. Analysis of diversity and relationships among orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) accessions using start codon-targeted markers. *Genetics and Molecular Research*. 2014;13(2):4406-4418. DOI: 10.4238/2014.June.11.4
- Jones E.S., Dupal M.P., Kölliker R., Drayton M.C., Forster J.W. Development and characterisation of simple sequence repeat (SSR) markers for perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 2001;102:405-415. DOI: 10.1007/s001220051661
- Kilchevsky A.V., Khotyleva L.V. (eds). Genetic foundations of plant breeding (Geneticheskiye osnovy selektsii rasteniy). Minsk: National Academy of Sciences of Belarus; 2012. [in Russian] [Генетические основы селекции растений / под ред. А.В. Кильчевского, Л.В. Хотылевой. Минск: Национальная академия наук Беларуси; 2012].
- Klimenko I.A., Kozlov N.N., Kostenko S.I., Shamustakimova A.O., Mavlyutov Y.M. Identification and certification of forage grasses (meadow clover, alfalfa, sowing and hop) based on DNA markers: guidelines. Lobnya: Federal Williams Research Center of Forage Production and Agroecology; 2020. [in Russian] [Клименко И.А., Козлов Н.Н., Костенко С.И., Шамустакимова А.О., Мавлютов Ю.М. Идентификация и паспортизация сортов кормовых трав (клевера лугового, люцерны изменчивой, посевной и хмелевидной) на основе ДНК-маркеров: методические рекомендации. Лобня: Федеральный научный центр кормопроизводства и агроэкологии им. В.Р. Вильямса; 2020]. DOI: 10.33814/978-5-6043194-9-9
- Klimenko I.A., Kozlov N.N., Shamustakimova A.O., Dushkin V.A. Investigation of forage crops genetic diversity using molecular DNA markers. *Adaptive Fodder Production*. 2019;(4):89-100. [in Russian] [Клименко И.А., Козлов Н.Н., Шамустакимова А.О., Душкин В.А. Адаптивное кормопроизводство. 2019;(4):89-100]. DOI: 10.33814/AFP-2222-5366-2019-4-89-100
- Kölliker R., Jones E.S., Jahufer M.Z.Z., Forster J.W. Bulk AFLP analysis for the assessment of genetic diversity in white clover (*Trifolium repens* L.). *Euphytica*. 2001;121(3):305-315. DOI: 10.1023/A:1012048103585
- Konarev A.V., Perchuk I.N. Protein markers are an effective tool for assessing the state of *in situ* and *ex situ* genetic diversity, seed quality, as well as supporting the breeding process in cereal grasses (Belkovye markery – effektivnyy instrument otsenki sostoyaniya *in-situ* i *ex-situ* geneticheskogo raznoobraziya, kachestva semenovodstva, a takzhe soprovozhdeniya selektsionnogo protsessu u zlakovykh trav). In: *The current state and prospects for development of meadow fodder production in the 21st century. Proceedings of the Scientific and Practical Conference (Sovremennoye sostoyaniye i perspektivy razvitiya lugovogo kormoproizvodstva v XXI veke. Materialy nauchno-prakticheskoy konferentsii)*. St. Petersburg: St. Petersburg State Agrarian University; 2018. p.57-65. [in Russian] [Конарев А.В., Перчук И.Н. Белковые маркеры – эффективный инструмент оценки состояния *in-situ* и *ex-situ* генетического разнообразия, качества семеноводства, а также сопровождения селекционного процесса у злаковых трав. Современное состояние и перспективы развития лугового кормопроизводства в XXI веке. Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный аграрный университет; 2018. С.57-65].
- Kosolapov V.M., Kostenko S.I., Pilipko S.V. Adaptive variety of food and herbs for extreme conditions of Russia. *Achievements of Science and Technology of AIC*. 2013a;(7):71-73. [in Russian] [Косолапов В.М., Костенко С.И., Пилипко С.В. Адаптивные сорта кормовых трав для экстремальных условий России. *Достижения науки и техники АПК*. 2013a;(7):71-73].
- Kosolapov V.M., Shamsutdinov Z.Sh., Kostenko S.I., Pilipko S.V., Tyurin Yu.S., Piskovatsky Yu.M., Novoselov M.Yu., Kozlov N.N., Perepravo N.I., Solozhentseva L.F., Stepanova G.V., Korovina V.L., Klochkova V.S., Drobysheva L.V., Zyatchina G.P., Piskovatskaya R.G., Starshinova O.A., Makaeva A.M., Shmatkova A.A., Volovik V.T., Sergeeva S.E., Zolotarev V.N., Shamsutdinova E.Z., Razgulyaeva N.V., Kostenko N.Yu., Putsa N.M., Korenev V.B., Ivanov I.S., Saprykina N.V., Truzina L.A., Chuykov V.A., Georgiadi N.I. Fodder crop cultivars bred at the Federal Williams Research Center of Forage Production and Agroecology (Sorta kormovykh kultur selektsii FGBNU "Federalny nauchnyy tsentr kormoproizvodstva i agroekologii imeni V.R. Vilyamsa"). Lobnya: Federal Williams Research Center of Forage Production and Agroecology; 2019. [in Russian] [Косолапов В.М., Шамсутдинов З.Ш., Костенко С.И., Пилипко С.В., Тюрин Ю.С., Писковацкий Ю.М., Новоселов М.Ю., Козлов Н.Н., Переправо Н.И., Соложенцева Л.Ф., Степанова Г.В., Коровина В.Л., Ключкова В.С., Дробышева Л.В., Зятчина Г.П., Писковацкая Р.Г., Старшинова О.А., Макаева А.М., Шматкова А.А., Воловик В.Т., Сергеева С.Е., Золотарев В.Н., Шамсутдинова Э.З., Разгуляева Н.В., Костенко Н.Ю., Пуца Н.М., Корнев В.Б., Иванов И.С., Сапрыкина Н.В., Трузина Л.А., Чуйков В.А., Георгиади Н.И. Сорта кормовых культур селекции ФГБНУ «Федеральный научный центр кормопроизводства и агроэкологии имени В.Р. Вильямса»: монография. Лобня: Федеральный научный центр кормопроизводства и агроэкологии им. В.Р. Вильямса; 2019]. URL: <https://www.vniikormov.ru/pdf/sorta-kormovykh-kultur-selektsii-vik.pdf> [дата обращения: 16.02.2023].
- Kosolapov V.M., Trofimov I.A., Trofimova L.S. Balanced development to forage production (Kormoproizvodstvu – sba-

- lansirovannoye razvitiye). *APK: Ekonomika, upravleniye = AIC: Economics, Management*. 2013b;(7):15-23. [in Russian] (Косолапов В.М., Трофимов И.А., Трофимова Л.С. Кормопроизводству – сбалансированное развитие. *АПК: Экономика, управление*. 2013b;(7):15-23).
- Kostenko S.I., Kosolapov V.M., Pilipko S.V., Kostenko E.S. Breeding perennial gramineous for adaptive forage production. *Fodder Production*. 2016;(8):35-39. [in Russian] (Костенко С.И., Косолапов В.М., Пилипко С.В., Костенко Е.С. Селекция многолетних злаковых трав для адаптивного кормопроизводства. *Кормопроизводство*. 2016;(8):35-39).
- Kubik C., Sawkins M., Meyer W.A., Gaut B.S. Genetic diversity in seven perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) cultivars based on SSR markers. *Crop Science*. 2001;41(5):1565-1572. DOI: 10.2135/cropsci2001.4151565x
- Lauvergeat V., Barre P., Bonnet M., Ghesquière M. Sixty simple sequence repeat markers for use in the *Festuca-Lolium* complex of grasses. *Molecular Ecology Notes*. 2005;5(2):401-405. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2005.00941.x
- Liu S., Feuerstein U., Luesink W., Schulze S., Asp T., Studer B. et al. DaRT, SNP, and SSR analyses of genetic diversity in *Lolium perenne* L. using bulk sampling. *BMC Genetics*. 2018;19(1):10. DOI: 10.1186/s12863-017-0589-0
- Loera-Sánchez M., Studer B., Kölliker R. DNA-based assessment of genetic diversity in grassland plant species: challenges, approaches, and applications. *Agronomy*. 2019;9(12):881. DOI: 10.3390/agronomy9120881
- Muyllé H., Baert J., Van Bockstaele E., Moerkerke B., Goetghebeur E., Roldán-Ruiz I. 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. *Euphytica*. 2005;143(1):135-144. DOI: 10.1007/s10681-005-3058-1
- Nie G., Huang T., Ma X., Huang L., Peng Y., Yan Y. et al. Genetic variability evaluation and cultivar identification of tetraploid annual ryegrass using SSR markers. *PeerJ*. 20019;7:e7742. DOI: 10.7717/peerj.7742
- Omasheva M.E., Aubakirova K.P., Ryabushkina N.A. Molecular markers. Causes and consequences of genotyping errors (Molekulyarnye markery. Prichiny i posledstviya oshibok genotipirovaniya). *Biotechnology. Theory and Practice*. 2013;(4):20-28. [in Russian] (Омашева М.Е., Аубакирова К.П., Рябушкина Н.А. Молекулярные маркеры. Причины и последствия ошибок генотипирования. *Биотехнология. Теория и практика*. 2013;(4):20-28). DOI: 10.11134/btp.4.2013.3
- Pasquali E., Palumbo F., Barcaccia G. Assessment of the genetic distinctiveness and uniformity of pre-basic seed stocks of Italian ryegrass varieties. *Genes*. 2022;13(11):2097. DOI: 10.3390/genes13112097
- Peakall R., Smouse P.E. GenA1Ex 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 2006;6(1):288-295. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x
- Perrier X., Jacquemoud-Collet J.P. DARwin software. Paris: CIRAD; 2006. Available from: <https://darwin.cirad.fr/> [accessed Mar. 02, 2023].
- Pirnajmedin F., Majidi M.M., Barre P., Kölliker R., Saeidi G. Enhanced polycross breeding of tall fescue through marker-based paternity identification and estimation of combining ability. *Euphytica*. 2020;216(9):139. DOI: 10.1007/s10681-020-02671-1
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000;155(2):945-959. DOI: 10.1093/genetics/155.2.945
- Safari H., Zebajadi A., Kahrizi D., Jafari A.A. The study of inter-specific relationships of Bromus genus based on SCoT and ISSR molecular markers. *Molecular Biology Reports*. 2019;46(5):5209-5223. DOI: 10.1007/s11033-019-04978-2
- State Register for Selection Achievements Admitted for Usage: [website]. [in Russian] (Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию: [сайт]). URL: <https://reestr.gossortrf.ru> [дата обращения 01.02.2023].
- Studer B., Asp T., Frei U., Hentrup S., Meally H., Guillard A., et al. Expressed sequence tag-derived microsatellite markers of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Molecular Breeding*. 2008;21:533-548. DOI: 10.1007/s11032-007-9148-0
- Sukhareva A.S., Kuluev B.R. DNA markers for genetic analysis of crops. *Biomics*. 2018;10(1):69-84. [in Russian] (Сухарева А.С., Кулуев Б.Р. ДНК-маркеры для генетического анализа сортов культурных растений. *Биомика*. 2018;10(1):69-84). DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-15
- Sweeney P.M., Danneberger T.K. Random amplified polymorphic DNA in perennial ryegrass: A comparison of bulk samples vs. individuals. *Horticultural Science*. 1994;29(6):624-626. DOI: 10.21273/HORTSCI.29.6.624
- Wang J., Dobrowolski M.P., Cogan N.O., Forster J.W., Smith K.F. Assignment of individual genotypes to specific forage cultivars of perennial ryegrass based on SSR markers. *Crop Science*. 2009;49(1):49-58. DOI: 10.2135/cropsci2008.03.0177
- Yan H., Zhang Y., Zeng B., Yin G., Zhang X., Ji Y. et al. Genetic diversity and association of EST-SSR and SCoT markers with rust traits in orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). *Molecules*. 2016;21(1):66. DOI: 10.3390/molecules21010066
- Zeng B., Zhang Y., Huang L.K., Jiang X.M., Luo D., Yin G. Genetic diversity of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) germplasms with resistance to rust diseases revealed by Start Codon Targeted (SCoT) markers. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2014;54(1):96-102. DOI: 10.1016/j.bse.2013.12.028

Информация об авторах

Юлиан Муратович Мавлютов, научный сотрудник, Федеральный научный центр кормопроизводства и агроэкологии им. В.Р. Вильямса, 141055 Россия, Московская область, Лобня, Научный городок, корпус 1, аспирант, Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, 127550 Россия, Москва, ул. Тимирязевская, 49, yulian92@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5695-6242>

Елена Александровна Вертикова, доктор сельскохозяйственных наук, доцент, профессор, Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, 127550 Россия, Москва, ул. Тимирязевская, 49, vertikova@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2457-7253>

Анастасия Олеговна Шамустакимова, научный сотрудник, Федеральный научный центр кормопроизводства и агроэкологии им. В.Р. Вильямса, 141055 Россия, Московская область, Лобня, Научный городок, корпус 1, nastja_sham@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3535-3108>

Ирина Александровна Клименко, кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник, заведующая лабораторией, Федеральный научный центр кормопроизводства и агроэкологии им. В.Р. Вильямса, 141055 Россия, Московская область, Лобня, Научный городок, корпус 1, iaklimenko@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1850-3859>

Information about authors

Yulian M. Mavlyutov, Researcher, Federal Williams Research Center of Forage Production and Agroecology, Bldg. 1, Scientific Campus, Lobnya, Moscow Province 141055, Russia, Postgraduate Student, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, 49 Timiryazevskaya St., Moscow 127550, Russia, yulian92@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5695-6242>

Elena A. Vertikova, Dr. Sci. (Agriculture), Associate Professor, Professor, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, 49 Timiryazevskaya St., Moscow 127550, Russia, vertikova@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2457-7253>

Anastasia O. Shamustakimova Researcher, Federal Williams Research Center of Forage Production and Agroecology, Bldg. 1, Scientific Campus, Lobnya, Moscow Province 141055, Russia, nastja_sham@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3535-3108>

Irina A. Klimenko, Cand. Sci. (Agriculture), Senior Researcher, Head of a Laboratory, Federal Williams Research Center of Forage Production and Agroecology, Bldg. 1, Scientific Campus, Lobnya, Moscow Province 141055, Russia, iaklimenko@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1850-3859>

Вклад авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Contribution of the authors: the authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests: the authors declare no conflicts of interests.

Статья поступила в редакцию 03.05.2023; одобрена после рецензирования 22.07.2023; принята к публикации 04.09.2023.
The article was submitted on 03.05.2023; approved after reviewing on 22.07.2023; accepted for publication on 04.09.2023.