

# Эффективность SSR- и PawS-маркеров для оценки генетического полиморфизма сортов клевера лугового (*Trifolium pratense* L.)

DOI: 10.30901/2227-8834-2020-3-100-109



УДК 57.577.21

Поступление/Received: 20.06.2020

Принято/Accepted: 21.09.2020

И. А. КЛИМЕНКО\*, С. И. КОСТЕНКО,  
Ю. М. МАВЛЮТОВ, А. О. ШАМУСТАКИМОВА

Efficiency of SSR and PawS markers for  
evaluation of genetic polymorphism among  
red clover (*Trifolium pratense* L.) cultivars

I. A. KLIMENKO\*, S. I. KOSTENKO,  
YU. M. MAVLYUTOV, A. O. SHAMUSTAKIMOVA

Федеральный научный центр кормопроизводства  
и агроэкологии имени В.Р. Вильямса,  
141055 Россия, Московская обл., г. Лобня,  
Научный городок, корп. 1  
\*✉ iaklimenko@mail.ru

Federal Williams Research Center of Forage Production  
and Agroecology,  
Bldg. 1, Scientific Campus, Lobnya,  
Moscow Province 141055, Russia  
\*✉ iaklimenko@mail.ru

**Актуальность.** Исследования по изучению генетической изменчивости, идентификации и паспортизации селекционных достижений актуальны в связи с сокращением сроков создания сортов и ежегодным ускоренным ростом их числа. С помощью методов на основе ДНК-маркеров разрабатывают генетический паспорт сорта, который может служить основанием для защиты авторских прав селекционеров, для контроля чистоты семенного материала. Представлены результаты исследований по оценке эффективности систем маркирования на основе SSR-локусов и PawS-маркеров для изучения ДНК-полиморфизма российских сортов клевера лугового с целью идентификации и последующей паспортизации. **Материалы и методы.** Геномную ДНК выделяли на основе SDS-метода с модификациями из 30 проростков от каждого сорта. Для ДНК-типирования использовали 9 SSR- и 4 PawS-маркера из семейства R173 ретротранспозонов. Анализ результатов проведен с помощью программ GelAnalyzer 2010a, MStools v.3, Statistica 7.0. **Результаты и заключение.** По результатам SSR-анализа выявлен невысокий средний уровень межсортового ДНК-полиморфизма клевера лугового – 38,6%. Обнаружены сортоспецифичные аллели для четырех образцов исследуемой выборки ('Трифон', 'Топаз', 'Трио', 'Марс') с использованием маркеров RCS1307 и RCS3095, которые могут служить для идентификации и разработки генетических паспортов. PawS-маркеры оказались неинформативны для анализа генетической изменчивости. Воспроизводимые продукты амплификации удалось получить лишь с комбинацией PawS5+PawS16, однако в ДНК-профилях не выявлено уникальных ампликонов для изучаемых сортов.

**Ключевые слова:** генетическое разнообразие, ДНК-полиморфизм, микросателлитные локусы, ретротранспозоны, молекулярно-генетическая паспортизация.

**Background.** Identification of crop varieties is presently one of the most important aspects due a significant annual increase in the number of newly developed cultivars. Application of molecular markers makes it possible to identify cultivars and secure protection of plant breeders' rights. Marker techniques based on SSR loci and PawS markers were evaluated for their efficiency in revealing the DNA polymorphism in Russian red clover cultivars, and the research results are presented in this publication. **Materials and methods.** The total genome DNA was extracted by a modified SDS method from 30 seedlings per each cultivar. Nine simple sequence repeats (SSR) and 4 PawS markers were used for genotyping. The basic genetic diversity parameters were measured and analyzed using the software resources GelAnalyzer 2010a, MStools v.3, and Statistica 7.0. **Results and conclusion.** The mean level of intervarietal DNA polymorphism in red clover was 38.6%. Cultivar-specific amplicons were obtained for 4 accessions (cvs. 'Trifon', 'Topaz', 'Trio' and 'Mars') with SSR loci RCS1307 and RCS3095. These loci were found appropriate for identification and certification of such cultivars. The tested PawS markers (individually and in combinations) proved non-informative for the analysis of intervarietal DNA polymorphism in red clover. The only primer pair PawS5+PawS16 generated reproducible PCR products, but unique amplicons were absent in the DNA profiles. The data obtained in this study may be helpful for further identification and certification of Russian red clover cultivars and promising breeding materials.

**Key words:** genetic diversity, DNA polymorphism, microsatellite loci, retrotransposons, molecular-genetic certification.

## Введение

Клевер луговой (*Trifolium pratense* L.) возделывается практически во всех регионах нашей страны и используется в сельскохозяйственном производстве не только в качестве источника высокоэнергетических белковых кормов для животных, но и как прекрасный предшественник пшеницы, льна, картофеля, ржи и других культур севооборота. Велика его роль в биологизации земледелия – в сохранении и повышении

плодородия почв за счет обогащения их симбиотическим азотом, защите от водной и ветровой эрозии (Novoselov, 2015). Определяющее значение в реализации потенциальных возможностей любой культуры принадлежит сорту. В последние годы проводится интенсивная селекционная работа по созданию новых высокопродуктивных сортов клевера лугового с использованием современных методов селекции и включением в селекционный процесс перспективных источников исходного материала. Только в Федеральном научном

центре кормопроизводства и агроэкологии имени В.Р. Вильямса (ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса») создано 14 сортов клевера лугового нового поколения, сочетающих хозяйственно ценные признаки с адаптивностью к конкретным условиям культивирования. Для повышения эффективности селекционного процесса, совершенствования системы идентификации и регистрации сортового материала и гарантированной защиты авторских прав необходима надежная система маркирования селекционных достижений. Наряду с традиционными методами, основанными на оценке морфологических и биохимических признаков, для этих целей все чаще используются молекулярные ДНК-маркеры. Они позволяют проводить идентификацию генотипов, сортов, форм и гибридов независимо от внешних условий, выявлять скрытую изменчивость, повышая тем самым разрешающую способность и точность анализа, могут применяться на любых стадиях развития растений, начиная с семян (Korir et al., 2012).

ДНК-маркеры для определения сортовой принадлежности должны быть высокополиморфными, удобными для практического использования, воспроизводимыми по результатам и наследуемыми в поколениях (Schulman, 2007; Khlestkina, 2013). Этим требованиям в полной мере отвечают микросателлиты, или SSR-маркеры (simple sequence repeat) – простые, повторяющиеся последовательности ДНК, полиморфизм которых основан на варьировании длины повтора, что в свою очередь обусловлено различиями в числе единиц повтора (Tautz, Renz, 1984; Khlestkina, 2011). Микросателлиты характеризуются высоким полиморфизмом, кодоминантным типом наследования, информативностью и воспроизводимостью результатов анализа (Khavkin, 2003; Ramazanova et al., 2008). Благодаря этим свойствам, они широко используются для оценки генетического разнообразия растений на межвидовом и внутривидовом уровне, для молекулярно-генетической характеристики генотипов природных популяций и образцов в составе мировых коллекций (Boropnikova, 2009; Karim et al., 2009; Liu et al., 2018).

Для клевера лугового исследований подобного рода с использованием SSR-маркеров на сегодняшний день известно немного. В частности, группой бразильских ученых на основе 14 микросателлитных локусов проведена оценка генетического разнообразия 58 образцов клевера из коллекции NPGS-USDA, объединяющей генплазму (сорта и популяции) наиболее важных сельскохозяйственных растений из 35 стран мира (Dias et al., 2008). Исследователи из Латвии использовали набор из 6 микросателлитных локусов для дифференциации 7 местных диплоидных сортов клевера лугового (Berzina et al., 2008). Ю. Дугарь и В. Попов с помощью SSR-маркеров выявляли ДНК-полиморфизм между сортами украинской селекции (Dugar, Porov, 2013). Исследовательские группы из Индии и Сербии на основе SSR-маркеров изучали генетическую изменчивость образцов клевера лугового из коллекций разных стран мира (Gupta et al., 2016; Radinovic et al., 2017). В России исследования по изучению ДНК-полиморфизма клевера лугового на основе SSR-маркеров для идентификации и генетической паспортизации селекционных достижений только начинают появляться (Klimenko, Kozlov, 2018; Klimenko et al., 2019).

При несомненных достоинствах микросателлитов их использованием не всегда удается обнаружить

внутрисортовую и межсортовую гетерогенность изучаемого материала, поскольку одна пара праймеров для фланкирующих областей в ПЦР позволяет рассматривать полиморфизм только одного локуса. Возникают сложности при изучении варибельности последовательностей, которые в геноме растений не являются кодирующими, но обладают высокой степенью полиморфизма. Некоторые исследователи предлагают в таких случаях использовать новый тип маркеров на основе фрагментов амплификации геномной ДНК между близко расположенными последовательностями ретротранспозонов (Kumar, Bennetzen, 1999; Gao et al., 2012). Ретротранспозоны равномерно распределены по всему геному и не объединены в тандемные повторы, что делает их более удобными для генотипирования. Впервые семейство ретротранспозонов, получившее название R173, описано у ржи и включает около 15 тысяч копий на диплоидный геном (Rogowsky et al., 1992). Позднее было установлено, что умеренно повторяющиеся последовательности из семейства R173 в большом количестве имеются у других видов растений. Для исследования этих участков генома создана система PwS-маркеров, которая в последние годы успешно применяется при изучении ДНК-полиморфизма видов и сортов многих хозяйственно ценных растений, в том числе пшеницы, ячменя, картофеля, риса, свеклы и др. (Zaytsev, Khavkin, 2001; Brik et al., 2006; Glazko et al., 2012; Fedulova, Fedorin, 2014). Эта техника считается достаточно воспроизводимой, так как PwS-маркеры имеют относительно большой размер (18 и более пар нуклеотидов), а праймеры для их амплификации – высокую температуру отжига (в пределах +40...+55°C), и позволяет различать близкородственные сорта, а также сорта-двойники (Kumar, 2001; Tam et al., 2005). В доступных источниках литературы нет сведений об использовании этого типа маркеров для молекулярно-генетического анализа клевера лугового. На сегодняшний день не разработана универсальная технология генотипирования с учетом особенностей этой важной кормовой культуры, не определен оптимальный набор ДНК-маркеров для выявления сортоспецифичных характеристик селекционного материала.

В связи с этим, *цель настоящих исследований* состояла в оценке эффективности систем маркирования на основе SSR-локусов и PwS-маркеров для изучения ДНК-полиморфизма отечественных сортов клевера лугового и возможности определения ДНК-маркеров для идентификации и генетической паспортизации.

## Материалы и методы

### *Растительный материал и выделение ДНК*

Семена сортов для молекулярно-генетического анализа получены из коллекции генофонда кормовых культур ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса». Выборка включала сорта клевера лугового разного уровня плоидности, наиболее востребованные для посевов в Центральном и Северо-Западном регионах РФ (табл. 1).

Геномную ДНК выделяли с использованием модифицированного SDS-метода (Dellaporta et al., 1983) из 7-дневных проростков семян, по 30 штук от каждого сорта. Качество и количественный выход ДНК проверяли методом электрофореза в 1,5% агарозном геле и измерением концентрации на спектрофотометре Nabi (MicroDigital, Корея).

**Таблица 1.** Перечень сортов клевера лугового (*Trifolium pratense* L.), используемых для оценки ДНК-полиморфизма**Table 1.** Red clover (*Trifolium pratense* L.) cultivars for DNA-polymorphism evaluation

Номер образца / Accession No.	Название сорта / Cultivar name	Дата внесения в Госреестр, происхождение / Date of listing in the State Register, originator	Уровень плоидности / Ploidy level
1	Ранний 2	1995 г., ФНЦ «ВИК им В.Р. Вильямса»	2n
2	Марс	1993 г., ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса» совместно с Институтом селекции кормовых культур (Мальхов, Германия)	4n
3	ВИК 77	2006 г., ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса»	2n
4	Топаз	2000 г., ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса»	2n
5	Трифон	2014 г., НИИСХ Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого	2n
6	Трио	1995 г., ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса» совместно с НИИСХ Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого	2n
7	Метеор	2007 г., ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса» совместно с СибНИИ кормов	4n

**SSR-анализ**

Для ДНК-типирования использовали маркеры, разработанные для клевера лугового на основе экспрессирующихся последовательностей (Expressed Sequence Tag, EST) (Sato et al., 2005) и представленные в базе данных Red Clover Marker Database (Kazusa, Japan). Реакционная смесь для ПЦР объемом 20 мкл содержала: 2 мкл 10× Tag Turbo буфера; 0,5 мкл раствора дезоксинуклеотидов (50× раствора по 10 мМ каждого); 0,2 мкл Taq ДНК-полимеразы (5 ед/мкл); 1 мкл каждого праймера (5 мМ); 20 нг/мкл геномной ДНК исследуемого объекта.

Аmplification выполнялась в термоциклере Bio-Rad iCycler (США) по программе Touch-down ПЦР (Don et al., 1991) с некоторыми модификациями и состояла из предварительной денатурации при 94°C в течение 3 мин и последующих чередований температурно-временных параметров со снижающейся на 2°C температурой отжига праймеров через каждые 3 цикла: 94°C – 30 с, 68°C – 30 с (3 цикла); 94°C – 30 с, 66°C – 30 с (3 цикла); 94°C – 30 с, 64°C – 30 с (3 цикла). В следующие циклы программы был включен дополнительный этап элонгации цепи: 94°C – 30 с, 62°C – 30 с и 72°C – 30 с (3 цикла); 94°C – 30 с, 60°C – 30 с и 72°C – 30 с (3 цикла); 94°C – 30 с, 58°C – 30 с и 72°C – 30 с (3 цикла). Затем температура гибридизации праймеров снижалась до 55°C и сохранялась на этом значении оставшиеся 30 циклов реакции: 94°C – 30 с, 55°C – 30 с и 72°C – 30 с. Заключительный этап элонгации цепи проходил при 72°C в течение 10 мин.

Продукты амплификации разделяли путем электрофореза (предварительное тестирование – в 1,6-процентном геле с использованием агарозы типа LE2 (Lonza, США) в 0,5× TAE буфере в присутствии бромистого этидия; с информативными маркерами – в 4-процентном геле на основе высоко разрешающей агарозы MetaPhor<sup>®</sup> Agarose (США). В качестве маркеров-стандартов использовали 20 bp DNA Ladder (Takara BIO Inc., Japan)

и 50+bp DNA Ladder («Евроген», Россия). Результаты документировали с помощью системы microDOC (Clever Scientific, UK), воспроизводимость проверяли проведением экспериментов в 2–3-кратной повторности. Верификация результатов SSR-анализа осуществлялась путем выборочного клонирования ПЦР-продуктов в pAL2-T вектор и секвенирования на автоматическом анализаторе («Евроген», Россия).

**ПЦР-анализ на основе Paws-маркеров**

PawS-маркеры из семейства ретротранспозонов (Rogowsky et al., 1992; Biryukova, 2006) использовали для ДНК-типирования по одному на реакцию и в парных комбинациях. Условия ПЦР с одиночными праймерами соответствовали предложенным Р. М. Rogowsky et al. (1992). При использовании парных комбинаций температуру отжига подбирали, ориентируясь на праймер с более низкими значениями этого показателя (табл. 3).

Детектировали фрагменты амплифицированной ДНК с помощью электрофореза в 1,6-процентном геле на основе агарозы типа LE2. Для определения размера продуктов амплификации применяли стандарт молекулярного веса 100 bp+1,5 kb DNA Ladder (ООО «СибЭнзим», Россия).

**Анализ данных**

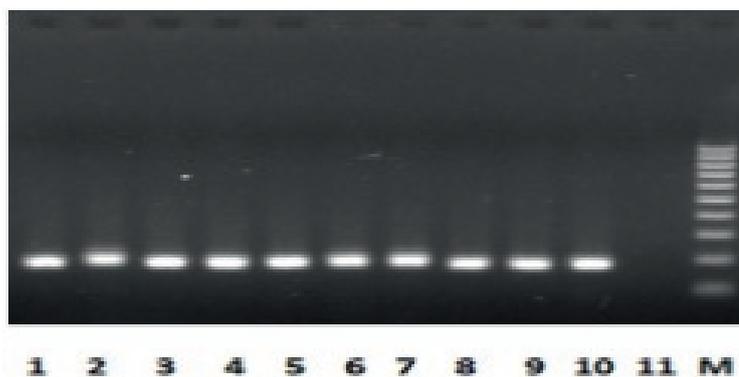
Полученные данные анализировали при помощи пакета программ GelAnalyzer 2010a (Lazar et al., 2010). Показатели генетического разнообразия рассчитывали с помощью программы Microsatellite toolkit (MStools v.3) (Park, 2001). Уровень полиморфизма микросателлитных локусов определяли по соотношению числа полиморфных ампликонов к общему количеству полученных фрагментов амплификации. Расчет генетических расстояний и кластеризацию экспериментального материала выполняли методом невзвешенно-

го парно-группового кластерного анализа с арифметическим усреднением (UPGMA) (Sokal, Michener, 1958) с использованием программы Statistica 7.0. В процессе работы пользовались информацией по SSR-маркерам из международной базы данных Red Clover Marker Database (Kazusa, Japan).

### Результаты и обсуждение

Большинство сортов клевера лугового, относящегося к перекрестноопыляемым культурам, состоит из гетерогенных биотипов с высоким уровнем вариабельности. Для предварительной оценки межсортовых различий и достоверной статистической обработки такого материала необходима достаточно большая выборка – объемом 30–50 семян от сорта. Однако на практике масштабное генотипирование требует значительных затрат труда, времени и финансовых средств. Эффективным подходом в этом случае является применение «балк-анализа» (bulk analysis) – метода, при котором для изучения генетического разнообразия используется общая навеска растительной ткани из отдельных образцов в составе большого пула (Kölliker et al., 2001; Herrmann et al., 2005). В базовый SDS-метод, использованный для ДНК-экстракции, были внесены некоторые изменения. В частности, лизирующий буфер готовили из расчета на индивидуальный вес 30 проростков от каждого сорта, уменьшали количество РНКазы за счет большей продолжительности времени инкубации образца с ферментом в термостате, не использовали ток-

материала. По мнению других авторов (Michelmore et al., 1991), общая ДНК-проба должна аккумулировать в себе специфические маркеры, характерные для всей популяции или сорта, и может успешно применяться при изучении генетической изменчивости. Для получения большего объема информации мы провели предварительный анализ внутрисортной изменчивости на трех сортах ('Марс', 'Ранний 2' и 'Трифон'), используя в ПЦР образцы ДНК, выделенные из отдельных проростков каждого сорта (по 10 генотипов). По результатам нашей работы не выявлено существенного внутрисортного ДНК-полиморфизма при использовании 5 SSR-маркеров. Незначительные различия в размере фрагментов ДНК обнаружены в сортах 'Марс' и 'Ранний 2' при амплификации с праймером RCS1307, а также между генотипами сорта 'Трифон' с праймером RCS4280 (диапазон размеров, полученных ампликонов – 111–114 пн) (рис. 1). Эти данные позволяют прийти к заключению о выравнивании генотипов в составе анализируемых сортов и обоснованности использования «балк-стратегии» в настоящем исследовании. В источниках литературы и ранее встречались сведения о невысоком уровне генетической изменчивости клевера лугового, выявленном с использованием разных типов молекулярных маркеров (Kongkiatngam et al., 1995; Kölliker et al., 2003). Однако большинство исследователей отмечают значительную вариабельность, причем более высокую внутри сортов и популяций, чем на межпопуляционном уровне (Dias et al., 2008; Gupta et al., 2016).



**Рис. 1.** Продукты амплификации с праймером RCS1307 генотипов сорта клевера лугового Трифон (анализ внутрисортного ДНК-полиморфизма):

1–10 – индивидуальные генотипы; М – маркер молекулярной массы; 11 – контроль ( $H_2O$ ); (LE2 агарозный гель)

**Fig. 1.** Amplification products with the primer RCS1307 in individual genotypes of the red clover cultivar Trifon (intravarietal DNA polymorphism analysis):

1–10 – individual genotypes; M – molecular weight marker; 11 – control ( $H_2O$ ); (LE2 agarose gel)

сичный фенол в процедурах по осаждению и очистке. В результате на основе модифицированного SDS-метода были получены ДНК-пробы хорошего качества для ПЦР-анализа.

На текущий момент, к сожалению, нет единого мнения о приемлемости использования «балк-образцов» при оценке филогенетических отношений между популяциями и сортами. Некоторые исследователи считают, что при таком подходе часть редких аллелей, присущих индивидуальным генотипам в составе суммарной ДНК-пробы, неизбежно выпадает из анализа и статистической обработки (Gilbert et al., 1999; Kölliker et al., 2001), и полученные результаты не будут отражать весь спектр генетического разнообразия исследуемого

При ПЦР-анализе балк-образцов ДНК изучаемых сортов с большей частью праймеров получены фрагменты амплифицированной ДНК, в общей сложности – 119, в среднем – по 16 на сорт и 14 на комбинацию праймеров. Размер ампликонов варьировал в диапазоне от 110 до 300 пар нуклеотидов. Полиморфных фрагментов выявлено 46, рассчитанный средний уровень межсортового полиморфизма составил 38,6%, что свидетельствует о невысокой генетической изменчивости в пределах изучаемой выборки. Для статистической обработки отбирали наиболее отчетливые и воспроизводимые ампликоны. Показатели, характеризующие генетическое разнообразие изучаемого материала, представлены в таблице 2.

**Таблица 2.** Характеристика микросателлитных (SSR) локусов, использованных для анализа сортов клевера лугового

**Table 2.** Characteristics of the microsatellite (SSR) loci used for the analysis of red clover cultivars

Маркер / Marker	Группа сцепления / Linkage group	Мотив / Motif	Число аллелей / Allele number	Размер фрагментов (пн) / Fragment size (bp)	Частота встречаемости аллеля / Allele frequency	He	PIC
RCS4280	LG1	(GGA) <sub>18</sub>	5	111-124	0,4	0,73	0,62
RCS3186	LG2	(AAAT) <sub>12</sub>	5	248-257	0,3	0,83	0,74
RCS3095	LG2	(AAAT) <sub>28</sub>	9	207-224	0,2	0,92	0,84
RCS2183	LG3	(AGC) <sub>18</sub>	5	174-183	0,4	0,79	0,70
RCS1307	LG4	(GGGA) <sub>22</sub>	4	140-159	0,4	0,75	0,64
RCS0131	LG5	(AAC) <sub>16</sub>	5	213-217	0,3	0,84	0,74
RCS3711	LG6	(AAG) <sub>18</sub>	5	147-153	0,3	0,84	0,74
RCS1640	LG7	(GGGA) <sub>22</sub>	7	120-144	0,2	0,90	0,82
RCS0033	LG3	(AAT) <sub>39</sub>	1	182	0,1	0,0	0,0

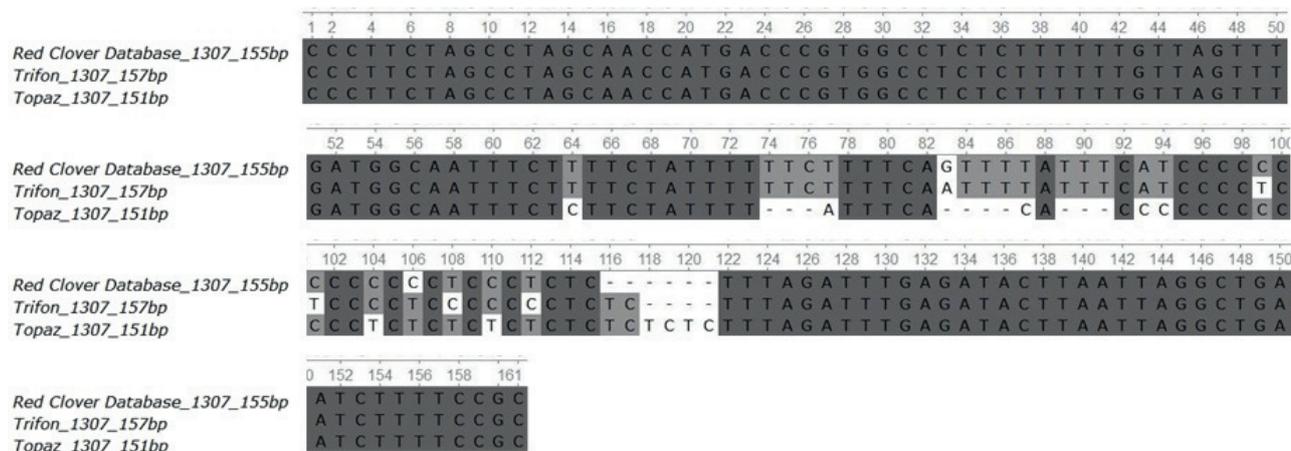
Примечание: PIC – polymorphism information content (индекс информативности маркера); He – expected heterozygosities (ожидаемая гетерозиготность), пн – bp (пары нуклеотидов)

В среднем на локус получено 5 аллелей, что существенно ниже, чем в работах других авторов, выявивших в популяциях клевера лугового в среднем до 9 аллелей на локус (Dias et al., 2008; Dugar, Porov, 2013). Индекс информативности (PIC), отражающий способность специфического маркера обнаруживать полиморфизм в изучаемых образцах (Gilbert et al., 1999), был довольно высоким для используемого набора (от 0,62 до 0,84), за исключением RCS0033. Значения этого показателя в среднем соответствовали диапазону, определенному в работах других исследователей. Так, Sato et al. (2005) показали, что уровень PIC для тех же локусов на картируемых популяциях клевера лугового менялся от 0,54 до 0,83 со средним значением 0,60; в работе Dias et al. (2008) – 0,64–0,85. Чешские исследователи (Vymyslicky

et al., 2012) при оценке образцов из коллекции клевера лугового определили, что значения индекса информативности для 11 SSR-маркеров составляли 0,40–0,86.

Маркеры RCS3095 и RCS1307 оказались наиболее информативными для выявления ДНК-полиморфизма между анализируемыми сортами. Получены уникальные фрагменты амплификации для сортов ‘Трион’ (207 пн) и ‘Марс’ (212 и 224 пн) с маркером RCS3095, а также для сортов ‘Трифон’ (158 пн) и ‘Топаз’ (151 пн) с RCS1307. Для подтверждения результатов SSR-анализа и определения точного размера целевого фрагмента проведено выборочное клонирование ПЦР-продуктов в rAL2-T вектор и секвенирование (рис. 2).

Сопоставимость отсеквенированных последовательностей с имеющимися в базе данных валидирует ре-



**Рис. 2.** Сравнительный анализ последовательностей нуклеотидов SSR-маркера RCS1307 (сорта Трифон, Топаз) и последовательностей этого маркера из базы данных Red Clover Marker Database

**Fig. 2.** Comparison among the studied SSR sequences of the SSR marker RSC1307 (cvs. Trifon and Topaz) and sequences from the Red Clover Marker Database

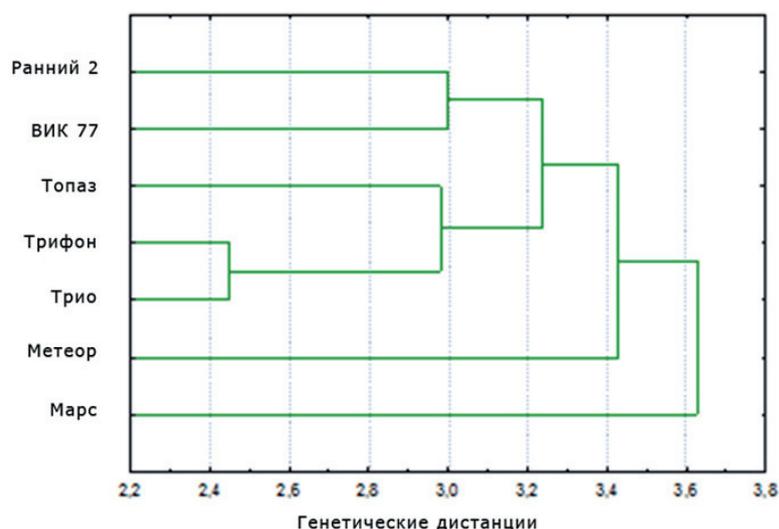
зультаты анализа и позволяет заключить, что SSR-маркеры RCS3095 и RCS1307 можно использовать в качестве идентификационных для ряда отечественных сортов клевера лугового.

На основе результатов микросателлитного анализа была составлена матрица бинарных признаков, в которой наличие или отсутствие в электрофоретических профилях одинаковых по размеру ампликонов рассматривалось как состояние 1 и 0 соответственно. Проведена кластеризация и построена дендрограмма генетической гетерогенности исследуемых сортов (UPGMA, Statistica 7.0), согласно которой они группируются по трем кластерам (рис. 3). Наибольшим генетическим сходством обладают сорта 'Трифон' и 'Трио', а также 'Ранний 2' и 'ВИК 77'. Генетическая дистанция в первом случае равна 2,42, во втором – 3,0. В отдельную ветвь выделились тетраплоидные сорта 'Метеор' и 'Марс' с самыми дальними дистанциями – 3,42 и 3,62 соответственно, что указывает на их генетическую обособленность в анализируемом материале. Сорт 'Топаз' имеет большее генетическое

сходство с сортами 'Трио' и 'Трифон', чем с остальными сортами из выборки; генетическая дистанция – 2,88.

Кластерный анализ выявил определенную зависимость генетических особенностей изучаемых сортов от уровня пloidности или происхождения: у сортов 'Трифон' и 'Трио' – общий оригинатор (НИИСХ Северо-Востока, г. Киров), а сорта 'Марс' и 'Метеор' – тетраплоиды. Однако на данном этапе можно вынести лишь предварительное суждение по генетической гетерогенности исследуемого материала – более точная характеристика не может быть представлена вследствие ограниченного набора испытанных SSR-маркеров.

В ходе исследований попытались изучить возможности группы ДНК-маркеров на основе умеренно повторяющихся последовательностей из семейства R173 для выявления ДНК-полиморфизма между сортами клевера лугового. Разработанные этим участком генома праймеры использовали по одному на реакцию и в парных комбинациях (см. табл. 3). С одиночными Paws-праймерами не получили продуктов амплификации.



**Рис. 3.** Дендрограмма кластеризации сортов клевера лугового, построенная на основе микросателлитного анализа (UPGMA, Statistica 7.0)

**Fig. 3.** The dendrogram of red clover cultivars based on microsatellite analysis (UPGMA, Statistica 7.0)

**Таблица 3.** Paws-маркеры, используемые для анализа сортов клевера лугового

**Table 3.** Paws markers used for the analysis of red clover cultivars

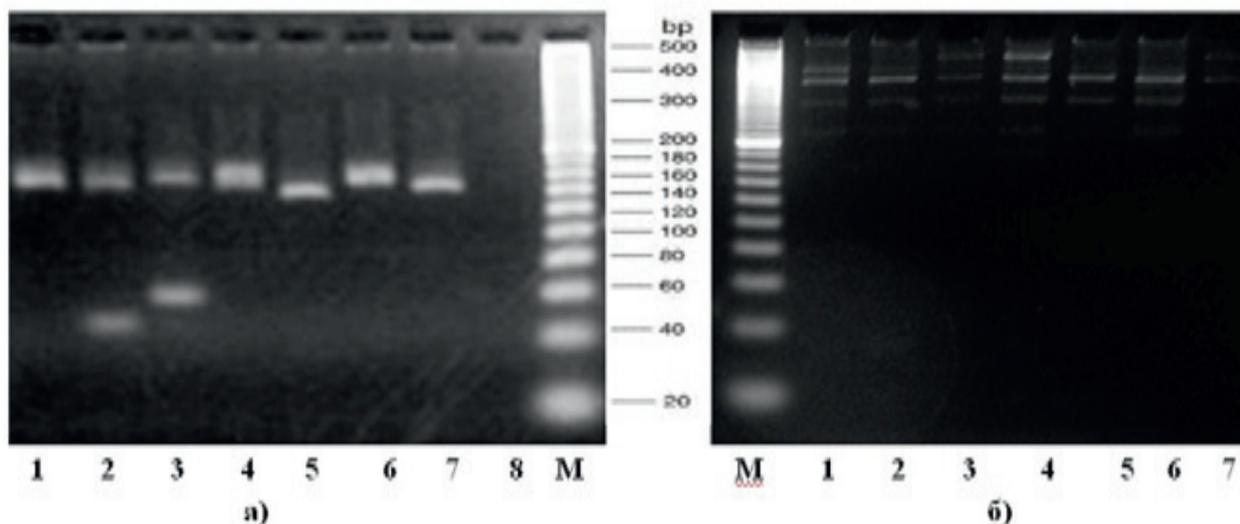
Праймер / температура отжига Primer / annealing temperature	Последовательность нуклеотидов / Sequence	Комбинации праймеров / Primer pairs	Сорт, ампликоны (пн) / Cultivar, amplicons (bp)
PawS16 / 55°C	AACGAGGGGTTCGAGGCC	–	–
PawS6 / 45°C	GAGTGTCAAACCCAACGA	PawS6+PawS5 PawS6+PawS11	– –
PawS11 / 36°C	GAATTCTTGGAAAATGTA	PawS11+PawS5 PawS11+PawS6	– –
PawS5 / 56°C	ACCTCTGCGCTTGAGGC	PawS5+PawS16	Ранний 2: 479; 377; 357; 283 Марс: 479; 283; 350 ВИК 77: 283; 350; 485 Топаз: 226; 293; 350 Трифон: 357; 485 Трио: 485 Метеор: 479

Использование Paws6, Paws11 и Paws16 в сочетаниях также не привело к положительным результатам.

Эффективность Paws5 проверили во всех возможных комбинациях, так как ряд исследователей сообщают о его высокой активности как ретроэлемента, с помощью которого можно надежно дифференцировать сорта различных видов сельскохозяйственных культур (Glazko et al., 2012; Fedulova, Fedorin, 2014; Bezlepina et al., 2019). Однако лишь с использованием комбинации Paws5+Paws16 удалось получить воспроизводимые ПЦР-продукты для анализируемых сортов – в общей сложности 20 ампликонов. При этом сортоспецифичных фрагментов амплификации не выявлено (рис. 4).

исхождения сортового материала. Исследования следует продолжить с расширенным набором праймеров для анализа или использовать более информативную систему маркирования.

Методика на основе Paws-маркеров проста в исполнении и доступна по стоимости, но неэффективна для оценки генетической изменчивости в сортах клевера лугового. С использованием одиночных праймеров, разработанных для анализа полиморфизма умеренных повторов, а также их комбинаций, продуктов амплификации не получено, за исключением Paws5 (в комбинации с Paws16), что, вероятно, обусловлено его высокой активностью.



**Рис. 4. Электрофореграммы продуктов амплификации с различными типами праймеров:**  
**а) с праймером RCS1307.** М – маркер молекулярной массы; 1 – 7 сорта: Марс, Ранний 2, Метеор, Топаз, Трифон, Трио, ВИК77; 8 – отрицательный контроль;  
**б) с комбинацией Paws5+Paws16.** М – маркер молекулярной массы; 1 – 7 сорта: Ранний 2, Марс, ВИК 77, Топаз, Трифон, Трио, Метеор

**Fig. 4. Electrophoregrams of PCR products with different types of primers:**  
**a) primer RCS1307.** M – marker fragment length standard;

1 – 7 cultivars: Mars, Ranniy 2, Meteor, Topaz, Trifon, Trio, VIK 77; 8 – negative control;

**b) combination Paws5+Paws16.** M – marker fragment length standard; 1 – 7 cultivars: Ranniy 2, Mars, VIK77, Topaz, Trifon, Trio, Meteor

### Заключение

Таким образом, проведенные исследования показали, что система SSR-маркирования является достаточно удобной и относительно недорогой техникой при использовании уже разработанных маркеров из доступных баз данных и вполне приемлема для анализа кормовых культур. Существенно снизить трудоемкость, временные затраты и стоимость работ по изучению межсортового ДНК-полиморфизма позволяет применение «балк-стратегии» при формировании выборки генотипов от сорта для выделения ДНК.

SSR-маркеры RCS1307 и RCS3095 выявляют уникальные аллели в сортах российской селекции ‘Трио’, ‘Марс’, ‘Трифон’, ‘Топаз’ и могут использоваться для их идентификации и генетической паспортизации.

В целом для всей выборки выявлен невысокий уровень ДНК-полиморфизма (38,6%). Одной из причин может быть высокая степень гомологии в исследуемых участках генома вследствие близкородственного про-

Полученные данные могут быть использованы при разработке универсальной технологии генотипирования для клевера лугового с целью идентификации и генетической паспортизации существующих и вновь создаваемых сортов.

*Работа выполнена в рамках проекта Министерства науки и высшего образования № 0442-2019-0001 по теме «Разработка адаптированных методов молекулярно-генетического анализа культурных видов и форм кормовых растений для интенсификации селекционного процесса».*

*The research was performed within the framework of the Project No. 0442-2019-0001 “Development of adapted methods for molecular genetic analysis of cultivated forage crop species and forms aimed breeding process intensification”, funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.*

## References/Литература

- Berzina I., Zhuk A., Veinberga I., Rasha I., Rungis D.D. Genetic fingerprinting of Latvian red clover (*Trifolium pratense* L.) varieties using simple sequence repeat (SSR) markers: comparisons over time and space. *Latvian Journal of Agronomy*. 2008;11:28-32.
- Bezlepkina E.V., Guliaeva A.A., Galkova A.A. The PawS5 retrotransposon based genotyping of apricot (*Prunus armenica* L.) varieties from collection of the Russian Research Institute of Fruit Crop Breeding (VNIISPK) *Contemporary Horticulture*. 2019;3:9-15. [in Russian] (Безлепкина Е.В., Гуляева А.А., Галькова А.А. Применение ретротранспозона PawS5 в качестве ДНК-маркера при генотипировании сортообразцов абрикоса обыкновенного (*Prunus armenica* L.) из коллекции ВНИИСПК. *Современное садоводство*. 2019;3:9-15). DOI: 10.24411/2312-6701-2019-10302
- Biryukova V.A. Assessment of the genetic diversity of potato varieties and related *Solanum* species by analyzing moderately repetitive genome sequences (Otsenka geneticheskogo raznoobraziya sortov kartofelya i rodstvennykh vidov *Solanum* metodom analiza umerenno povtoryayushchikhsya posledovatel'nostey genoma) [dissertation]. Moscow; 2002. [in Russian] (Бирюкова В.А. Оценка генетического разнообразия сортов картофеля и родственных видов *Solanum* методом анализа умеренно повторяющихся последовательностей генома: дис. ... канд. биол. наук. Москва; 2006).
- Boronnikova S.V. Molecular marking and genetic certification resource and rare species of plants for the purpose of optimization of preservation of their genofunds. *Agrarian Bulletin of the Urals*. 2009;2(56):57-59. [in Russian] (Боронникова С.В. Молекулярное маркирование и генетическая паспортизация ресурсных и редких видов растений с целью оптимизации сохранения их генофондов. *Аграрный вестник Урала*. 2009;2(56):57-59).
- Brik A.F., Kalendar R.N., Stratula O.P., Sivolap Yu.M. IRAP and REMAP analysis barley varieties from Odessa collection (IRAP- i REMAP-analiz sortov yachmenya Odesskoy selektsii). *Cytology and Genetics*. 2006;3:24-33. [in Russian] (Брик А.Ф., Календарь Р.Н., Стратула О.П., Сиволап Ю.М. IRAP- и REMAP-анализ сортов ячменя Одесской селекции. *Цитология и генетика*. 2006;3:24-33).
- Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1983;1(4):19-21. DOI: 10.1007/BF02712670
- Dias P.M.B., Julier B., Sampoux J.P., Barre P., Dall'Agnol M. Genetic diversity in red clover (*Trifolium pratense* L.) revealed by morphological and microsatellite (SSR) markers. *Euphytica*. 2008;160(2):189-205. DOI: 10.1007/s10681-007-9534-z
- Don R.H., Cox P.T., Wainwright B.J., Baker K., Mattick J.S. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research*. 1991;19(14):4008. DOI: 10.1093/nar/19.14.4008
- Dugar Y.N., Popov V.N. Genetic structure and diversity of Ukrainian red clover cultivars revealed by microsatellite markers. *Open Journal of Genetics*. 2013;3:235-242. DOI: 10.4236/ojgen.2013.34026
- Fedulova T.P., Fedorin D.N. Genetic diversity analysis sort type root beet (*Beta vulgaris* L.) based on DNA-marker. *Auditorium: Electronic Scientific Journal of Kursk State University*. 2014;4(4). [in Russian] (Федулова Т.П., Федорин Д.Н. Анализ генетического разнообразия сортотипов корнеплодной свеклы (*Beta vulgaris* L.) на основе ДНК-маркеров. *Auditorium электронный научный журнал Курского государственного университета*. 2014;4(4). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/analiz-geneticheskogo-raznoobraziya-sortotipov-korneplodnoy-svekly-beta-vulgaris-l-na-osnove-dnk-markerov> [дата обращения: 10.06.2020].
- Gao D., Chen J., Chen M., Meyers B.C., Jackson S. A highly conserved, small LTR retrotransposon that preferentially targets genes in grass genomes. *PLoS ONE*. 2012;7(2):e32010. DOI: 10.1371/journal.pone.0032010
- Gilbert J.E., Lewis R.V., Wilkinson M.J., Caligari P.D.S. Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections. *Theoretical and Applied Genetics*. 1999;98(6-7):1125-1131. DOI: 10.1007/s001220051176
- Glazko V.I., El'kina M.A., Glazko T.T. Homologous nucleotide sequences of the flank of retrotransposon PawS5 of R173 family in animal and plant genomes. *Agricultural Biology*. 2012;4:36-41. [in Russian] (Глазко В.И., Елькина М.А., Глазко Т.Т. Гомологичные нуклеотидные последовательности фланга ретротранспозона PawS5 из семейства R173 в геномах животных и растений. *Сельскохозяйственная биология*. 2012;4:36-41). DOI: 10.15389/agrobiology.2012.4.36rus
- Gupta M., Sharma V., Singh S.K., Chahota R.K., Sharma T.R. Analysis of genetic diversity and structure in a genebank collection of red clover (*Trifolium pratense* L.) using SSR markers. *Plant Genetic Resources*. 2016;15(4):376-379. DOI: 10.1017/S1479262116000034
- Herrmann D., Boller B., Widmer F., Kölliker R. Optimization of bulked AFLP analysis and its application for exploring diversity of natural and cultivated populations of red clover. *Genome*. 2005;48(3):474-486. DOI: 10.1139/g05-011
- Karim K., Rawda A., Hatem C.M. Genetic diversity in local Tunisian barley based on RAPD and SSR analysis. *Biological Diversity and Conservation*. 2009;2(1):27-35.
- Khavkin E.E. Plant molecular breeding: DNA technologies of creating new crop varieties. *Agricultural Biology*. 2003;38(3):26-41. [in Russian] (Хавкин Э.Е. Молекулярная селекция растений: ДНК-технологии создания новых сортов сельскохозяйственных культур. *Сельскохозяйственная биология*. 2003;38(3):26-41).
- Khlestkina E.K. Molecular markers in genetic studies and breeding. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2013;17(4/2):1044-1054. [in Russian] (Хлесткина Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013;17(4/2):1044-1054).
- Khlestkina E.K. Molecular methods of the analysis of the structural and functional organization of genes and genomes in higher plants. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2011;15(4):757-768. [in Russian] (Хлесткина Е.К. Молекулярные методы анализа структурно-функциональной организации генов и геномов высших растений. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2011;15(4):757-768).
- Klimenko I.A., Kozlov N.N. Assessment of red clover breeding samples on the base of microsatellite analysis. In: *Multifunctional adaptive fodder production: Collection of scientific papers. Issue 19(67). (Mnogofunktsionalnoye adaptivnoye kormoproizvodstvo: sbornik nauchnykh trudov. Vypusk 19(67))*. Moscow; 2018. [in Russian] (Клименко И.А., Козлов Н.Н. Оценка сортообразцов клевера лугового на основе микросателлитного анализа. В кн.: *Многофункциональное адаптивное кормо-*

производство: сборник научных трудов. Выпуск 19(67). Москва; 2018).

- Klimenko I.A., Shamustakimova A.O., Kapustina N.V., Makarenkov M.A. Microsatellite genotyping of red clover and alfalfa varieties of the Williams Forage Crops Research Institute breeding (Mikrosatellitnoye genotipirovaniye sortov klevera lugovogo i lutserny VNIИ кормов им. В.Р. Вильямса). *Aktualnaya biotekhnologiya = Actual Biotechnology*. 2019;3(30):180-182. [in Russian] (Клименко И.А., Шамустакимова А.О., Капустина Н.В., Макаренков М.А. Микросателлитное генотипирование сортов клевера лугового и люцерны селекции ВНИИ кормов им. В.Р. Вильямса. *Актуальная биотехнология*. 2019;3(30):180-182).
- Kölliker R., Hermann D., Boller B., Widmer F. Swiss Mattenkleee landraces, a distinct and diverse genetic resource of red clover (*Trifolium pratense* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 2003;107:306-315.
- Kölliker R., Jones E.S., Jahufer M.Z.Z., Forster J.W. Bulked AFLP analysis for the assessment of genetic diversity in white clover (*Trifolium repens* L.). *Euphytica*. 2001;121:305-315.
- Kongkiatngam P., Waterway M.J., Fortin M.G., Coulman B.E. Genetic variation within and between two cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.): comparisons of morphological, isozyme, and RAPD markers. *Euphytica*. 1995;84:237-246. DOI: 10.1007/BF01681816
- Korir N.K., Han J., Shangguan L., Wang C., Kayesh E., Zhang Y. et al. Plant variety and cultivar identification: advances and prospects. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2012;33(2):111-125. DOI: 10.3109/07388551.2012.675314
- Kumar A., Bennetzen J.L. Plant retrotransposons. *Annual Review of Genetics*. 1999;33:479-532.
- Kumar A., Hirochika H. Application of retrotransposons as genetic tools in plant biology. *Trends in Plant Science*. 2001;6(3):127-134. DOI: 10.1016/S1360-1385(00)01860-4
- Lazar I., Zwecker-Lazar I., Lazar R.H. GelAnalyzer 2010a: Freeware 1D gel electrophoresis image analysis software. ScienceOpen, Inc.; 2010.
- 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
- Michelmore R.W., Paran I., Kesseli R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *PNAS*. 1991;88(21):9828-9832. DOI: 10.1073/pnas.88.21.9828
- Novoselov M.Y. Red clover (*Trifolium pratense* L.) (Klever lugovoy [*Trifolium pratense* L.]). In: *The basic species and varieties of fodder crops (Osnovnye vidy i sorta kormovykh kultur)*. Moscow: Nauka; 2015. p.26-30. [in Russian] (Новоселов М.Ю. Клевер луговой (*Trifolium pratense* L.). В кн.: *Основные виды и сорта кормовых культур*. Москва: Наука; 2015. С.26-30).
- Park S. MStools v. 3 (Excel Spreadsheet Toolkit for Data Conversion). Dublin: Trinity College; 2001.
- Radinovic I., Vasiljevic S., Brankovic G., Salem-Ahsyee R., Momirovic U., Perovic D. et al. Molecular characterization of red clover genotypes utilizing microsatellite markers. *Chilean Journal of Agricultural Research*. 2017;77(1):41-47. DOI: 10.4067/S0718-58392017000100005
- Ramazanov S.A., Guchetl C.Z., Chelyustnikova T.A., Antonova T.S. Identification of soybean cultivars of Russian breeding on the basis of DNA SSR-loci analysis. *Oil Crops. Scientific and Technical Bulletin of VNIIMK*. 2008;2(139):56-58. [in Russian] (Рамазанова С.А., Гучетль С.З., Челюстникова Т.А., Антонова Т.С. Идентификация сортов сои российской селекции на основе анализа микросателлитных (SSR) локусов ДНК. *Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур*. 2008;2(139):56-58).
- Rogowsky P.M., Shepherd K.W., Langridge P. Polymerase chain reaction based mapping of rye involving repeated DNA sequences. *Genome*. 1992;35(4):621-626. DOI: 10.1139/g92-093
- Sato S., Isobe S., Asamizu E., Ohmido N., Kataoka R., Nakamura Y. et al. Comprehensive structural analysis of the genome of red clover (*Trifolium pratense* L.). *DNA Research*. 2005;12(5):301-364. DOI: 10.1093/dnares/dsi018
- Schulman A.H. Molecular markers to assess genetic diversity. *Euphytica*. 2007;158:313-321. DOI: 10.1007/s10681-006-9282-5
- Sokal R.R., Michener C.D. A statistical methods for evaluating relationships. *University of Kansas Science Bulletin*. 1958;38:1409-1448.
- Tam S.M., Mhiri C., Vogelaar A., Kerkveld M., Pearce S.R., Grandbastien M.A. Comparative analyses of genetic diversities within tomato and pepper collections detected by retrotransposon-based SSAP, AFLP and SSR. *Theoretical and Applied Genetics*. 2005;110(5):819-831. DOI: 10.1007/s00122-004-1837-z
- Tautz D., Renz M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*. 1984;12(10):4127-4138. DOI: 10.1093/nar/12.10.4127
- Vymyslicky T., Smarda P., Pelikan J., Cholostova T., Nedelnik J., Moravcova H. et al. Evaluation of the Czech core collection of *Trifolium pratense*, including morphological, molecular and phytopathological data. *African Journal of Biotechnology*. 2012;11(15):3583-3595. DOI: 10.5897/AJB11.3085
- Zaytsev V.S., Khavkin E.E. Identification of plant genotypes using PCR analysis of repeated DNA sequences R173 family. (Идентификация генотипов растений с помощью ПЦР-анализа рассеянных повторяющихся последовательностей R173). *Russian Agricultural Sciences*. 2001;2:3-5. [in Russian] (Зайцев В.С., Хавкин Э.Е. Идентификация генотипов растений с помощью ПЦР-анализа рассеянных повторяющихся последовательностей R173. *Доклады РАСХН*. 2001;2:3-5).

**Прозрачность финансовой деятельности / The transparency of financial activities**

Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

The authors declare the absence of any financial interest in the materials or methods presented.

**Для цитирования / How to cite this article**

Клименко И.А., Костенко С.И., Мавлютов Ю.М., Шамустакимова А.О. Эффективность SSR- и PawS-маркеров для оценки генетического полиморфизма сортов клевера лугового (*Trifolium pratense* L.). Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2020;181(3):100-109. DOI:10.30901/2227-8834-2020-3-100-109

Klimenko I.A., Kostenko S.I., Mavlyutov Yu.M., Shamustakimova A.O. Efficiency of SSR and PawS markers for evaluation of genetic polymorphism among red clover (*Trifolium pratense* L.) cultivars. Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding. 2020;181(3):100-109. DOI: 10.30901/2227-8834-2020-3-100-109

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы / The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work

**Дополнительная информация / Additional information**

Полные данные этой статьи доступны / Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2020-3-100-109>

Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы / The journal's opinion is neutral to the presented materials, the authors, and their employer

Авторы одобрили рукопись / The authors approved the manuscript

Конфликт интересов отсутствует / No conflict of interest

**ORCID**

Klimenko I.A. <https://orcid.org/0000-0002-1850-3859>

Kostenko S.I. <https://orcid.org/0000-0001-9534-0603>

Mavlyutov Yu.M. <https://orcid.org/0000-0002-5695-6242>

Shamustakimova A.O. <https://orcid.org/0000-0003-3535-3108>