

## ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ СОРТОВ КЛЕВЕРА ЛУГОВОГО ПЦР-МЕТОДОМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ SRAP-МАРКЕРОВ

*Душкин Владимир Александрович, младший научный сотрудник ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса», tan-8090@mail.ru*

*Антонов Алексей Алексеевич, младший научный сотрудник ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса», antonov4B@yandex.ru*

***Аннотация:** Приведены результаты изучения ДНК-полиморфизма российских и зарубежных сортов клевера лугового с помощью молекулярно-генетического анализа на основе SRAP-маркеров.*

***Ключевые слова:** клевер луговой, генетическое разнообразие, ПЦР анализ, SRAP-маркеры.*

Многолетние бобовые травы играют важную роль в обеспечении животноводства высококачественными кормами, в повышении плодородия почв, защите их от водной и ветровой эрозии. Наиболее широко культивируется в различных регионах страны клевер луговой, который ценится за способность усваивать атмосферный азот с помощью клубеньковых бактерий и использовать его для формирования урожая, богатого белком [1, 2].

Интенсивное развитие селекции в настоящее время способствует появлению большого количества сортов сельскохозяйственных культур. Для идентификации сорта, наряду с традиционными фенотипическими признаками, используют современные подходы на основе молекулярных маркеров [3]. Методы молекулярного анализа помогают значительно сократить затраты труда и времени на оценку межвидового и межсортового генетического разнообразия, защитить авторские права, облегчить регистрацию новых селекционных достижений [3, 4].

Перспективным инструментом для изучения ДНК-полиморфизма является система SRAP-маркирования на основе ПЦР-метода. SRAP-маркеры (sequence-related amplified polymorphism) нацелены на амплификацию, так называемых, «открытых рамок считывания» (Open Reading Frame, ORF),- кодирующих последовательностей генома исследуемого организма [5]. Эта система сочетает в себе простоту, надёжность и хорошую воспроизводимость результатов.

Цель настоящего исследования - использование SRAP-маркеров для изучения генетического полиморфизма в коллекции российских и зарубежных сортов клевера лугового.

**Материалы и методы.** Работа проводилась в лаборатории молекулярно-генетических исследований кормовых культур ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса». Объектом исследования служили 16 российских и зарубежных сортов клевера лугового из коллекций ВИК им. В.Р. Вильямса и ВИР.

Выделение ДНК проводили из 7-дневных проростков с использованием модифицированного SDS-метода. Суммарная навеска состояла из 30 проростков на сорт («балк-образец»). Реакционная смесь ПЦР содержала 10x Taq Turbo buffer – 3 мкл,

50 dNTP mix – 0,5 мкл, 5U Taq-ДНК полимеразы – 0,5 мкл, 30 нг ДНК -1мкл, а также по 0,1 мкл каждого праймера (все компоненты указаны на 1 реакцию). Условия амплификации соответствовали предложенным в статье Aneja B. [6].

**Результаты и обсуждение.** По результатам предварительных исследований на клевере луговом был сформирован набор из 10 комбинаций SRAP-праймеров. ПЦР-анализ проводили в 2-3-х кратной повторности. Информативными считали праймеры, выявляющие ДНК-полиморфизм между сортами. Из 10 испытанных праймеров 9 обнаруживали различия в анализируемой коллекции (таблица 1).

Таблица 1

**Результаты ПЦР-анализа сортов клевера лугового с использованием SRAP-праймеров**

Праймерная пара	Нуклеотидная последовательность (5'-3')	Размер ПЦР-продуктов (п. н.)	Общее количество ПЦР-продуктов	Количество полиморфных фрагментов ДНК	% полиморфизма
F9-R9	GTA GCA CAA GCC GGA CC GAC TGC GTA CGA ATT TCA	224-1658	61	10	13,4
F13-Em2	CGA ATC TTA GCC GGC AC GAC TGC GTA CGA ATT TGC	234-763	47	2	4,3
F10-R7	GTA GCA CAA GCC GGA AG GAC TGC GTA CGA ATT GAG	100-655	33	3	9,1
F10-R8	GTA GCA CAA GCC GGA AG GAC ACC GTA CGA ATT GAC	100-1910	42	10	23,8
F13-R9	CGA ATC TTA GCC GGC AC GAC TGC GTA CGA ATT TCA	115-1315	62	6	9,7
F13-R7	CGA ATC TTA GCC GGC AC GAC TGC GTA CGA ATT GAG	109-1781	59	8	13,6
F9-R8	GTA GCA CAA GCC GGA CC GAC ACC GTA CGA ATT GAC	173-849	59	5	8,5
F10-R9	GTA GCA CAA GCC GGA AG GAC TGC GTA CGA ATT TCA	116-1442	46	10	21,7
F11-R7	CGA ATC TTA GCC GGA TA GAC TGC GTA CGA ATT GAG	232-1762	62	9	14,5
Среднее	-	-	52,3	7	13,2

В среднем, выявленный уровень полиморфизма был равен 13,2%. В общей сложности получены 471 ПЦР-продуктов, из которых 63 были уникальными в данной выборке. Уникальные фрагменты амплификации удалось получить для 13 сортов из 16. Для 7 сортов из коллекции по 3 и более праймерные комбинации оказались информативными для выявления генетических различий. Праймерная пара F10-R8 показала самый высокий процент полиморфизма (23,8%) в то время как самый низкий получен с комбинацией F13-Em2 (4,3%). Диапазон размеров продуктов амплификации составлял 100-1910 п. н.

Проведенный анализ позволяет заключить, что SRAP-система является эффективной для изучения генетических различий между отечественными и зарубежными сортами клевера лугового. Результаты исследований могут быть полезны при сортовой идентификации и при отборе перспективного материала для селекционных программ.

### Библиографический список

1. Новоселов, М. Ю. Современные подходы в селекции клевера лугового для кормопроизводства России [Текст] / М. Ю. Новоселов, Л. В. Дробышева, О. С. Матвеева, Г. П. Зятчина, О. А. Старшинова, А. А. Однородова, Е. М. Засименко // Земледелие. - 2014. - №. 2.
2. Нелюбина, Ж. С. Формирование сухой массы агрофитоценозами многолетних трав на основе клевера лугового тетраплоидного [Текст] / Ж. С. Нелюбина, Н. И. Касаткина, И. Ш. Фатыхов // Нива Поволжья. - 2020. - №. 3 (56).
3. Сиволап, Ю. М. Молекулярные маркеры и селекция [Текст] / Ю. М. Сиволап // Цитология и генетика. - 2013.
4. Чесноков, Ю. В. Молекулярные маркеры в популяционной генетике и селекции культурных растений : монография [Текст] / Ю. В. Чесноков, Н. В. Кочерина, В. М. Косолапов. - Москва : ООО «Угрешская Типография», 2019. - 200 с.
5. Li G., Quiros C. F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica // Theoretical and applied genetics. - 2001. - Т. 103. - №. 2-3. - С. 455-461.
6. Aneja V. Micronutrient and molecular diversity analysis in mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] genotypes : дис. - CCSHAU, 2010.

УДК 633.41:661.162.66

### ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА НА ПРОДУКТИВНОСТЬ КОРМОВОЙ СВЕКЛЫ

*Бородина Екатерина Сергеевна, аспирант кафедры растениеводства и луговых экосистем ФГБОУ ВО РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева, ekaterinapeliy@yandex.ru*

*Постников Андрей Николаевич, д.с.-х.н., профессор кафедры растениеводства и луговых экосистем ФГБОУ ВО РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева, apostnikov@rgau-msha.ru*

*Бондарь Владимир Иванович, к.с.-х.н., доцент кафедры механизации сельскохозяйственного производства КФ ФГБОУ ВО РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева, bondar-msha@mail.ru*

**Аннотация:** Экспериментальная работа проводилась на опытном поле Калужского филиала РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева в 2019-2020 годах. В данной работе исследовали влияние метеорологических условий на продуктивность и качество продукции кормовой свеклы под воздействием регуляторов роста. По результатам экспериментальных исследований доказана эффективность применения фиторегуляторов для снижения стрессовых метеофакторов, влияющих на рост и развитие культуры.