
ГЕНЕТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

УДК 631.523

ПРИМЕНЕНИЕ SCoT-МАРКЕРОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ РОССИЙСКИХ СОРТОВ ОВСЯНИЦЫ И ФЕСТУЛОЛИУМА

Ю. М. МАВЛЮТОВ¹⁾, В. Л. КОРОВИНА¹⁾, И. А. КЛИМЕНКО¹⁾

¹⁾Федеральный научный центр кормопроизводства и агроэкологии им. В. Р. Вильямса,
Научный городок, корп. 1, 141055, г. Лобня, Московская область, Россия

Необходимым условием повышения эффективности селекционного процесса кормовых злаковых трав является комплексная оценка исходного материала, в том числе с помощью современных ДНК-технологий. Цель исследования состояла в изучении эффективности использования системы SCoT-маркеров, основанных на ПЦР, при анализе межвидовой и межсортовой генетической изменчивости овсяницы (*Festuca*) и фестулолиума (*Festulolium* F. Aschers. et Graebn.). Проведено генотипирование 13 сортов российской селекции с применением 25 SCoT-маркеров, рекомендованных в литературных источниках в качестве информативных при анализе злаковых культур.

Образец цитирования:

Мавлютов ЮМ, Коровина ВЛ, Клименко ИА. Применение SCoT-маркеров для оценки генетической изменчивости российских сортов овсяницы и фестулолиума. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2022;3:53–63.
<https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-3-53-63>

For citation:

Mavlyutov YuM, Korovina VL, Klimenko IA. The use of SCoT markers for evaluation of the genetic variability of Russian fescue and festulolium varieties. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2022;3:53–63. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-3-53-63>

Авторы:

Юлиан Муратович Мавлютов – научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований кормовых культур.

Валентина Леонидовна Коровина – старший научный сотрудник лаборатории генофонда.

Ирина Александровна Клименко – кандидат сельскохозяйственных наук; старший научный сотрудник, заведующий лабораторией молекулярно-генетических исследований кормовых культур.

Authors:

Yulian M. Mavlyutov, researcher at the laboratory of molecular and genetic research of forage crops.

yulian92@mail.ru

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

Valentina L. Korovina, senior researcher at the laboratory of gene pool.

vlkorovina@gmail.com

Irina A. Klimenko, PhD (agricultural sciences); senior researcher and head of the laboratory of molecular and genetic research of forage crops.

iaklimenko@mail.ru

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

Показана высокая эффективность техники SCoT-маркирования как инструмента выявления ДНК-полиморфизма между видами и сортами овсяницы и фестулолиума. Полученные результаты могут быть использованы при разработке методов идентификации и паспортизации сортов, а информация о генетическом сходстве или различии будет полезна при подборе родительских форм для селекционного процесса.

Ключевые слова: овсяница; фестулолиум; генетическое разнообразие; SCoT-маркеры; ДНК-полиморфизм; генотипирование.

Благодарность. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственного задания по проекту 0442-2019-0001AAAA-A19-119122590053-0.

THE USE OF SCoT MARKERS FOR EVALUATION OF THE GENETIC VARIABILITY OF RUSSIAN FESCUE AND FESTULOLIUM VARIETIES

Yu. M. MAVLYUTOV^a, V. L. KOROVINA^a, I. A. KLIMENKO^a

^aFederal Williams Research Center of Forage Production & Agroecology,
Scientific campus, 1 building, Lobnya 141055, Moscow Region, Russia

Corresponding author: Yu. M. Mavlyutov (yulian92@mail.ru)

Forage gramineous grasses are the most important component of the hay lands and pasture agroecosystems. To increase the efficiency of grass breeding the complex evaluation of the initial plant material is necessary, including an application of the current DNA technologies. The aim of this study was to investigate the effectiveness of SCoT markers for PCR-analysis of interspecies and intervaretal genetic variations of Russian fescue (*Festuca*) and festulolium (*Festulolium* F. Aschers. et Graebn.) varieties. Total 13 samples, combined 30 seedlings per variety were genotyped with 25 SCoT markers, indicated as informative for gramineous grasses according to literature sources. The high efficiency of SCoT marking technique as a tool for DNA polymorphism revealing was found for Russian fescue and festulolium species and varieties. The obtained results can be used at the varieties identification and genetic certification as well as for selection the parental forms for the breeding process.

Keywords: fescue; festulolium; genetic diversity; SCoT markers; DNA polymorphism; genotyping.

Acknowledgements. This work was financially supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation according to the state assignment for the project 0442-2019-0001AAAA-A19-119122590053-0.

Введение

Многолетние кормовые злаковые травы являются важнейшим компонентом сенокосных и пастбищных агроэкосистем. Их используют для заготовки различных видов кормов (как в чистом виде, так и в составе травосмесей), при создании газонов для озеленения сельского и городского ландшафтов, а также при благоустройстве полевых аэродромов и спортивных площадок. Помимо высокой хозяйственной ценности, культурные виды злаковых трав имеют существенное экологическое значение, так как способствуют оздоровлению окружающей среды, обогащают почву органическими веществами, предотвращают эрозионные и деградационные процессы [1].

Наличие у многих ботанических видов злаковых трав большого количества форм и подвидов позволяет адаптировать их к произрастанию в условиях конкретного региона, вывести сорта одного вида, но разного типа использования. Так, для полевого травосеяния предпочтительны тимopheевка луговая, райграс высокий и овсяница тростниковая. В луговодстве чаще используются райграс пастбищный и различные виды овсяницы (красная, луговая, овечья). Главными направлениями селекции многолетних злаковых трав являются увеличение кормовой и семенной продуктивности, повышение зимостойкости и долгодетия растений, создание сортов, устойчивых к болезням [2]. В связи с этим большое значение для кормопроизводства имеют сорта фестулолиума – культуры, полученной методом межродовой гибридизации представителей родов *Lolium* sp. и *Festuca* sp. Основной задачей при создании гибрида было объединение в одном растении нескольких хозяйственно ценных признаков родительских форм – высокого качества корма, свойственного райграсам, и высокой устойчивости к неблагоприятным внешним факторам, характерной для овсяниц [3].

Необходимым условием повышения эффективности селекционного процесса является правильный выбор исходного материала и его оценка по основным фенотипическим признакам, хозяйственным свойствам и особенностям генетической структуры в целях рационального использования в программах по

созданию новых перспективных сортов [4]. Однако анализ генетического разнообразия злаковых трав является сложной задачей вследствие самонесовместимой перекрестноопыляемой природы этих культур, где каждый вид представлен высокогетерогенными популяциями индивидуальных генотипов [5]. В данном случае возможности морфологических или агрономических признаков как маркеров особенно ограничены. При этом высокий уровень полиморфизма, выявляемый с помощью молекулярных маркеров, основанных на ПЦР-анализе, может стать полезным инструментом дифференциации сортов, образцов и гибридов на генетическом уровне [6].

Для изучения генетического разнообразия многолетних злаковых трав успешно используются разные типы молекулярных маркеров. Так, в работе [7] с помощью техник ISSR- и EST-SSR-маркирования исследованы популяции овсяницы тростниковой, что позволило выявить высокий уровень полиморфизма в различных областях генома (86,6 и 90,6 % соответственно), а также установить филогенетические взаимоотношения между анализируемыми образцами. Для аналогичных целей авторы статьи [8] при изучении образцов овсяницы и райграса разных видов использовали SRAP-маркеры, в результате чего обнаружили высокий уровень межвидового ДНК-полиморфизма (до 100 %). Известно об успешном применении AFLP- и STS-маркеров для выявления генетического родства между исследуемыми сортами райграса многолетнего [9]. На основе SSR- и REMAP-анализа оценено генетическое разнообразие коллекции из 96 образцов тимофеевки луговой [10].

В последние годы одной из наиболее эффективных технологий для молекулярно-генетического анализа злаковых трав считается маркерная система SCoT (*start codon targeted polymorphism*) [11]. Метод основан на использовании одиночных праймеров, которые разработаны для амплификации коротких консервативных участков, фланкирующих стартовый кодон ATG в геноме растений. Для данных маркеров характерны высокая воспроизводимость результатов, нацеленность на амплификацию функциональных участков генома и относительно небольшие затраты на проведение анализа.

В настоящей работе SCoT-маркеры применяли для анализа межвидового и межсортного ДНК-полиморфизма российских сортов овсяницы и фестулолиума, чтобы оценить эффективность системы при изучении этих культур и определить направления дальнейшего использования полученных результатов в селекционных программах.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования служили 8 сортов овсяницы разных видов и 5 сортов фестулолиума, предоставленных 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).

Таблица 1

Перечень российских сортов овсяницы и фестулолиума
для анализа ДНК-полиморфизма

Table 1

List of Russian fescue and festulolium varieties
for DNA polymorphism analysis

Вид или гибрид	Сорт	Плоидность	Оригинатор
<i>Овсяница</i>			
Овсяница луговая (<i>Festuca pratensis</i> Huds.)	Бинара	4n	ФНЦ «ВИК им. В. Р. Вильямса»
	Кварта	2n	
	ВИК-5	2n	
Овсяница красная (<i>F. rubra</i> L.)	Диана	8n	
	Дипа	2n	
	Сигма	6n	
Овсяница тростниковая (<i>F. arundinacea</i> Schreb.)	Лира	6n	Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук
	Серебрянка	6n	

Окончание табл. 1
Ending table 1

Вид или гибрид	Сорт	Плоидность	Оригинатор
<i>Фестулолиум</i>			
× <i>Festulolium</i> F. Aschers. et Graebn.	Аллегро	4n	ФНЦ «ВИК им. В. Р. Вильямса», ООО «Грин Дир»
	Пилигрим	4n	ФНЦ «ВИК им. В. Р. Вильямса»
	Фест	4n	ФНЦ «ВИК им. В. Р. Вильямса», ООО «Грин Дир»
	Изумрудный	6n	Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, ЗАО «НПФ “Российские семена”»
	Айвенго	4n	ФНЦ «ВИК им. В. Р. Вильямса»

ДНК для генотипирования выделяли из 7-дневных проростков, формируя выборку по 30 генотипов от каждого сорта (балк-образец) [12]. Использовали лизирующий SDS-буфер с последующей обработкой лизатов осаждающими агентами (ацетат аммония и изопропанол), очисткой полученных фракций РНКазой и промывкой этанолом [13; 14, с. 12]. Концентрацию и качество полученной ДНК определяли с помощью электрофореза в 1 % агарозном геле, а также на спектрофотометре *Nabi UV/Vis Nano Spectrophotometer* (*MicroDigital Co.*, Корея). Финальная концентрация ДНК-пробы в смеси для ПЦР составляла 30 нг/мкл.

Набор из 25 SCoT-маркеров был определен на основании данных проведенных ранее исследований, где они указаны как информативные для анализа злаковых культур [11; 15–19]. Праймеры к этим маркерам синтезированы компанией *Евроген* (Россия).

Реакционная смесь для ПЦР (конечный объем 20 мкл) содержала 1-кратный буфер *Taq Turbo*, 0,5-кратную смесь dNTP, 0,5 ед. *Taq*-ДНК-полимеразы, 0,4 мкмоль/л праймера и 30 нг ДНК. С использованием термоциклера *T100* (*Bio-Rad*, США) провели амплификацию фрагментов ДНК при следующих условиях: 3 мин при 94 °C; 1 мин при 94 °C, 1 мин при 50 °C и 1 мин при 72 °C (35 циклов); 5 мин при 72 °C. Полученные ПЦР-продукты разделяли в 1,6 % агарозном геле при напряжении 50 В в течение 2 ч, а затем с помощью программного обеспечения *Image Lab* (версия 6.0.1) (*Bio-Rad*) определяли их размеры в сравнении с маркером молекулярного веса 1 kb DNA Ladder (*Евроген*). Воспроизводимость результатов проверяли путем постановки ПЦР в 3-кратной повторности, включая использование в качестве матрицы балк-образцов ДНК, полученных из разных выборок проростков от каждого сорта.

Для вычисления показателей генетического разнообразия по Нею, или ожидаемой гетерозиготности (H_e), эффективного числа аллелей (N_e) и информационного индекса Шеннона (I) применяли программный пакет *GenAlEx* (версия 6.2) [20]. На основе выявленных генетических дистанций между изучаемыми образцами провели кластеризацию методом *neighbour-joining* (NJ) в программе *DARwin* (версия 6.0.21) [21] с оценкой достоверности результатов бутстреп-анализом при использовании 10 000 реплик. Изучение генетической структуры объекта исследования осуществляли с помощью программы *Structure* (версия 2.3.4) [22; 23], где установили значения гипотетических популяций от $K = 1$ до $K = 10$, а также задали 10 000 повторов *burn-in period* и 10 000 итераций MCMC (*Markov chain Monte Carlo*). Для последующего определения оптимального значения кластеров использовали метод Эванно (*Evanno*) [24] в программе *Structure Harvester* [25]. Процент полиморфных локусов (P_1) рассчитывали по формуле

$$P_1 = \frac{F}{P} \cdot 100,$$

где F – общее количество амплифицированных фрагментов; P – количество полиморфных продуктов.

Результаты и их обсуждение

По результатам анализа коллекции российских сортов овсяницы и фестулолиума из 25 испытанных SCoT-маркеров выбрали 19 информативных маркеров, с помощью которых получены отчетливые и воспроизводимые в повторных экспериментах продукты амплификации для всех образцов (табл. 2).

Таблица 2

**Информативные SCoT-маркеры
для анализа сортов овсяницы и фестулолиума**

Table 2

**Informative SCoT markers
for the analysis of fescue and festulolium varieties**

Маркер	Последовательность (5'→3')	Количество ПЦР-продуктов (F)	Уровень полиморфизма (P _i), %
SCoT-02	CAACAATGGCTACCACCC	22	45,45
SCoT-06	CAACAATGGCTACCACGC	21	33,33
SCoT-07	CAACAATGGCTACCACGG	12	33,33
SCoT-08	CAACAATGGCTACCACGT	39	20,51
SCoT-11	AAGCAATGGCTACCACCA	10	10,00
SCoT-13	ACGACATGGCGACCATCG	19	42,11
SCoT-15	ACGACATGGCGACCGCGA	18	16,67
SCoT-20	ACCATGGCTACCACCGCG	35	40,00
SCoT-21	ACGACATGGCGACCCACA	32	21,88
SCoT-23	CACCATGGCTACCACCAG	35	40,00
SCoT-26	ACCATGGCTACCACCGTC	55	41,82
SCoT-28	CCATGGCTACCACCGCCA	16	25,00
SCoT-31	CCATGGCTACCACCGCCT	19	31,58
SCoT-32	CCATGGCTACCACCGCAC	30	23,33
SCoT-35	CATGGCTACCACCGGCC	22	27,27
SCoT-36	GCAACAATGGCTACCACC	24	4,17
SCoT-59	ACAATGGCTACCACCATC	22	31,82
SCoT-60	ACAATGGCTACCACCACA	32	28,13
SCoT-63	ACCATGGCTACCACGGGC	30	43,33
<i>Всего</i>	–	493	–
<i>Среднее значение</i>	–	25,95	29,46

С указанными маркерами удалось получить 493 ПЦР-фрагмента, из них 152 фрагмента (30,8 %) оказались полиморфными. В среднем на каждый информативный праймер приходилось 8 уникальных ПЦР-продуктов, размеры которых находились в диапазоне от 400 до 3600 пар нуклеотидов. Наибольшее число ампликонов (55) получено с использованием праймера SCoT-26, наименьшее (10) – с использованием праймера SCoT-11. Максимальный уровень ДНК-полиморфизма (45,45 %) обнаружен с маркером SCoT-02, минимальный (4,17 %) – с маркером SCoT-36.

Средний уровень полиморфизма, выявленный в настоящем исследовании (29,46 %), оказался существенно ниже значений, представленных в работах других авторов. Так, И. П. Кондрацкая с соавторами при идентификации генотипов райграса и фестулолиума с помощью системы SCoT-маркеров обнаружила значительный генетический полиморфизм – 94,52 % [26]. При изучении этих культур с использованием ISSR-маркеров уровень полиморфизма составил 71 % [27]. В ходе анализа генетической изменчивости 21 сорта овсяницы тростниковой с применением 14 SSR-маркеров средний уровень полиморфизма установлен в пределах 88,6 % [28]. Сравнительно низкое среднее значение степени межсортового ДНК-полиморфизма в настоящем исследовании, вероятно, можно объяснить происхождением образцов: в основном они получены путем отборов из близкородственного исходного материала.

На основании результатов генотипирования были рассчитаны показатели генетической изменчивости изучаемой выборки сортов. Среднее значение эффективного числа аллелей составило 1,249 и варьировалось от 1,184 (для маркера SCoT-26) до 1,328 (для маркера SCoT-11). С праймером к маркеру SCoT-11 получены также наибольшие значения индекса Шеннона (0,393) и генетического разнообразия по Нею (0,236). Близкие по значению показатели генетической изменчивости (эффективное число аллелей, индекс Шеннона, ожидаемая гетерозиготность) определены и для маркера SCoT-36 (1,302, 0,384 и 0,227 соответст-

венно) (табл. 3). При этом указанные маркеры характеризовались невысоким уровнем выявляемого ДНК-полиморфизма (10,00 % – SCoT-11, 4,17 % – SCoT-36). Относительно высокополиморфными (от 40,00 до 45,45 %) оказались маркеры SCoT-02, SCoT-13, SCoT-20, SCoT-23, SCoT-26, SCoT-63, которые можно использовать в качестве ДНК-идентификационных при различении сортов в селекции и семеноводстве овсяницы и фестулолиума.

Таблица 3

Показатели генетической изменчивости сортов овсяницы и фестулолиума по результатам анализа с использованием SCoT-маркеров

Table 3

Diversity indicators of fescue and festulolium varieties based on the SCoT analysis

Маркер	Эффективное число аллелей (N_e)	Генетическое разнообразие по Нею (H_e)	Индекс Шеннона (I)
SCoT-02	1,193	0,150	0,273
SCoT-06	1,222	0,175	0,310
SCoT-07	1,271	0,196	0,335
SCoT-08	1,224	0,177	0,316
SCoT-11	1,328	0,236	0,393
SCoT-13	1,188	0,153	0,281
SCoT-15	1,291	0,213	0,362
SCoT-20	1,251	0,185	0,319
SCoT-21	1,224	0,178	0,317
SCoT-23	1,210	0,163	0,293
SCoT-26	1,184	0,149	0,274
SCoT-28	1,244	0,187	0,327
SCoT-31	1,279	0,201	0,341
SCoT-32	1,292	0,209	0,353
SCoT-35	1,272	0,201	0,344
SCoT-36	1,302	0,227	0,384
SCoT-59	1,254	0,188	0,326
SCoT-60	1,237	0,183	0,321
SCoT-63	1,270	0,191	0,325
Среднее значение	1,249	0,187	0,326

Средние значения эффективного числа аллелей, индекса Шеннона и генетического разнообразия по Нею, полученные в настоящем исследовании, были ниже результатов, представленных в работе [7], где проводился ISSR-анализ 90 образцов овсяницы тростниковой (1,249, 0,326 и 0,187 против 1,549, 0,438 и 0,440 соответственно). Это позволяет заключить, что SCoT-маркеры несколько уступают ISSR-маркерам в дискриминационном потенциале, однако обе техники маркирования можно успешно использовать для различения сортов и генотипов разных видов овсяницы.

Данные о составе аллелей и показатели генетических дистанций между исследованными сортами злаковых трав послужили основой для построения дендрограммы методом NJ (рис. 1).

На дендрограмме выделились четыре выраженных кластера, группирующих анализируемые образцы в соответствии с видовой принадлежностью, селекционным происхождением, уровнем пloidности и морфотипом. В первом кластере оказались сорта фестулолиума Аллегро, Фест, Пилигрим и Айвенго селекции ФНЦ «ВИК им. В. Р. Вильямса». Сорт Аллегро – тетраплоид райграсового морфотипа, выведенный путем контролируемого скрещивания райграса многоукосного и овсяницы луговой, от которой он унаследовал высокую зимостойкость и долголетие. Данный сорт характеризуется

повышенной кормовой и семенной продуктивностью, а также высоким содержанием сахаров, по сравнению с райграсом является устойчивым к полеганию. Сорт Фест, как и сорт Аллегро, представляет собой тетраплоид райграсового морфотипа. Он получен в результате межродовой гибридизации райграса многоукосного и овсяницы тростниковой. Фестулолиум сорта Фест служит высокопродуктивным компонентом в составе кормовых травосмесей, отличается повышенной зимостойкостью и засухоустойчивостью, высокими кормовыми достоинствами, хорошо поедается животными, так как содержит большое количество сахара в сухом веществе (22,2 % в фазу выхода в трубку) [29]. Перспективный тетраплоидный сорт Пилигрим по долголетию на 30 % превосходит райграс пастбищный, а его семенная продуктивность при оптимальном питании может превышать 1,5 т/га. Данный сорт предназначен в основном для сенокосного использования, на орошаемых участках при регулярном внесении минеральных удобрений дает 2–3 полноценных укоса сена (до 20 т/га за сезон).

Во второй кластер вошли сорта овсяницы красной Сигма, Диана и Дипа. Сорт Сигма разработан селекционерами ФНЦ «ВИК им. В. Р. Вильямса» на основе синтетических популяций и предназначен для газонного, пастбищного и фитомелиоративного использования. Он характеризуется повышенной семенной продуктивностью (до 400–500 кг/га), ранним весенним и послеукосным отрастанием, долголетием, зимостойкостью и засухоустойчивостью. Сорта Диана и Дипа получены из сложногогибридных популяций и методом отбора соответственно. Сорт Дипа обладает способностью к симбиотической фиксации азота при инокуляции препаратами diaзотрофных бактерий [30].

Третий кластер объединил сорта овсяницы луговой ВИК-5, Бинара и Кварта (бутстреп-поддержка 100 %). Диплоидный сорт сенокосно-пастбищного назначения ВИК-5 получен отбором из закавказского образца. На его основе разработан тетраплоидный сорт Бинара, отличающийся повышенной продуктивностью. Овсяница сорта Кварта является сложногобридной популяцией пастбищно-газонного экотипа.

В четвертом кластере оказались овсяница тростниковая сортов Ли́ра и Серебрянка и фестулолиум сорта Изумрудный овсяницевого сортотипа (бутстреп-поддержка 100 %). Сорт Ли́ра – относительно новое селекционное достижение – получен путем отбора на основе высокопродуктивных российских сортов Балтика и Западная [3]. Гексаплоидный сорт Серебрянка, разработанный методом межвидовой гибридизации овсяницы восточной и овсяницы тростниковой, отличается раннеспелостью и повышенной продуктивностью. У сортов Серебрянка и Изумрудный общий оригина́тор – Уральский федера́льный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук. Сорт Изумрудный допущен к использованию с 2000 г. Он является межвидовым гибридом овсяницы тростниковой и райграса однолетнего. От овсяницы сорт унаследовал морфобиологические признаки, от райграса – качественные характеристики. Фестулолиум сорта Изумрудный обладает высокой кормовой и семенной продуктивностью, хорошим качеством зеленой массы при содержании 15 % протеина, а также относительной устойчивостью к абиотическим стрессам и снежной плесени. Растения быстро отрастают после стравливания или скашивания при пастбищном и сенокосном использовании [31].

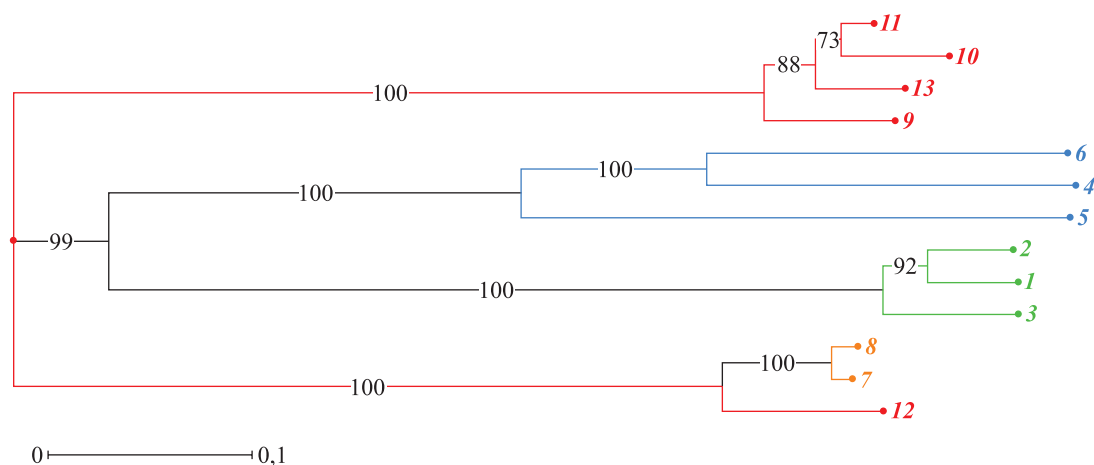


Рис. 1. Дендрограмма сортов овсяницы и фестулолиума по результатам анализа с применением SCoT-маркеров:

1 – Бинара; 2 – Кварта; 3 – ВИК-5; 4 – Диана; 5 – Дипа; 6 – Сигма; 7 – Лира;
8 – Серебрянка; 9 – Аллегро; 10 – Пилигрим; 11 – Фест; 12 – Изумрудный; 13 – Айвенго

Fig. 1. Dendrogram of fescue and festulolium varieties based on the results of SCoT analysis:

1 – Binara; 2 – Kvarta; 3 – VIK-5; 4 – Diana; 5 – Dipa; 6 – Sigma; 7 – Lira;
8 – Serebrjanka; 9 – Allegro; 10 – Piligrim; 11 – Fest; 12 – Izumrudniyj; 13 – Ajvengo

Совместная кластеризация вышеуказанных сортов злаковых трав, предположительно, обусловлена общностью происхождения и сходством основных морфобиологических признаков и качественных характеристик.

На основе байесовской модели и метода Эванно [24] в программе *Structure* определена генетическая структура изучаемых образцов овсяницы и фестулолиума, в соответствии с которой они разделились на четыре группы ($K = 4$) (рис. 2).

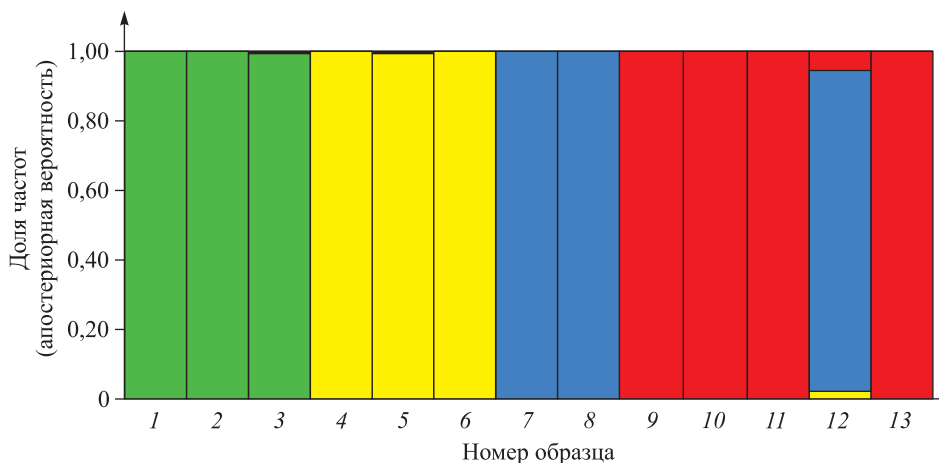


Рис. 2. Генетическая структура сортов овсяницы и фестулолиума по результатам оценки в программе *Structure*.

Цветовые коды соответствуют выявленным кластерам, а номера образцов – обозначениям сортов на рис. 1

Fig. 2. *Structure* analysis of the genetic structure of fescue and festulium varieties.

Colour codes correspond to identified clusters, and sample numbers – to variety designations in fig. 1

В группе сортов овсяницы наблюдалась четкая генетическая структуризация, тогда как в ряду фестулолиума обнаружена неравномерность распределения (выделялся сорт Изумрудный). Обособленное положение сорта Изумрудный по отношению к другим сортам данной культуры (Аллегро, Пилигрим, Фест, Айвенго) можно объяснить отличающимся уровнем пloidности. Как правило, гибридные растения фестулолиума, в зависимости от пloidности, морфологически наследуют признаки либо овсяницы, либо райграса, причем гексапloidные формы близки к овсянице тростниковой, а тетрапloidные формы – к райграсу пастбищному или райграсу многоцветковому [32, с. 12–14].

Эти особенности гибридной культуры нашли подтверждение и в данном исследовании. В изучаемой выборке сортов фестулолиум сорта Изумрудный оказался близок к овсянице тростниковой сортов Ли́ра и Серебрянка не только по уровню пloidности ($6n$), но и по результатам генотипирования и кластеризации (см. рис. 1), а также по генетической структуре, что отражено в одинаковых цветовых кодах, полученных для указанных образцов (см. рис. 2). Сравнительный анализ основных морфологических характеристик и агрономических признаков также обнаружил много общего. Высокий, слегка раскидистый куст и соцветие в виде пирамидальной метелки в сочетании с повышенной пластичностью, раннеспелостью, продуктивностью и долголетием (до 8 лет) указывают на сходство растений фестулолиума сорта Изумрудный с овсяницей тростниковой сорта Серебрянка. Благодаря этим свойствам фестулолиум можно использовать в качестве прямой замены сортов овсяницы в травосмесях для улучшения питательной ценности корма [31]. В отличие от включенных в анализ сортов райграсового типа растения сорта Изумрудный нетребовательны к почвенным условиям, не полегают, а их семена более устойчивы к осыпанию.

Заключение

Результаты исследования свидетельствуют об эффективности техники SCoT-маркирования для оценки генетического разнообразия российских сортов овсяницы и фестулолиума. Из 25 испытанных маркеров 19 маркеров (76 %) выявляли ДНК-полиморфизм между изучаемыми видами и сортами. С праймерами к информативным маркерам получены 152 полиморфных фрагмента амплификации ДНК (30,8 %). Для исследуемой коллекции образцов определены наборы маркеров, позволяющие обнаружить высокие значения уровня генетической изменчивости (SCoT-02, SCoT-11, SCoT-13, SCoT-20, SCoT-23, SCoT-26, SCoT-36, SCoT-63). Эти маркеры можно использовать в селекции и семеноводстве разных

видов овсяницы и фестулолиума, в частности, для ДНК-идентификации сортов и генотипов, разработки генетических паспортов, контроля стабильности сорта в процессе использования.

Кластерный анализ сгруппировал изучаемые образцы согласно видам, подвидам, происхождению и сходству по основным признакам. Выявлено соответствие результатов кластеризации селекционному описанию используемого в исследовании материала. Информация об установленном сходстве или различии на генетическом уровне будет полезна при выборе родительских форм для создания новых сортов с улучшенными характеристиками. Использование полученных данных позволит ускорить оценку исходного материала и контроль результатов гибридизации путем отбора ценных генотипов на ранней стадии онтогенеза без проведения трудоемких и затратных по времени полевых испытаний.

Широкое внедрение методов молекулярно-генетического анализа в селекцию многолетних злаковых трав будет способствовать дальнейшему развитию кормопроизводства и получению биологически полноценной сельскохозяйственной продукции.

Библиографические ссылки

1. Костенко СИ, Косолапов ВМ, Пилипко СВ, Костенко ЕС. Селекция многолетних злаковых трав для адаптивного кормопроизводства. *Кормопроизводство*. 2016;8:35–39.
2. Золотарев ВН, Катков ВА, Карпин ВИ. Биолого-генетические и технологические основы семеноводства сортов кормовых трав, созданных на основе индуцированных тетраплоидов. *Адаптивное кормопроизводство*. 2013;2:44–52.
3. Косолапов ВМ, Шамсутдинов ЗШ, Ившин ГИ, Кулешов ГФ, Новоселов МЮ, Новоселова АС и др. *Основные виды и сорта кормовых культур: итоги научной деятельности Центрального селекционного центра*. Шамсутдинов ЗШ, Новоселова АС, Косолапов ВМ, Агафодорова МН, Воловик ВТ, Дробышева ЛВ и др., редакторы. Москва: Наука; 2015. 545 с.
4. Клименко ИА, Козлов НН, Шамустакимова АО, Душкин ВА. Изучение генетического разнообразия кормовых культур с помощью молекулярных ДНК-маркеров. *Адаптивное кормопроизводство*. 2019;4:89–100. DOI: 10.33814/AFP-2222-5366-2019-4-89-100.
5. Сапрыкин СВ, Золотарев ВН, Иванов ИС, Степанова ГВ, Сапрыкина НВ, Лабинская РМ. *Научные основы селекции и семеноводства многолетних трав в Центрально-Черноземном регионе России*. Сапрыкин СВ, Золотарев ВН, Степанова ГВ, редакторы. Воронеж: Воронежская областная типография; 2020. 496 с.
6. 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.
7. Shahabzadeh Z, Mohammadi R, Darvishzadeh R, Jaffari M. Genetic structure and diversity analysis of tall fescue populations by EST-SSR and ISSR markers. *Molecular Biology Reports*. 2020;47(1):655–669. DOI: 10.1007/s11033-019-05173-z.
8. Cheng Y, Ma X, Zhou K, Humphreys MW, Zhang XQ. Phylogenetic analysis of *Festuca* – *Lolium* complex using SRAP markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2016;63(1):7–18. DOI: 10.1007/s10722-015-0324-5.
9. Roldán-Ruiz I, van Eeuwijk FA, Gilliland TJ, Dubreuil P, Dillmann C, Lallemand J, et al. A comparative study of molecular and morphological methods of describing relationships between perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) varieties. *Theoretical and Applied Genetics*. 2001;103(8):1138–1150. DOI: 10.1007/s001220100571.
10. Tanhuanpää P, Erkkilä M, Kalendar R, Schulman AH, Manninen O. Assessment of genetic diversity in Nordic timothy (*Phleum pratense* L.). *Hereditas*. 2016;153:5. DOI: 10.1186/s41065-016-0009-x.
11. Collard BCY, Mackill DJ. 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.
12. Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV. 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.
13. Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1983;1(4):19–21. DOI: 10.1007/BF02712670.
14. Клименко ИА, Козлов НН, Костенко СИ, Шамустакимова АО, Мавлютов ЮМ. *Идентификация и паспортизация сортов кормовых трав (клевера лугового, люцерны изменчивой, посевной и хмелевидной) на основе ДНК-маркеров*. Москва: Угреша Т; 2020. 35 с. DOI: 10.33814/978-5-6043194-9-9.
15. Amirmoradi B, Talebi R, Karami E. Comparison of genetic variation and differentiation among annual *Cicer* species using start codon targeted (SCoT) polymorphism, DAMD-PCR, and ISSR markers. *Plant Systematics and Evolution*. 2012;298(9):1679–1688. DOI: 10.1007/s00606-012-0669-6.
16. Jiang LF, Qi X, Zhang XQ, Huang LK, Ma X, Xie WG. 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.
17. 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.
18. Safari H, Zebarjadi A, Kahrizi D, Jafari AA. 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.
19. Кондрацкая ИП, Юхимук АН, Столепченко ВА, Чижик ОВ, Козловская ЗГ, Васьюк ПП и др. Создание межродовых гибридов фестулолиума морфотипа овсяницы тростниковой с использованием постгеномных технологий и ДНК-маркирования. В: Кунах ВА, Дробик НМ, Азизов ИВ, Андреев ИА, Атанасов А, Блюм ЯБ и др., редакторы. *Факторы экспериментальной эволюции организмов = Factors in experimental evolution of organisms*. Том 25. Киев: Украинское общество генетиков и селекционеров имени Н. И. Вавилова; 2019. с. 253–259. DOI: 10.7124/FEEO.v25.1172.

20. Peakall R, Smouse PE. *GenAlEx 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.
21. Perrier X, Jacquemoud-Collet JP. *DARwin software* [Internet]. Paris: CIRAD; 2006 [cited 2022 June 7]. Available from: <https://darwin.cirad.fr/>.
22. Pritchard JK, 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.
23. Falush D, Stephens M, Pritchard JK. 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.
24. 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.
25. Earl DA, vonHoldt BM. *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.
26. Кондрацкая ИП, Юхимук АН, Чижик ОВ, Решетников ВН. ДНК-маркеры как средство оценки генетического разнообразия и идентификации злаковых трав. В: Демидчик ВВ, Смолич ИИ, Падутов ВЕ, Шашко АЮ, редакторы. *Клеточная биология и биотехнология растений. Тезисы докладов III Международной научно-практической конференции; 24–27 мая 2022 г.; Минск, Беларусь*. Минск: БГУ; 2022. с. 70.
27. Pivorienė O, Pašakinskienė I. Genetic diversity assessment in perennial ryegrass and *Festulolium* by ISSR fingerprinting. *Zemdirbyste-Agriculture*. 2008;95(2):125–133.
28. Fu Kaixin, Guo Zhihui, Zhang Xinqian, Fan Yan, Wu Wendan, Li Daxu, et al. Insight into the genetic variability analysis and cultivar identification of tall fescue by using SSR markers. *Hereditas*. 2016;153:9. DOI: 10.1186/s41065-016-0013-1.
29. Золотарев ВН. Хозяйственно-биологические характеристики фестулолиума сорта Фест и особенности возделывания. *Адаптивное кормопроизводство*. 2022;2:35–48.
30. Трухан ОВ. Развитие семеноводства овсяницы красной. *Адаптивное кормопроизводство*. 2016;2:71–79.
31. Золотарев ВН, Переprawo НИ. Отличительные особенности сортов овсянице-райграсовых гибридов при возделывании на семена. В: *Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования. Материалы XII Международной конференции; 6–10 июня 2016 г.; Ялта, Россия*. Москва: Российский университет дружбы народов; 2016. с. 314–317.
32. Переprawo НИ, Косолапов ВМ, Рябова ВЭ, Золотарев ВН, Карпин ВИ, Лебедева НН и др. *Возделывание и использование новой кормовой культуры – фестулолиума – на корм и семена*. Переprawo НИ, Косолапов ВМ, Рябова ВЭ, Георгиади НИ, Бакулина ЮВ, редакторы. Москва: Издательство РГАУ – МСХА; 2012. 28 с.

References

1. Kostenko SI, Kosolapov VM, Pilipko SV, Kostenko ES. Breeding perennial gramineous for adaptive forage production. *Fodder Journal*. 2016;8:35–39. Russian.
2. Zolotarev VN, Katkov VA, Karpin VI. The biological-genetic and technological basis of a seed multiplication for varieties of forage grasses, created with use the induced tetraploids. *Adaptive Fodder Production*. 2013;2:44–52. Russian.
3. Kosolapov VM, Shamsutdinov ZSh, Ivshin GI, Kuleshov GF, Novoselov MYu, Novoselova AS, et al. *Osnovnye vidy i sorta kormovykh kul'tur: itogi nauchnoi deyatel'nosti Tsentral'nogo selektsionnogo tsentra* [The basic species and varieties of fodder crops: results of scientific activity of the Central Breeding Center]. Shamsutdinov ZSh, Novoselova AS, Kosolapov VM, Agafodorova MN, Volovik VT, Drobysheva LV, et al., editors. Moscow: Nauka; 2015. 545 p. Russian.
4. Klimenko IA, Kozlov NN, Shamustakimova AO, Dushkin VA. Investigation of forage crops genetic diversity using molecular DNA markers. *Adaptive Fodder Production*. 2019;4:89–100. Russian. DOI: 10.33814/AFP-2222-5366-2019-4-89-100.
5. Saprykin SV, Zolotarev VN, Ivanov IS, Stepanova GV, Saprykina NV, Labinskaya RM. *Nauchnye osnovy selektsii i semenovodstva mnogoletnikh trav v Tsentral'no-Chernozemnom regione Rossii* [Scientific bases of breeding and seed production of perennial grasses in the Central Chernozem region of Russia]. Saprykin SV, Zolotarev VN, Stepanova GV, editors. Voronezh: Voronezhskaya oblastnaya tipografiya; 2020. 496 p. Russian.
6. 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.
7. Shahabzadeh Z, Mohammadi R, Darvishzadeh R, Jaffari M. Genetic structure and diversity analysis of tall fescue populations by EST-SSR and ISSR markers. *Molecular Biology Reports*. 2020;47(1):655–669. DOI: 10.1007/s11033-019-05173-z.
8. Cheng Y, Ma X, Zhou K, Humphreys MW, Zhang XQ. Phylogenetic analysis of *Festuca – Lolium* complex using SRAP markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2016;63(1):7–18. DOI: 10.1007/s10722-015-0324-5.
9. Roldán-Ruiz I, van Eeuwijk FA, Gilliland TJ, Dubreuil P, Dillmann C, Lallemant J, et al. A comparative study of molecular and morphological methods of describing relationships between perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) varieties. *Theoretical and Applied Genetics*. 2001;103(8):1138–1150. DOI: 10.1007/s001220100571.
10. Tanhuanpää P, Erkkilä M, Kalendar R, Schulman AH, Manninen O. Assessment of genetic diversity in Nordic timothy (*Phleum pratense* L.). *Hereditas*. 2016;153:5. DOI: 10.1186/s41065-016-0009-x.
11. Collard BCY, Mackill DJ. 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.
12. Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV. 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.
13. Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1983;1(4):19–21. DOI: 10.1007/BF02712670.
14. Klimenko IA, Kozlov NN, Kostenko SI, Shamustakimova AO, Mavlyutov YuM. *Identifikatsiya i pasportizatsiya sortov kormovykh trav (klevra lugovogo, lyutserny izmenchivoi, posevnoi i khmelevidnoi) na osnove DNK-markerov* [Identification and certification of forage grasses varieties (red clover, bastard alfalfa, common alfalfa and black medick alfalfa), based on DNA markers]. Moscow: Ugresha T; 2020. 35 p. Russian. DOI: 10.33814/978-5-6043194-9-9.

15. Amirmoradi B, Talebi R, Karami E. Comparison of genetic variation and differentiation among annual *Cicer* species using start codon targeted (SCoT) polymorphism, DAMD-PCR, and ISSR markers. *Plant Systematics and Evolution*. 2012;298(9):1679–1688. DOI: 10.1007/s00606-012-0669-6.
16. Jiang LF, Qi X, Zhang XQ, Huang LK, Ma X, Xie WG. 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.
17. 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.
18. Safari H, Zebarjadi A, Kahrizi D, Jafari AA. 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.
19. Kondratskaya IP, Yukhimuk AN, Stolepchenko VA, Chizhik OV, Kozlovskaya ZG, Vasko PP, et al. The creating of inter-genetic hybrids of *Festulolium* of *Festuca arundinacea* morphotype with the use of post-genomic technologies and DNA-marking. In: Kunakh VA, Drobyk NM, Azizov IV, Andreev IO, Atanasov A, Blume YaB, et al., editors. *Factors in experimental evolution of organisms. Volume 25*. Kyiv: M. I. Vavilov Society of Geneticists and Breeders of Ukraine; 2019. p. 253–259. Russian. DOI: 10.7124/FEEO.v25.1172.
20. Peakall R, Smouse PE. *GenAlEx 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.
21. Perrier X, Jacquemoud-Collet JP. *DARwin software* [Internet]. Paris: CIRAD; 2006 [cited 2022 June 7]. Available from: <https://darwin.cirad.fr/>.
22. Pritchard JK, 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.
23. Falush D, Stephens M, Pritchard JK. 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.
24. 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.
25. Earl DA, vonHoldt BM. *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.
26. Kondratskaya IP, Yukhimuk AN, Chizhik OV, Reshetnikov VN. [DNA markers as a means of assessing the genetic diversity and identification of grasses]. In: Demidchik VV, Smolich II, Padutov VE, Shashko AYU, editors. *Kletochnaya biologiya i biotekhnologiya rastenii. Tezisy dokladov III Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii; 24–27 maya 2022 g.; Minsk, Belarus'* [Plant cell biology and biotechnology. Abstracts of the 3rd International scientific and practical conference; 2022 May 24–27; Minsk, Belarus]. Minsk: Belarusian State University; 2022. p. 70. Russian.
27. Pivorienė O, Pašakinskienė I. Genetic diversity assessment in perennial ryegrass and *Festulolium* by ISSR fingerprinting. *Zemdirbyste-Agriculture*. 2008;95(2):125–133.
28. Fu Kaixin, Guo Zhihui, Zhang Xinquan, Fan Yan, Wu Wendan, Li Daxu, et al. Insight into the genetic variability analysis and cultivar identification of tall fescue by using SSR markers. *Hereditas*. 2016;153:9. DOI: 10.1186/s41065-016-0013-1.
29. Zolotarev VN. Economic and biological characteristics festulolium varieties Fest and features cultivation. *Adaptive Fodder Production*. 2022;2:35–48. Russian.
30. Trukhan OV. The development of red fescue seed production. *Adaptive Fodder Production*. 2016;2:71–79. Russian.
31. Zolotarev VN, Perepravo NI. [Distinctive features of varieties of fescue-ryegrass hybrids when cultivated for seeds]. In: *Novye i netraditsionnye rasteniya i perspektivy ikh ispol'zovaniya. Materialy XII Mezhdunarodnoi konferentsii; 6–10 iyunya 2016 g.; Yalta, Rossiya* [New and non-traditional plants and prospects for their use. Proceedings of the 12th International conference; 2016 June 6–10; Yalta, Russia]. Moscow: RUDN University; 2016. p. 314–317. Russian.
32. Perepravo NI, Kosolapov VM, Ryabova VE, Zolotarev VN, Karpin VI, Lebedeva NN, et al. *Vozdelyvanie i ispol'zovanie novoi kormovoi kul'tury – festuloliuma – na korm i semena* [Cultivation and use of a new forage crop – festulolium – for fodder and seeds]. Moscow: Publishing House of the Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy; 2012. 28 p. Russian.