

УДК 577.22: 577.088

**МИКРОСАТЕЛЛИТНОЕ ГЕНОТИПИРОВАНИЕ СОРТОВ КЛЕВЕРА ЛУГОВОГО И ЛЮЦЕРНЫ СЕЛЕКЦИИ ВНИИ КОРМОВ ИМ. В.Р. ВИЛЬЯМСА**

***И.А. Клименко, А.О. Шамустакимова, Н.В. Капустина, М.А. Макаренко***

*ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса, Лобня Московской обл., Россия*

В Государственном реестре селекционных достижений РФ зарегистрировано 150 сортов кормовых культур селекции ВНИИ кормов, что составляет около 14 % от всех районированных на территории России. Сорт в современном кормопроизводстве определяет решение многих экологических и экономических проблем, является основой формирования отбора ценных генотипов для использования в селекционных программах. Быстрое развитие селекции и появление ежегодно большого количества новых сортов растений обуславливает необходимость применения надежной системы маркирования для контроля подлинности и генетической однородности материала, охраны интеллектуальной собственности селекционеров. В последние годы эти задачи успешно решаются внедрением в практику современных биотехнологических подходов, основанных на изучении генетической изменчивости с помощью ДНК-маркеров.

Молекулярные методы идентификации сортов растений основаны на определении длины фрагмента ДНК в отдельном участке хромосом. Количество таких участков в геноме велико, поэтому возможности метода неограниченны при условии выбора наиболее информативных и удобных для анализа молекулярных маркеров. Чаще всего при изучении биоразнообразия растительных видов, популяций, отдельных генотипов используют микросателлиты – монолокусные ДНК-маркеры, которые характеризуются высокой частотой распределения по геному и кодоминантным типом наследования [1].

**Цель работы** – оценка ДНК-полиморфизма сортов клевера лугового и люцерны на основе анализа микросателлитов и определении набора генетических маркеров для межсортовой дифференциации.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследований служили 6 сортов клевера лугового – Ранний 2, Марс, ВИК 77, Топаз, Трио, Метеор – и 6 сортов люцерны – Соната, перспективный сортообразец А2, Находка, Мира, Агния, Пастбищная 88 – селекции ВНИИ кормов им. В.Р. Вильямса.

Геномную ДНК для ПЦР выделяли, руководствуясь методикой, известной под названием балк-анализ [2; 3]. Для этого от каждого сорта формировали общую навеску из 30 проростков семян, предварительно проскарифицированных и выращенных в чашках Петри в течение 7 дней. ДНК-экстракцию провели с использованием реагентов из коммерческого набора «ДНК-Экстран-4» от компании «Синтол» (Россия) по инструкции производителя с некоторыми модификациями. В частности, лизирующий буфер готовили в соответствии с протоколом SDS-метода из расчета на вес пробы растительной ткани для каждого индивидуального образца.

Оценка ДНК-полиморфизма проведена с использованием 6 микросателлитных (SSR) праймеров, разработанных ранее для изучения генома клевера лугового [4; 5]. Праймеры синтезированы в компании «Евроген» (Россия). Амплификация была выполнена в термоциклере «Bio-Rad iCycler» (США) в соответствии с условиями, описанными в вышеуказанных литературных источниках.

Полученные ПЦР-продукты разделяли путем электрофореза в 4 % агарозном геле («MetaPhor<sup>R</sup> Agarose», США) в присутствии бромистого этидия. Для определения размера фрагментов ДНК использовали маркер молекулярной массы 20 bp DNA Ladder («Takara BIO Inc.», Япония).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В серии ПЦР с большей частью испытанных праймеров получены фрагменты амплифицированной ДНК разного размера и интенсивности, за исключением RCS1640, амплификация с которым была слабовыраженной и невоспроизводимой в повторных экспериментах на изучаемых культурах. Для статистической обработки отбирали наиболее отчетливые и воспроизводимые бэнды (полоски фрагментов амплифицированной ДНК). Индекс информативности праймеров и показатели, характеризующие генетическое разнообразие изучаемого материала, определяли с помощью специализированных компьютерных программ «Microsatellite toolkit» и «GelAnalyzer» (табл. 1).

Таблица 1. Полиморфизм SSR-локусов, полученных при анализе сортов клевера лугового и люцерны селекции ВНИИ кормов им. В.Р. Вильямса

Локус	Число аллелей		Размер аллелей, п.н.		He		PIC	
	сорта клевера лугового	сорта люцерны	сорта клевера лугового	сорта люцерны	сорта клевера лугового	сорта люцерны	сорта клевера лугового	сорта люцерны
RCS1307 (Sato et al., 2003)	3	5	149–159	104–140	0,747	0,867	0,641	0,745
RCS3711 (Sato et al., 2003)	5	4	147–153	157–162	0,835	0,788	0,740	0,671
RCS3095 (Sato et al., 2003)	12	-	207–224	-	0,923	-	0,842	-
RCS0033 (Sato et al., 2003)	-	6	-	132–138	-	0,848	-	0,744
TPSSR16 (Kölliker et al., 2006)	-	7	-	180–216	-	0,924	-	0,828
RCS1640 (Sato et al., 2003)	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: PIC – polymorphism information content (индекс информативности маркера), He – ожидаемая гетерозиготность