

УДК 633.575.22

## ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ КОРМОВЫХ КУЛЬТУР С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ДНК-МАРКЕРОВ

**И.А. Клименко**, кандидат сельскохозяйственных наук  
**Н.Н. Козлов**, кандидат сельскохозяйственных наук  
**А.О. Шамустакимова**, научный сотрудник  
**В.А. Душкин**, младший научный сотрудник

*ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса»  
141055, Россия, Московская область, г. Лобня, ул. Научный городок, корп. 1  
[iaklimenko@mail.ru](mailto:iaklimenko@mail.ru)*

## INVESTIGATION OF FORAGE CROPS GENETIC DIVERSITY USING MOLECULAR DNA MARKERS

**I.A. Klimenko**, Candidate of Agricultural Sciences  
**N.N. Kozlov**, Candidate of Agricultural Sciences  
**A.O. Shamustakimova**, Researcher  
**V.A. Dushkin**, Junior Researcher

*Federal Williams Research Center of Forage Production and Agroecology  
141055, Russia, Moscow region, Lobnya, Nauchnyi gorodok str., k. 1  
[iaklimenko@mail.ru](mailto:iaklimenko@mail.ru)*

DOI 10.33814/AFP-2222-5366-2019-4-89-100

Рассматриваются важнейшие аспекты изучения генетической изменчивости популяций, сортов, образцов и форм дикорастущих и культивируемых кормовых растений. Указаны факторы, оказывающие негативное влияние на сохранение биоразнообразия кормовых многолетних трав в современных условиях, дана характеристика основных типов генетических маркеров, используемых для оценки этой группы растений. Основное внимание уделено роли молекулярных ДНК-маркеров, обсуждаются преимущества их применения в популяционной генетике и филогенетических исследованиях кормовых культур, отличающихся большой вариабельностью признаков и свойств, сложностью генетической системы и высокой степенью пластичности. Последнее поколение генетических маркеров — ДНК-маркеры — позволяет провести объективную и точную оценку генетической изменчивости, способствует ускорению селекционного процесса, создает возможности для идентификации и молекулярно-генетической паспортизации селекционных достижений.

**Ключевые слова:** биоразнообразие, генетическая изменчивость, ДНК-полиморфизм, молекулярные ДНК-маркеры, генотипирование, селекционные программы.

Genetic diversity is the precondition for any selection program. The collection and exploitation of natural variation from ecotypes and landraces has played a vital role in the improvement of forage crops. The review is devoted to the most important aspects of studying the genetic variation in populations, cultivars,

samples and forms of wild and cultivated forage plants. The factors with negative impact on the biodiversity conservation have been determined. The main types of genetic markers that used for genetic resources of perennial grasses evaluation were described. Particular attention was focused on the role of molecular DNA markers for the population genetics and phylogenetic studies. The main advantages of DNA markers application for the forage crops, due of its great variability of traits and properties, the complexity of the genetic system and a high degree of plasticity of this group of plants, have been discussed. The latest generation of genetic DNA markers allows conducting the objective and accurate assessment of genetic diversity, provides selection process intensification, increases the possibilities for identification and molecular-genetic certification of the selection achievements.

**Keywords:** biological diversity, genetic variation, DNA-polymorphism, molecular DNA markers, genotyping, breeding programs.

Сохранение биоразнообразия является одной из важнейших проблем современности, поскольку оно обеспечивает стабильность функционирования природных экосистем, их адаптационный потенциал и устойчивость к воздействию негативных факторов окружающей среды, служит предпосылкой любой селекционной программы. Наличие перспективного исходного материала с широким диапазоном признаков и свойств — необходимое условие для создания новых современных сортов растений с улучшенными хозяйственно ценными характеристиками.

В современных условиях на состояние генетических ресурсов существенное влияние оказывают различные виды деятельности человека, в том числе урбанизация и интенсивное развитие сельскохозяйственного производства [1]. Так, изменение структуры и площадей природных кормовых угодий за счет строительства дорог и иных сооружений ведет к изоляции и уменьшению числа и величины популяций, негативно отражается на составе и состоянии их компонентов [2]. В некоторых исследованиях указывается на снижение уровня биоразнообразия кормовых многолетних трав при внесении повышенных доз ми-

неральных удобрений и частой дефолиации растений [3].

К сужению внутривидового генетического разнообразия приводит также интенсификация селекционного процесса. В основе сортов, поставляемых на рынок ведущими селекционными фирмами, часто лежат немногие источники. Как правило, элитные сорта адаптированы к тем климатическим условиям и болезням тех регионов, где их создавали, и не всегда могут полностью реализовать свой потенциал в условиях с менее благоприятным климатом. Сорта, традиционно выращиваемые в конкретной климатической зоне, содержат генетические факторы, определяющие лучшую адаптационную способность. Выявление таких уникальных генотипов, адаптированных к местному климату — одна из важных задач селекционеров.

Для эффективного использования, поддержания и сохранения всей совокупности растительных ресурсов требуется тщательное и объективное изучение свойственной им генетической изменчивости, возникшей в результате отбора, мутации, генетического дрейфа или рекомбинаций генов. Эти события вызывают изменения в частоте генов и аллелей и проводят к эволюции популяций.

Традиционно для определения генетического разнообразия использовали морфологические отличия или маркеры, которые, в первую очередь, были сфокусированы на выявлении характеристик, представляющих хозяйственную ценность, таких как урожайность сухого вещества, кормовые достоинства растения, устойчивость к болезням и вредителям [4]. Однако уже сегодня накопленное разнообразие сортов не поддается описанию с использованием традиционных подходов в силу своих масштабов. Даже опытным селекционерам не всегда удается различить материал, ориентируясь исключительно на морфологические признаки, число которых у культивируемых форм невелико. Например, у клевера их насчитывается около 15, а у люцерны — около 20, тогда как количество сортов, созданных путем реализации селекционных программ, продолжает расти [5]. При анализе кормовых культур использование морфологических маркеров осложняется также большой вариабельностью признаков и свойств этой группы растений, таких как однолетность/многолетность выращивания, различия в репродуктивном поведении, высокая степень пластичности, ведущая к значительным уровням взаимодействия генотипа и условий окружающей среды [6]. Кроме того, сорта кормовых культур (многолетний райграс, люцерна, белый клевер и клевер луговой) часто похожи по морфологическим признакам, хотя и отличаются высокой генетической гетерогенностью [7]. Нередко проявление морфологических маркеров зависит от стадии онтогенеза и генетического фона, для многих из них характерно плейотропное действие. По

этим причинам селекция, основанная на применении морфологических маркеров, является длительной, трудоемкой, зачастую требует повторных экспериментов в меняющихся условиях.

В настоящее время при изучении биоразнообразия широко используются молекулярные маркеры, позволяющие иметь тест-системы на уровне генетического материала клетки. Гомологичные последовательности ДНК у различных индивидов могут различаться по одному или нескольким основаниям в результате точечных мутаций, вставок, делеций или инверсий. Такие последовательности ДНК называются полиморфными, а само явление гетерогенности нуклеотидного состава гомологичных последовательностей — ДНК-полиморфизмом. Число генерированных ДНК-маркеров практически неограниченно, проявление их нейтрально по отношению к фенотипу, не является тканеспецифичным и не зависит от воздействия факторов окружающей среды; обнаружить их можно на любой стадии развития растений. Молекулярные методы позволяют выявить скрытую изменчивость вида и увидеть отличия в тех областях генома, которые не имеют четко выраженного внешнего проявления.

Существует два основных методологических подхода к проблеме выявления полиморфизма геномов и маркирования полиморфных участков ДНК. Принципиальное различие технологий — в используемой системе детекции полиморфизма: расщепление геномной ДНК различными рестрикционными эндонуклеазами с последующей гибридизацией с мечеными зондами (полиморфизм длины рестрикционных фрагментов — ПДРФ)

или амплификация участков ДНК с помощью ДНК-полимеразы *in vitro* (методы на основе полимеразной цепной реакции — ПЦР).

Развитие ПЦР-технологии привело к созданию большого числа техник и систем маркирования, широко применяемых в популяционных или генетико-селекционных исследованиях. Для успешного решения поставленных задач молекулярные маркёры, по мнению ряда исследователей, должны отвечать определенным требованиям: селективно нейтральное поведение, кодоминантный характер наследования, высокий уровень полиморфизма и воспроизводимости результатов, оптимальная частота встречаемости в геноме по хромосомам [8]. На сегодняшний день не существует идеальных молекулярных маркёров, которые полностью соответствовали бы перечисленным показателям. Для каждой методики характерны определенные преимущества и недостатки, что и обуславливает их использование в зависимости от цели исследований и особенностей структуры изучаемого генома.

Применение современных маркерных систем развивается в двух направлениях. Это селекция с помощью маркёров (MAS — marker-assisted-selection) и ДНК-профилирование. MAS основана на использовании маркёров, сцепленных с локусами, участвующими в контроле генов различных заболеваний и главных генов количественных признаков. ДНК-профилирование предполагает использование маркерного локуса для оценки генетического разнообразия внутри и между естественными и синтетическими популяциями. Посредством молекулярного маркирования селекционер получа-

ет возможность на протяжении всей селекционной программы осуществлять контроль генетической системы популяции и фиксировать процессы, происходящие в ней: механическое засорение и переопыление, появление новых мутаций и т.п. ДНК-профилирование помогает выявить полиморфные участки в геноме и способствует решению ряда важных практических задач:

- 1) установление филогенетических взаимоотношений между культурными и дикорастущими видами — донорами ценных признаков;
- 2) оценка родительских генотипов и гибридов, подбор для скрещиваний генетически дивергентных пар;
- 3) выявление наличия или отсутствия аллеля, хромосомы, гена; интрогрессии сцепленных аллелей, контролируемых количественные признаки;
- 4) использование в молекулярной таксономии, для определения степени родства инбредных линий гибридов при эффекте гетерозиса;
- 5) применение в работе с мировыми генетическими ресурсами растений для регистрации и обеспечения их сохранности; охрана авторских прав на источники и формы из генетических коллекций;
- 6) идентификация сортов и генотипов в селекции, семеноводстве и семенном контроле.

В настоящее время известны различные модификации ПЦР-технологии в зависимости от природы используемых праймеров и способа идентификации полученных фрагментов амплифицированной ДНК. Одна из первых методик получила название RAPD (полиморфизм случайно амплифицированных фраг-

ментов ДНК); она оказалась незаменимой при анализе культур с низким уровнем полиморфизма, для растений с определенными трудностями выделения высококачественной ДНК, при отсутствии информации о сиквенсах и в тех случаях, когда исследовать геном другими методами длительно и дорого. RAPD-маркерная система является доминантной по типу наследования аллельных вариантов и мультилокусной по природе выявляемого полиморфизма. Такими же свойствами обладает технология AFLP — полиморфизм длины амплифицированных фрагментов. Это сложный метод, позволяющий определять генетические изменения, вызванные точечными мутациями в сайтах рестрикции или в участках отжига праймеров (присутствие или отсутствие продукта амплификации в спектре) и небольшими вставками-делециями внутри рестриционного фрагмента (изменение размера полосы в спектре). В сравнении с RAPD-методом AFLP-маркерная система отличается более высоким уровнем выявляемого полиморфизма.

Что касается кормовых культур, мультилокусные RAPD- и AFLP-маркеры применялись для анализа генетических вариаций в сортах и популяциях клевера лугового [9; 10]. На основе этих методов изучали ДНК-полиморфизм и проводили идентификацию сортообразцов и межвидовых гибридов многолетних злаковых трав [11; 12; 13; 14].

Полезным инструментом для скрининга биоразнообразия различных видов кормовых культур в последние годы стал метод микросателлитного анализа (SSR-маркирование). Микросателлиты состоят из участков ДНК длиной в 2–

6 пар оснований, распространенных в тандемных повторностях по всему эукариотическому геному, могут легко амплифицироваться в процессе ПЦР. Широкое использование SSR-маркерной системы для анализа кормовых многолетних трав обусловлено особенностями их генетической структуры. Большинство видов характеризуется высоким уровнем внутривидовой и межвидовой генетической гетерогенности, в результате чего при скрещивании индивидуальных генотипов можно наблюдать сегрегацию до четырех различных аллелей на один локус. Мультиаллельные кодоминантные SSR-маркеры наилучшим образом подходят для мониторинга наследственности множественных аллелей. Преимущества этого метода заключаются также в его доступности, простоте, высокой воспроизводимости результатов.

С помощью SSR-маркеров исследовали уровень генетической дифференциации между сортами и популяциями люцерны [15; 16], использовали их для выявления ДНК-полиморфизма между сортами многолетнего райграса [17; 18], при анализе биоразнообразия популяций овсяницы тростниковидной [19], при изучении межсортового полиморфизма клевера ползучего [20] и клевера лугового [21].

Работа по оптимизации технологии генотипирования кормовых культур на основе микросателлитного анализа продолжается. Необходимо, чтобы эта высокоэффективная методология позволяла осуществить скрининг большого количества растительных образцов с наименьшими затратами и высокой воспроизводимостью результатов.

ISSR-маркирование — один из наиболее современных и информативных подходов для выявления внутривидовой и межвидовой изменчивости, идентификации и паспортизации видов, популяций, сортов, линий и иногда индивидов [22]. Основан на сравнении полиморфизма длин фрагментов ДНК, находящихся между микросателлитными повторами. С применением ISSR-маркеров проведена оценка биоразнообразия генетических ресурсов ежи сборной [23], установлено филогенетическое родство локальных популяций лисохвоста лугового (*Alopecurus pratensis* L.) [24].

Метод с использованием SNP-маркеров (однонуклеотидный полиморфизм) позволяет выявить мутацию единственного основания между гомологичными фрагментами ДНК. Характеризуется высокой стабильностью и воспроизводимостью результатов — в большей степени, чем это свойственно другим маркерным системам, в том числе SSR- или AFLP-маркерам. Однако до настоящего момента технология остается достаточно затратной, так как для разработки SNP-маркеров необходимо широкомасштабное геномное секвенирование. По этой причине SNP-маркирование нечасто используется для анализа растительных геномов, хотя в последнее время такие работы стали появляться, в том числе и при изучении внутрисортовой генетической изменчивости кормовых культур, например, райграса многолетнего [25; 26].

Объективность и достоверность оценки генетического разнообразия популяции зависит не только от используемого для анализа молекулярно-генетического метода, но, в немалой

степени, и от репрезентативности выборки или количества анализируемых индивидуальностей от исследуемого объекта. Популяции перекрестноопыляемых видов, включая сорта, природные популяции или растения разных видов, обитающие в определенной экосистеме, состоят их множества различных генотипов и характеризуются высоким уровнем внутривидовой изменчивости. Следовательно, чем большее количество растений от популяции включено в исследование по оценке генетического разнообразия, тем выше вероятность охвата редких аллелей. Генотипы или аллели, встречающиеся с частотой не менее 10%, с большой долей вероятности будут определены при анализе выборки размером не менее 40 растений, тогда как для детекции аллелей, встречающихся с частотой 5%, необходимо проанализировать не менее 100 растений [27]. Чтобы провести оценку внутривидовой и межвидовой генетической изменчивости таких видов, как клевер луговой, выборку формируют, как правило, из не менее 25 растений на популяцию, в результате до 90% повышается вероятность учета аллелей, встречающихся в популяции с частотой 10% [28]. Однако на практике анализ большого числа индивидуальностей является дорогостоящим и трудоемким процессом. Эффективным подходом, позволяющим генотипировать перекрестноопыляемые культуры с наименьшими усилиями, является «балк-стратегия», когда растительный материал или ДНК нескольких разных растений большого пула объединяют в один смешанный образец для анализа [29]. Недостаток метода — неизбежная потеря

редких аллелей, встречающихся у изучаемых генотипов [30; 31], хотя, с другой стороны, балк-образец должен аккумулировать все специфические маркеры, характерные для данной популяции. В любом случае диапазон ограничений детекции аллелей зависит от сиквенса и комбинации используемых праймеров и биологии оцениваемого вида растений. Из литературных источников на сегодняшний день известно о нескольких работах по исследованию генетической изменчивости кормовых трав на основе балк-анализа: райграса многолетнего [26], клевера ползучего [30], клевера лугового [32; 33].

В связи с быстрым развитием селекции и появлением ежегодно большого количества новых сортов растений все более актуальной становится проблема их маркирования и паспортизации. В настоящее время регистрация сорта базируется на морфофизиологических различиях. Процесс такой идентификации является длительным по времени и часто затруднительным из-за невозможности разграничить генетические признаки и морфозы, вызванные влиянием окружающей среды. Сортная идентификация может быть точно выполнена на основе данных ДНК-фингерпринтинга — различения индивидуальных характеристик растения с помощью ДНК-маркеров, — особенно для материала, который характеризуется высоким уровнем генетической изменчивости между сортами и отсутствием изменчивости в пределах сортов. Полученные уникальные ДНК-профили изучаемого образца позволяют разработать, так называемый, генетический паспорт линий и сортов сельскохозяйственных культур. Уже сегодня гене-

тическая паспортизация с помощью ДНК-маркеров принята в ряде стран. Для отечественных сортов подобные «паспорта» существуют лишь для небольшого спектра культур, например, для сортов пшеницы, ячменя, гороха, рапса, свеклы.

Для кормовых трав на сегодняшний день нет единых универсальных методов сортной ДНК-идентификации, как нет и единого мнения относительно выбора типа молекулярных маркеров, которые могут быть применены для этих целей, их количества и уровня информативности. Это связано, в частности, с недостатком знаний о генетическом разнообразии сортов, возделываемых в разных странах, уровне полиморфизма отдельных областей генома различных видов. Применяемые технологии генотипирования, очевидно, нуждаются в оптимизации с учетом сложности генетической системы и морфофизиологических особенностей этой группы растений. Особенно актуальным является разработка и использование для анализа кормовых культур молекулярных маркеров нового поколения, прямо связанных с функциональными характеристиками и имеющими корреляции с разнообразием морфофизиологических признаков [4; 26; 34].

В ближайшие годы предстоит огромная работа по идентификации молекулярных маркеров, то есть выявлению соответствия участка ДНК тому или иному морфологическому признаку или физиологическому процессу, а также по идентификации и молекулярно-генетической паспортизации видов, сортов, образцов. Успешное решение этих задач позволит значительно повысить эффективность практической селекции в кормопроизводстве.

## Литература

1. Khlestkina E.K., Huang X.Q., Quenum F.J.-B., Chebotar S., Roder M., Borner A. Genetic diversity in cultivated plants – loss or stability? *Theor. Appl. Genet.*, 2004, 108: 1466–1472. DOI 10.1007/s00122-003-1572-x.
2. White, A., M.G.R. Cannell, and A.G. Friend, 2000: CO<sub>2</sub> stabilization, climate change and the terrestrial carbon sink. *Glob. Change Biol.*, 6, 817–833, DOI:10.1046/j.1365-2486.2000.00358.x.
3. Kölliker R., Stadelmann F.J., Reidy B., Nösberger J. Fertilization and defoliation frequency affect genetic variability of *Festuca pratensis* Huds. in permanent grasslands. *Mol. Ecol.*, 1998, 7: 1757–1768.
4. 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*, 2007, 160: 189–205.
5. Forster, J.W., Jones, E.S., Kölliker R., Drayton, M.C., Dumsday, J.L., Dupal, M.P., Guthridge, K.M., Mahoney, N.L. Development and implementation of molecular markers for forage crop improvement. In: Spandenberg G. (ed.). *Molecular breeding of forage crops*, 2000, 101–133.
6. Clements, R.J., Hayward, M.D., Byth, D.E. Genetic adaptation in pasture plants. In: McIvor, J.G., Bray, R.A. (eds.). *Genetic Resources of Forage Plants*. CSIRO, Australia, 1983, 101–106.
7. Woodfield, D.R., Clifford, P.T.P., Baird, I.J., Cousins, G.R. Gene flow and estimated isolation requirements for transgenic white clover. In: Jones D.D. (ed.). *Proc. of the 3 International Symposium on the biosafety results of field tests of genetically modified plants and micro-organisms*. Oakland, University of California, 1995.
8. Хлесткина Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Т. 17. – № 4/2. – С. 1044–1054.
9. Kongkiatngam, P., Waterway, M.J., Coulman, B.E., and Fortin, M.G. Genetic variation among cultivars of red clover detected by RAPD markers amplified from bulk genomic DNA. *Euphytica*, 1996, 89: 355–361.
10. Близнюк А.М., Дугарь Ю.Н., Долгова Т.А., Попов В.Н. RAPD-анализ природных популяций клевера лугового (*Trifolium pratense* L.) // Вісник Харківського національного аграрного Університету. Сер. біологія, 2012, вип. 1 (25), с. 51–56.
11. Huff D.R. RAPD characterization of heterogenous perennial ryegrass cultivars. *Crop Science*, 1997, 37: 557–564.
12. Клименко И.А., Коровина В.Л., Козлов Н.Н. Использование RAPD-маркеров для идентификации сортообразцов и межвидовых гибридов кормовых культур // Многофункциональное адаптивное кормопроизводство : сб. науч. тр. – Москва, 2016. – С. 11–18.
13. Peng Y., Zhang X.-Q., Deng Y., Ma X. Evaluation of genetic diversity in wild orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) based on AFLP markers. *Hereditas*, 2008, 145: 174–181.
14. Mian M.A.R., Hopkins A.A., Zwonitzer J.C. Determination of genetic diversity in tall fescue with AFLP markers. *Crop Science*, 2002, 42: 944–950.
15. Sandrine Flajoulot, Joelle Ronfort, Pierre Baudouin, Philippe Barre, Thierry Huguet, Christian Huyghe, Bernadette Julier. Genetic diversity among alfalfa (*Medicago sativa*) cultivars coming from a breeding program, using SSR markers. *Theor. Appl. Genet.*, 2005, 111: 1420–1429. DOI 10.1007/s00122-005-0074-4.
16. Diwan, N. and Bhagwat, A.A., Buuchan, G.B. and Cregan, P.B. Simple Sequence repeat DNA markers in alfalfa and perennial and annual *Medicago* species. *Genome*, 1997, 40: 887–895.
17. Kubik C., Sawkins M., Meyer W.A., Gaut B.S. Genetic diversity in seven perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) cultivars based on SSR markers. *Crop Science*, 2001, 41: 1565–1572.

18. Wang J., Dobrowolski M.P., Cogan N.O.I., Forster J.W., Smith K.F. Assignment of individual genotypes to specific forage cultivars of perennial ryegrass based on SSR markers. *Crop Science*, 2009, 49: 49–58.
19. Mian M.A.R., Saha M.C., Hopkins A.A., Wang Z. Use of tall fescue EST-SSR markers in phylogenetic analysis of cool-season forage grasses. *Genome*, 2005, 48: 637–647.
20. George J., Dobrowolski M.P., van Zijll de Jong E., Cogan N.O.I., Smith K.F., Forster J.W. Assessment of genetic diversity in cultivars of white clover (*Trifolium repens* L.) detected by simple sequence repeat polymorphism. *Genome*, 2006, 49: 919–930.
21. Клименко И.А., Шамустакимова А.О., Капустина Н.В., Макаренков М.А. Микросателлитное генотипирование сортов клевера лугового и люцерны селекции ВНИИ кормов им. В.П. Вильямса // Актуальная биотехнология. – 2019. – № 3(30). – С. 180–182.
22. Gupta M., Chyi Y.S., Romero-Severson J., Owen J. L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theor. and Appl. Genet.*, 1994, vol. 89, pp. 998–1006.
23. Ахмедов Р.Б., Нам И.Я., Заякин В.В. Молекулярно-генетическое исследование локальных популяций *Alopecurus pratensis* L. (Poaceae) Брянской, Калужской и Смоленской областей // Бюллетень Брянского отделения РБО. – 2016. – № 1 (7). – С. 54–60.
24. Zeng B., Zhang X.-Q., Lan Y. Genetic diversity of *Dactylis glomerata* germplasm resources detected by intersimple sequence repeats (ISSR) molecular markers. *Hereditas (Beijing)*, 2006, 28: 1093–1100.
25. Ganai M.W., Altmann T., Roder M.S. SNP identification in crop plants. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2009, 12: 211–217.
26. Siyang Liu, ULF Feuerstein, Wilbert Luesink, Sabine Schulse, Torben Asp, Bruno Studer, Heiko C. Becker and Klaus J. Dehmer et al. DArT, SNP, and SSR analyses of genetic diversity in *Lolium perenne* L. using bulk sampling. *BMC Genetics*, 2018, 19: 10. DOI 10.1186/s12863-017-0589-0.
27. Crossa J. Methodologies for estimating the sample-size required for genetic conservation of outbreeding crops. *Theor. Appl. Genet.*, 1989, 77: 153–161.
28. Semerikov V.L., Belyaev A.Y., Lascoux M. The origin of Russian cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.) and their genetic relationships to wild populations in the Urals. *Theor. Appl. Genet.*, 2002, 106: 127–132.
29. Michelmore R.W., Paran I. and 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1991, 88: 9828–9832.
30. Kölliker R., Jones E.S., Jahufer M.Z., Forster J.W. Bulked AFLP analysis for the assessment of genetic diversity in white clover (*Trifolium repens* L.). *Euphytica*, 2001, 121: 305–315.
31. Greene S.L., Gritsenko M., Vandemark G. Relating morphologic and RAPD marker variation to collection site environment in wild populations of red clover (*Trifolium pratense* L.). *Genet. Resour. Crop Evol.*, 2004, 51: 643–653.
32. 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: 474–486.
33. Клименко И.А., Козлов Н.Н., Шамустакимова А.О. Изучение ДНК-полиморфизма сортов клевера лугового на основе микросателлитного анализа с целью их генетической паспортизации // Интеграция науки и высшего образования, как основа инновационного развития аграрного производства: материалы Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием. – Ярославль, 2019. – С. 73–74.

34. Sato S., Isobe S., Asamizu E., Ohmido N., Okumura K., Klimenko I., Sasamoto S., Wada T. and Tabata S. Comprehensive Structural Analysis of the Genome of Red Clover (*Trifolium pratense* L.). *DNA Research*, 2005, 12, 301–364.

## References

1. Khlestkina E.K., Huang X.Q., Quenum F.J.-B., Chebotar S., Roder M.S., Borner A. Genetic diversity in cultivated plants – loss or stability? *Theor. Appl. Genet.*, 2004, 108: 1466–1472. DOI 10.1007/s00122-003-1572-x.
2. White, A., M.G.R. Cannell, and A.G. Friend, 2000: CO<sub>2</sub> stabilization, climate change and the terrestrial carbon sink. *Glob. Change Biol.*, 6, 817–833, DOI:10.1046/j.1365-2486.2000.00358.x.
3. Kölliker R., Stadelmann F.J., Reidy B., Nösberger J. Fertilization and defoliation frequency affect genetic variability of *Festuca pratensis* Huds. in permanent grasslands. *Mol. Ecol.*, 1998, 7: 1757–1768.
4. 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*, 2007, 160: 189–205.
5. Forster, J.W., Jones, E.S., Kölliker R., Drayton, M.C., Dumsday, J.L., Dupal, M.P., Guthridge, K.M., Mahoney, N.L. Development and implementation of molecular markers for forage crop improvement. In: Spandenberg G. (ed.). *Molecular breeding of forage crops*, 2000, 101–133.
6. Clements, R.J., Hayward, M.D., Byth, D.E. Genetic adaptation in pasture plants. In: McIvor J.G., Bray, R.A. (eds.). *Genetic resources of Forage Plants*, CSIRO, Australia, 1983, 101–106.
7. Woodfield, D.R., Clifford, P.T.P., Baird, I.J., Cousins, G.R. Gene flow and estimated isolation requirements for transgenic white clover. In: Jones D.D. (ed.). *Proc. of the 3 International Symposium on the biosafety results of field tests of genetically modified plants and micro-organisms*. Oakland, University of California, 1995.
8. Khlestkina E.K. Molekulyarnye markery v geneticheskikh issledovaniyakh i v selektsii [Molecular markers in the genetic researches and breeding]. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i selektsii* [*Vavilov Journal of Genetics and Selection*], 2013, vol. 17, no. 4/2. pp. 1044–1054.
9. Kongkiatngam, P., Waterway, M.J., Coulman, B.E., and Fortin, M.G. Genetic variation among cultivars of red clover detected by RAPD markers amplified from bulk genomic DNA. *Euphytica*, 1996, 89: 355–361.
10. Bliznyuk A.M., Dugar Yu.N., Dolgova T.A., Popov V.N. RAPD-analiz prirodnykh populyatsiy klevera lugovogo (*Trifolium pratense* L.) [RAPD-analysis of natural populations of red clover (*Trifolium pratense* L.)]. *Visnik Kharkivskogo natsionalnogo agrarnogo Universitetu* [*Bulletin of Kharkov National Agricultural University. Ser. biologiya*], 2012, no. 1 (25), pp. 51–56.
11. Huff D.R. RAPD characterization of heterogenous perennial ryegrass cultivars. *Crop Science*, 1997, 37: 557–564.
12. Klimenko I.A., Korovina V.L., Kozlov N.N. Ispolzovanie RAPD-markerov dlya identifikatsii sortoobraztsov i mezhhvidovykh gibridov kormovykh kultur [Using of RAPD markers for identification of variety-samples and intra-species hybrids of forage crops]. *Mnogofunktsionalnoe adaptivnoe kormoproizvodstvo* [*Multifunctional adaptive fodder production : collection of scientific articles*]. Moscow, 2016, pp. 11–18.
13. Peng Y., Zhang X.-Q., Deng Y., Ma X. Evaluation of genetic diversity in wild orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) based on AFLP markers. *Hereditas*, 2008, 145: 174–181.
14. Mian M.A.R., Hopkins A.A., Zwonitzer J.C. Determination of genetic diversity in tall fescue with AFLP markers. *Crop Science*, 2002, 42: 944–950.
15. Sandrine Flajoulot, Joelle Ronfort, Pierre Baudouin, Philippe Barre, Thierry Huguet, Christian Huyghe, Bernadette Julier. Genetic diversity among alfalfa (*Medicago sativa*) cultivars coming from

- a breeding program, using SSR markers. *Theor. Appl. Genet.*, 2005, 111: 1420–1429. DOI 10.1007/s00122-005-0074-4.
16. Diwan N. and Bhagwat, A.A., Buuchan G.B. and Cregan, P.B. Simple Sequence repeat DNA markers in alfalfa and perennial and annual *Medicago* species. *Genome*, 1997, 40, 887–895.
  17. Kubik C., Sawkins M., Meyer W.A., Gaut B.S. Genetic diversity in seven perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) cultivars based on SSR markers. *Crop Science*, 2001, 41: 1565–1572.
  18. Wang J., Dobrowolski M.P., Cogan N.O.I., Forster J.W., Smith K.F. Assignment of individual genotypes to specific forage cultivars of perennial ryegrass based on SSR markers. *Crop Science*, 2009, 49: 49–58.
  19. Mian M.A.R., Saha M.C., Hopkins A.A., Wang Z. Use of tall fescue EST-SSR markers in phylogenetic analysis of cool-season forage grasses. *Genome*, 2005, 48: 637–647.
  20. George J., Dobrowolski M.P., van Zijll de Jong E., Cogan N.O.I., Smith K.F., Forster J.W. Assessment of genetic diversity in cultivars of white clover (*Trifolium repens* L.) detected by simple sequence repeat polymorphism. *Genome*, 2006, 49: 919–930.
  21. Klimenko I.A., Shamustakimova A.O., Kapustina N.V., Makarenkov M.A. Mikrosatellitnoe genotipirovnie sortov klevera lugovogo i lyutserny selektsii VNII kormov im. V.R. Vilyamsa [Microsatellite genotyping of red clover and alfalfa varieties of Williams Fodder Research Institute Breeding]. *Aktualnaya biotekhnologiya [Actual Biotechnology]*, 2019, no. 3 (30), pp. 180–182.
  22. Gupta M., Chyi Y.S., Romero-Severson J., Owen J. L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theor. and Appl. Genet.*, 1994, vol. 89, pp. 998–1006.
  23. Akhmedov R.B., Nam I.Ya., Zayakin V.V. Molekulyarno-geneticheskoe issledovanie lokalnykh populyatsiy *Alopecurus pratensis* L. (Poaceae) Bryanskoy, Kaluzhskoy i Smolenskoy oblastey [Molecular-genetic study of local populations of *Alopecurus pratensis* L. (Poaceae) in Bryansk, Kaluga and Smolensk regions]. *Byulleten Bryanskogo otdeleniya RBO [Bulletin of Bryansk department RBO]*, 2016, no. 1 (7), pp. 54–60.
  24. Zeng B., Zhang X.-Q., Lan Y. Genetic diversity of *Dactylis glomerata* germplasm resources detected by intersimple sequence repeats (ISSR) molecular markers. *Hereditas (Beijing)*, 2006, 28: 1093–1100.
  25. Ganal M.W., Altmann T., Roder M.S. SNP identification in crop plants. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2009, 12: 211–217.
  26. Siyang Liu, ULF Feuerstein, Wilbert Luesink, Sabine Schulse, Torben Asp, Bruno Studer, Heiko C. Becker and Klaus J. Dehmer et al. DArT, SNP, and SSR analyses of genetic diversity in *Lolium perenne* L. using bulk sampling. *BMC Genetics*, 2018, 19: 10. DOI 10.1186/s12863-017-0589-0.
  27. Crossa J. Methodologies for estimating the sample-size required for genetic conservation of outbreeding crops. *Theor. Appl. Genet.*, 1989, 77: 153–161.
  28. Semerikov V.L., Belyaev A.Y., Lascoux M. The origin of Russian cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.) and their genetic relationships to wild populations in the Urals. *Theor. Appl. Genet.*, 2002, 106: 127–132.
  29. Michelmore R.W., Paran I. and 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1991, 88: 9828–9832.
  30. Kölliker R., Jones E.S., Jahufer M.Z., Forster J.W. Bulked AFLP analysis for the assessment of genetic diversity in white clover (*Trifolium repens* L.). *Euphytica*, 2001, 121: 305–315.
  31. Greene S.L., Gritsenko M., Vandemark G. Relating morphologic and RAPD marker variation to collection site environment in wild populations of red clover (*Trifolium pratense* L.). *Genet. Resour. Crop Evol.*, 2004, 51: 643–653.

32. 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: 474–486.
33. Klimenko I.A., Kozlov N.N., Shamustakimova A.O. Izuchenie DNK-polimorfizma sortov klevera lugovogo na osnove mikrosatellitnogo analiza s tselyu ikh geneticheskoy pasportizatsii [The study of DNA-polymorphism of red clover varieties on the base of microsatellite analysis for molecular-genetic certification]. *Integratsiya nauki i vysshego obrazovaniya, kak osnova innovatsionnogo razvitiya agrarnogo proizvodstva* [The integration of science and higher education as the basis for the innovative development of agricultural production : Proceedings of All-Russian scientific-practical Conference with international participation]. Yaroslavl, 2019, pp. 73–74.
34. Sato S., Isobe S., Asamizu E., Ohmido N., Okumura K., Klimenko I., Sasamoto S., Wada T. and Tabata S. Comprehensive Structural Analysis of the Genome of Red Clover (*Trifolium pratense* L.). *DNA Research*, 2005, no. 12, pp. 301–364.