

УДК 631.523

DOI: 10.33814/AFP-2222-5366-2024-3-15-23

## ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ SRAP-МАРКЕРОВ ДЛЯ АНАЛИЗА КОРМОВЫХ БОБОВЫХ КУЛЬТУР

**В.А. Душкин**, научный сотрудник

ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса»

141055, Россия, Московская область, г. Лобня, ул. Научный городок, корп. 1

[va\\_dushkin@vniikormov.ru](mailto:va_dushkin@vniikormov.ru)

## ASSESSMENT OF SRAP MARKERS EFFECTIVENESS FOR ANALYSIS OF FORAGE LEGUME CROPS

**V.A. Dushkin**, Researcher

*Federal Williams Research Center of Forage Production and Agroecology*

*141055, Russia, Moscow region, Lobnya, Nauchnyi gorodok str., k. 1*

[va\\_dushkin@vniikormov.ru](mailto:va_dushkin@vniikormov.ru)

Проведен молекулярно-генетический анализ кормовых бобовых культур (клевера лугового, люпина разных видов, лядвенца рогатого и Крылова) с применением 31 комбинации SRAP-маркеров. Для каждой культуры подобраны наборы информативных праймеров для оценки генетического разнообразия. Определены показатели, отражающие межвидовой и межсортовой полиморфизм ДНК: эффективное количество аллелей, индекс генетического разнообразия по Нею, индекс Шеннона. На основании данных генотипирования построены дендрограммы генетического сходства с помощью методов UPGMA и анализа главных координат (PCoA), которые, большей частью, сгруппировали изучаемые образцы в соответствии с их происхождением. Значения PIC (показателя информативности праймеров) оказались высокими для всех изучаемых видов, с вариациями от 0,76 у клевера лугового, до 0,81 в коллекции люпина. Полученные результаты свидетельствуют об эффективности метода SRAP-маркирования для изучения генетической структуры популяций разных видов бобовых трав и для оценки межсортовой генетической изменчивости; могут использоваться для улучшения селекционных программ по кормовым культурам.

**Ключевые слова:** кормовые бобовые культуры, молекулярно-генетический анализ, SRAP-маркеры, генетический полиморфизм, кластерный анализ.

Molecular and genetic analysis of forage legumes (red clover, different species of lupine, and bird's-foot trefoil) was conducted using 31 combinations of SRAP markers. The informative primers were selected for each plant species to assess the genetic diversity. Parameters of interspecies and inter-varietal DNA polymorphism were estimated: effective number of alleles, Nei's genetic diversity index and Shannon's index. Based on the genotyping data the dendrograms of genetic similarity were constructed using UPGMA method and PCoA-analysis. As a rule the samples were combined accordingly their origin. The values of PIC (polymorphism information content) indicator were high for every studied species with variations from 0.76 in red clover to 0.81 in lupine. The results obtained confirmed the SRAP-marking method effectiveness for the genetic structure analysis of legume grasses different species, as well as for inter-varietal genetic variability evaluation. The data can be used for legume crops breeding programs enhancing.

**Keywords:** forage legumes, molecular and genetic analysis, SRAP markers, genetic polymorphism, cluster analysis.

**Введение.** Семейство бобовых (*Fabaceae*) — одно из крупнейших в растительном царстве, включает более 19 тысяч видов, объединенных в 730 родов. Уникальной особенностью растений этого семейства является способность к симбиотическому взаимодействию с азотфиксирующими бактериями рода *Rhizobium*, которые обитают в клубеньках на корнях и накапливают атмосферный азот, повышая плодородие почвы [1].

Благодаря интенсивному развитию селекции, ежегодно отмечается увеличение числа новых сортов различных культур, что делает задачу идентификации материала особенно актуальной. В связи с этим поиск эффективных методов оценки генетического разнообразия является одной из ключевых задач. В последние годы для изучения генетических

различий между организмами активно применяется система SRAP-маркеров (Sequence-Related Amplified Polymorphism). Это метод, основанный на амплификации экзон-интронных участков генома с помощью двух праймеров с особой структурой (рис. 1). Первые 10–11 оснований с 5'-конца неспецифичны и служат для повышения эффективности связывания с ДНК-мишенью. В прямом праймере за основанием следует последовательность CCGG для амплификации экзона, а в обратном — AATT (для интронов). На 3'-штрихе конце праймеров — нуклеотиды, обеспечивающие связывание с определенными участками генома. Основания, не имеющие специфичности, называют «заполняющими», их последовательности должны меняться от праймера к праймеру [2].

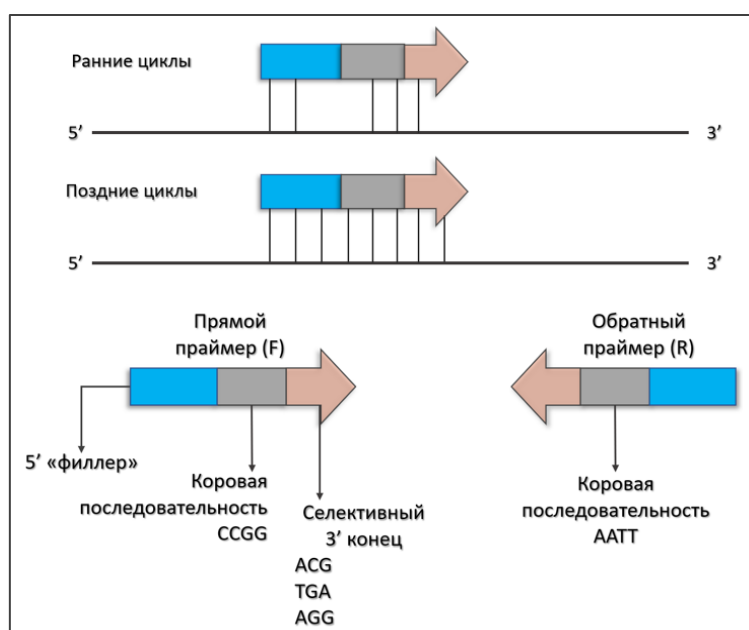


Рис. 1. Структура и схема работы SRAP-праймеров [3]

SRAP-маркеры широко применяются для выявления генетического полиморфизма у гибридов различных видов [4] и для изучения генетического разнообра-

зия, а также при создании генетических карт [5]. В работе Wei B. с соавторами показано, что SRAP-праймеры генерируют меньшее количество амплифици-

рованных фрагментов ДНК по сравнению с AFLP (187 против 353), но при этом отличаются повышенной информативностью и позволяют выявить больше сортоспецифичных продуктов амплификации (77,1% против 64,6%) [6].

Цель настоящих исследований состояла в изучении возможности использования SRAP-маркерной системы для оценки ДНК-полиморфизма разных видов бобовых культур.

**Материалы и методы.** Объектами исследования служили 16 образцов клевера лугового (*Trifolium pratense* L.), 10 сортов и сортообразцов лядвенца рога-того (*Lotus corniculatus* L.) и лядвенца Крылова (*Lotus krylovii* Schischk. et Serg L.), а также 25 образцов люпина трех видов (*Lupinus albus*, *angustifolius*, *luteus* L.).

Для получения геномной ДНК использовали модифицированный SDS-метод [7]. Суммарная навеска состояла из 30 семидневных проростков на сорт («балк-образец»). Количественные показатели определяли спектрофотометром Nabi («MicroDigital Co., Ltd.», Корея), а

качественные — с помощью агарозного электрофореза. Для анализа использовали образцы с конечной концентрацией 30 нг/мкл.

Амплификацию ДНК-проб провели в термоциклере «С1000 Thermal Cycler» («Bio-Rad», США) с использованием комбинаций SRAP-праймеров, сформированных из одиночных олигонуклеотидов (табл. 1).

Состав смеси для ПЦР подбирали экспериментальным путем; в общем объеме 20 мкл содержалось: 10×Taq-TurboBuffer — 3 мкл, 5UTaq-ДНК полимеразы — 0,4 мкл, 50×dNTPmix — 0,4 мкл, 30 нг/мкл геномной ДНК — 1 мкл, 10 мкМ праймеры — по 1 мкл каждого. Продукты ПЦР детектировали методом электрофореза в 1,6%-ном агарозном геле при 90 В в течение 90 минут.

Показатели генетической изменчивости рассчитывали с использованием ПО Image Lab v 6.0.1 («Bio-Rad Laboratories», США) и PopGene32 v 1.3.1 [8].

Температурные и временные режимы амплификации приведены в таблице 2.

### 1. Комбинации SRAP-праймеров, применяемых в анализе [2; 9]

Праймеры	F9	F10	F11	F13	ME1	ME3	Me4
R7	F9-R7	F10-R7	F11-R7	F13-R7	—	—	—
R8	F9-R8	F10-R8	F11-R8	F13-R8	—	—	—
R9	F9-R9	F10-R9	F11-R9	F13-R9	—	—	—
R14	F9-R14	F10-R14	F11-R14	F13-R14	—	—	—
EM1	—	—	—	—	ME1-EM1	ME3-EM1	Me4-EM1
EM2	—	—	—	—	ME1-EM2	ME3-EM2	Me4-EM2
EM3	—	—	—	—	ME1-EM3	ME3-EM3	Me4-EM3
EM4	—	—	—	—	ME1-EM4	ME3-EM4	Me4-EM4
EM5	—	—	—	—	ME1-EM5	ME3-EM5	Me4-EM5

## 2. Программа амплификации праймеров для SRAP-анализа [9]

Этапы и циклы ПЦР	Температура, °С	Время, мин	Количество циклов
Начальная денатурация	94	4	1
Денатурация	94	1	10
Отжиг праймеров	35	1	
Элонгация	72	1	
Денатурация	94	1	
Отжиг праймеров	50	1	30
Элонгация	72	1	
Конечная элонгация	72	5	
			1

### Результаты и обсуждение.

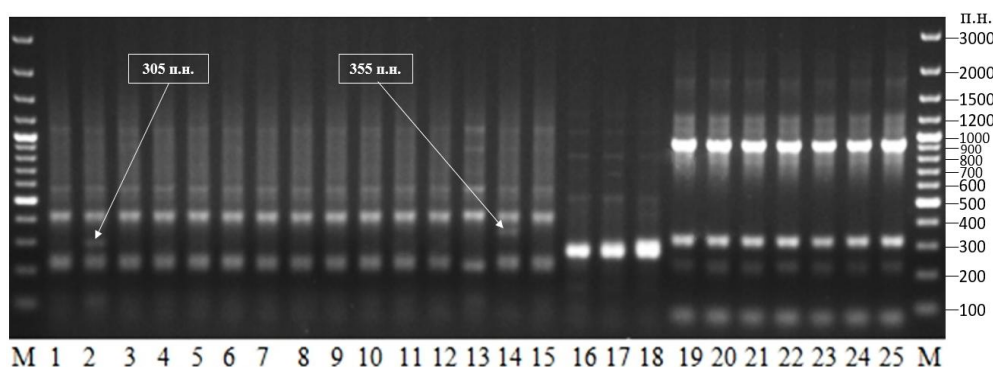
С использованием 16 одиночных SRAP-праймеров составили 31 комбинацию, каждая была испытана на разных бобовых культурах. Примеры результатов генотипирования с информативными

праймерами представлены на рисунках 2–3.

Для каждой культуры определен оптимальный набор SRAP-праймеров, обеспечивающий выявление генетического полиморфизма (табл. 3).

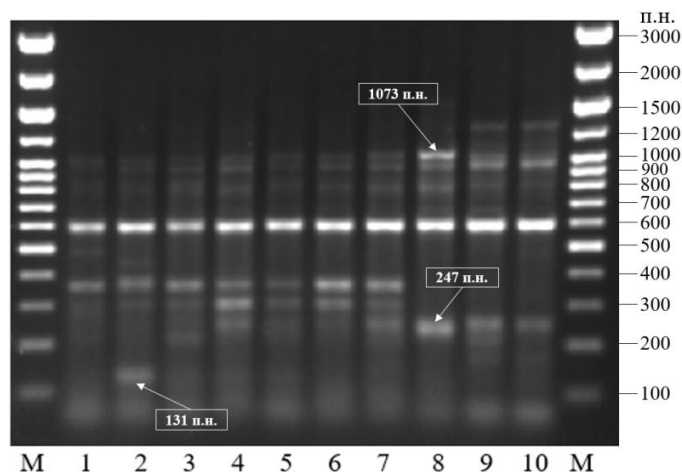
## 3. Информативные комбинации SRAP-маркеров для кормовых бобовых культур

Культура	Клевер	Люпин	Лядвенец	Люцерна [10]
Информативные SRAP-маркеры	F9-R9	ME1-EM2	F9-R14	F9-R9
	F10-R8	ME1-EM5	F11-R9	F9-R8
	F10-R9	ME3-EM1	F11-R14	F10-R7
	F9-R14	ME3-EM4	ME1-EM5	F10-R8
	Me4-EM1	Me4-EM1	ME3-EM3	F13-R9



**Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК образцов люпина разных видов с комбинацией SRAP-праймеров ME1-EM5**

1 – Мичуринский; 2 – Алый парус; 3 – Белый сидерат; 4 – Дега; 5 – Гамма; 6 – Тимирязевский; 7 – СН 17-14; 8 – СН 55-14; 9 – СН 8-12; 10 – СН 32-19; 11 – СН 5-19; 12 – Андромеда; 13 – СН 86-17 ДТ1; 14 – СН 90-17 ДТ1; 15 – СН 96-15 ДТ1; 16 – Булат; 17 – Антей; 18 – Алтын 4; 19 – Белорозовый 144; 20 – Эпигональ 1215; 21 – Сидерат 46; 22 – Куршавель; 23 – Деко 2; 24 – Ладный; 25 – Фазан. М – маркер-стандарт 100 bp («Thermo Fisher Scientific», США)



**Рис. 3. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК образцов лядвенца разных видов с комбинацией SRAP-праймеров ME3-EM3**

1 – Луч; 2 – Чепрасовский; 3 – Смоленский 1; 4 – Изумруд; 5 – Изис; 6 – Empire; 7 – Leo; 8 – Крылова Б-1; 9 – Крылова Г-1; 10 – Крылова Г-1С2. М – маркер молекулярной массы 100 bp («Biolab-mix», Россия)

В результате анализа люпина было идентифицировано семь уникальных продуктов у четырех сортов (Фазан, Алый парус, Куршавель, Ладный) и одной перспективной селекционной линии (СН 90-17 ДТ1), причем для сорта Фазан обнаружены специфичные ДНК-фрагменты с использованием нескольких сочетаний праймеров: ME1-EM2, ME3-EM4 и Me4-EM1.

При изучении лядвенца выявлены 11 уникальных продуктов ПЦР у шести образцов (Луч, Чепрасовский, Изумруд, Empire, Б-1, Г-1). Сорт Изумруд и образец Б-1 выделялись с двумя комбинациями праймеров: F9-R14, F11-R14 и ME1-EM5, ME3-EM3 соответственно.

У клевера лугового обнаружено 32 уникальных фрагмента амплифицированной ДНК для семи сортов: Трифон (отличался по трем комбинациям маркеров), Freedom, Ganymed, Ранний 2, Ветеран, Воронежский, Nemaro. Последние три сорта выделялись по двум разным

комбинациям SRAP-маркеров.

По результатам проведенных ранее в условиях нашей лаборатории исследований с применением SRAP-маркеров на люцерне разных видов [10] выявлены сортоспецифичные фрагменты амплификации и для 14 образцов этой культуры (см. табл. 3).

На основании данных ДНК-типирования с информативными комбинациями праймеров рассчитаны средние показатели генетической изменчивости (табл. 4).

Размеры ПЦР-продуктов варьировались от 100 до 1910 п.н. (пар нуклеотидов), эффективное число аллелей менялось в диапазоне от 1,20 у клевера до 1,50 у люпина. Минимальные значения индекса разнообразия по Нею и индекса Шеннона отмечены у клевера (0,14 и 0,25 соответственно), в то время как максимальные значения получены для лядвенца (индекс разнообразия 0,46) и люпина (индекс Шеннона 0,47).

#### 4. Средние показатели информативности комбинаций SRAP-праймеров, использованных для анализа образцов бобовых культур

Культура	Размер ПЦР-продуктов (п.н.)	Эффективное число аллелей ( $N_e$ )	Индекс генетического разнообразия по Нею ( $H_e$ )	Индекс Шеннона ( $I$ )	PIC (Polymorphism Information Content)
Люпин	103–1183	1,50	0,30	0,47	0,81
Лядвенец	121–1175	1,46	0,46	0,43	0,78
Клевер	100–1910	1,20	0,14	0,25	0,76

Показатель PIC (Polymorphism Information Content) характеризовался высокими значениями для всех изучаемых культур, минимальное — у клевера (0,76) и максимальное — у люпина (0,81). В то же время иранские ученые в 2011 г. при анализе люцерны определили более высокие значения показателей генетического разнообразия для люцерны: эффективное число аллелей составило 1,59, индекс генетического разнообразия был равен 0,35, а индекс Шеннона достиг 0,52 [11]. Однако показатель инфор-

мативности праймеров (PIC) в работе этого же автора составил 0,34, что заметно ниже значений, полученных в нашем исследовании [12].

На основе бинарных матриц были рассчитаны индексы генетического сходства и дистанции Нея для установления филогенетических связей между анализируемыми образцами. На рисунках 4 и 5 представлены примеры UPGMA-дендрограммы генетического сходства и результаты анализа методом главных координат (PCoA-анализ).

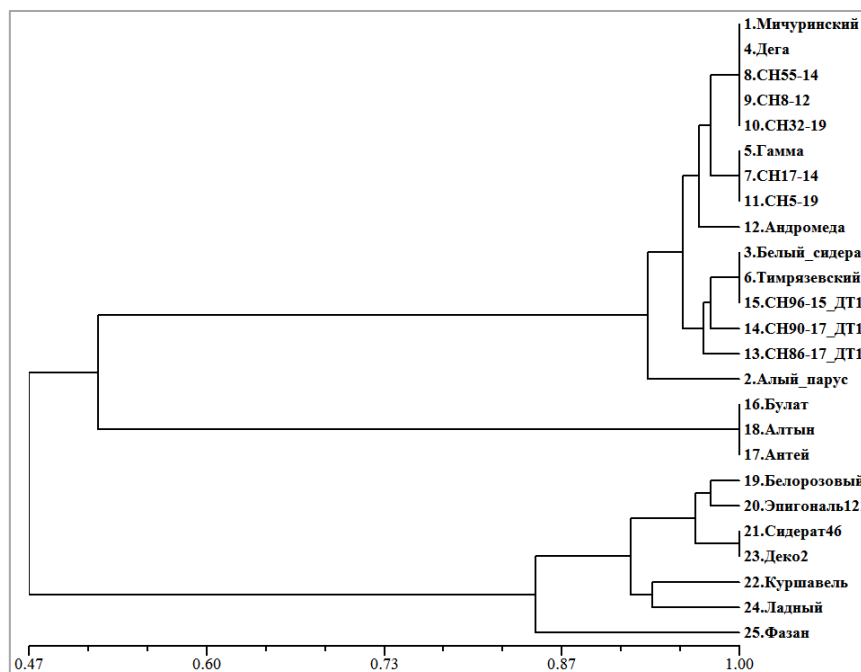


Рис. 4. UPGMA-дендрограммы генетического сходства между образцами люпина разных видов

В изучаемой коллекции выделялись три видовых кластера: белого, желтого и узколистного люпина.

Кластер белого люпина подразделялся на две основные группы: первая включала сорта Мичуринский, Дега, Гамма и пять перспективных селекционных линий (СН55-14, СН8-12, СН32-19, СН17-14, СН5-19); вторая — сорта Белый сидерат, Тимирязевский, Андромеда и три перспективные линии (СН96-15ДТ1, СН86-17 ДТ1, СН90-17 ДТ1). Сорт Алый парус выделился в отдельную группу.

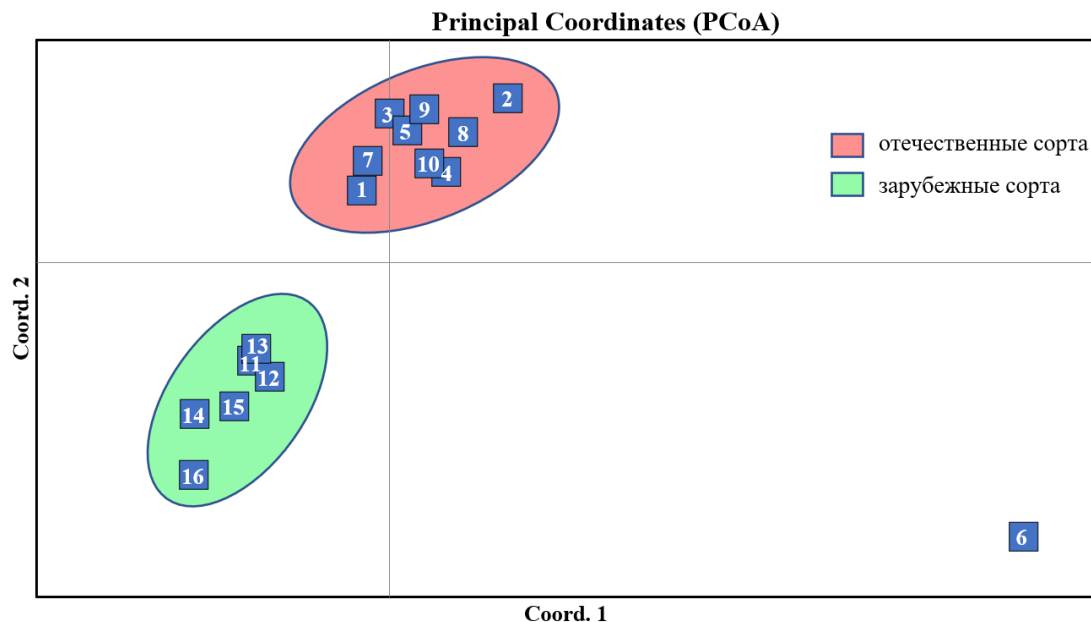
Образцы люпина желтого объединились в один кластер, включающий сорта Антей, Булат, Алтын.

Сорта узколистного люпина Белорозовый 144, Эпигональ 1215, Сидерат 46, Куршавель, Деко 2, Ладный характеризовались генетическим сходством, тогда

как сорт Фазан расположился в этом кластере на более удаленной генетической дистанции.

С использованием метода главных координат (РСоА) удалось разделить образцы клевера лугового на две большие группы: одна — из сортов отечественной селекции (Ранний 2, Трифон, Памяти Лисицына, Трио, Алтын, Пеликан, Тетра ВИК, ВИК 84, Воронежский), а вторая — иностранные сорта (Norlac, Freedom, Metis, Nemaro, Ganymed, Marathon). Сорт Ветеран расположился отдельно.

Таким образом, результаты кластеризации UPGMA-методом и данные РСоА-анализа позволили сформировать структурированные группы: у люпина — в соответствии с видовой принадлежностью, а у клевера лугового — в зависимости от происхождения.



**Рис. 5. Результаты РСоА-анализа сортов клевера лугового на основе данных генотипирования с использованием информативных SRAP-праймеров**

1 – Ранний 2; 2 – Трифон; 3 – Памяти Лисицына; 4 – Пеликан; 5 – Трио; 6 – Ветеран; 7 – Алтын; 8 – ВИК 84; 9 – Тетра ВИК; 10 – Воронежский; 11 – Norlac; 12 – Freedom; 13 – Ganymed; 14 – Metis; 15 – Nemaro; 16 – Marathon

**Заключение.** Результаты проведенных исследований показали высокую эффективность системы SRAP-маркирования для оценки генетического разнообразия разных видов кормовых бобовых культур. Определены высокие показатели информативности используемых праймеров (от 0,76 с образцами клевера лугового до 0,81 с образцами люпина разных видов); проведена оценка генетических связей в изучаемых коллекциях.

Установлено, что комбинации SRAP-маркеров F9-R9 и F10-R8 способны вы-

являть полиморфизм ДНК между сортами клевера лугового и люцерны. С использованием сочетания маркеров Me4 и EM1 можно идентифицировать сорта клевера лугового и люпина разных видов. Комбинация F9-R14 является универсальной для различения сортов внутри видов клевера лугового, лядвенца рогатого и Крылова. Полученная информация может использоваться в селекции и семеноводстве наиболее распространенных и хозяйственно значимых видов и сортов кормовых бобовых трав.

## Литература

1. Соловьева Ю.А., Соловьев А.В. Бобовые — основной источник обеспеченности животных растительным кормом // Состояние среды обитания и фауна охотничьих животных России и сопредельных территорий: Материалы III Международной, VIII Всероссийской Научно-практической конференции, Москва, 18–19 марта 2024 г. — М., 2024. — С. 122–127.
2. 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. Vol. 103. P. 455–461.
3. Pocza P., Varga I., Laos M., Cseh A., Bell N., Valkonen J. P., & Hyvönen J. Advances in plant gene-targeted and functional markers: a review. *Plant Methods*. 2013. Vol. 9. P. 1–32.
4. Hale A.L., Farnham M.W., Nzaramba M.N., & Kimbeng C.A. Heterosis for horticultural traits in broccoli. *Theoretical and Applied Genetics*. 2007. Vol. 115. P. 351–360.
5. Liu L.W., Gong Y.Q., Huang H., & Zhu X.W. Novel molecular marker systems-SRAP and TRAP and their application. *Yi Chuan = Hereditas*. 2004. Vol. 26, No. 5. P. 777–781.
6. Wei B., Cao L., Li S., Huang D., Cai G., & Lu X. Population structure of *Euodia rutaecarpa* in China revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP) and sequence-related amplified polymorphism (SRAP). *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011. Vol. 5, No. 30. P. 6628–6635.
7. Эффективный способ выделения ДНК для ПЦР-анализа из «балк-образцов» проростков / И.А. Клименко, А.А. Антонов, В.А. Душкин, А.О. Шамустакимова, Ю.М. Мавлютов // Адаптивное кормопроизводство. — 2021. — № 3. — С. 29–48.
8. Yeh F.C. POPGENE (version 1.3. 1): Microsoft window-based freeware for population genetic analysis [Electronic resource]. Available at: <http://www.ualberta.ca/~fyeh/>. — 1999.
9. Aneja B., Yadav N.R., Chawla V., & Yadav R.C. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) molecular marker system and its applications in crop improvement. *Molecular Breeding*. 2012. Vol. 30. P. 1635–1648.
10. Шамустакимова А.О., Мавлютов Ю.М., Клименко И.А. Применение SRAP-маркеров для ДНК-идентификации российских сортов люцерны // Генетика. — 2021. — Т. 57, № 5. — С. 536–543.
11. Talebi M., Hajiahmadi Z., Rahimmalek M. Genetic diversity and population structure of four Iranian alfalfa populations revealed by sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers. *Journal of Crop Science and Biotechnology*. 2011. Vol. 14. P. 173–178.
12. Castonguay Y., Cloutier J., Bertrand A., Michaud R., & Laberge S. SRAP polymorphisms associated with superior freezing tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* spp. *sativa*). *Theoretical and Applied Genetics*. 2010. Vol. 120. P. 1611–1619.



## References

1. Solovieva Yu.A., Soloviev A.V. Bobovye — osnovnoy istochnik obespechennosti zhivotnykh rastitel'nym kormom [Legumes are the main source of plant feed for animals]. *Sostoyaniye sredy obitaniya i fauna okhotnich'ikh zhivotnykh Rossii i sopredel'nykh territoriy: Materialy III Mezhdunarodnoy, VIII Vserossiyskoy Nauchno-prakticheskoy konferentsii, Moskva, 18–19 marta 2024 g.* [State of the habitat and fauna of game animals in Russia and adjacent territories: Proceedings of the III International, VIII All-Russian Scientific and Practical Conference, Moscow, March 18–19, 2024]. Moscow, 2024, pp. 122–127.
2. 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. Vol. 103. P. 455–461.
3. Poczai P., Varga I., Laos M., Cseh A., Bell N., Valkonen J.P., & Hyvönen J. Advances in plant gene-targeted and functional markers: a review. *Plant Methods*. 2013. Vol. 9. P. 1–32.
4. Hale A.L., Farnham M.W., Nzaramba M.N., & Kimbeng C.A. Heterosis for horticultural traits in broccoli. *Theoretical and Applied Genetics*. 2007. Vol. 115. P. 351–360.
5. Liu L.W., Gong Y.Q., Huang H., & Zhu X.W. Novel molecular marker systems-SRAP and TRAP and their application. *Yi Chuan = Hereditas*. 2004. Vol. 26, No. 5. P. 777–781.
6. Wei B., Cao L., Li S., Huang D., Cai G., & Lu X. Population structure of *Euodia rutaecarpa* in China revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP) and sequence-related amplified polymorphism (SRAP). *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011. Vol. 5, No. 30. P. 6628–6635.
7. Klimenko I.A., Antonov A.A., Dushkin V.A., Shamustakimova A.O., Mavlyutov Yu.M. Effektivnyy sposob vydeleniya DNK dlya PCR-analiza iz «balk-obraztsov» prorostrukov [Efficient method of DNA isolation from bulking samples of seedlings]. *Adaptivnoe kormoproizvodstvo [Adaptive fodder production]*, 2021, no. 3, pp. 29–48.
8. Yeh F.C. POPGENE (version 1.3. 1): Microsoft window-based freeware for population genetic analysis [Electronic resource]. Available at: <http://www.ualberta.ca/~fyeh/>. – 1999.
9. Aneja B., Yadav N.R., Chawla V., & Yadav R.C. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) molecular marker system and its applications in crop improvement. *Molecular Breeding*. 2012. Vol. 30. P. 1635–1648.
10. Shamustakimova A.O., Mavlyutov Yu.M., Klimenko I.A. Primenenie SRAP-markerov dlya DNK-identifikatsii rossiyskikh sortov lyutserny [Application of SRAP markers for DNA identification of Russian alfalfa varieties]. *Genetika [Genetics]*. 2021. T. 57, No. 5. P. 536–543.
11. Talebi M., Hajiahmadi Z., Rahimmalek M. Genetic diversity and population structure of four Iranian alfalfa populations revealed by sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers. *Journal of Crop Science and Biotechnology*. – 2011. – Vol. 14. – P. 173-178.
12. Castonguay Y., Cloutier J., Bertrand A., Michaud R., & Laberge S. SRAP polymorphisms associated with superior freezing tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* spp. *sativa*). *Theoretical and Applied Genetics*. 2010. Vol. 120. P. 1611–1619.