

УДК 631.523

DOI 10.33814/AFP-2222-5366-2025-3-6-13

ОСОБЕННОСТИ СОРТОВОЙ ДНК-ИДЕНТИФИКАЦИИ ОБРАЗЦОВ ЛЯДВЕНЦА РОГАТОГО (*Lotus corniculatus* L.)

В.А. Душкин, научный сотрудник
А.О. Шамустакимова, старший научный сотрудник
Э.С. Рекашус, старший научный сотрудник

ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса»
141055, Россия, Московская область, г. Лобня, ул. Научный городок, корп. 1
va_dushkin@vniikormov.ru

FEATURES OF VARIETAL DNA IDENTIFICATION IN *Lotus corniculatus* L. SAMPLES

V.A. Dushkin, Researcher
A.O. Shamustakimova, Senior Researcher
E.S. Rekashus, Senior Researcher

Federal Williams Research Center of Forage Production and Agroecology
141055, Russia, Moscow region, Lobnya, Nauchnyi gorodok str., k. 1
va_dushkin@vniikormov.ru

Проведена молекулярно-генетическая идентификация зашифрованных образцов лядвенца рогатого (*Lotus corniculatus* L.) с использованием маркерных систем iPBS (*Inter-Primer Binding Site*) и SRAP (*Sequence-Related Amplified Polymorphism*). Цель исследования заключалась в установлении соответствия этих образцов эталонным сортам Смоленский 1, Луч и Чепрасовский. В качестве объекта исследования использовалась коллекция, содержащая как известные сорта, так и зашифрованные образцы этих же сортов, но полученные в разные годы. Геномную ДНК выделяли из семидневных проростков, используя суммарную навеску 30 генотипов на сорт. После скрининга для анализа были отобраны три информативные комбинации SRAP-праймеров (ME3-EM3, F9-R14, F11-R14) и три iPBS-праймера (2217, 2257, 2239), выявляющие межсортной полиморфизм. Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в агарозном геле, а полученные бинарные матрицы анализировали методом главных координат (PCoA) в программе GenAlEx 6.5. Первые две координаты PCoA объяснили 57,44% общей молекулярной дисперсии. Результаты показали, что ДНК-профили зашифрованных образцов не образуют четких кластеров с эталонными сортами, что исключает их однозначную идентификацию. Наблюдаемые различия между биологическими повторностями известных сортов подтверждают генетический дрейф, характерный для перекрестноопыляемых культур, и обосновывают законодательное требование о периодическом обновлении генетических паспортов каждые три–пять лет для достоверной сортовой идентификации.

Ключевые слова: *Lotus corniculatus* L., генетическая идентификация, iPBS-маркеры, SRAP-маркеры, анализ главных координат.

This study focuses on molecular-genetic identification of encrypted samples of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) using Inter-Primer Binding Site (iPBS) and Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP) marker systems. The research aimed to verify whether the encrypted samples genetically match the reference varieties Smolensky 1, Luch, and Cheprasovsky. The analysis involved a collection of known reference samples and encrypted accessions of the same varieties but from different harvest years. Genomic DNA was isolated from seven-day-old seedlings using a pooled sample of 30 genotypes per variety. Following preliminary screening, three informative SRAP primer combinations (ME3-EM3, F9-R14, F11-R14) and three iPBS primers (2217, 2257, 2239) revealing interspecific polymorphism were selected for analysis. The PCR products were separated by agarose gel electrophoresis, and the resulting binary matrices were processed using principal coordinate analysis (PCoA) in GenAlEx 6.5. The first two PCoA coordinates explained 57.44% of the total molecular variance. The results demonstrated that the DNA profiles of the encrypted samples did not form clear clusters with the reference varieties, preventing their unambiguous identification. The observed genetic drift between biological replicates of the known varieties underscores the inherent variability in this cross-pollinating species and validates the legislative requirement for periodic updates of genetic reference passports every 3-5 years to ensure reliable cultivar identification.

Keywords: *Lotus corniculatus* L., genetic identification, iPBS markers, SRAP markers, principal coordinate analysis.

Введение. Лядвенец рогатый (*Lotus corniculatus* L.) — многолетнее бобовое растение высотой от 30 до 80 см, имеющее тонкие голые стебли и развитую стержневую корневую систему. Листья ланцетные или продолговатояйцевидные, опушение отсутствует. Период цветения длится с мая по октябрь, а размножение происходит преимущественно семенами, хотя и возможны вегетативные способы. Опыление осуществляется насекомыми, но не исключено самоопыление. Важной особенностью лядвенца, как и многих других бобовых, является его способность формировать долговременный запас семян в почве, сохраняющий всхожесть до 65 лет, что обеспечивает устойчивость популяции даже в неблагоприятных условиях [1].

Лядвенец обладает уникальной способностью к симбиотической азотфиксации, накапливая до 140 кг/га атмосферного азота, что полностью исключает необходимость применения минеральных азотных удобрений. Культура

отличается высокой адаптивностью: она успешно растет даже на бедных кислых почвах, включая участки с низким содержанием фосфора, где другие бобовые не дают хороших урожаев. Лядвенец устойчив к временному переувлажнению, засухе и морозам, что делает его ценным растением для рекультивации деградированных земель [2; 3].

Благодаря развитию молекулярно-генетических технологий у селекционеров появились новые возможности для отбора перспективных линий лядвенца рогатого. С использованием современных методов стало возможно достоверно верифицировать даже близкородственный генетический материал, что особенно важно для контроля подлинности сортов [4].

Цель текущего исследования заключалась в сортовой идентификации зашифрованных образцов лядвенца рогатого (*Lotus corniculatus* L.) с применением iPBS и SRAP маркерных систем.

Материалы и методы. Объектом исследования служила коллекция, состоящая из трех известных образцов (сорта Смоленский 1, Луч, Чепрасовский) и четырех зашифрованных (включая дополнительно сорт Иржа) (рис. 1).



Рис. 1. Проростки зашифрованных образцов, используемых в анализе

Коллекцию сформировали, подобрав для трех зашифрованных образцов парус-контроль в виде того же сорта, но другого года репродукции (табл. 1).

1. Сводная информация по годам урожая анализируемых образцов

Сорт, образец	Год урожая
Луч	2022
Чепрасовский	2019
Смоленский 1	2019
а.1	1996
а.2	2024
а.3	2024
а.4	2017

Геномную ДНК для анализа выделяли модифицированным SDS-методом из семидневных проростков [5]. Для каждого сорта использовали суммарную навеску растительной ткани, состоящую из 30 генотипов. Для повышения достоверности результатов известные образцы анализировались в трех биологических повторностях.

Для молекулярно-генетического анализа применяли 31 SRAP-комбинацию

и 10 одиночных iPBS-праймеров, взятых из литературных источников [6; 7; 8].

Реакционная смесь для ПЦР общим объемом 20 мкл содержала следующие компоненты: 3 мкл 10x Taq Turbo Buffer; 0,4 мкл 50x dNTP mix; 0,4 мкл Taq-ДНК-полимеразы (5U); 1 мкл геномной ДНК (30 нг/мкл), а также 0,5 мкМ праймера (для iPBS) или по 0,5 мкМ прямого и обратного праймеров (для SRAP).

Амплификацию проводили в термоциклере С-1000 («BioRad», США). Разделяли ПЦР-продукты с помощью электрофореза в 1,6%-ном агарозном геле (LE2, «Lonza», США). Размеры определяли в сравнении с маркером-стандартом Step 100 Long («Biolabmix», Россия). Документирование результатов проводили с помощью системы «Gel Doc™ XR+» (Bio-Rad, USA). Анализ методом главных координат (РCoA-анализ) был выполнен с использованием программного обеспечения GenAlEx v. 6.5 [9]. Индексы генетического сходства и дистанции Нея рассчитывали в программе PopGene.

Результаты и обсуждение. После предварительного скрининга из 31 комбинации SRAP-праймеров были отобраны три наиболее информативные (ME3-EM3, F9-R14 и F11-R14), ранее использованные нами для выявления генетического разнообразия и составления молекулярных формул [10]. При тестировании 10 одиночных iPBS также было определено три праймера (PBS 2217, PBS 2257, PBS 2239), выявляющих межсортовой полиморфизм. На рисунке 2 представлены показательные электрофореграммы с маркерными системами SRAP и iPBS.

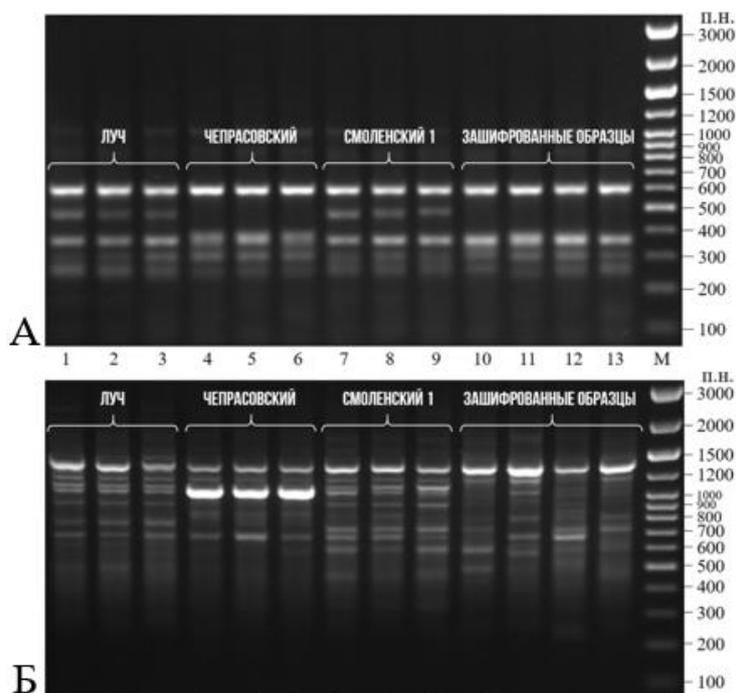


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР образцов лядвенца рогатого:
А – с комбинацией SRAP-праймеров ME3-EM3; Б – с единичным iPBS праймером PBS 2239

1–3 — Луч (балк-Л 1.1–1.3); 4–6 — Чепрасовский (балк-Ч. 1.1–1.3);
 7–9 — Смоленский 1 (балк-С 1.1–1.3); 10–13 – зашифрованные образцы (а.1-а.4),
 М — маркер молекулярной массы 100 bp «Biolabmix», Россия

Для того чтобы проанализировать полученный результат, необходимо привести расшифровку образцов и составить пару «контроль–образец», используя попарное сравнение бинарных матриц (табл. 2).

2. Попарное сравнение анализируемой коллекции на основании бинарных матриц

Известные образцы		Зашифрованные образцы		Количество различающих пар «контроль-образец» дескрипторов*		
				Биологическая повторность		
Сорт	Год урожая	Шифр	Год урожая	1	2	3
Луч	2022	a.3	2024	7 SRAP	7 SRAP	6 SRAP
				11 iPBS	11 iPBS	11 iPBS
Чепрасовский	2019	a.2	2024	6 SRAP	5 SRAP	5 SRAP
				9 iPBS	11 iPBS	13 iPBS
Смоленский 1	2019	a.1	1996	7 SRAP	8 SRAP	11 SRAP
				7 iPBS	8 iPBS	8 iPBS
Иржа	—	a.4	2017	—	—	—

*Количество полиморфных бэндов при попарном сравнении бинарных матриц контроля и зашифрованного образца

Исходя из данных таблицы 2, можно сделать вывод, что вне зависимости от года урожая сравниваемой пары профиль ДНК различается. При этом если общее число полиморфных бэндов при попарном сравнении варьировало от 14 до 19, то на iPBS систему приходилось большее число (от 9 до 13) для сортов Луч и Чепрасовский. Исключением стал сорт Смоленский 1, для которого iPBS система выявила меньшее число поли-

морфных бэндов в отличие от комбинаций SRAP-маркеров.

Из таблицы 2 также видно, что при анализе всех трех сортов наблюдаются вариации в ДНК-профилях биологических повторностей.

Для визуализации наблюдаемых различий на основе бинарных матриц, объединяющих данные по обоим маркерным системам, был проведен анализ главных координат (PCoA) (рис. 3).

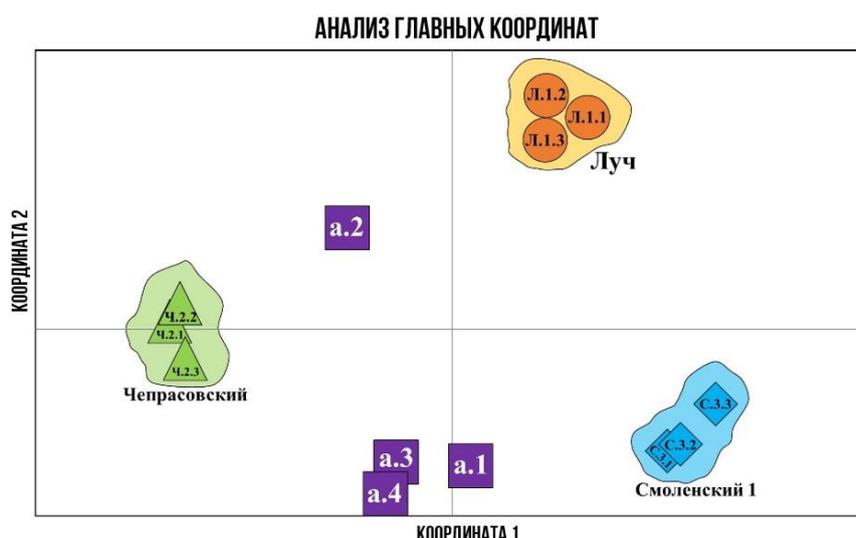


Рис. 3. PCoA-анализ генотипирования образцов лядвенца рогатого, проведенного с применением SRAP и iPBS маркеров

Л.1.1–Л.1.3 — Луч; Ч.2.1–Ч.2.3 — Чепрасовский; С.3.1–С.3.3 — Смоленский 1;
a.1–a.4 — зашифрованные образцы

На графике (рис. 3) наблюдаются три четких кластера (отмеченных цветом). При этом в биологических повторностях видны различия, которые позволяют отнести такой образец (1.1, 1.2 или 1.3) к тому или иному сорту. Зашифрованные образцы а.1, а.3 и а.4 не образуют четких кластеров с известными сортами, что исключает возможность их точной идентификации. Образец а.2 занимает промежуточное положение между сортами

Луч и Чепрасовский, что также не позволяет однозначно установить его принадлежность к сорту.

Поскольку метод анализа главных координат не позволил выявить сортовую принадлежность зашифрованных образцов, нами были определены дистанции Нея и индекс генетического сходства для выявления филогенетических отношений между образцами (табл. 3).

3. Индексы генетического сходства (над диагональю) и дистанции Нея (под диагональю)

Образец	Л.1.1	Л.1.2	Л.1.3	Ч.1.1	Ч.1.2	Ч.1.3	С.1.1	С.1.2	С.1.3	а.1	а.2	а.3	а.4
Л.1.1	***	0,9649	0,9123	0,5614	0,5965	0,5439	0,6842	0,7018	0,7018	0,6491	0,6491	0,6842	0,614
Л.1.2	0,0357	***	0,9123	0,5614	0,5965	0,5439	0,6842	0,6667	0,7018	0,614	0,6842	0,6491	0,5789
Л.1.3	0,0918	0,0918	***	0,5789	0,614	0,5614	0,7018	0,6842	0,7193	0,5965	0,6667	0,7018	0,5965
Ч.1.1	0,5773	0,5773	0,5465	***	0,9649	0,8772	0,5614	0,5439	0,5088	0,6316	0,7368	0,7368	0,6667
Ч.1.2	0,5167	0,5167	0,4877	0,0357	***	0,9123	0,5614	0,5789	0,5439	0,6316	0,7368	0,7368	0,7018
Ч.1.3	0,6091	0,6091	0,5773	0,5773	0,131	***	0,5439	0,5614	0,5263	0,614	0,6842	0,7544	0,6491
С.1.1	0,3795	0,3795	0,3542	0,5773	0,5773	0,6091	***	0,9123	0,8772	0,7544	0,6491	0,7544	0,6491
С.1.2	0,3542	0,4055	0,3795	0,6091	0,5465	0,5773	0,0918	***	0,8947	0,7018	0,6316	0,7368	0,7018
С.1.3	0,3542	0,3542	0,3295	0,6758	0,6091	0,6419	0,131	0,1112	***	0,6667	0,6316	0,7018	0,5965
а.1	0,4321	0,4877	0,5167	0,4595	0,4595	0,4877	0,2819	0,3542	0,4055	***	0,614	0,8246	0,8246
а.2	0,4321	0,3795	0,4055	0,3054	0,3054	0,3795	0,4321	0,4595	0,4595	0,4877	***	0,7193	0,614
а.3	0,3795	0,4321	0,3542	0,3054	0,3054	0,2819	0,2819	0,3054	0,3542	0,1929	0,3295	***	0,8246
а.4	0,4877	0,5465	0,5167	0,4055	0,3542	0,4321	0,4321	0,3542	0,5167	0,1929	0,4877	0,1929	***

Из таблицы 3 видно, что наиболее сходны между собой биологические повторности одного сорта (подсвечены красным сверху и темно-синим снизу). Индекс их генетического разнообразия варьировал от 0,8772 до 0,9649, при этом значения дистанций Нея между ними были минимальны (от 0,0357 до 0,1310). При сопоставлении данных, представленных в таблице, с данными РСoA также выявляется общее сходство зашифрованных образцов а.1, а.3 и а.4 между собой и их сильное отличие от образца под номером а.2. При попарном сравнении зашифрованных образцов с контрольными (отмечены коричневой, зеленой и синей рамками) выявлены следующие индексы генетического сходства:

0,6842–0,7018; 0,6842–0,7368; 0,6667–0,7544 для пар Луч–а.3, Чепрасовский–а.2 и Смоленский 1–а.1 соответственно. Дистанции Нея для таких пар находились в диапазоне от 0,2819 до 0,4320, превышая значения, полученные нами для биологических повторностей. Основываясь на анализе главных координат и анализе индексов генетического сходства, можно сделать вывод о генетической удаленности между зашифрованными и контрольными образцами.

Выводы. Проведенный генетический анализ не выявил соответствия между ДНК-профилями зашифрованных образцов и изученных эталонных сортов (Луч, Чепрасовский, Смоленский 1). Это может быть связано с естественными био-

логическими процессами, характерными для перекрестноопыляемых культур, таких как лядвенец рогатый. В соответствии с Федеральным законом от 30.12.2021 № 454-ФЗ для таких культур предусмотрено периодическое обновление генетических паспортов каждые три–пять лет, что обусловлено возможностью неконтролируемого переопыления в процессе репродукции. Данный

процесс закономерно приводит к генетическому дрейфу — изменению аллельных частот и модификации ДНК-профилей сортов со временем. Наблюдаемая вариабельность среди эталонных образцов подтверждает обоснованность законодательных требований и необходимость использования актуальных референсных данных для достоверной генетической идентификации сортов.

Литература

1. Баймиев А.Х., Сафиуллина И.М., Газеева И.И. Лядвенец рогатый – особенности биологии и экологии // Актуальные исследования. – 2021. – № 47. – С. 8.
2. Лядвенец рогатый (*Lotus corniculatus* L.) в органическом пастбищном хозяйстве / Н.Н. Лазарев, Е.М. Куренкова, О.В. Кухаренкова, А.А. Климов, С.А. Дикарёва, А.Ю. Бойцова // Кормопроизводство. – 2023. – № 1. – С. 3–11.
3. Золотарев В.Н. Эффективность применения удобрений на семенных травостоях лядвенца рогатого // Многофункциональное адаптивное кормопроизводство. – 2021. – С. 50–58. DOI: <https://doi.org/10.33814/МАК-2021-25-73-50-58>.
4. Кшникаткина А.Н., Еськин В.Н. Формирование высокопродуктивных агрофитоценозов лядвенца рогатого (*Lotus corniculatus*) // Нива Поволжья. – 2009. – № 1. – С. 22–28.
5. 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. – Т. 3. – № 47. – С. 29–48. DOI: <https://doi.org/10.33814/AFP-2222-5366-2021-3-29-48>.
6. Analysis of genetic diversity in legumes germplasm using retrotransposon based molecular markers / O.N. Khapilina, A.Z. Daniyarov, A.A. Amenov, A.P. Novakovskaya, A.S. Turzhanova, D.S. Tagimanova, N.I. Filipova, R.N. Kalendar // Eurasian Journal of Applied Biotechnology. – 2017. – № 2. – P. 26–34.
7. Li G., Quiros C. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica // Theor Appl Genet. – 2001. – Vol. 103. – P. 455–461. DOI: <https://doi.org/10.1007/s001220100570>.
8. Assessment of the genetic variation in alfalfa genotypes using SRAP markers for breeding purposes / H.B. Rhouma, K. Taski-Ajdukovic, N. Zitouna, D. Sdouga, D. Milic, N. Trifi-Farah // Chil J Agric Res. – 2017. – Vol. 77, № 4. – P. 332–339. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392017000400332>.
9. Peakall R., Smouse P. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // Molecular ecology notes. – 2006. – Vol. 6, № 1. – P. 288–295. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>.
10. Душкин В.А., Шамустакимова А.О. Молекулярно-генетический анализ лядвенца с помощью SRAP-маркерной системы // Генетические и радиационные технологии в сельском хозяйстве: сб. докладов III международной молодежной конференции, Обнинск, 23–24 октября 2024 года. – Обнинск : НИЦ «Курчатовский институт» – ВНИИРАЭ, 2024. – С. 37–39.

References

1. Baimiev A.Kh., Safiullina I.M., Gazeeva I.I. *Liadvenets rogatyi – osobennosti biologii i ekologii* [Lotus corniculatus – features of biology and ecology]. *Aktual'nye issledovaniia* [Current researches], 2021, no. 47. pp. 8.
2. Lazarev N.N., Kurenkova E.M., Kukharenkova O.V., Klimov A.A., Dikareva S.A., Boitsova A.Iu. *Liadvenets rogatyi (Lotus corniculatus L.) v organicheskom pastbishchnom khoziaistve* [Bird's-foot trefoil (Lotus corniculatus L.) in the system of organic grazing]. *Kormoproizvodstvo* [Forage production], 2023, no. 1, pp. 3–11.
3. Zolotarev V.N. *Effektivnost' primeneniia udobrenii na semennykh travostoianiakh liadventsia rogatogo* [Efficiency of fertilizer application on seed stands of birdsfoot trefoil]. *Mnogofunktional'noe adaptivnoe kormoproizvodstvo* [Multifunctional adaptive forage production], 2021, pp. 50–58. DOI: <https://doi.org/10.33814/MAK-2021-25-73-50-58>.
4. Kshnikatkina A.N., Eskin V.N. *Formirovanie vysokoproduktivnykh agrofitsenozov liadventsia rogatogo (Lotus corniculatus)* [Formation of highly productive agrophytocenoses of Bird's-foot trefoil]. *Niva Povolzh'ia* [Volga Region Farmland], 2009, no. 1, pp. 22–28.
5. Klimenko I.A., Antonov A.A., Dushkin V.A., Shamustakimova A.O., Mavliutov U.M. *Effektivnyi sposob vydeleniia DNK dlia PCR-analiza iz «balk-obraztsov» prorostkov* [Efficient method of DNA isolation from bulking samples of seedlings]. *Adaptivnoe kormoproizvodstvo* [Forage production], 2021, vol. 3, no. 47, pp. 29–48. DOI: <https://doi.org/10.33814/AFP-2222-5366-2021-3-29-48>.
6. Khapilina O.N., Daniyarov A.Z., Amenov A.A., Novakovskaya A.P., Turzhanova A.S., Tagimanova D.S., Filipova N.I., Kalendar R.N. Analysis of genetic diversity in legumes germplasm using retrotransposon based molecular markers. *Eurasian Journal of Applied Biotechnology*, 2017, no. 2, pp. 26–34.
7. Li G., Quiros C. 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, pp. 455–461. DOI: <https://doi.org/10.1007/s001220100570>.
8. Rhouma H.B., Taski-Ajdukovic K., Zitouna N., Sdouga D., Milic D., Trifi-Farah N. Assessment of the genetic variation in alfalfa genotypes using SRAP markers for breeding purposes. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 2017, vol. 77, no. 4, pp. 332–339. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392017000400332>.
9. Peakall R., Smouse P. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 2006, vol. 6, no. 1, pp. 288–295. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>.
10. Dushkin V.A., Shamustakimova A.O. *Molekuliarno-geneticheskii analiz liadventsia s pomoshch'iu SRAP-markernoi sistemy* [Molecular and genetic analysis of lotus using SRAP marker system]. In: *Geneticheskie i radiatsionnye tekhnologii v sel'skom khoziaistve: sb. dokladov III mezhdunarodnoi molodezhnoi konferentsii, Obninsk, 23–24 oktyabrya 2024 goda* [Genetic and radiation technologies in agriculture: collection of papers from the III International Youth Conference, Obninsk, October 23–24, 2024]. Obninsk: NITs "Kurchatovskii institut" – VNIIRAE Publ., 2024, pp. 37–39.