



ЛАБОРАТОРИЯ
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
КОРМОВЫХ КУЛЬТУР

PLANT GENE 2025

ПОИСК И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ДНК-МАРКЕРОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ПРИЗНАКОМ МНОГОЛИСТОЧКОВОСТИ У ЛЮЦЕРНЫ ИЗМЕНЧИВОЙ (*MEDICAGO VARIA MART*) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ SRAP-АНАЛИЗА

В.А. ДУШКИН^{1*}, А.О. ШАМУСТАКИМОВА¹

¹ ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР КОРМОПРОИЗВОДСТВА И АГРОЭКОЛОГИИ ИМЕНИ
В.Р. ВИЛЬЯМСА» (ФНЦ «ВИК ИМ. В.Р. ВИЛЬЯМСА»), ЛОБНЯ, РОССИЯ

SEARCH AND IDENTIFICATION OF DNA MARKERS ASSOCIATED WITH THE MULTI- LEAFLET TRAIT IN ALFALFA (*MEDICAGO VARIA MART*) USING SRAP ANALYSIS

V.A. DUSHKIN^{1*}, A.O. SHAMUSTAKIMOVA¹

¹ FEDERAL WILLIAMS RESEARCH CENTER OF FORAGE PRODUCTION & AGROECOLOGY, LOBNYA, RUSSIA

ВВЕДЕНИЕ

ЛЮЦЕРНА — многолетняя бобовая культура, отличающаяся высокой питательной ценностью. В её составе содержится значительное количество **белка** (15–20% от сухой массы), **витаминов**, а также **минеральных веществ**. Она широко используется для производства таких кормов, как **сено, сенаж, силос и травяная мука**. В последние годы повышенное внимание исследователей привлекают многолисточковые формы люцерны. В настоящий момент установлено, что на проявление признака у люцерны посевной (*MEDICAGO SATIVA L.*) могут влиять пять генов: *PALM1*, *KNOX*, *SPL*, *MSNAC39* и *REV*. Изучение этих генов, а также поиск новых механизмов открывает перспективы для селекции высокопродуктивных сортов с улучшенными кормовыми характеристиками и повышенной урожайностью. **Цель данного исследования** заключалась в поиске ДНК-маркеров, ассоциированных с признаком многолисточковости у перспективного селекционного материала люцерны изменчивой (*MEDICAGO VARIA MART.*).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

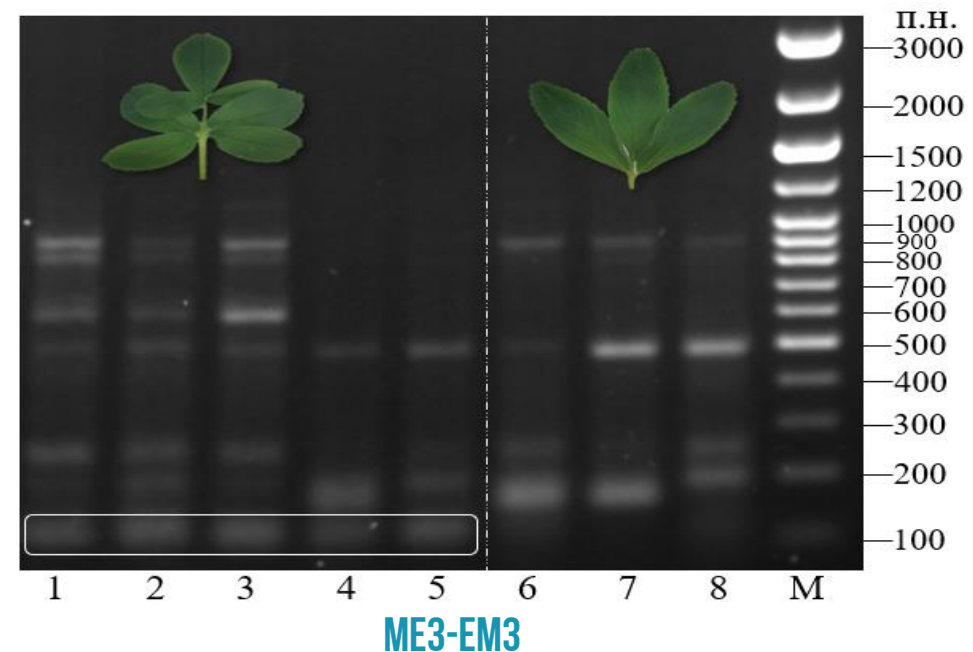
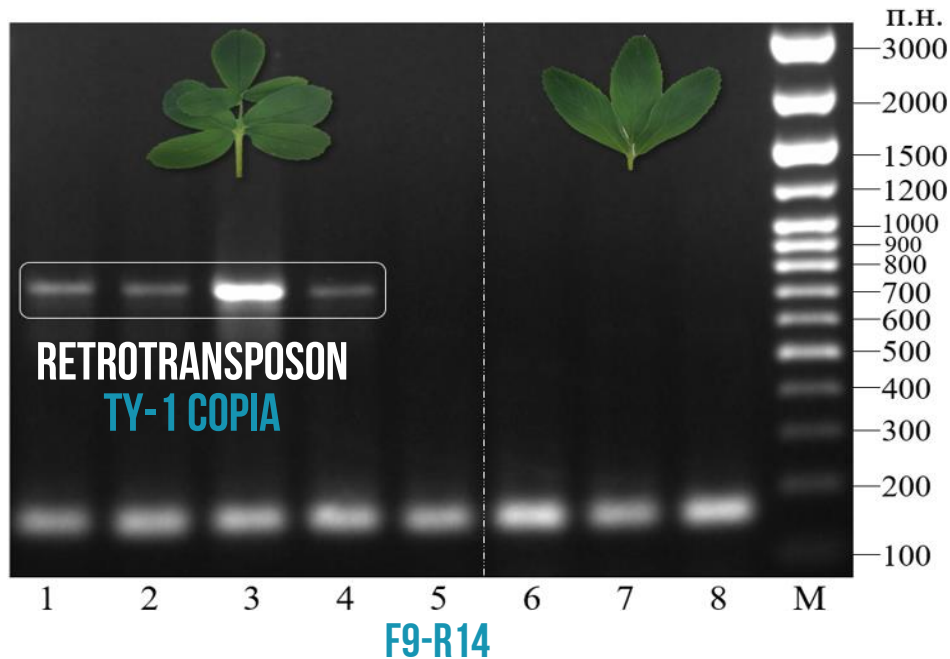
ДЛЯ АНАЛИЗА БЫЛА СФОРМИРОВАНА **КОНТРАСТНАЯ КОЛЛЕКЦИЯ**, ВКЛЮЧАЮЩАЯ ПЯТЬ МНОГОЛИСТОЧКОВЫХ ФОРМ И ТРИ ОБРАЗЦА С НОРМАЛЬНОЙ ФОРМОЙ ЛИСТА. ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ГЕНОМНОЙ ДНК ИСПОЛЬЗОВАЛИ **МОДИФИЦИРОВАННЫЙ SDS-МЕТОД**. НАВЕСКА СОСТОЯЛА ИЗ ЛИСТОВОЙ ТКАНИ ВЗРОСЛОГО РАСТЕНИЯ МАССОЙ 0,3 ГРАММА ДЛЯ КАЖДОГО ОБРАЗЦА. КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ОПРЕДЕЛЯЛИ СПЕКТРОФОТОМЕТРОМ NABI («**MICRODIGITAL CO., LTD.**», КОРЕЯ). ДЛЯ АНАЛИЗА ИСПОЛЬЗОВАЛИ ОБРАЗЦЫ С ФИНАЛЬНОЙ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ **30 НГ/МКЛ**. СОСТАВ СМЕСИ БЫЛ ПОДОБРАН ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ПУТЁМ. АМПЛИФИКАЦИЮ ОСУЩЕСТВЛЯЛИ В ТЕРМОЦИКЛЕРЕ «**T100 THERMAL CYCLER**» («**BIO-RAD**», США). ДЕТЕКЦИЮ ПРОДУКТОВ ПЦР ПРОВОДИЛИ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В **1,6%-НОМ АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ** В ТЕЧЕНИЕ 90 МИНУТ ПРИ 50 V. ДЕТЕКЦИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРОВОДИЛИ НА ПРИБОРЕ **GEL DOC™ XR+** («**BIO-RAD**», США). РАЗМЕРЫ АМПЛИКОНОВ В ИЗУЧАЕМЫХ КОЛЛЕКЦИЯХ РАССЧИТЫВАЛИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОГРАММЫ **IMAGE LAB V 6.0.1** (BIO-RAD LABORATORIES, США).

№ П.П.	НАЗВАНИЕ ОБРАЗЦА	СРЕДНЕЕ КОЛИЧЕСТВО ЛИСТОЧКОВ НА ЛИСТАХ
1	МНЛ-1	5,82
2	МНЛ-2	5,58
3	МНЛ-3	5,68
4	МНЛ-4	4,55
5	МНЛ-5	4,85
6	НФЛ-1	3,01
7	НФЛ-2	3,03
8	НФЛ-3	3,00



РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

С ПОМОЩЬЮ 16 ОДИНОЧНЫХ ПРАЙМЕРОВ БЫЛА СОСТАВЛЕНА 31 КОМБИНАЦИЯ, ИЗ КОТОРЫХ ДВЕ (F9-R14 И ME3-EM3) ПОКАЗАЛИ РАЗЛИЧИЯ МЕЖДУ ОБРАЗЦАМИ С МНОГОЛИСТОЧКОВОЙ И НОРМАЛЬНОЙ ФОРМОЙ ЛИСТА. С КОМБИНАЦИЕЙ F9-R14 У ЧЕТЫРЁХ ИЗ ПЯТИ МНОГОЛИСТОЧКОВЫХ ОБРАЗЦОВ БЫЛ ВЫЯВЛЕН АМПЛИКОН РАЗМЕРОМ 717 П.Н., ОТСУТСТВУЮЩИЙ У РАСТЕНИЙ С НОРМАЛЬНОЙ ФОРМОЙ ЛИСТА. С КОМБИНАЦИЕЙ ME3-EM3 У ВСЕХ ПЯТИ РАСТЕНИЙ С МУТАНТНОЙ ФОРМОЙ ЛИСТА БЫЛ ОБНАРУЖЕН АМПЛИКОН РАЗМЕРОМ 104 П.Н. В ДАЛЬНЕЙШЕМ ОТЛИЧИМЫЕ БЭНДЫ БЫЛИ ВЫРЕЗАНЫ ИЗ ГЕЛЯ, ОЧИЩЕНЫ И СЕКВЕНИРОВАНЫ. АНАЛИЗ ПОКАЗАЛ, ЧТО ВСЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ВЫРАВНИВАЮТСЯ НА ГЕНОМ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА БОБОВЫЕ. ДЛЯ КОМБИНАЦИИ F9-R14 БЫЛО ВЫЯВЛЕНО НАЛИЧИЕ УЧАСТКА КОПИИ РЕТРОТРАНСПОЗОНА, ПРИНАДЛЕЖАЩЕГО К ГРУППЕ TY-1-COPIA LTR, КОТОРЫЙ ПО ДАННЫМ GENE BANK РАННЕЕ БЫЛ ОБНАРУЖЕН В ГЕНОМЕ НУТА (*CICER ARIETINUM* L.).



ВЫВОДЫ

1. ПРИ ТЕСТИРОВАНИИ 31 КОМБИНАЦИИ SRAP-ПРАЙМЕРОВ ВЫЯВЛЕНО ДВЕ, ПОЗВОЛЯЮЩИЕ РАЗЛИЧИТЬ МНОГОЛИСТОЧКОВЫЕ И ОБЫЧНЫЕ ФОРМЫ ЛИСТА: F9-R14 И ME3-EM3.
2. ПРИ СЕКВЕНИРОВАНИИ ОБРАЗЦЫ С КОМБИНАЦИЕЙ ME3-EM3 ВЫРАВНИВАЛИСЬ НА ГЕНОМ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА БОБОВЫЕ (*FABACEAE*). В ТО ЖЕ ВРЕМЯ ДЛЯ ПРАЙМЕРОВ F9-R14 БЫЛ ИДЕНТИФИЦИРОВАН УЧАСТОК РЕТРОТРАНСПОЗОНА TY1-COPIA LTR, РАНЕЕ ОБНАРУЖЕННЫЙ В ГЕНОМЕ НУТА.
3. ПОЛУЧЕННЫЕ ДАННЫЕ МОГУТ ИСПОЛЬЗОВАТЬСЯ ДЛЯ ОТБОРА ЭЛИТНЫХ ФОРМ ЛЮЦЕРНЫ С ПОВЫШЕННОЙ ЛИСТОВОЙ МАССОЙ

Cicer arietinum Ty1-copia retrotransposon partial pol gene for putative reverse transcriptase, clone cart5

Sequence ID: [AJ535748.1](#) Length: 293 Number of Matches: 1

Range 1: 5 to 292 [GenBank](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
363 bits(196)	5e-95	261/290(90%)	21/290(7%)	Plus/Plus
Query 747	CCTGCA-GTCGACCATATGGGAGAGTTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCT	805		
Sbjct 5	CCTGCANGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATANCTTGAGTATTCT	64		
Query 806	ATAGTGTCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTG	865		
Sbjct 65	ATAGTGTCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATANCTGTTTCCTGTGTGAAATTG	124		
Query 866	TTATCCGCTCACA-TTCCACAACAACATACGAGCC-GAAGCATAAAGTGTAAGC-TGGG	922		
Sbjct 125	TTATCCGCTCACAATTCCAC-ACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGG	183		
Query 923	-TGC-TA-TGAGTGAGCTA-CTCCACATTA-TGGCA-TGCGCTCACTGCCCCGCTTTC-AG	975		
Sbjct 184	GTGCCTAATGAGTGAGCTAACTC-ACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCAN	242		
Query 976	TCGG-AAAC-TGTC-TGCCA-CTGCAT-A-TGA-TCGGCCACCGC-CGGG	1017		
Sbjct 243	TCGGGAACCTGTCGTGCCANCTGCATTAATGAATCGNCCAACGCGCGGG	292		

НАЗВАНИЕ ОБРАЗЦА	SRAP-МАРКЕР	№ КЛОНА	СОВПАДЕНИЕ В БАЗОЙ NCBI
1	ME3-EM3	9-7	<i>MEDICAGO SATIVA</i> MIDDLE REPETITIVE DNA (RPE15) GENE, COMPLETE CDS
		9-8	
2		10-1	
		10-2	
3		11-3	
		11-4	
4		12-1	
		12-2	
1	F9-R14	16-4	1) <i>CICER ARIETINUM</i> TY1-COPIA RETROTRANSPONON PARTIAL POL GENE FOR PUTATIVE REVERSE TRANSCRIPTASE, CLONE CART5
		16-5	
3		17-7	
4		18-2	2) PREDICTED: <i>MEDICAGO TRUNCATULA</i> UNCHARACTERIZED LOC120580584 (LOC120580584), NCRNA
3		17-6	PREDICTED: <i>MEDICAGO TRUNCATULA</i> RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE HERK 1 (LOC11408742), TRANSCRIPT VARIANT X1, MRNA
4		18-1	