



**ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ПОПУЛЯЦИЙ *MEDICAGO VARIA* MART. ОТОБРАННЫХ ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ В УСЛОВИЯХ РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН МЕТОДОМ SSR-АНАЛИЗА**

<sup>1,2</sup>Гайнуллина К.П., <sup>2</sup>Низаева А.А., <sup>1</sup>Кулуев Б.Р.

<sup>1</sup>Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Россия, 450054, Уфа, пр. Октября, 71, E-mail: [karina28021985@yandex.ru](mailto:karina28021985@yandex.ru)

<sup>2</sup>Опытная станция «Уфимская» – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Россия, 450535, Республика Башкортостан, Уфимский район, с. Чернолесовский, ул. Тополиная, 1, E-mail: [nizaeva\\_a@mail.ru](mailto:nizaeva_a@mail.ru)

**Резюме**

Люцерна изменчивая (*Medicago varia* Mart.) – высокопродуктивная, богатая белком, многолетняя кормовая культура, хорошо приспособленная к условиям Южного Урала и Предуралья. В Республике Башкортостан селекция люцерны изменчивой ведется в Башкирском научно-исследовательском институте сельского хозяйства УФИЦ РАН и опытной станции «Уфимская». Для оценки генетического полиморфизма исходного семенного материала, точной идентификации и паспортизации сортов люцерны может быть использован метод SSR-анализа, который заключается в ПЦР-анализе размеров локусов, содержащих микросателлитные повторы. Большинство SSR-маркеров люцерны разработано для модельного объекта *Medicago truncatula* Gaertn. (люцерна усеченная), опубликовано несколько исследований SSR-локусов *Medicago sativa* L (люцерна посевная). Для генетического анализа люцерны изменчивой предлагается использовать те же самые SSR-маркеры, однако насколько они будут эффективны на отечественных сортообразцах этого вида остается неизвестным. Целью данного исследования было испытание SSR-праймеров к 10 микросателлитным локусам на популяциях люцерны изменчивой, находящихся в селекционной работе в условиях Республики Башкортостан. Для работы использовали три популяции *M. varia*: Скороспелая 9, С 3-6, С 3-8, а также сорт Чишминская 131. Анализ молекулярно-генетического полиморфизма этих образцов люцерны изменчивой методом SSR-ПЦР позволил получить данные по аллельному составу микросателлитных локусов MsEST53, MSE265, MSE562, MSE486, MSE195, MSE590, MSE323, MsEST9, MSE470, MSE276. Наиболее эффективными для генетической паспортизации популяций и сортов этой культуры оказались SSR-маркеры MsEST53, MSE265, MSE562, MSE486, MSE195, MSE590, MsEST9, которые давали наибольшее число полиморфных фрагментов ДНК по результатам ПЦР и электрофореза в полиакриламидном геле, позволяли различить все четыре образца, а также характеризовались близкой температурой отжига праймеров и неперекрывающимися аллельными диапазонами, что делает теоретически возможным их использование в одной совместной мультиплексной ПЦР. Выявленные в ходе работы высоковариабельные SSR-маркеры могут быть использованы для создания тест-систем для точной идентификации и паспортизации сортов, а также для оценки генетического полиморфизма образцов люцерны изменчивой.

**Ключевые слова:** Люцерна изменчивая, кормовая культура, ДНК, ПЦР, SSR, микросателлитный анализ

**Цитирование:** Гайнуллина К.П., Низаева А.А., Кулуев Б.Р. Оценка генетического разнообразия популяций *Medicago varia* Mart. отобранных для селекции в условиях Республики Башкортостан методом SSR-анализа // *Biomics*. 2023. Т.15(3). С. 159 - 166. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2023-16

© Авторы

ASSESSMENT OF GENETIC DIVERSITY OF *MEDICAGO VARIA* MART. POPULATIONS SELECTED FOR BREEDING IN THE CONDITIONS OF THE REPUBLIC OF BASHKORTOSTAN USING SSR-ANALYSIS

<sup>1,2</sup>Gainullina K.P., <sup>2</sup>Nizaeva A.A., <sup>1</sup>Kuluev B.R.

<sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences

<sup>2</sup>Experimental station "Ufimskaya", Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences

Resume

*Medicago varia* Mart. (bastard alfalfa) is a highly productive, protein-rich, perennial forage crop, well adapted to the conditions of the Southern Urals and Cis-Urals. In the Republic of Bashkortostan, the breeding of alfalfa is carried out at the Bashkir Scientific Research Institute of Agriculture of the UFRS RAS and the experimental station "Ufimskaya". To assess the genetic polymorphism of the initial seed material, accurately identify and certify alfalfa varieties, the SSR analysis method can be used, which consists of PCR analysis of the sizes of loci containing microsatellite repeats. Most alfalfa SSR markers have been developed for the model object *Medicago truncatula* Gaertn. (truncated alfalfa), several studies on the SSR loci of *Medicago sativa* L (common alfalfa) have been published. For genetic analysis of bastard alfalfa, it is proposed to use the same SSR markers, but how effective they will be on domestic varieties of this species remains unknown. The purpose of this study was to test SSR primers for 10 microsatellite loci on populations of bastard alfalfa, which are in breeding study at the Republic of Bashkortostan. For the study, four samples of *M. varia* were used: variety Chishminskaya 131, populations Skorospelaya 9, S 3-6, and S 3-8. Analysis of the molecular genetic polymorphism of these *M. varia* samples using the SSR-PCR method allowed us to obtain data on the allelic composition of the microsatellite loci MsEST53, MSE265, MSE562, MSE486, MSE195, MSE590, MSE323, MsEST9, MSE470, MSE276. The most effective for genetic certification of varieties and populations of this crop were the SSR markers MsEST53, MSE265, MSE562, MSE486, MSE195, MSE590, MsEST9, which gave the largest number of polymorphic DNA fragments according to the results of PCR and polyacrylamide gel electrophoresis, making it possible to distinguish all four samples, and were also characterized by similar primer annealing temperatures and non-overlapping allelic ranges, which makes it theoretically possible to use them in multiplex PCR. The highly variable SSR markers identified during the study can be used to create test systems for accurate identification and certification of varieties, as well as for assessing the genetic polymorphism of *M. varia* samples.

**Keywords:** Alfalfa, forage crop, DNA, PCR, SSR, microsatellite analysis

**Citation:** Gainullina K.P., Nizaeva A.A., Kuluev B.R. Assessment of genetic diversity of *Medicago varia* Mart. populations selected for breeding in the conditions of the Republic of Bashkortostan using SSR-analysis. *Biomics*. 2023. V.15(3). P. 159 - 166. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2023-16 (In Russian)

© The Authors

Введение

Важной сельскохозяйственной культурой семейства Fabaceae Lindl. является люцерна (*Medicago* L.). Большинство сортов люцерны являются автотетраплоидами ( $2n = 4x = 32$ ) с основным числом хромосом – 8 [Wang et al., 2013]. Люцерна отличается исключительной способностью расти в разнообразных природных условиях, стабильной урожайностью, долголетием, воспроизводством плодородия почвы за счет фиксации атмосферного азота. Данная культура используется в кормовых целях в зеленом виде или для заготовки кормов (сена, сенажа, травяной муки).

Сено люцерны отличается высокими кормовыми качествами, содержит большое количество протеина, фосфор, кальций, незаменимые аминокислоты [Бородаева (Borodayeva), 2020]. Увеличение производства кормов возможно за счет создания более продуктивных и качественных сортов люцерны. Каждой почвенно-климатической зоне необходим разнообразный набор взаимодополняющих сортов, приспособленных к различным экстремальным условиям произрастания [Грязева (Gryazeva), 2005]. В соответствии с этим, изучение генетического разнообразия исходного материала люцерны имеет большое теоретическое и

практическое значение. В настоящее время в России разработка подходов к генетической идентификации и паспортизации сортов люцерны на основе ДНК-маркеров начата только в ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса» [Клименко и др. (Klimentenko et al.), 2020], однако имеющиеся методики требуют дальнейшей оптимизации, в том числе за счет увеличения числа эффективных для выявления межсортового полиморфизма ДНК-маркеров и их последующего отбора с учетом возможности амплификации в одной реакции (близкие температуры отжига праймеров, неперекрывающиеся размеры ампликонов, отсутствие димеров праймеров) для включения в мультиплексные тест-системы. В русскоязычной литературе имеется лишь одна работа с описанием оценки генетического разнообразия рода *Medicago* с использованием ISSR-маркеров [Гювендиев и др. (Guvendiev et al.), 2020], однако данное исследование было проведено азербайджанскими учеными. ISSR-анализ чаще всего используют для генетического анализа дикорастущих растений, для которых неизвестны нуклеотидные последовательности генома [Нигматуллина и др. (Nigmatullina et al.), 2018]. Однако для люцерны в GenBank имеется большое число нуклеотидных последовательностей, поэтому для данной культуры могут быть использованы более специфичные и значит более эффективные ДНК-маркеры.

Одним из часто используемых методов оценки генетического полиморфизма культурных растений является SSR-анализ (Simple Sequence Repeats – простые повторяющиеся последовательности (микросателлиты)). Основными преимуществами SSR-маркеров являются кодоминантное наследование и обилие в геномах микросателлитной ДНК, а также высокий уровень воспроизводимости и дешевизна SSR-ПЦП совместно с гель-электрофорезом в полиакриламидном геле [Сухарева, Кулуев (Sukhareva, Kuluev), 2018]. В одной из ранних работ была продемонстрирована возможность использования праймеров к SSR-локусам, взятых из базы данных EST *Medicago truncatula* Gaertn. (люцерна усеченная) для построения генетических карт сцепления *Medicago sativa* L. (люцерна посевная) [Julier et al., 2003]. В дальнейшем праймеры, подобранные для SSR-анализа *M. truncatula*, успешно применялись также и для оценки генетического полиморфизма образцов *M. sativa* [Sakiroğlu et al., 2010]. Однако необходимо иметь в виду, что размер генома тетраплоидной и многолетней *M. sativa* составляет около 800–1000 Мб, что в два раза больше, чем у диплоидной и однолетней *M. truncatula* [Blondon et al., 1994]. Поэтому большой интерес представляет поиск SSR-локусов в геноме люцерны посевной, что стало

возможным благодаря публикациям многочисленных EST-последовательностей в GenBank. Большое число SSR-маркеров для люцерны посевной были разработаны на основе анализа 12371 EST из GenBank [Wang et al., 2013]. Всего в 716 EST было идентифицировано 774 последовательности, которые содержали SSR-локусы. Авторы подобрали сто пар праймеров для детекции EST-SSR, и 29 из них продемонстрировали полиморфизм среди 28 анализируемых образцов люцерны посевной, относящихся к шести основным подвидам. Причем большая часть праймеров также была эффективна не только при использовании на других видах люцерны, но и при их применении у близкородственных родов, например у *Trifolium repens* и *Melilotus albus* [Wang et al., 2013].

Из многолетних видов кормовых культур в условиях Республики Башкортостан наибольший интерес представляет люцерна изменчивая или гибридная (*Medicago sativa* L. nothosubsp. *varia* (Martyn) Arcang), которая произошла в результате естественного или искусственного скрещивания люцерны посевной (*Medicago sativa* L.), желтой (*Medicago falcata* L.) и северной (*Medicago borealis* G.) [Ломов, Писковацкий (Lomov, Piskovatsky), 2021]. В Республике Башкортостан работы по селекции новых сортов люцерны изменчивой ведутся в Башкирском научно-исследовательском институте сельского хозяйства (БНИИСХ) УФИЦ РАН [Кузнецов и др. (Kuznetsov et al.), 2023], а с 2023 года также в опытной станции «Уфимская» УФИЦ РАН. Целью данного исследования было испытание ряда SSR-праймеров, подобранных ранее в работах [Wang et al., 2013; 2014], на популяциях люцерны изменчивой, находящихся в селекционной работе в Республике Башкортостан. Выявленные в ходе работы наиболее высоковариабельные SSR-локусы могут быть рекомендованы для включения в методы оценки генетического полиморфизма линий и сортов данного вида люцерны, а соответствующие пары праймеров – для включения в мультиплексные тест-системы.

#### Материалы и методы исследования

Исходя из данных литературных источников [Wang et al., 2013; 2014] и по результатам анализа аннотированных нуклеотидных последовательностей люцерны посевной в GenBank, был осуществлен подбор наиболее оптимальных SSR-локусов, которые отвечают требованиям поставленной задачи. Праймеры были проверены и подобраны с учетом ряда параметров при помощи программы PrimerSelect (DNASar, США): отсутствие парных димеров и самодимеров праймеров каждого отдельного микросателлитного локуса, близкие температуры отжига праймеров, обеспечение наиболее высокого уровня полиморфизма (высокий показатель PIC).

Характеристики SSR-локусов и праймеров приведены в таблице 1.

Таблица 1.

Микросателлитные маркеры, выбранные для анализа молекулярно-генетического полиморфизма люцерны изменчивой (*M. varia*) [согласно данным Wang et al., 2013; 2014]

Table 1 - Microsatellite markers selected for the analysis of molecular genetic polymorphism variable alfalfa (*M. varia*) [according to Wang et al., 2013; 2014]

Название локуса Locus name	Праймеры Primers	Размер локуса, п.н. Locus size, bp	Число аллелей Number of alleles	PIC	T <sub>m</sub> , °C	Повторяющийся мотив Core motif
MsEST53	F: GGATCGTATCTGCTGCGAC	101-119	7	0,70	58	(TGC) <sub>7</sub>
	R: GTTCCAAACGTTGGAGTGAC					
MSE265	F: CCTAGAATTTCTGTTGCTGTTGC	138-157	6	0,77	60,3	(TC) <sub>9</sub>
	R: ACTTCTGCTACAGTTTCCCCTCT				59,8	
MSE562	F: CGTATGGTGGTGTGTCTAAGGTA	159-177	6	0,75	58,9	(AAT) <sub>6</sub>
	R: GCAGAAGCATTCCAATATTGTTT				59,9	
MSE486	F: GGATAAAGCTCAAACCCATTTCT	178-184	4	0,65	59,8	(TCT) <sub>5</sub>
	R: TGGTGGTGTATATAGGAGTTTG				60,1	
MSE195	F: TTTGTAGACAGGTAATCGTTGGC	186-194	5	0,73	60,4	(GAA) <sub>5</sub>
	R: AGAGCGAGAGAGGTAACGAAAGT				60,1	
MSE590	F: TACTAGGAGGTGGAGGAGTTTC	196-211	5	0,73	60,0	(ATG) <sub>6</sub>
	R: TCAATCTTCTCAACTTCTCGCTC				60,1	
MSE323	F: GAGATATTTACACATCGCGCACT	225-254	4	0,69	60,5	(ATT) <sub>5</sub>
	R: CAAATCTTCAATCAAGTCCAGC				60,1	
MsEST9	F: ACAACATGGCTTCAACACCT	257-277	8	0,79	58,3	(TCT) <sub>9</sub>
	R: TCACCCACCAAATCAGAATC					
MSE470	F: CTTTCTTTGGATTTCTTCCCAT	173-197	10	0,81	59,8	(TGT) <sub>6</sub>
	R: ATTAGCAGCTGGTCAAACAAGAG				59,9	
MSE276	F: GGAGTCCTAGAGTCGATGGAGAT	153-174	9	0,84	60,1	(AAT) <sub>7</sub>
	R: TATTCGCGTCTAGAAGATGAAGC				60,0	

Семена четырех образцов люцерны изменчивой (сорт Чижминская 131, популяции Скороспелая 9, С 3-6 и С 3-8) проращивали на чашках Петри с фильтровальной бумагой. ДНК выделяли из 7 дневных проростков с помощью набора «Genomic DNA Purification Kit» («Thermo Fisher Scientific», США). ДНК выделяли в трех отдельных микропробирках, в каждую из которых переносили кусочки листьев от 2 растений. Таким образом, ДНК была выделена из 6 растений для каждого образца.

ПЦР проводили в амплификаторе «Т-100» («Bio-Rad», США). Конечный объем реакционной смеси составлял 25 мкл и содержал 1 мкл раствора тотальной геномной ДНК, 12,5 мкл раствора Dream Taq™ PCR Master Mix («Thermo Fisher Scientific», Литва), по 1 мкл каждого из пары праймеров («Евроген», Россия) и 9,5 мкл стерильной деионизированной воды. Амплификация проводилась по следующей программе: начальная денатурация при 95°C – 3 мин.; 34 цикла: денатурация при 95°C – 30 сек., отжиг праймеров при 60°C – 40 сек.,

элонгация при 72°C – 1 мин.; конечная элонгация при 72°C – 10 мин.

Продукты амплификации разделяли методом вертикального электрофореза в камере VE-20 («Хеликон», Россия) в 10% полиакриламидном геле в течение 3,5-7,5 часов при напряжении 350 В. Визуализацию и документирование результатов электрофореза осуществляли в гель-документирующей системе Gel Doc™ EZ System («Bio Rad», США) с помощью программного обеспечения Image Lab™ Software.

#### Результаты исследования

Анализ молекулярно-генетического полиморфизма селекционных популяций люцерны изменчивой методом SSR-ПЦР в условиях Республики Башкортостан позволил нам получить данные по аллельному составу микросателлитных локусов MsEST53, MSE265, MSE562, MSE486, MSE195, MSE590, MSE323, MsEST9, MSE470, MSE276.

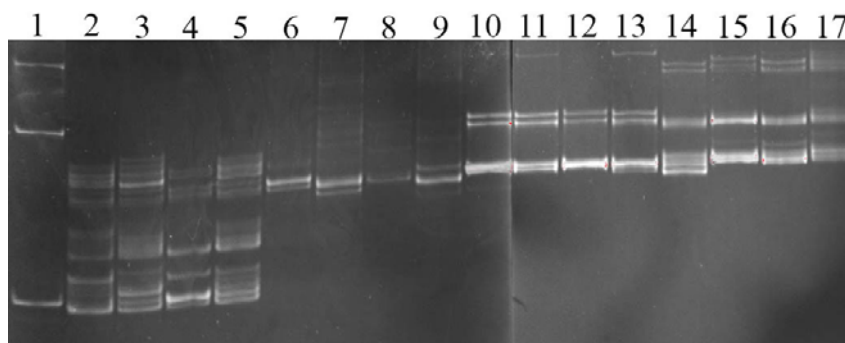


Рис. 1. Электрофоретические спектры, полученные при амплификации SSR-локусов *M. varia*. MsEST53 (2-5), MSE265 (6-9), MSE276 (10-13), MSE562 (14-17). 1 – маркер молекулярного веса 100bp (Евроген, Россия). Образцы: сорт Чишминская 131 (2, 6, 10, 14); популяция Скороспелая 9 (3, 7, 11, 15); популяция С 3-6 (4, 8, 12, 16); популяция С 3-8 (5, 9, 13, 17).  
 Fig. 1. Electrophoretic spectra obtained by amplification of *M. varia* SSR loci. MsEST53 (2-5), MSE265 (6-9), MSE276 (10-13), MSE562 (14-17). 1 – 100bp molecular weight marker (Evrogen, Russia). Samples: Chishminskaya variety 131 (2, 6, 10, 14); population Skorospelaya 9 (3, 7, 11, 15); population С 3-6 (4, 8, 12, 16); population С 3-8 (5, 9, 13, 17).

По результатам SSR-ПЦР локуса MsEST53 было выявлено несколько ампликонов разного размера (рис. 1), причем все анализируемые образцы отличались друг от друга по размерам и сочетанию различных бэндов, которые соответствуют ампликонам. Это означает, что SSR-праймеры локуса MsEST53 могут быть использованы для генетической идентификации и паспортизации популяций и сортов люцерны изменчивой. Анализ локуса MSE265 показал образование меньшего числа ампликонов, однако по их размерам и сочетанию полного совпадения между разными образцами люцерны также не обнаруживалось. Это говорит о том, что данный микросателлитный локус также может быть использован для оценки генетического полиморфизма популяций и сортов *M. varia*. По результатам ПЦР-анализа локуса MSE276 различий между изучаемыми образцами выявлено не было, поэтому данный SSR-

маркер не эффективен для выявления ДНК-полиморфизма у люцерны изменчивой. Кроме того, аллельный диапазон данного локуса (153-174 пн) почти полностью перекрывается со спектром аллелей локуса MSE562 (159-177 пн), поэтому его включение в мультиплексные тест-системы нецелесообразно. Локус MSE562 оказался вполне информативным для идентификации популяций и сортов люцерны. Совпадение размеров ампликонов было характерно только для популяций Скороспелая 9 и С 3-6.

Далее приступили к SSR-анализу популяций *M. varia* по локусам MSE470 и MSE486 с частично перекрывающимися аллельными диапазонами (173-197 и 178-184 пн соответственно). Оба локуса оказались достаточно полиморфными, однако более явные различия между образцами визуализировались по локусу MSE486 (рис. 2).

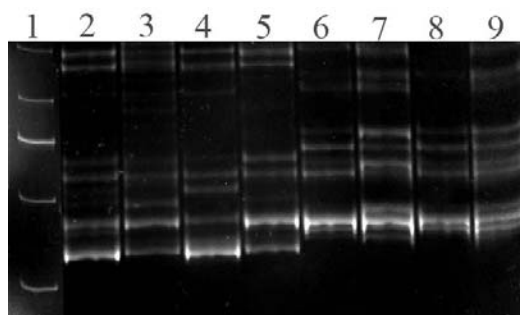


Рис. 2. Электрофоретические спектры, полученные при амплификации SSR-локусов *M. varia*. MSE470 (2-5), MSE486 (6-9). 1 – маркер молекулярного веса 100bp (Евроген, Россия). Образцы: сорт Чишминская 131 (2 и 6); популяция Скороспелая 9 (3 и 7); популяция С 3-6 (4 и 8); популяция С 3-8 (5 и 9).  
 Fig. 2. Electrophoretic spectra obtained by amplification of *M. varia* SSR loci. MSI 470 (2-5), MSE486 (6-9). 1 – 100bp molecular weight marker (Evrogen, Russia). Samples: Chishminskaya variety 131 (2 and 6); population Skorospelaya 9 (3 and 7); population С 3-6 (4 and 8); population С 3-8 (5 and 9).

В результате анализа полиморфизма микросателлитных локусов MsEST9 и MSE590 у исследуемых образцов люцерны гибридной было выявлено множество ампликонов разного размера

(рис. 3). Совпадений между образцами обнаружено не было, что позволяет считать данные локусы эффективными для генетической паспортизации *M. varia*.

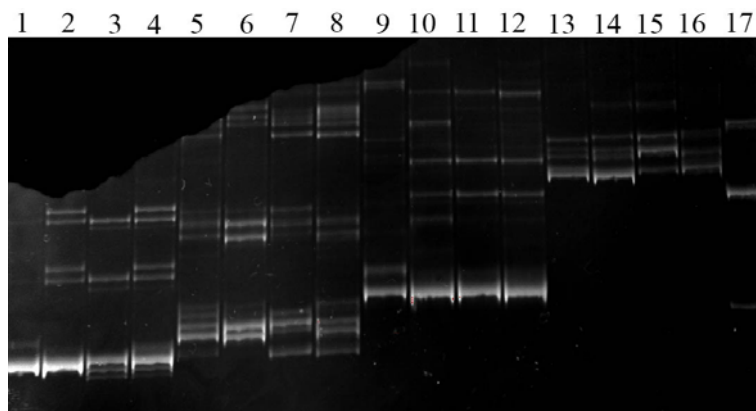


Рис. 3. Электрофоретические спектры, полученные при амплификации SSR-локусов *M. varia*. MSE195 (1-4), MSE590 (5-8), MSE323 (9-12), MsEST9 (13-16). Образцы: сорт Чишминская 131 (1, 5, 9, 13); популяция Скороспелая 9 (2, 6, 10, 14); популяция С 3-6 (3, 7, 11, 15); популяция С 3-8 (4, 8, 12, 16). 17 – маркер молекулярного веса 100bp (Евроген, Россия).

Fig. 3. Electrophoretic spectra obtained by amplification of *M. varia* SSR loci. MS 195 (1-4), MSE590 (5-8), MS 323 (9-12), MsEST9 (13-16). Samples: Chishminskaya variety 131 (1, 5, 9, 13); population Skorospelaya 9 (2, 6, 10, 14); population С 3-6 (3, 7, 11, 15); population С 3-8 (4, 8, 12, 16). 17 – 100bp molecular weight marker (Evrogen, Russia).

По локусу MSE195 амплифицировалось меньшее число фрагментов ДНК, отмечалось совпадение их размеров и сочетания у сорта Чишминская 131 и популяции Скороспелая 9, а также у популяций С 3-6 и С 3-8 (рис. 3). Тем не менее, наличие полиморфных фрагментов, а также хорошая воспроизводимость результатов позволяет рекомендовать данный микросателлитный локус для сортовой идентификации люцерны изменчивой. Наименьшая вариабельность была характерна для локуса MSE323 (рис. 3).

### Обсуждение

Методы оценки генетического полиморфизма с применением SSR-маркеров могут быть востребованы, прежде всего, в научно-образовательных учреждениях, селекционных центрах, семеноводческих организациях, агрохолдингах и т.д. Также SSR-анализ может быть использован для точной идентификации сортов на любом этапе производства: от покупки семян до получения урожая любыми заинтересованными организациями и службами, лабораториями и самими производителями. Исследования генетического полиморфизма кормовых культур в России только начинаются, к примеру, были проведены работы по SSR-анализу сортов клевера лугового [Клименко и др. (Klimenko et al.), 2020], сортообразцов кормовых

злаковых культур [Кулуев и др. (Kuluev et al.), 2022]. Нами впервые в условиях Республики Башкортостан было проведено изучение молекулярно-генетического полиморфизма селекционных популяций люцерны изменчивой с использованием 10 микросателлитных маркеров MsEST53, MSE265, MSE562, MSE486, MSE195, MSE590, MSE323, MsEST9, MSE470, MSE276. Была показана высокая информативность данных SSR-маркеров при генотипировании образцов *M. varia*. Наиболее эффективными для генетической паспортизации популяций и сортов этой культуры оказались SSR-маркеры MsEST53, MSE265, MSE562, MSE486, MSE195, MSE590, MsEST9, которые давали наибольшее число полиморфных фрагментов ДНК, позволяли различить все изученные нами образцы, а также характеризовались близкой температурой отжига праймеров и неперекрывающимися аллельными диапазонами, что делает теоретически возможным их использование в одной совместной мультиплексной ПЦР. Однако в виду полиплоидной природы люцерны изменчивой при идентификации генотипов ее сортов и линий посредством фрагментного анализа возникает ряд трудностей, связанных с невозможностью отличить гомозиготные и гетерозиготные фрагменты ДНК на генетическом анализаторе (капиллярном секвенаторе). Тем не менее, электрофорез в 8-10% ПААГе в вертикальной камере на гелевых пластинах размером не менее

15×15 см позволяет успешно проводить генотипирование и идентификацию популяций и сортов данной кормовой культуры.

Работа выполнена в рамках государственного задания №122030200143-8 при поддержке гранта Минобрнауки РФ (№ 075-15-2021-549).

### Литература

1. Бородаева Ж.А. Влияние почвенно-климатических условий Центрально-Черноземного региона на проявление адаптивных признаков и свойств люцерны изменчивой (*Medicago varia* Mart.): автореф. канд. ...с.-х. наук : 06.01.05. Рамонь. 2020. 24 с.
2. Грязева Т.В. Селекция люцерны и эспарцета в условиях Ростовской области: автореф. канд. ...с.-х. наук : 06.01.05. п. Рассвет. 2005. 24 с.
3. Гювендиев В.М., Аскеров А.М., Гювендиева Х.М., Калантарова Н.С., Гаджиев Э.С. Исследование генетического разнообразия рода люцерны (*Medicago* L.) с применением ISSR маркеров // *Проблемы развития АПК региона*. 2020. № 1 (41). С. 27–34.
4. Клименко И.А., Костенко С.И., Мавлютов Ю.М., Шамустакимова А.О. Эффективность SSR- и PAWS-маркеров для оценки генетического полиморфизма сортов клевера лугового (*Trifolium pratense* L.) // *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2020. Т. 181. № 3. С. 100–109. doi: 10.30901/2227-8834-2020-3-100-109
5. Клименко И.А., Козлов Н.Н., Костенко С.И., Шамустакимова А.О., Мавлютов Ю.М. Идентификация и паспортизация сортов кормовых трав (клевера лугового, люцерны изменчивой, посевной и хмелевидной) на основе ДНК-маркеров. Москва. 2020. 35 с.
6. Кулуев Б.Р., Бережнева З.А., Гайнуллина К.П., Габитова А.И., Низаева А.А. Оценка генетического разнообразия сортообразцов кормовых культур *Dactylis glomerata* L., *Agropyron pectiniforme* Roem. et Schult и *Phleum pratense* L., отобранных в условиях Республики Башкортостан // *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*. 2023. Т. 19(1). С. 32–40.
7. Кузнецов И.Ю., Низаева А.А., Башаров А.А. Изучение и оценка селекционной ценности сортопопуляций люцерны для условий южной лесостепной зоны Республики Башкортостан // *Известия Международной академии аграрного образования*. 2023. № 65. С. 130–137.
8. Ломов М.В., Писковацкий Ю.М. Люцерна - высокобелковая кормовая культура // *Адаптивное кормопроизводство*. 2021. № 3. С. 6–15.
9. Нигматуллина Н.В., Кулуев А.Р., Кулуев Б.Р. Молекулярные маркеры, применяемые для определения генетического разнообразия и видоидентификации дикорастущих растений //

*Биомика*. 2018. Т10(3). С. 290–318. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-39.

10. Сухарева А.С., Кулуев Б.Р. ДНК-маркеры для генетического анализа сортов культурных растений // *Биомика*. 2018. Т. 10. № 1. С. 69–84. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-15

11. Blondon F., Marie D., Brown S., Kondorosi A. Genome size and base composition in *Medicago sativa* and *M. truncatula* species // *Genome*. 1994. V. 37. P. 264–270.

12. Julier B., Flajoulot S., Barre P., Cardinet G., Santoni S., Huguet T., Huyghe C. Construction of two genetic linkage maps in cultivated tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*) using microsatellite and AFLP markers // *BMC Plant Biol*. 2003. V. 19(3):9. doi: 10.1186/1471-2229-3-9

13. Sakiroğlu M., Doyle J.J., Charles Brummer E. Inferring population structure and genetic diversity of broad range of wild diploid alfalfa (*Medicago sativa* L.) accessions using SSR markers // *Theor Appl Genet*. 2010. V. 121(3). P. 403–415. doi: 10.1007/s00122-010-1319-4

14. Wang Z., Yan H., Fu X., Li X., Gao H. Development of simple sequence repeat markers and diversity analysis in alfalfa (*Medicago sativa* L.) // *Molecular Biology Reports*. 2013. V. 40. No 4. P. 3291–3298. doi: 10.1007/s11033-012-2404-3

15. Wang Z., Yu G., Shi B., Wang X., Qiang H., Gao H. Development and characterization of Simple Sequence Repeat (SSR) markers based on RNA-sequencing of *Medicago sativa* and *in silico* mapping onto the *M. truncatula* genome // *PLOS One*. 2014. V. 9. No 3. e92029. doi: 10.1371/journal.pone.0092029

### References

1. Blondon F., Marie D., Brown S., Kondorosi A. Genome size and base composition in *Medicago sativa* and *M. truncatula* species. *Genome*. 1994. V. 37. P. 264–270.
2. Borodaeva Zh.A. The influence of soil and climatic conditions of the Central Chernozem region on the manifestation of adaptive traits and properties of alfalfa (*Medicago varia* Mart.): abstract. Ph.D. ... agricultural Sciences: 01/06/05. Ramon. 2020. 24 p.
3. Gryazeva T.V. Selection of alfalfa and sainfoin in the conditions of the Rostov region: abstract of thesis. Ph.D. ... agricultural Sciences: 01/06/05. Rassvet. 2005. 24 p.
4. Gyuwendiev V.M., Askerov A.M., Gyuwendieva Kh.M., Kalantarova N.S., Gadzhiev E.S. Study of genetic diversity of alfalfa species (*Medicago* L.) with ISSR markers in Azerbaijan. *Problems of development of the regional agro-industrial complex*. 2020. No. 1 (41). pp. 27–34.
5. Julier B., Flajoulot S., Barre P., Cardinet G., Santoni S., Huguet T., Huyghe C. Construction of two genetic linkage maps in cultivated tetraploid alfalfa (*Medicago*

- sativa*) using microsatellite and AFLP markers. *BMC Plant Biol.* 2003. V. 19 (3):9. doi: 10.1186/1471-2229-3-9
6. Klimenko I.A., Kostenko S.I., Mavlyutov Yu.M., Shamustakimova A.O. Efficiency of SSR and PAWS markers for assessing genetic polymorphism of red clover (*Trifolium pratense* L.) varieties. *Proceedings on applied botany, genetics and breeding.* 2020. T. 181. No. 3. P. 100–109. doi: 10.30901/2227-8834-2020-3-100-109
7. Klimenko I.A., Kozlov N.N., Kostenko S.I., Shamustakimova A.O., Mavlyutov Yu.M. Identification and certification of forage grass varieties (meadow clover, variable alfalfa, common alfalfa and hop grass) based on DNA markers. Moscow. 2020. 35 p.
8. Kuluev B.R., Berezhneva Z.A., Gainullina K.P., Gabitova A.I., Nizaeva A.A. Assessment of the genetic diversity of breeding lines of forage crops *Dactylis glomerata* L., *Agropyron pectiniforme* Roem. et Schult and *Phleum pratense* L., selected in the conditions of the Republic of Bashkortostan. *Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov.* 2023; 19(1). P. 32–40.
9. Kuznetsov I.Yu., Nizaeva A.A., Basharov A.A. Study and assessment of the breeding value of alfalfa variety populations for the conditions of the southern forest-steppe zone of the Republic of Bashkortostan. *News of the International Academy of Agrarian Education.* 2023. No. 65. P. 130–137.
10. Lomov M.V., Piskovatsky Yu.M. Alfalfa is a high-protein feed crop. *Adaptive feed production.* 2021. No. 3. P. 6–15.
11. Nigmatullina N.V., Kuluev A.R., Kuluev B.R. Molecular markers used to determine genetic diversity and species identification of wild plants. *Biomics.* 2018. V.10(3). P. 290–318. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-39
12. Sakiroğlu M., Doyle J.J., Charles Brummer E. Inferring population structure and genetic diversity of broad range of wild diploid alfalfa (*Medicago sativa* L.) accessions using SSR markers. *Theor Appl Genet.* 2010. V. 121(3). P. 403-415. doi: 10.1007/s00122-010-1319-4
13. Sukhareva A.S., Kuluev B.R. DNA markers for genetic analysis of crops. *Biomics.* 2018. 10(1). P. 69-84. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-15
14. Wang Z., Yan H., Fu X., Li X., Gao H. Development of simple sequence repeat markers and diversity analysis in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Molecular Biology Reports.* 2013. V. 40. No 4. P. 3291–3298. doi: 10.1007/s11033-012-2404-3
15. Wang Z., Yu G., Shi B., Wang X., Qiang H., Gao H. Development and characterization of Simple Sequence Repeat (SSR) markers based on RNA-sequencing of *Medicago sativa* and *in silico* mapping onto the *M. truncatula* genome. *PLOS One.* 2014. V. 9. No 3. e92029. doi: 10.1371/journal.pone.0092029