БИОТЕХНОЛОГИЯ, 2024, том 40, № 4, с. 3–18

ПРОДУЦЕНТЫ, БИОЛОГИЯ, СЕЛЕКЦИЯ, ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

УДК 57.577.21

СОРТОВАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЛЮПИНА (*Lupinus* L.) НА ОСНОВЕ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ДНК-МАРКЕРОВ

© 2024 г. И. А. Клименко[1, *], В. А. Душкин[1], М. И. Лукашевич[2], М. Е. Селиванова[2], Н. В. Новик[2], П. А. Агеева[2]

[1]ФГБНУ "Федеральный научный центр кормопроизводства и агроэкологии им. В.Р. Вильямса" (ФНЦ "ВИК им. В.Р. Вильямса"), Московская область, Лобня, 141055 Россия

[2]Всероссийский научно-исследовательский институт люпина – филиал ФНЦ "ВИК им. В.Р. Вильямса", Брянск, 241524 Россия

**e-mail: iaklimenko@mail.ru*

Поступила в редакцию 02.04.2024 г.
После доработки 16.05.2024 г.
Принята к публикации 30.05.2024 г.

С использованием технологии SSR-маркирования исследован генетический полиморфизм коллекции образцов рода *Lupinus*. Средний уровень полиморфизма ДНК внутри анализируемых видов: *L. albus*, *L. angustifolius* и *L. luteus* – составил 25.8, 21.6 и 34.7% соответственно. Определены эффективные маркеры для генотипирования и идентификации сортов и сортообразцов люпина российской селекции. В результате оценки генетических дистанций выявлены генетически дивергентные образцы, которые могут служить перспективным материалом для использования в селекционных программах люпина белого (*L. albus*) и желтого (*L. luteus*): СН 8-12, СН 96-15 ДТ1, КСИ 22 9-15, КСИ 22 9-17, 19-ПИО-18-3, СН 12-11-02-2-4-1. На основе полученных данных разработаны молекулярные формулы изученных образцов и эталонные генетические паспорта сортов Белорозовый 144, Надежный, Антей, Куршавель. Практические результаты исследования и новые знания по структуре геномов российских сортов люпина можно использовать при сортоиспытании, в семеноводстве и в качестве системы информационной поддержки процессов селекции и сохранения национального генофонда люпина – ценной сельскохозяйственной культуры.

Ключевые слова: кормовые культуры, люпин, SSR-маркеры, сортовая идентификация, генетическая паспортизация

DOI: 10.56304/S0234275824040069

Степень генетической изменчивости внутри и между популяциями оказывает существенное влияние на выбор источников исходного материала и селекционных программ для создания новых улучшенных сортов. В связи с этим критически важна разработка эффективных стратегий сохранения растительных генетических ресурсов, а также внедрение надежных и низкозатратных способов их оценки и использования. На сегодняшний день к наиболее объективным средствам оценки существующего генетического разнообразия относятся технологии молекулярных маркеров, так называемое ДНК-профилирование. Оно предполагает использование современных методов изучения внутри- и межвидового генетического полиморфизма на основе молекулярных маркеров, которые дают возможность получить информацию об изменчивости по определенным локусам генома [1]. ДНК-профилирование способствует решению ряда практических задач: подбору генетически дивергентных пар для скрещивания, установлению генетических взаимосвязей между сортами для выбора доноров ценных признаков; регистрации и обеспечению сохранности образцов коллекций; идентификации сортов и генотипов в селекции, семеноводстве и семенном контроле [2]. Оценка генетической изменчивости внутри и между естественными и синтетическими популяциями приобретает особое значение в рамках исполнения Закона "О семеноводстве" в редакции от 04.08.23 № 485-ФЗ[1], а также Указа Президента Российской Федера-

Список сокращений: PIC (polymorphism information content) – показатель информативности праймеров; SSR (simple sequence repeats) – простые повторяющиеся последовательности; ISSR (inter simple sequence repeat) – последовательности между простыми повторами; DArT (diversity array technology) – ДНК-чип технология для изучения разнообразия; UPGM (unweighted pair group method with arithmetic mean) – метод невзвешенного попарного среднего.

ции от 08.02.2022 № 44 “О Национальном центре генетических ресурсов растений”[2].

Для агропромышленного комплекса России одна из актуальных задач в современных экономических условиях – производство качественных высокобелковых кормов для животноводства. Главным источником обогащения кормов растительным белком служат бобовые культуры, в том числе представители рода *Lupinus*. Содержание сырого протеина в зерне люпина варьирует от 30 до 35%, а в сухом веществе зеленой массы – от 10 до 20% [3, 4]. По биологической ценности белок люпина не уступает сое и характеризуется достаточно высокой усвояемостью. Кроме того, семена люпина содержат 5.3–20.0% масла, витамины, микро- и макроэлементы [5–7]. Благодаря этим свойствам малоалкалоидные и среднеалкалоидные сорта пригодны для скармливания всем видам животных и птиц, способствуют увеличению питательной и энергетической ценности рациона и снижению себестоимости получаемой животноводческой продукции.

Высокий хозяйственный и экономический потенциал люпина до настоящего времени используют не в полной мере. Из 300 видов в составе рода *Lupinus* только 4 востребованы в сельскохозяйственном производстве: люпин белый (*L. albus* L.), люпин узколистный (*L. angustifolius* L.), люпин желтый (*L. luteus* L.) и люпин изменчивый (*L. mutabilis*) [8]. Для упрощения задач селекционеров по выделению форм с ценными свойствами и качественными характеристиками – с целью их активного вовлечения в селекционный процесс – необходима комплексная оценка генофонда с привлечением методов молекулярно-генетического анализа [9, 10]. К настоящему моменту с помощью ДНК-технологий лучше других изучены представители вида *L. angustifolius,* причем исследования в основном проводили на образцах зарубежной селекции [11, 12]. Известно о работе белорусских исследователей по анализу генов хозяйственно ценных признаков образцов из Новой Зеландии, Австралии, Польши, Испании, Швеции, и лишь единичные сорта белорусских и российских селекционеров были включены в изучаемую коллекцию [13–15]. Практически нет на сегодняшний день работ по молекулярно-генетической характеристике отечественного генофонда этой перспективной бобовой культуры. Для ускорения процесса создания новых высокопродуктивных и устойчивых сортов различного хозяйственного назначения (универсальные, зернофуражные, сидеральные), а также для повышения эффективности контроля сортового соответствия и чистоты семян необходима разработка надежных методов оценки исходного и селекционного материала.

В связи с этим цель проведенного нами исследования состояла в изучении полиморфизма расширенной коллекции российских сортов и селекционных образцов люпина разных видов с использованием простых повторяющихся последовательностей (simple sequence repeats) – SSR-маркеров для ДНК-идентификации, генетической паспортизации и выделения перспективного материала для включения в селекционные программы.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Растительный материал

Объектом исследования служили сорта, зарегистрированные в Госсортреестре Российской Федерации, и перспективные образцы, планируемые для регистрации в качестве новых селекционных достижений: 29 люпина белого (*Lupinus albus* L.), 20 люпина узколистного (*Lupinus angustifolius* L.), 18 люпина желтого (*Lupinus luteus* L.). Материал получен из ВНИИ люпина – филиала ФНЦ “ВИК им. В.Р. Вильямса”, Федерального научного центра зернобобовых и крупяных культур (ФГБНУ ФНЦ ЗБК) и Российского Государственного аграрного университета – МСХА имени К.А. Тимирязева и в основе своей создан российскими селекционерами. Для сравнительного анализа коллекция дополнена образцами иностранной селекции – 6 сортов (табл. 1).

Выделение геномной ДНК

Геномную ДНК для анализа выделяли из “балк-образцов” – суммарной навески 30 семидневных проростков от каждого сорта или селекционного образца – с использованием SDS-метода, модифицированного в условиях лаборатории для данного типа растительной ткани [16]. Количественные и качественные показатели ДНК-проб определяли электрофорезом в агарозном геле и измерением концентрации и чистоты на спектрофотометре UV-vis Nabi (MicroDigital Co., Ltd., Корея). Концентрацию всех образцов ДНК доводили до 30 нг/мкл.

Генотипирование растений рода Lupinus

ПЦР-анализ. Для генотипирования сформировали набор полиморфных SSR-маркеров по результатам проведенных ранее исследований на растениях рода *Lupinus* разных видов. Использовали реагенты и праймеры, синтезированные в ЗАО “Евроген Лаб” (Россия). В результате оптимизации условий ПЦР остановились на следую-

[1] “О внесении изменений в Федеральный закон о семеноводстве и отдельные законодательные акты Российской Федерации” (http://publication.pravo.gov.ru/document/0001202308040092).

[2] “О формировании, сохранении и использовании коллекций генетических ресурсов растений” (https://legalacts.ru/doc/ukaz-prezidenta-rf-ot-08022022-n-44-o-natsionalnom/).

Таблица 1. Перечень сортов и селекционных образцов люпина, включенных в анализ ДНК-полиморфизмов
Table 1. List of *Lupinus* samples included in DNA polymorphism analysis

Название сорта или селекционного образца (страна происхождения)		
Lupinus albus L.	*Lupinus luteus* L.	*Lupinus angustifolius* L.
Мичуринский* (Российская Федерация)	Булат* (Российская Федерация)	Белорозовый 144* (Российская Федерация)
Алый парус* (Российская Федерация)	Антей* (Российская Федерация)	Эпигональ 1215** (Российская Федерация)
Белый сидерат* (Российская Федерация)	Алтын* (Республика Беларусь)	Сидерат 46* (Российская Федерация)
Дега* (Российская Федерация)	Новозыбковский 100* (Российская Федерация)	Витязь* (Российская Федерация)
Гамма* (Российская Федерация)	18-ПИО-45-1**	Брянский кормовой* (Российская Федерация)
Тимирязевский* (Российская Федерация)	19-ПИО-18-3**	СН 78-07**
СН 17-14**	СН 12-11-02-2-4-1**	Гибрид 1246**
СН 55-14**	16-15-1-1**	bСБС 56-15-1**
СН 8-12**	16-23-4-3**	Узколистный 53* (Российская Федерация)
СН 32-19**	ЛМИ СН 61-18**	УСН 53-236**
СН 5-19**	Борлута × Житомирский**	БСВ 51-19**
Андромеда*	Союз × Пламенный**	Сидерат 265-19* (Российская Федерация)
СН 86-17 ДТ1**	Parys* (Польша)	Каля* (Австралия)
СН 90-17 ДТ1**	Puissant* (Нидерланды)	Рамонак* (Республика Беларусь)
СН 96-15 ДТ1**	СН 1163-08**	Куршавель* (Российская Федерация)
Пилигрим* (Российская Федерация)	СП2-08-д1065**	Деко 2* (Российская Федерация)
Эллин* (Республика Беларусь)	Надежный* (Российская Федерация)	Ладный* (Российская Федерация)
КСИ-22 д-5**	Бригантина* (Российская Федерация)	Фазан* (Российская Федерация)
КСИ-22 д-9**		Орловский сидерат* (Российская Федерация)
КСИ-22 д-10**		Орловский* (Российская Федерация)
КСИ-22 д-12**		
КСИ-22 д-15**		
КСИ-22 д-17**		
КСИ-22 д-19**		
КП-22 д-36**		
КП-22 д-77**		
bКП-22 д-87**		
КП-22 д-118**		
КП-22 д-19**		

Примечание: * Сорта; ** селекционные образцы, полученные от селекционеров ВНИИ люпина (Россия).
Note: * Varieties; ** breeding samples, obtained from the breeders of All-Russian Research Institute of Lupine (Russia).

щем компонентном составе: в 20 мкл реакционной смеси содержалось 3 мкл 10× ПЦР-буфера Taq Turbo, 0.4 мкл 50× dNTPs mix (10 мМ каждого нуклеотида), 0.4 мкл ДНК-полимеразы Taq (5 ед/мкл), 0.1 мкл каждого праймера (100 мкМ), 1 мкл геномной ДНК (30 нг/мкл). Амплификацию проводили в термоциклере T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, США) в режиме: 3 мин при 94°C, затем 35 циклов [30 с при 94°C, 40 с в интервале 54–64°C (в зависимости от используемой пары праймеров), 2 мин при 72°C] и финальная элонгация в течение 15 мин при 72°C. Предварительно результаты ПЦР детектировали методом электрофореза в 1.6%-ном агарозном геле при 90 В в течение 90 мин. Размер полученных фрагментов ДНК определяли с помощью пакета программ Image Lab version 6.0 на приборе Gel Doc™ XR+ (Bio-Rad) с использованием маркера молекулярной массы 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США).

Анализ полиморфизмов. Продукты амплификации с полиморфными маркерами оценивали с помощью высокоразрешающего метода капиллярного электрофореза на автоматической системе $Qsep_1$-Plus (BiOptic Inc., Тайвань) и программного обеспечения к нему Q-Analyzer.

На основе составленных бинарных матриц определяли генетические дистанции между изучаемыми образцами и строили дендрограмму методом невзвешенных парных группировок с использованием среднего арифметического (UPGMA-метод) [17].

Для оценки информативности используемых в работе SSR-маркеров и уровня межсортового полиморфизма ДНК провели анализ полученных данных с помощью программы PopGen32 [18] с определением эффективного числа аллелей (*Ne*), индекса генетического разнообразия по Нею (H_e), индекса Шеннона (*I*), показателя информативности праймеров (polymorphism information content; PIC) [19].

Верификация размеров сортоспецифичных ДНК-фрагментов для разработки генетических паспортов проведена в ЗАО “Евроген Лаб” с использованием секвенирования на генетическом анализаторе ABI PRISM 3130XL (Applied Biosystems, США). Данные секвенирования анализировали с помощью программы UGENE [20].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Подготовка препаратов ДНК для анализа генетического полиморфизма

Исследования по изучению внутривидового генетического полиморфизма и ДНК-идентификации селекционных достижений предполагают проведение масштабного анализа индивидуальных генотипов в составе каждого сорта, что является трудоемким и дорогостоящим процессом. Использование метода “балк-анализа” (bulk analysis) – формирование суммарной навески растительной ткани нескольких генотипов для одного образца – позволяет существенно сократить затраты труда, времени и реактивов при получении достоверных результатов [21, 22]. Однако для культур перекрестноопыляемых и с альтернативными типами опыления, к которым относятся в частности некоторые виды в пределах рода *Lupinus*, такой подход оправдан при условии, что выборка для анализа репрезентативна. Это повышает вероятность учета редких аллелей, встречающихся в популяции с частотой менее 10% [23, 24]. В работах по оценке генетического разнообразия высокогетерогенных популяций с использованием разных типов маркеров (DArT, SSR, SNP, AFLP и др.) показано, что для межсортовой дифференциации и надежной идентификации достаточно выборки из 20–30 индивидуальных генотипов на один образец [25–27].

В проведенном нами исследовании геномную ДНК люпина разных видов выделяли из растительной ткани 30 семидневных проростков от каждого сорта или селекционного образца. С помощью модифицированного SDS-метода, эффективного на разных видах бобовых культур, удалось получить качественные препараты ДНК, свободные от примесей, ингибирующих ПЦР, которые в значительном количестве присутствуют в композитном составе растений люпина (белки, полисахариды и вторичные метаболиты в виде алкалоидов) (рис. 1). Спектрофотометрический анализ выявил существенные различия в концентрации готовых растворов ДНК, что, вероятно, связано как с массой конкретного “балк”-образца (варьировала в диапазоне 0.32–1.34 г), так и с особенностями химического состава (меньшая или бóльшая обводненность ткани проростков). Средние значения концентраций ДНК-проб составили 297.4 и 320.3 нг/мкл для люпина белого и узколистного соответственно, с наименьшим показателем для люпина желтого – 131.2 нг/мкл.

Анализ ДНК-полиморфизма сортов и образцов Lupinus

Для наиболее распространенных видов люпина характерен низкий уровень полиморфизма, что создает определенные трудности при внутривидовой дифференциации. На протяжении последних двух десятилетий для оценки генетического разнообразия, ДНК-идентификации сортов, линий и гибридов различных сельскохозяйственных культур широко используют кодоминантные SSR-маркеры, которые позволяют дифференцировать генотипы, отличающиеся от исходных по немногим генам или их фрагментам при высокой воспроизводимости результатов [28, 29].

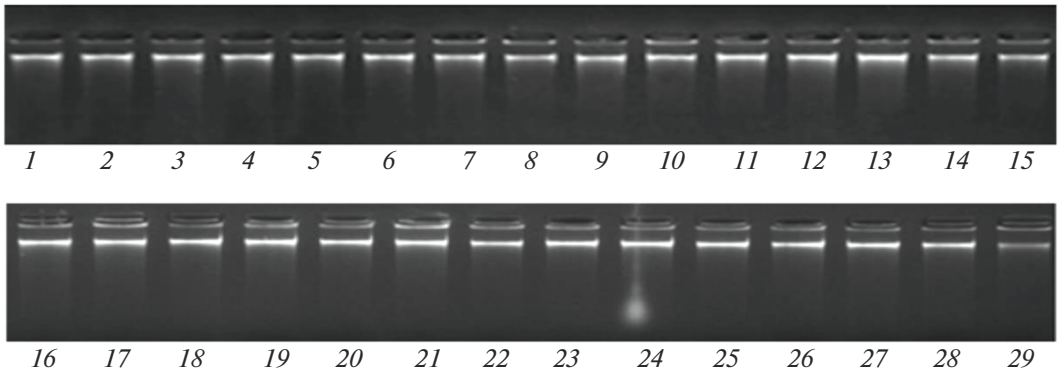

Рис. 1. Электрофореграмма образцов геномной ДНК люпина белого (*Lupinus albus*). Сорта и образцы: Мичуринский (*1*), Алый парус (*2*), Белый сидерат (*3*), Дега (*4*), Гамма (*5*), Тимирязевский (*6*), СН 17-14 (*7*), СН 55-14 (*8*), СН 8-12 (*9*), СН 32-19 (*10*), СН 5-19 (*11*), Андромеда (*12*), СН 86-17 ДТ1 (*13*), СН 90-17 ДТ1 (*14*), СН 96-15 ДТ1 (*15*), Пилигрим (*16*), Эллин (*17*), КСИ-22 д-5 (*18*), КСИ-22 д-9 (*19*), КСИ-22 д-10 (*20*), КСИ-22 д-12 (*21*), КСИ-22 д-15 (*22*), КСИ-22 д-17 (*23*), КСИ-22 д-19 (*24*), КП-22 д-36 (*25*), КП-22 д-77 (*26*), КП-22 д-87 (*27*), КП-22 д-118 (*28*), КП-22 д-19 (*29*).
Fig. 1. Electrophoregram of genome DNA samples of white lupine (*Lupinus albus*). Varieties and accessions: Michurinskiy (*1*), Aliy parus (*2*), Beliy siderat (*3*), Dega (*4*), Gamma (*5*), Timiryazevskiy (*6*), SN 17-14 (*7*), SN 55-14 (*8*), SN 8-12 (*9*), SN 32-19 (*10*), SN 5-19 (*11*), Andromeda (*12*), SN 86-17 DT1 (*13*), SN 90-17 DT1 (*14*), SN 96-15 DT1 (*15*), Piligrim (*16*), Ellin (*17*), KSI-22 d-5 (*18*), KSI-22 d-9 (*19*), KSI-22 d-10 (*20*), KSI-22 d-12 (*21*), KSI 22 d-15 (*22*), KSI-22 d-17 (*23*), KSI-22 d-19 (*24*), KP-22 d-36 (*25*), KP 22 d-77 (*26*), KP-22 d-87 (*27*), KP-22 d-118 (*28*), KP-22 d-19 (*29*).

Для оценки генетического полиморфизма люпина разных видов сформировали набор из 37 микросателлитных SSR-маркеров на основании данных литературных источников, где для них определены наибольшие значения PIC [30–33]. В предварительных экспериментах верифицировали праймеры, синтезированные к этим маркерам, и отобрали 22 информативные пары, с которыми получены отчетливые и воспроизводимые продукты амплификации с наличием межсортового ДНК-полиморфизма (табл. 2).

В результате анализа 29 сортов люпина белого (*L. albus*) с использованием 10 информативных SSR-маркеров в общей сложности выявили 420 ПЦР-продуктов, но только 4 из них оказались полиморфными. Среднее число ДНК-фрагментов на 1 маркер составило 42.1, а полиморфных – 0.4. Размеры амплифицированных фрагментов ДНК варьировали от 128 п.н. (с SSR-праймером aPT1-1) до 1 042 п.н. (aLup 197). Наибольшее число ампликонов получено с маркером aLup 125 – 88, а наименьшее – с маркерами aLSSR 55, aLup 197 и aGLNA (по 29). Специфичные ДНК-профили выявлены для 20 из 29 образцов, что составило 69%. С праймером к SSR-маркеру aLa1-EST01 получен уникальный фрагмент размером 218 п.н. для сорта Андромеда из Западной Австралии (рис. 2), имеющего в качестве родительских форм устойчивый к антракнозу генотип происхождением из Эфиопии и скороспелый высокопродуктивный сорт Киевский мутант украинской селекции. Средний процент полиморфизма для вида определен в пределах 25.8. Этот показатель оказался существенно выше, чем при анализе люпина белого с использованием ISSR-маркеров (в среднем – 11.7%) [15]. Однако Raman R. с соавт. [34], используя SSR- и DArT-маркеры, выявили более высокий уровень внутривидового ДНК-полиморфизма: 41 и 80% соответственно. Вероятно, эти результаты можно объяснить размером и составом изучаемой коллекции, сформированной из 94 дикорастущих образцов, селекционных линий и сортов происхождением из Австралии, Эфиопии, Европы (Италии, Франции, Польши, Украины), включая сорт Владимир и 4 селекционные линии из России.

Люпин узколистный (*L. angustifolius*) наиболее полно исследован с применением современных молекулярно-генетических методов на основе AFLP-, ISSR-, RAPD-, SSR-маркеров [11, 12, 31]. В большинстве работ выявлен достаточно высокий уровень генетической изменчивости современных сортов, что может быть обусловлено вариациями в некодирующих низкоконсервативных участках генома. Заметим, что небольшие морфологические различия исследователи связывают с незначительными изменениями в локусах генов, ответственных за проявление конкретных признаков [35–37].

При изучении ДНК-полиморфизма 20 сортов и сортообразцов *L. angustifolius* с помощью 5 информативных SSR-маркеров мы получили 160 ампликонов с размерами в диапазоне от 149 п.н. (с маркером NLL-9-G39) до 754 п.н. (с aLup 197). Наибольшее число ПЦР-продуктов (41) генерировали праймеры к маркерам NLL-1-G32 и aLup 197, а наименьшее (20) – к NLL-3-G-16. Среднее число амплифицированных фрагментов ДНК на праймер составило 32.2, уровень полиморфизма – 21.6%. Для сравнения приведем данные Артюховой А.В. с соавт. [15] по внутривидовому полиморфизму,

Таблица 2. Показатели эффективности SSR-маркеров, использованных для анализа генетической изменчивости сортов *Lupinus*
Table 2. Efficiency indicators of SSR markers used for analysis of genetic variability of *Lupinus* varieties

Название маркера	Эффективное число аллелей (*Ne*)	Генетическое разнообразие по Нею (H_e)	Индекс Шеннона (*I*)	Показатель информативности праймеров (PIC)
		Lupinus albus		
aLup 125[1]	1.6077	0.3499	0.5112	0.803
aPT1-1[1]	1.8483	0.4528	0.6435	0.779
aLSSR 55[1]	1.6077	0.3499	0.5112	0.185
aLSSR 14[1]	1.2325	0.1795	0.3155	0.361
aLa1-EST01[1]	1.1347	0.1132	0.2204	0.196
NLL16G35[2]	1.9016	0.4732	0.6660	0.482
aLup 197[1]	1.0967	0.0872	0.1836	0.131
aAnMtS 13[1]	1.8130	0.4471	0.6390	0.660
aCHS9[1]	1.1518	0.1237	0.2217	0.546
aGLNA[1]	1.0476	0.0444	0.1000	0.067
Среднее	1.4442	0.2621	0.4012	0.421
		Lupinus angustifolius		
NLL-9-G39[2]	1.1899	0.1514	0.2778	0.633
NLL-17-G19[2]	1.4064	0.2875	0.4616	0.308
NLL-1-G32[2]	1.5475	0.2963	0.4446	0.653
NLL-3-G16[2]	1.3137	0.2133	0.3336	0.320
aLup 197[1]	1.1082	0.0917	0.1745	0.545
Среднее	1.3131	0.2080	0.3384	0.492
		Lupinus luteus		
Lup P1C01[3]	1.7786	0.4218	0.6082	0.620
Lup P1C02[3]	1.3522	0.2305	0.3531	0.332
Lup CT20380[3]	1.1430	0.1235	0.2414	0.577
2itg50945[4]	1.5277	0.3416	0.5237	0.584
2itg03938[4]	1.4937	0.2910	0.4465	0.778
2itg14694[4]	1.5291	0.3169	0.4806	0.475
2itg26293[4]	1.5727	0.3175	0.4746	0.778
Среднее	1.4853	0.2918	0.4469	0.592

Примечание: Цифрами в надстрочнике обозначены ссылки на литературные источники с информацией по нуклеотидным последовательностям праймеров: 1 – [30], 2 – [31], 3 – [32], 4 – [33].
Note: The numbers in the superscript indicate references to literary sources with information on the nucleotide sequences of primers: 1 – [30], 2 – [31], 3 – [32], 4 – [33].

выявленному для образцов данного вида при использовании мультилокусных ISSR-маркеров, – около 25%. В нашей коллекции сортоспецифичные ДНК-профили обнаружены для 9 образцов (45%), а для сортов Белорозовый 144, Куршавель и Эпиграль 1215 выделены уникальные ДНК-фрагменты: 159, 149 и 197 п.н. соответственно – с праймерами к маркерам NLL-1-G32 и NLL-9-G39 (рис. 3).

Согласно литературным источникам, для люпина желтого (*L. luteus*), как и для других видов люпина, характерен низкий уровень генетического полиморфизма, однако маркеры, разработанные на основе микросателлитных повторов, расположенных внутри кодирующих последовательностей ДНК (expressed sequence tag simple sequence repeat, EST-SSR), обладают достаточным

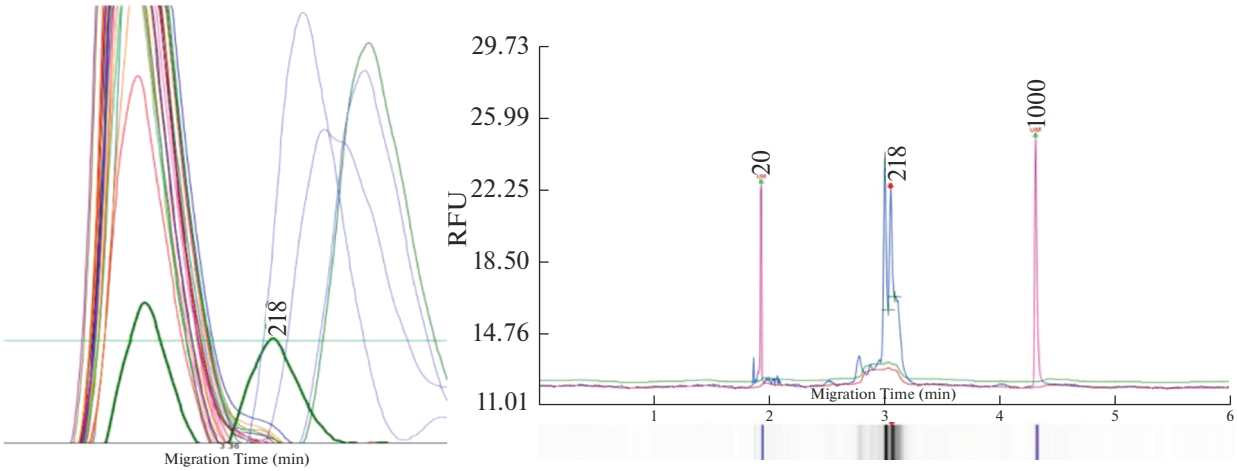

Рис. 2. ДНК-профиль сорта Андромеда *Lupinus albus* с SSR-маркером aLa1-EST01 по результатам капиллярного электрофореза. Цифрами обозначены размеры основных фрагментов, в том числе 218 п.н. – уникальный для коллекции ДНК-фрагмент в сравнении с маркерами-стандартами; RFU – интенсивность флуоресценции (отн. ед.); Migration Time (min) – время миграции фрагментов ДНК (мин).
Fig. 2. DNA profile of *Lupinus albus* variety Andromeda generated by primer to SSR marker aLa1-EST01 based on the results of capillary electrophoresis. The numbers are sizes of basic DNA fragments including the unique 218-bp and standard molecular markers.

дискриминационным потенциалом для различения сортов [32, 33].

В результате генотипирования 18 образцов *L. luteus* с использованием 7 специфичных SSR-локусов нами выявлено 182 ампликона размером от 126 п.н. (с 2itg26293) до 337 п.н. (с Lup P1C01). Наибольшее число амплифицированных фрагментов ДНК (35) получили с праймерами к маркерам Lup CT20380, а также 2itg26293, для которого определено высокое значение PIC и в работе Е. Сысолятина с соавт. [32]. Средний процент полиморфизма составил 34.7%, что существенно выше показателей, рассчитанных нами для образцов люпина белого и узколистного, а также полученных для коллекции люпина желтого в исследовании L. Gonzalez и др. [33].

Специфичные ДНК-профили, отражающие аллельное разнообразие, получили для 16 образцов исследуемой выборки (88.9%). Выявлено 6 уникальных по размеру фрагментов ДНК с SSR-маркерами: 2itg26293 для сортообразца 19-ПИО-18-3 (126 п.н.), 2itg14694 для сорта Надежный (262 п.н.), 2itg03938 для сорта Parys (246 п.н.) и Lup CT20380 для сорта Антей (128 п.н.). Между образцами 18-ПИО-45-1 и 16-15-1-1 генетический полиморфизм по микросателлитным локусам отсутствовал, поэтому составленные для них молекулярные формулы оказались идентичными. Пример электрофореграммы, полученной с использованием наиболее полиморфного маркера 2itg26293, представлен на рис. 4.

По результатам оценки межсортовой генетической изменчивости люпина разных видов были рассчитаны показатели эффективности используемых SSR-маркеров (см. табл. 2). Эффективное число аллелей (*Ne*) для люпина белого находилось в диапазоне от 1.0476 до 1.8483, среднее значение – 1.4442. Этот же показатель для сортов люпина узколистного и желтого составил 1.3131 и 1.4853 соответственно. Среднее значение индекса генетического разнообразия по Нею (*He*), определяемого как уровень частоты аллеля между особями и измеряемого числом замен генов или кодонов на один локус, равнялось 0.2621 для выборки образцов люпина белого, 0.2080 для узколистного и 0.2918 для желтого. Индекс Шеннона (*I*) – показатель, с помощью которого можно измерить разнообразие видов (генотипов в выборке) с учетом их однородности, – варьировал от 0.1745 до 0.6660 со средним значением 0.4012. Наименьшие значения этого показателя характерны для образцов, относящихся к виду *L. angustifolius* (в среднем 0.3384), тогда как наибольший средний показатель – для представителей вида *L. luteus* (0.4469).

Для используемых в анализе SSR-маркеров отмечены умеренные и высокие значения PIC с незначительными вариациями по видам: с наименьшим у люпина белого (0.421) и наибольшим (0.592) у люпина желтого (приведены средние значения). Самые высокие показатели определены для SSR-маркеров aLup 125, aPT1-1, 2itg03938 и 2itg26293. Значения PIC, рассчитанные практически для всех проанализированных нами информативных маркеров, были соизмеримы или превышали опубликованные в литературе [33, 34, 36], что, вероятно, связано с особенностями геномов анализируемой коллекции и спецификой отбора праймеров для анализа.

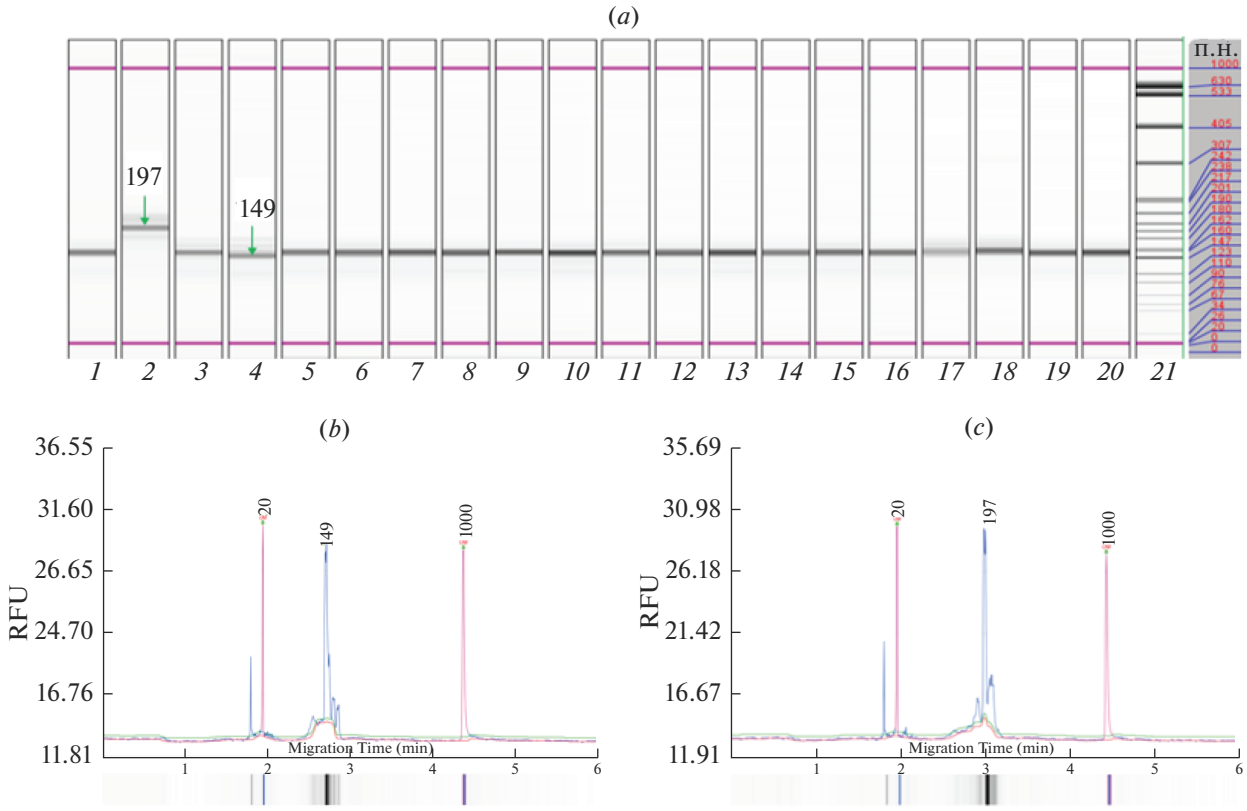

Рис. 3. Результаты капиллярного электрофореза коллекции образцов люпина узколистного (*Lupinus angustifolius*) с использованием SSR-маркера NLL-9-G39. *a* – Схема электрофореграммы сортов и селекционных образцов: Белорозовый 144 (*1*), Эпигональ 1215 (*2*), Сидерат 46 (*3*), Куршавель (*4*), Деко 2 (*5*), Ладный (*6*), Фазан (*7*), Витязь (*8*), Брянский кормовой (*9*), СН 78-07 (*10*), Гибрид 1246 (*11*), СБС 56-15-1 (*12*), Узколистный 53 (*13*), УСН 53-236 (*14*), БСВ 51-19 (*15*), Сидерат 265-19 (*16*), Каля (*17*), Рамонак (*18*), Орловский сидерат (*19*), Орловский (*20*), маркер молекулярной массы C109200 (*21*). ДНК-профили сортообразца Эпигональ 1215 (*b*) и сорта Куршавель (*c*). Цифрами обозначены размеры уникальных ДНК-фрагментов (149 и 197 п.н.) в сравнении с маркерами-стандартами.
Fig. 3. The results of capillary electrophoresis of *Lupinus angustifolius* collection with SSR marker NLL-9-G39. *a* – Scheme of electrophoregrame of following accessions: Belorozoviy 144 (*1*), Epigonal 1215 (*2*), Siderat 46 (*3*), Kurshavel (*4*), Deko (*5*), Ladniy (*6*), Fazan (*7*), Vityaz (*8*), Brianskiy kormovoy (*9*), SN 78-07 (*10*), Hybrid 1246 (*11*), SBS 56-15-1 (*12*), Uzkolistniy 53 (*13*), USN 53-236 (*14*), BSV 51-19 (*15*), Siderat 265-19 (*16*), Kalya (*17*), Ramonak (*18*), Orlovskiy siderat (*19*), Orlovskiy (*20*), molecular marker C109200 (*21*). DNA profiles of the sample Epigonal 1215 (*b*) and variety Kurshavel (*c*). Sizes of the unique DNA fragments, 149 and 197 bp, and markers-standards are indicated.

В целом, по результатам проведенного исследования можно говорить о невысокой степени межсортового ДНК-полиморфизма у люпина всех видов – среднее значение составляло 27.4%. Это соответствовало ожиданиям, так как размножение наиболее распространенных видов происходит чаще всего самоопылением и, кроме того, большинство современных сортов получено на основе небольшого числа низкоалколоидных форм. При сравнительном анализе показано, что наибольшая степень межсортовой генетической изменчивости присуща люпину желтому (*L. luteus*): получено 88.9% сортоспецифичных ДНК-профилей с 34.7% полиморфных продуктов от общего числа выявленных. Для образцов люпина белого (*L. albus*) средний показатель полиморфизма составил 25.8%, при этом индивидуальные ДНК-паттерны обнаружены у 20 из 29 образцов, включенных в анализ (69%). В коллекции из 20 образцов люпина узколистного (*L. angustifolius*) уникальное сочетание аллелей получили для 9 образцов, что составило 45% при самом низком уровне внутривидового генетического полиморфизма (21.6%).

Оценка генетических взаимосвязей в коллекции Lupinus

Методом невзвешенных парных групп с использованием среднего арифметического была построена общая UPGMA-дендрограмма, отражающая генетические взаимосвязи между видами люпина и образцами внутри видов. Расстояние между двумя различными кластерами рассчитывали как среднее между всеми парами объектов в них (рис. 5). На дендрограмме исследуемые сорта и сортообразцы отчетливо разделились на 3 кластера в со-

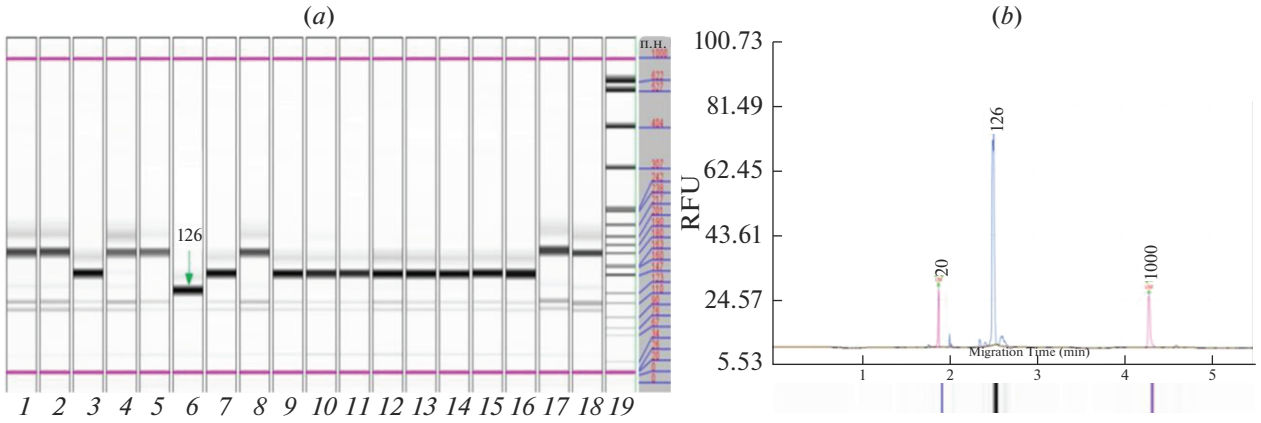

Рис. 4. Результаты капиллярного электрофореза коллекции образцов люпина желтого (*L. luteus*) с SSR-маркером 2itg26293. *a* – Схема электрофореграммы сортов и селекционных образцов: Булат (*1*), Антей (*2*), Алтын (*3*), Новозыбковский 100 (*4*), 18-ПИО-45-1 (*5*), 19-ПИО-18-3 (*6*), СН 12-11-02-2-4-1 (*7*), 16-15-1-1 (*8*), 16-23-4-3 (*9*), ЛМИ СН 61-18 (*10*), Борлута × Житомирский (*11*), Союз × Пламенный (*12*), Parys (*13*), Puissant (*14*), СН 1163-08 (*15*), СП2-08-д1065 (*16*), Надежный (*17*), Бригантина (*18*), маркер молекулярной массы С109200 (*19*). *b* – ДНК-профиль образца 19-ПИО-18-3. Цифрами указаны размеры уникального ДНК-фрагмента (126 п.н.) и маркеров-стандартов.
Fig. 4. The results of capillary electrophoresis of *L. luteus* collection with SSR marker 2itg26293. *a* – Scheme of electrophoregrame of following accessions: Bulat (*1*), Antey (*2*), Altin (*3*), Novozibkovskiy 100 (*4*), 18-PIO-45-1 (*5*), 19-PIO-18-3 (*6*), SN 12-11-02-2-4-1 (*7*), 16-15-1-1 (*8*); 16-23-4-3 (*9*), LMI SN 61-18 (*10*), Borluta x Zhitomirskiy (*11*), Soyus × Plamenniy (*12*), Parys (*13*), Puissant (*14*), SN 1163-08 (*15*), SP2-08-d1065 (*16*), Nadezhniy (*17*), Brigantina (*18*), molecular marker C109200 (*19*). *b* – DNA-profile of the sample 19-PIO-18-3. The sizes of the unique 126 bp DNA fragment and markers-standards are indicated.

ответствии с видовой принадлежностью, которой обусловлены и особенности в проявлении морфобиологических и агрономических признаков.

Следует заметить, что в кластере люпина белого, отличающегося от других видов высокой продуктивностью (до 55 ц/га) и высоким содержанием в семенах белка (37–40%) и жира (10–12%), но более требовательного к условиям произрастания (температурный режим и состав почв) [5, 38], сформировалось четыре группы, в каждую из которых входит 3–5 образцов. В общей группе оказались скороспелые сорта универсального назначения: Мичуринский, Тимирязевский и Пилигрим. Сорт Мичуринский характеризуется высокой урожайностью и содержанием белка до 35%, не уступая по этому показателю сое. Пилигрим выведен путем многократного отбора из засухоустойчивых и продуктивных форм сорта Гамма, который расположился на соседней ветви дендрограммы. Гамма – сорт российской селекции универсального назначения, получен методом радиационного мутагенеза с последующим индивидуальным отбором из перспективного образца. Этот раннеспелый, устойчивый к фузариозу сорт оказался генетически близким белорусскому среднеспелому сорту Эллин, высокотолерантному к фузариозу и антракнозу, устойчивому к засухе и заморозкам. Продуктивный сорт сидерального назначения Белый сидерат кластеризовался вместе с селекционными образцами СН 96-15 ДТ1 и КСИ-22 д-17. Обособленно, на отдельных ветвях дендрограммы, расположились скороспелый зернофуражный сортообразец СН 90-17 ДТ1, сорт австралийской селекции Андромеда и среднеспелый, устойчивый к заболеваниям сорт универсального использования Алый парус. Наиболее удаленными, а, следовательно, генетически дивергентными, оказались сортообразцы СН 8-12 и СН 96-15 ДТ1, а также КСИ-22 д-17 и КСИ-22 д-15, которые могут служить перспективным материалом для селекции.

Узколистный люпин получил наибольшее распространение среди культивируемых в нашей стране видов кормового люпина. Считается перспективной зернофуражной культурой благодаря повышенной семенной продуктивности, высокому содержанию белка, скороспелости и неприхотливости к почвам [4, 14]. Сорта и сортообразцы люпина узколистного также распределились по четырем группам. В расположении образцов на ветвях дендрограммы прослеживаются корреляционные связи с их селекционной характеристикой. Так, раннеспелые сорта Сидерат 46, Деко 2, Орловский, отличающиеся повышенной устойчивостью к антракнозу и фузариозу, формируют одну группу, а сорта иностранной селекции: Каля (Австралия) и Рамонак (Республика Беларусь) – разделились по разным локациям. Отличительной особенностью сорта Каля является низкорослость растений, тогда как Рамонак – высокорослый и продуктивный. На отдельных ветвях генеалогического древа оказались сорт Белорозовый 144 и сортообразец Эпигональ 1215, при молекулярном анализе которых определены выраженные генетические различия по микросателлитным локусам генома.

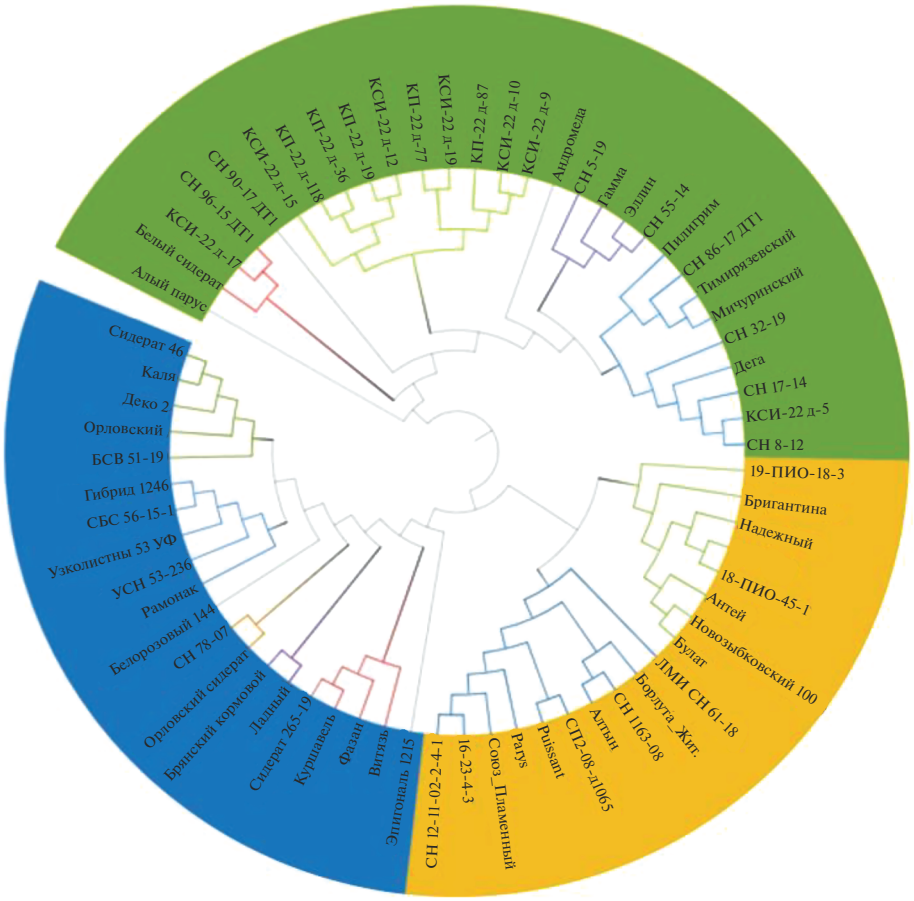

Рис. 5. Дендрограмма образцов люпина, построенная с помощью метода UPGMA по данным SSR-анализа. Желтым цветом обозначен кластер люпина желтого (*L. luteus*), зеленым – люпина белого (*L. albus*), синим – узколистного (*L. angustifolius*). Сокращения в написании названий образцов: Борл._Жит. – Борлута × Житомирский; Союз_Пламенный – Союз × Пламенный.

Fig. 5. UPGMA-dendrogram of *Lupinus* accessions based on SSR markers data. The *L. luteus* cluster is highlighted in yellow, *L. albus* in green, and *L. angustifolius* in blue.

У растений люпина желтого преобладает перекрестный тип опыления; большинство сортов этого вида – универсального использования, дают хорошие урожаи зерна и зеленой массы на малопродуктивных легких и средних по механическому составу почвах. Желтый люпин отличается высокой биологической ценностью белка в семенах – существенно превышает другие виды по содержанию цистеина и метионина [39, 40]. По результатам генотипирования кластер люпина желтого разделился на две группы, одна из которых объединила сорта Булат, Новозыбковский 100, Антей; Надежный и Бригантина. Отдельно расположились сорта и сортообразцы зарубежной селекции, причем отмечена тенденция к разделению в соответствии с происхождением. Так, голландский сорт Puissant и польский Parys, а также сорт белорусской селекции Алтын и образец, имеющий в качестве родительских форм украинские сорта Борлута и Житомирский, оказались в разных подгруппах. Перспективными для использования в селекционных схемах можно считать генетически удаленные образцы 19-ПИО-18-3 и СН 12-11-02-2-4-1. Полученная информация может быть востребована в работе селекционеров при составлении схем гибридизации.

Верификация результатов и составление молекулярно-генетических формул

По результатам изучения генетического полиморфизма для 45 сортов и сортообразцов из общей коллекции люпина получены индивидуальные (сортоспецифичные) ДНК-профили. Размеры выявленных аллелей верифицировали методами капиллярного электрофореза и выборочного секвенирования. На основе этой информации со-

Таблица 3. Молекулярно-генетические формулы сортов и селекционных образцов люпина разных видов
Table 3. Molecular genetic formulas of varieties and breeding samples of different *Lupinus* species

Название сорта/ селекционного образца	Молекулярно-генетическая формула	Название маркера/код локуса
Lupinus albus		
Мичуринский	$A_{275,513,531}B_{137,139}C_{157}D_{163}E_{207}F_{255}$	aLup 125/A aPT1-1/B aLSSR 55/C aLSSR 14/D aLa1-EST01/E NLL-16-G35/F
Алый парус	$A_{275,513,531}B_{128,131}C_{163}D_{157}E_{225}$	
Белый сидерат	$A_{275,513,531}B_{128,131}C_{157}D_{163}E_{207}\ F_{245,255}F_{245}$	
Дега	$A_{363,513,531}B_{137,139,140}C_{157}D_{163}E_{207}F_{255}$	
Гамма	$A_{363,513,531}B_{128,131,140}C_{157}D_{163}E_{207}F_{255}$	
Тимирязевский	$A_{275,513,531}B_{137,139}C_{157}D_{163}E_{207}F_{245,255}$	
Андромеда	$A_{363,513,531}B_{128,131,137,140}C_{157}D_{163,190}E_{207,\mathbf{218}}F_{245}$	
Пилигрим	$A_{275,513,531}B_{139,140}C_{157}D_{163}E_{207}F_{255}$	
СН 32-19	$A_{363,513,531}B_{137,139}C_{157}D_{157}E_{207}F_{245,255}$	
СН 5-19	$A_{363,513,531}B_{128,131}C_{157}D_{163}E_{207}F_{245}$	
СН 86-17 ДТ1	$A_{275,513,531}B_{137,139}C_{157}D_{163}E_{207}F_{245}$	
СН 90-17 ДТ1	$A_{275,513,531}B_{137,139}C_{157}D_{163}E_{225}F_{245}$	
СН 96-15 ДТ1	$A_{363,513,531}B_{128,131}C_{163}D_{163}E_{207}F_{245}$	
КСИ-22 д-15	$A_{282,513,549}B_{128,131,137,140}C_{157}D_{157,163,190}E_{207}F_{255}$	
КСИ-22 д-17	$A_{375,513,549}B_{128,131}C_{163}D_{163}E_{207}F_{245}$	
КСИ-22 д-19	$A_{282,513,549}B_{137,140}C_{157}D_{163}E_{225}F_{245}$	
КП-22 д-36	$A_{375,513,549}B_{128,131}C_{157}D_{163}E_{207}F_{255}$	
КП-22 д-77	$A_{282,513,549}B_{137,139}C_{157}D_{163}E_{225}F_{245}$	
КП-22 д-87	$A_{282,513,549}B_{137,139}C_{157}D_{163}E_{207}F_{245}$	
КП-22 д-118	$A_{282,375,513,549}B_{128,131}C_{157}D_{163}E_{207}F_{255}$	
Lupinus angustifolius		
Белорозовый 144	$A_{155,158}B_{239}C_{\mathbf{159}},_{193}D_{218}$	NLL-9-G39/A NLL-17-G19/B NLL-1-G32/C NLL-3-G16/D
Эпигональ 1215	$A_{\mathbf{197}}B_{239}C_{164,193}D_{218}$	
Куршавель	$A_{\mathbf{149}}B_{239}C_{164,182}D_{227}$	
Деко 2	$A_{155,158}B_{214}C_{164,182}D_{218}$	
Ладный	$A_{155,158}B_{214}C_{164,193}D_{218}$	
Каля	$A_{158,162}B_{214}C_{164,182}D_{218}$	
Рамонак	$A_{158,162}B_{239}C_{164,182}\ D_{227}$	
Орловский сидерат	$A_{155,158}B_{124,239}C_{164,193}D_{218}$	
Гибрид 1246	$A_{155,158}B_{239}C_{164,182,193}D_{218}$	

Таблица 3. Окончание

Название сорта/ селекционного образца	Молекулярно-генетическая формула	Название маркера/код локуса
Lupinus luteus		
Булат	$A_{325}B_{308}C_{132,134}D_{205,207}E_{214}F_{282}G_{180,183}$	Lup P1C01/A Lup P1C02/B Lup CT20380/C 2itg50945/D 2itg03938/E 2itg14694/F 2itg26293/G
Антей	$A_{325}B_{308}C_{\mathbf{128}}D_{205,207}E_{211,214}F_{282}G_{180,183}$	
Алтын	$A_{337}B_{308,318}C_{132,134}D_{202,205}E_{253,255}F_{282}G_{149,152}$	
Новозыбковский 100	$A_{325}B_{308}C_{132,134}D_{207}E_{211,214}F_{282}G_{180,183}$	
Борлута × Житомирский	$A_{332}B_{318}C_{132,134}D_{205,207}E_{253,255}F_{266}G_{149,152}$	
Союз × Пламенный	$A_{337}B_{318}C_{132,134}D_{207}E_{255}F_{266}G_{149,152}$	
Parys	$A_{337}B_{308}C_{132,134}D_{205,207}E_{\mathbf{246}}F_{266}G_{149,152}$	
Puissant	$A_{332}B_{308}C_{132,134}D_{205}E_{255}F_{266}G_{149,152}$	
Надежный	$A_{325}B_{308}C_{132,134}D_{205,207}E_{214}F_{\mathbf{262}}G_{180,183}$	
Бригантина	$A_{337}B_{308}C_{132,134}D_{205,207}E_{211,214}F_{266}G_{180}$	
СН 1163-08	$A_{337}B_{318}C_{137,139}D_{202,205}E_{253,255}F_{271}G_{149,152}$	
19-ПИО-18-3	$A_{325}B_{308}C_{\mathbf{165}}D_{205,207}E_{\mathbf{284}}F_{266}G_{\mathbf{128}}$	
СН 12-11-02-2-4-1	$A_{337}B_{308}C_{132,134}D_{205,207}E_{255}F_{266}G_{149,152}$	
СП2-08-д1065	$A_{332}B_{308}C_{137,139}D_{202}E_{255}F_{271}G_{149,152}$	
16-23-4-3	$A_{337}B_{308}C_{132,134}D_{207}E_{255}F_{266}G_{149,152}$	
ЛМИ СН 61-18	$A_{325,337}B_{308}C_{132,134}D_{207}E_{253,255}F_{282}G_{149,152}$	

Примечание: Классификация материала по сортам и селекционным образцам приведена в табл. 1. Жирным шрифтом выделены ампликоны уникальных размеров (валидированы секвенированием).
Note: The material was classified by varieties and breeding samples in the Table 1. Amplicons of unique sizes validated by sequencing are shown in bold.

ставлены молекулярно-генетические формулы, содержащие код маркера и форму аллельного варианта в буквенно-цифровом обозначении (табл. 3). Формула может служить дополнительной генетической характеристикой, подтверждающей оригинальность селекционного достижения при регистрации или при решении спорных правовых вопросов по его авторству.

Для сортов, зарегистрированных в Госреестре Российской Федерации и выделившихся внутри вида не только специфичным ДНК-профилем, но и уникальной нуклеотидной последовательностью в исследованной области генома (Белорозовый 144, Надежный, Антей, Куршавель), разработаны эталонные генетические паспорта. Основная характеристика в таком паспорте – индивидуальная молекулярная формула, а дополнительно включена краткая информация по происхождению сорта, регионам возделывания, основным морфобиологическим признакам и хозяйственным свойствам. Образец генетического паспорта для сорта Антей люпина желтого (*L. luteus*) представлен на рис. 6.

Уникальные ДНК-фрагменты выявлены также у сортов и сортообразцов, не включенных на текущий момент в Госреестр Российской Федерации. Это люпин белый Андромеда (218 п.н.), сортообразец Эпигональ 1215 люпина узколистного (149 п.н.) и польский сорт Parys люпина желтого (246 п.н.). Селекционный образец 19-ПИО-18-3 выделялся в изучаемой коллекции по трем отличающимся размерами продуктам амплификации в разных локусах генома: с SSR-маркерами Lup CT20380 (165 п.н.), 2itg03938 (284 п.н.) и 2itg26293 (128 п.н.), – что уже на данном этапе подтверждает его оригинальность на генетическом уровне.

Аннотированные нуклеотидные последовательности, выявленные в геномах сортов Мичуринский, Алый парус, Дега, Ладный, Фазан, Белорозовый 144, Эпигональ, Куршавель, Антей и Надежный, депонированы в международной базе генетических ресурсов GenBank NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov) под идентификационными номерами OP327073, OP327075, OP327076, OP327074, OP354273, OP354275,

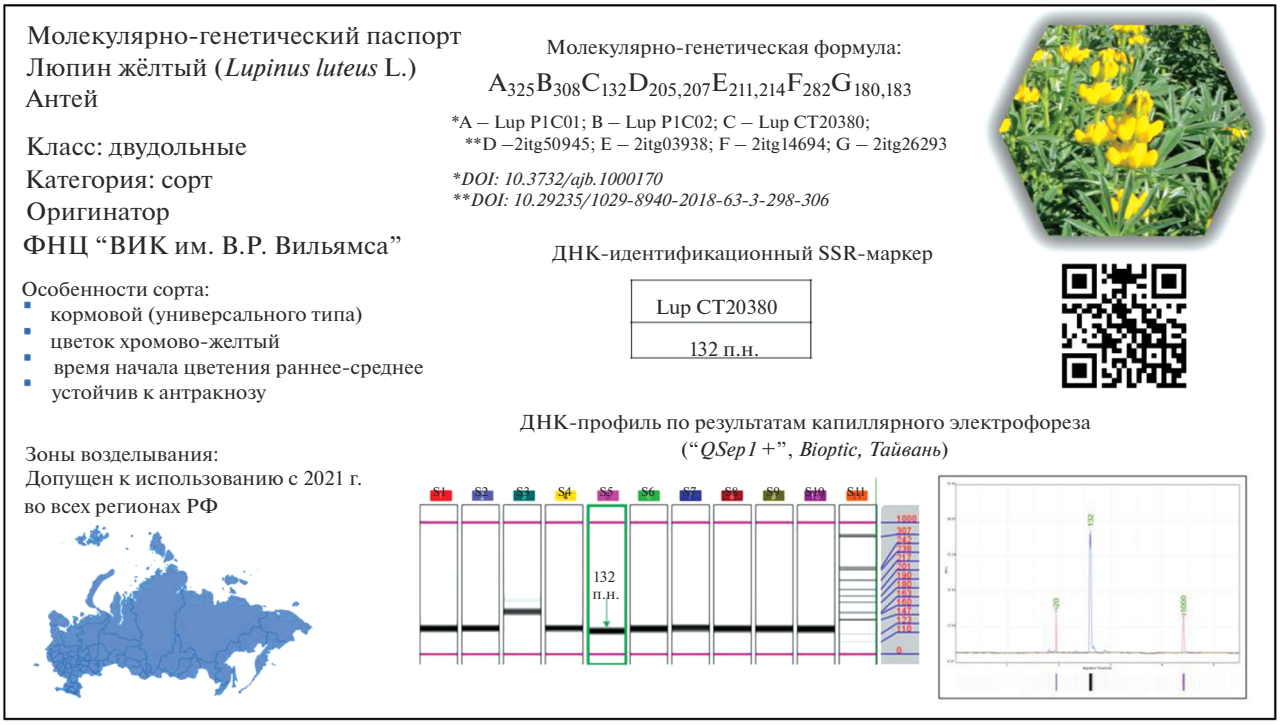

Рис. 6. Молекулярно-генетический паспорт люпина желтого (*L. luteus*) сорта Антей, разработанный на основе SSR-маркеров.
Fig. 6. Genetic passport of *Lupinus luteus* variety Antey developed on the basis of SSR markers.

OP354276, OR880868, OR880872 и OR880874 соответственно. Эта информация может быть востребована в исследованиях по генетике и филогенетике люпина разных видов, при создании ДНК-маркеров к генам хозяйственно ценных признаков, а также в работе селекционеров при подборе перспективных пар для скрещивания, контроле результатов гибридизации и оценке структуры сортов-популяций для решения вопросов сортообновления и сортосмены.

На основании результатов проведенного исследования можно заключить, что для люпина изученных видов характерна невысокая степень генетического разнообразия по микросателлитным локусам генома: средний уровень межсортового полиморфизма ДНК составил 27.4%.

Определены информативные SSR-маркеры, позволяющие с высокой степенью достоверности генотипировать сорта и образцы люпина российской селекции и пригодные для их дифференциации. Наиболее эффективными, в соответствии с рассчитанными значениями PIC, можно считать маркеры aLSSR 55 и aPT1-1 для люпина белого, NLL-9-G39 и NLL-1-G32 для узколистного, 2itg03938 и 2itg26293 для люпина желтого.

В результате оценки генетических дистанций в анализируемой коллекции люпина выявлены генетически дивергентные образцы, которые могут служить перспективным материалом для использования в селекционных программах. Это сортообразцы люпина белого: СН 8-12 и СН 96-15 ДТ1, КСИ 22 д-15 и КСИ 22 д-17, – а также люпина желтого: 19-ПИО-18-3 и СН 12-11-02-2-4-1.

Разработанные молекулярные формулы перспективных селекционных образцов могут быть востребованы для подтверждения их оригинальности при патентовании и для достоверного сохранения коллекций, а эталонные генетические паспорта – при оценке сортового соответствия и чистоты семенного материала.

В ходе исследований получены новые знания по структуре геномов сортов люпина разных видов из национального генофонда Российской Федерации. Секвенированные фрагменты генов пополнили картотеку международного банка биоресурсной информации, которую можно использовать в качестве системы информационной поддержки процессов селекции, семеноводства и производства люпина – ценной сельскохозяйственной культуры.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы работы выражают благодарность селекционерам – научным сотрудникам Федерального научного центра зернобобовых и крупяных культур (ФГБНУ ФНЦ ЗБК) и Российского Государственного аграрного университета – МСХА имени К.А. Тимирязе-

ва за любезно предоставленный материал для исследований.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование финансировалось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания по теме FGGW-2022-0007.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Камнев А.М., Антонова О.Ю., Дунаева С.Е., Гавриленко Т.А., Чухина И.Г.* Молекулярные маркеры в исследованиях генетического разнообразия представителей рода *Rubus* L. и перспективы их применения в селекции. *Вавиловский журнал генетики и селекции*, 2020, 24(1), 20–30. https://doi.org/10.18699/VJ20.591
2. *Gulisano A., Alves S., Martins J.N., Trindade L.M.* Genetics and breeding of *Lupinus mutabilis*: an emerging protein crop. *Front. Plant Sci*., 2019, 10, 1385. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01385
3. *Lucas M.M., Stoddard F.L., Annicchiarico P., Frías J., Martínez-Villaluenga C., Sussmann D., Duranti M., Seger A., Zander P.M., Pueyo J.J.* The future of Lupin as a protein crop in Europe. *Front. Plant Sci.*, 2015, 6, 705. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00705
4. *Агеева П.А., Почутина Н.А., Громова О.М., Зайцева Н.М.* Люпин узколистный – результаты изучения сортов и сортообразцов по адаптивности и комплексу хозяйственно-биологических признаков. *Аграрная наука Евро-Северо-Востока*, 2022, 23(2), 211–220. https://doi.org/10.30766/2072-9081
5. *Лукашевич М.И., Селиванова М.Е., Свириденко Т.В.* Актуальные направления изучения генофонда люпина белого *(Lupinus albus* L.). *Зернобобовые и крупяные культуры,* 2023, 2(46), 89–95. https://doi.org/10.24412/2309-348X-2023-2-89-95
6. *Вишнякова М.А.* О перспективах введения в культуру и интродукции различных видов люпина. *Сельскохозяйственная биология*, 2005, 2, 101–109.
7. *Вишнякова М.А., Власова Е.В., Егорова Г.П.* Генетические ресурсы люпина узколистного (*Lupinus angustifolius* L.) и их роль в доместикации и селекции культуры. *Вавиловский журнал генетики и селекции*, 2021, 25(6), 620–630. https://doi.org/10.18699/VJ21.070
8. *Gresta F., Wink M., Prins U., Abberton M., Capraro J., Scarafoni A., Hill G.* Lupins in European cropping systems. In: *Legumes in Cropping Systems*. CAB International, 2017, 88–108. https://doi.org/10.1079/9781780644981
9. *Annicchiarico P., Caroni A.M.* Diversity white and narrow-leafed lupine genotypes adaptive response across climatically-contrasting Italian environments and implications for selection. *Euphytica*, 2009, 166, 71–81. https://doi.org/10.1007/s10681-008-9836-9
10. *You M., Boersma J.G., Buirchell B.J., Sweetingham M.W., Siddique K.H., M., Yang H.A.* PCR-based molecular marker applicable for marker-assisted selection for anthracnose disease resistance in lupine breeding. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 2005, 10, 123–124.
11. *Boersma J.G., Buirchell B.J., Sivasithamparam K., Yang H.* Development of two sequence-specific PCR markers linked to the le gene that reduces pod shattering in narrow-leafed lupine (*Lupinus angustifolius* L.). *Genet. Mol. Biol.*, 2007, 30(3), 623–629. https://doi.org/10.1590/S1415-47572007000400020
12. *Yang H., Renshaw D., Thomas G., Buirchell B., Sweetingham M.A.* A strategy to develop molecular markers applicable to a wide range of crosses for marker assisted selection in plant breeding: a case study on anthracnose disease resistance in lupine (*Lupinus angustifolius* L.). *Mol. Breeding*, 2008, 21, 473–483. https://doi.org/10.1007/s11032-007-9146-2
13. *Анисимова Н.В., Сысолятин Е.Н., Крицкий М.Н., Шор В.Ч., Гринь В.В., Козловский А.А., Кильчевский А.В.* Анализ коллекции люпина узколистного (*Lupinus angustifolius* L.); по генам хозяйственно ценных признаков. *Земледелие и селекция в Беларуси*, 2018, 54, 300–307.
14. *Сысолятин Е.Н., Анохина В.С., Анисимова Н.В., Бабак О.Г., Кильчевский А.В.* Генетическое типирование образцов люпина узколистного (*Lupinus angustifolius* L.) по хозяйственно ценным признакам. *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук*, 2015, 4, 44–50. https://vestibio.belnauka.by/jour/article/view/165/166.
15. *Артюхова А.В., Гришин С.Ю., Заякин В.В., Нам И.Я.* Использование метода ISSR-PCR для выявления генетического полиморфизма сортов разных видов рода *Lupinus. Факторы экспериментальной эволюции организмов. Сб. научных трудов.* Киев: Логос, 2010, 8, 299–302.
16. *Клименко И.А., Антонов А.А. Душкин В.А., Шамустакимова А.О., Мавлютов Ю.М.* Эффективный способ выделения ДНК для ПЦР-анализа из “балк-образцов” проростков. *Адаптивное кормопроизводство*, 2021, 3, 29–48.
17. *Letunic I., Bork P.* Interactive Tree of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res.*, 2021, 49(W1), W293–W296. https://doi.org/10.1093/nar/gkab301
18. *Yeh F.C., Boyle T.J.B.* Population genetic analysis of codominant and dominant markers and quantitative traits. *Belg. J. Bot.*, 1997, 129, 157–163.
19. *Чесноков Ю.В., Артемьева А.М.* Оценка меры информационного полиморфизма генетического разнообразия. *Сельскохозяйственная биология*, 2015,

50(5), 571–578.
https://doi.org/10.15389/agrobiology.2015.5.571rus

20. *Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M.* The UGENE team. Unipro UGENE: a unified bio-informatics toolkit. *Bioinformatics*, 2012, 28(8), 1166–1167.
https://doi.org/0.1093/bioinformatics/bts091

21. *Gilbert J.E., Lewis R.V., Wilkinson M.J., Caligari P.D.S.* Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections. *Theor. Appl. Genet.*, 1999, 98, 1125–1131.
https://doi.org/10.1007/s001220051176

22. *Fu Y.B.* Applications of bulking in molecular characterization of plant germplasm: a critical review. *Plant Genet. Resour.*, 2003, 1(2–3), 161–167.
https://doi.org/10.1079/PGR200324

23. *Crossa J.* Methodologies for estimating the sample-size required for genetic conservation of outbreeding crops. *Theor. Appl. Genet.,* 1989, 77, 153–161.
https://doi.org/10.1007/BF00266180

24. *Michelmore R., Paran I., 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, 88, 28–32.
https://doi.org/10.1073/pnas.88.21.9828

25. *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.
https://doi.org/10.1023/A:1012048103585

26. *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(3), 478–486.
https://doi.org/10.1139/g05-011

27. *Liu S., Feuerstein U., Luesink W., Schulze S., Asp T., Studer B., Becker H.C., Dehmer K.J.* DArT, SNP, and SSR analyses of genetic diversity in *Lolium perenne* L. using bulk sampling. *BMC Genet.*, 2018, 19, 10.
https://doi.org/10.1186/s12863-017-0589-0

28. *Maughan P., Buss M.G.* Microsatellite and amplified sequence length polymorphism in cultivated and wild soybean. *Genome,* 1995, 38, 715–723.
https://doi.org/10.1139/g95-090

29. *Yin Sh., Wang Y., Nan Zh*. Genetic diversity studies of alfalfa germplasm (*Medicago sativa* L. subsp. *sativa*) of United States origin using microsatellite analysis. *Legume Research*, 2018, 41(2), 202–207.
https://doi.org/10.18805/LR-358

30. *Atnaf M., Yao N., Martina K., Dagne K., Wegary D., Tesfaye K.* Molecular genetic diversity and population structure of Ethiopian white lupin landraces: implications for breeding and conservation. *PLoS One*, 2017, 12(11), e0188696.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188696

31. *Ji Y., Liu R., Hu J., Huang Y.,·Wang D., Li G.,·Rahman Md. M., Zhang H., Wang C., Li M., Yang T., Zong X.* Genetic diversity analysis for narrow-leafed lupine (*Lupinus angustifolius* L.) by SSR markers. *Mol. Biol. Rep.*, 2020, 47(7), 5215–5224.
https://doi.org/10.1007/s11033-020-05596-z

32. *Сысолятин Е.Н., Анисимова Н.В., Бабак О.Г., Анохина В.С., Романчук И.Ю., Кильчевский А.В.* Анализ межсортового полиморфизма люпина желтого (*Lupinus luteus* L.) с использованием EST-SSR и SRAP-RGA маркеров. *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук*, 2018, 63(3), 298–306.
https://doi.org/10.29235/1029-8940-2018-63-3-298-306

33. *Gonzalez L.B., Straub S.C., Doyle J.J., Ortega P.E., Garrido H.E., Butler I.J.* Development of microsatellite markers in *Lupinus luteus* (Fabaceae) and cross-species amplification in other lupine species. *Am. J. Botany*, 2010, e72–e74.
https://doi.org/10.3732/ajb.1000170

34. *Raman R., Cowley R.B., Raman H., Luckett D.J.* Analyses using SSR and DArT molecular markers reveal that Ethiopian accessions of white lupine (*Lupinus albus* L.) represent a unique genepool. *Open J. Genet.*, 2014, 4(2), 87–98.
https://doi.org/10.4236/ojgen.2014.42012

35. *Talhinhas P., Neves-Martins J., Leitao J.* AFLP, ISSR and RAPD markers reveal high levels of genetic diversity among *Lupinus* spp. *Plant Breeding*, 2003, 122, 507–510.
https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2003.00892.x

36. *Talhinhas P., Leitao J., Martins J.N.* Collection of *Lupinus angustifolius* L. germplasm and characterization of morphological and molecular diversity. *Genet. Resour. Crop Evol.*, 2006, 53(3), 563–578.
https://doi.org/10.1007/s10722-004-2684-0

37. *Анохина В.С., Каминская Л.Н., Саук И.Б., Петручения С.В.* Молекулярно-генетические исследования у люпина (*Lupinus* L.): создание молекулярных маркеров и генетических карт. *Молекулярная и прикладная генетика*, 2010, 11, 54–67.

38. *Гатаулина Г.Г., Шитикова А.В., Медведева Н.В.* Влияние стрессовых погодных условий на разных этапах вегетации на формирование элементов продуктивности у сортов люпина белого (*Lupinus albus* L.) селекции РГАУ МСХА им. К.А. Тимирязева. *Известия ТСХА*, 2021, 5, 65–76.
https://doi.org/10.26897/0021-342X-2021-5-65-76

39. *Никитенко А.Н., Домаш В.И., Шейко А.Ч.* Исследование аминокислотного состава белков семян злаковых и зернобобовых культур белорусской селекции. *Труды БГТУ*, 2015, 4, 211–215.

40. *Glencross B.D., Carter C.G., Duijster N., Evans D.R., Dods K., McCafferty P., Hawkins W.E., Maas R., Sipsas S.* A comparison of the digestibility of a range of lupine and soybean protein products when fed to either Atlantic salmon (*Salmo salar*) or rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 2004, 237, 333–346.
https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.03.023

Varietal Identification of Lupine (*Lupinus* L.) Based on the Microsatellite DNA Markers

I. A. Klimenko[a, #], V. A. Dushkin[a], M. I. Lukashevitch[b], M. E. Selivanova[b], N. V. Novik[b], and P. A. Ageeva[b]

[a] *Federal Williams Research Center of Forage Production & Agroecology, Moscow oblast', Lobnya, 141055 Russia*

[b] *All-Russian Scientific Research Institute of Lupine – Branch of the Federal Williams Research Center of Forage Production & Agroecology, Bryansk, 241524 Russia*

[#] *e-mail: iaklimenko@mail.ru*

Abstract—Genetic polymorphism of a collection of *Lupinus* genus accessions was studied using SSR marking techno-logy. The average level of intra-species DNA polymorphism for *L. albus, L. angustifolius* and *L. luteus* was found to be 25.8, 21.6 and 34.7%, respectively. The informative markers for genotyping and identification of Russian lupine varieties and breeding samples were determined. As a result of genetic distance assessment, genetically divergent accessions were identified that can serve as promising material for use in breeding programs for white (*L. albus*) and yellow (*L. luteus*) *lupine*, namely: SN 8-12, SN 96-15 DT1, KCI-22 d-15, KCI 22 d-17, 19-PIO-18-3, SN 12-11-02-2-4-1. Based on data obtained, molecular formulas of the studied samples were developed, and reference genetic passports were compiled for the lupine varieties Belorozoviy 144, Nadyezhniy, Antey, Kurshavel. The practical results of the research and new knowledge on the structure of the genomes of Russian lupine varieties can be used in variety testing, seed production, and as a system of information support for the processes of selection and preservation of the National gene pool of lupine, a valuable agricultural crop.

Keywords: forage crops, *Lupinus* spp, SSR markers, variety identification, genetic certification