

ПРИМЕНЕНИЕ SRAP-МАРКЕРОВ ДЛЯ ДНК-ИДЕНТИФИКАЦИИ РОССИЙСКИХ СОРТОВ ЛЮЦЕРНЫ

© 2021 г. А. О. Шамустакимова¹, Ю. М. Мавлютов¹*, И. А. Клименко¹

¹Федеральный научный центр кормопроизводства и агроэкологии им. В.Р. Вильямса ФНЦ “ВИК им. В.Р. Вильямса”,
Московская обл., Лобня, 141055 Россия

*e-mail: yulian92@mail.ru

Поступила в редакцию 02.06.2020 г.

После доработки 28.07.2020 г.

Принята к публикации 25.08.2020 г.

Проведена оценка 17 сортов и одного сортообразца люцерны с использованием маркерной системы SRAP (*sequence-related amplified polymorphism*) с целью определения ее эффективности для сортовой идентификации. Из 25 протестированных комбинаций SRAP-маркеров семь оказались информативными для выявления ДНК-полиморфизма в исследуемых сортах. Эти комбинации генерировали 129 ПЦР-продуктов с уровнем полиморфизма от 21 до 50%. Для 14 сортов удалось выявить специфические продукты амплификации с целью последующей разработки генетических паспортов.

Ключевые слова: люцерна, SRAP-маркеры, полиморфизм ДНК, генетическое разнообразие, геном.

DOI: 10.31857/S0016675821050118

Люцерна является важнейшей сельскохозяйственной культурой, которая возделывается в качестве источника высококачественного белкового корма для всех видов скота и птицы [1]. Род люцерны насчитывает более 100 видов, из которых наиболее значимыми на территории Российской Федерации являются четыре: люцерна изменчивая (*Medicago varia* Mart.), люцерна посевная (*M. sativa* L.), люцерна желтая (*M. falcata* L.) и люцерна хмелевидная (*M. lupulina* L.). На их основе создана система сортов, обладающих высокой урожайностью и устойчивостью к болезням и вредителям [1, 2]. С целью успешного решения практических задач, связанных с использованием новых сортов в кормопроизводстве, для развития семеноводства, а также для обеспечения правовой защиты селекционных достижений необходима надежная система идентификации [3, 4].

Современные подходы анализа генетического разнообразия, основанные на полимеразной цепной реакции, позволяют идентифицировать виды и сорта различных культур, в частности с целью последующей паспортизации [5]. При этом одной из главных проблем является адекватный подбор маркерной системы, соответствующей основным требованиям и задачам исследования. Среди важнейших характеристик маркерной системы, необходимых при анализе генетического разнообразия, можно выделить уровень полиморфизма, принцип наследования маркера, а также воспроизводимость полученных результатов [6]. Особый

интерес в настоящий момент представляет маркерная система SRAP (*Sequence-related amplified polymorphism*), основанная на амплификации открытых рамок считывания (*Open reading Frame, OR*), или интрон-экзонных областей генома. Длина SRAP-праймеров, используемых для этого метода, составляет 17–18 нуклеотидов. Коровая последовательность содержит 13–14 оснований, включающих неспецифический участок из 10–11 нуклеотидов на 5'-конце, а также GC-богатый регион в прямом праймере и AT-богатый – в обратном. Вариабельность продуктов ПЦР достигается за счет использования обратного праймера, нацеленного на некодирующую область генома, обладающую низкой консервативностью [7]. SRAP-маркерная система на данный момент успешно используется в ряде исследований: для изучения генетического разнообразия и описания зародышевой плазмы [8], разработки генетических карт [9], идентификации генов, отвечающих за целевой признак [10], контроля гибридизации [11] и сравнительного геномного анализа [12].

Цель исследования – ДНК-идентификация российских сортов люцерны с использованием SRAP-маркеров для последующей паспортизации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал и ДНК-экстракция. В исследовании использовали 17 сортов и один перспективный сортообразец люцерны российской

Таблица 1. Перечень исследуемых сортов люцерны

№	Аббревиатура	Сорт	Вид	Оригинатор
1	ЛГВ	Луговая 67	<i>Medicago varia</i> Mart.	ФНЦ ВИК им. В.Р. Вильямса
2	ВГА	Вега 87		То же
3	ЛДА	Лада		»
4	АГН	Агния		ФНЦ ВИК им. В.Р. Вильямса ООО “НТЦ Травы Сибири”
5	КМЛ	Камелия		Пензенский НИИСХ
6	ВРЖ	Воронежская 6		ФНЦ ВИК им. В.Р. Вильямса
7	ВЛД	Влада		НИИСХ Юго-Востока
8	СЛН	Селена		ФНЦ ВИК им. В.Р. Вильямса
9	ТСА	Таисия		То же
10	ВЕЛ	Вела		»
11	СРГ	Сарга		УрФАНИЦ УрО РАН
12	ПСА	Пастбищная 88		ФНЦ ВИК им. В.Р. Вильямса
13	А2	А2		То же
14	НКА	Находка		»
15	БЛД	Благодать		»
16	ТМБ	Тамбовчанка	<i>Medicago sativa</i> L.	ОНО “Моршанская селекционная станция”
17	УЗН	Узень		НИИСХ Юго-Востока
18	МРА	Мира	<i>Medicago lupulina</i> L.	ФНЦ ВИК им. В.Р. Вильямса

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности SRAP-праймеров, использованных для выявления ДНК-полиморфизма в сортах люцерны

Прямой праймер (F)	Последовательность праймера (5' → 3')	Обратный праймер (R)	Последовательность праймера (5' → 3')
F9	GTAGCACAAGCCGGACC	R9	GACTGCGTACGAATTTCA
F13	CGAATCTTAGCCGGCAC	R7	GACTGCGTACGAATTGAG
Me4	CGAATCTTAGCCGGAAT	Em2	GACTGCGTACGAATTCGG
F10	GTAGCACAAGCCGGAAG	R14	CGCACGTCCGTAATTAAC
F11	CGAATCTTAGCCGGATA	R8	GACACCGTACGAATTGAC

селекции (табл. 1), принадлежащих к разным видам: *Medicago varia* Mart. ($N = 15$), *Medicago sativa* L. ($N = 2$), *Medicago lupulina* L. ($N = 1$). Экспериментальная работа по генотипированию сортов проводилась на семидневных проростках (по 30 шт. на образец), выращенных в чашках Петри. Тотальную геномную ДНК выделяли с помощью модифицированного SDS метода [13] и разбавляли до концентрации 20 нг/мкл.

SRAP-анализ. В исследовании использовали пять прямых и пять обратных SRAP-праймеров, образующих в общей сложности 25 комбинаций (табл. 2).

Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 10× Taq Turbo buffer, 50× dNTP mix, 5 U Taq-ДНК полимеразы, а также по 0.2 мкМ каждого праймера и 20 нг ДНК. Амплификация осуществлялась на приборе “Bio-Rad iCycler, USA” в соответствии с условиями, предложенными Li и Quiros [7] с внесением некоторых модификаций. Детекция результатов ПЦР проводилась путем электрофореза в 1.6%-ном агарозном геле. Для оценки размера фрагментов продуктов амплификации использовался молекулярный маркер 1kb DNA Ladder (“Евроген”, Россия). Визуализация фрагментов амплификации проводилась на приборе “Gel Doc™ XR+” (Bio-Rad, USA).

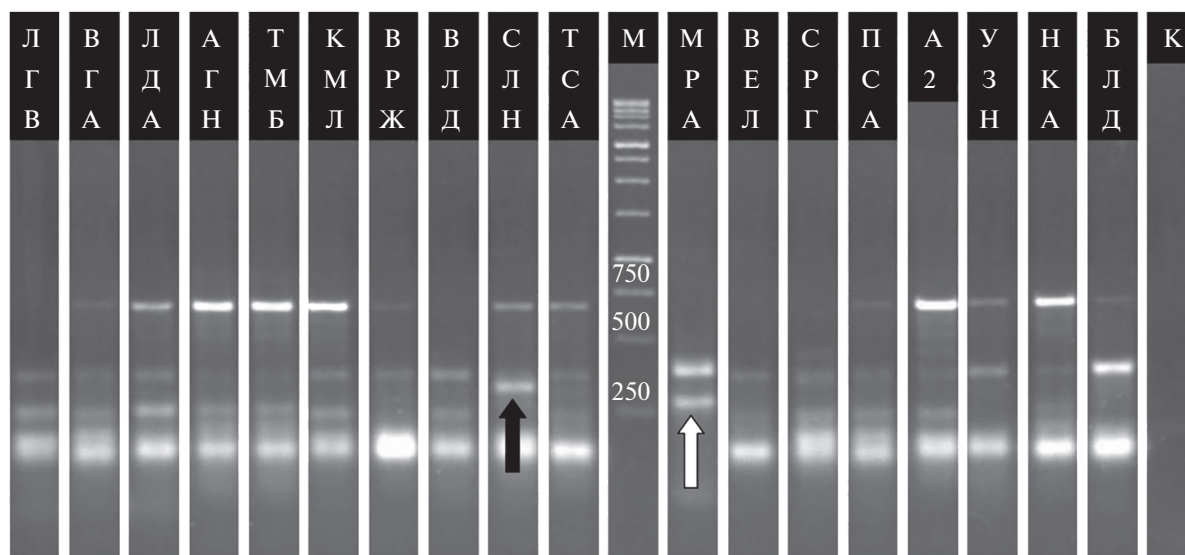


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК сортов люцерны с комбинацией SRAP-праймеров F10-R7. Расшифровка аббревиатур дана в табл. 1.

Анализ данных. Размер продуктов амплификации определяли с использованием программы Image Lab. Для каждой праймерной пары были составлены бинарные матрицы. Показатели генетического разнообразия рассчитывали с помощью программы PopGene. Определяли: эффективное число аллелей на локус, индекс Шеннона, индекс генетического разнообразия, индекс генетического сходства и дистанции Нея. На основе данных генетических дистанций Нея составлена дендрограмма методом невзвешенной попарной группировки с усреднением UPGMA.

РЕЗУЛЬТАТЫ

SRAP-анализ. В нашем исследовании семь из 25 протестированных комбинаций SRAP-праймеров генерировали четкие и воспроизводимые продукты амплификации на большинстве тестируемых сортов люцерны.

Показатели генетического разнообразия сортового материала, полученные с помощью семи информативных праймерных пар, представлены в табл. 3. В общей сложности с использованием SRAP-маркеров удалось выявить 129 воспроизводимых ПЦР-продуктов длиной от 50 до 708 пн, из которых 41 оказался полиморфным. Количество полученных ПЦР-фрагментов на одну комбинацию SRAP-маркеров варьировало от девяти до 27 при среднем показателе 18.4 ампликона на праймерную пару. Число полиморфных бэндов составляло от 3 до 9, в среднем 5.9 – на комбинацию праймеров. Наибольшее количество полиморфных продуктов (9) было получено с праймерами F13-R7. Уровень полиморфизма при использова-

нии данной комбинации составил 50%. Эффективное число аллелей (N_e) находилось в диапазоне от 1.2637 до 1.4367. Коэффициент генетического разнообразия по Нею составил от 0.1941 (F13-R7) до 0.2716 (F13-R9) со средним значением 0.2503. Индекс разнообразия Шеннона варьировал от 0.3357 до 0.4305 со средней 0.4038.

На рис. 1 представлена электрофореграмма ПЦР-продуктов, полученных с использованием пары праймеров F10-R7, где черной стрелкой обозначен специфический ампликон для сорта Селена (316 пн), белой стрелкой – для сорта Мира (275 пн).

На базе бинарных матриц подсчитали индексы генетического сходства и дистанции Нея для выявления филогенетических отношений между сортами (табл. 4). Наименьший коэффициент генетического сходства (0.6667) был обнаружен между сортами Сарга и Лада, а также Пастбищная и Тамбовчанка. Наибольший (0.8837) – между образцами Камелия и Воронежская 9. Наименьшие генетические дистанции (0.1236) наблюдались между сортами Камелия и Воронежская.

Дендрограмма, полученная по методу UPGMA (рис. 2), позволила выявить пять кластеров и подгрупп. В первую группу вошли сорта Луговая 67 и Вега 87. Вторая группа представлена тремя подгруппами, а именно: 2а – Лада, Агния и Тамбовчанка; 2б – Камелия, Воронежская, 2в – Влада, Таисия и Селена. В третью группу вошел сорт люцерны хмелевидной Мира. Четвертая группа включает такие сорта как Вела и Сарга, выделившиеся в подгруппу 4а, Пастбищная 88 и А2 – подгруппа 4б. Пятая группа представлена тремя сортами – Узень, Находка, Благодать. Проведенный

Таблица 3. Показатели изменчивости при анализе сортов люцерны с использованием SRAP-маркеров

Праймерная пара	Последовательности праймеров (5'-3')	Размер ПЦР-продукта (пн)	Общее количество ПЦР-продуктов	Количество полиморфных продуктов	Процент полиморфных продуктов	Эффективное число аллелей (N _e)	Индекс генетического разнообразия по Нею (H _e)	Индекс Шеннона (I)
F9-R9	GTAGCACAAGCCGGACC GACTGCGTACCGAATTCA	105-490	25	7	28	1.3498	0.2368	0.3882
F9-R8	GTAGCACAAGCCGGACC GACACCGTACCGAATTGAC	125-385	14	3	21	1.4102	0.2654	0.4235
F13-Em2	CGAATCTTAGCCGGCACC GACTGCGTACCGAATTGGG	125-235	9	3	33	1.3925	0.2524	0.4050
F10-R7	GTAGCACAAGCCGGGAAG GACTGCGTACCGAATTGAG	165-708	16	6	38	1.4367	0.2685	0.4220
F10-R8	GTAGCACAAGCCGGGAAG GACACCGTACCGAATTGAC	145-708	27	8	30	1.3934	0.2634	0.4223
F13-R9	CGAATCTTAGCCGGCACC GACTGCGTACCGAATTCA	60-485	20	5	25	1.4230	0.2716	0.4305
F13-R7	CGAATCTTAGCCGGCACC GACTGCGTACCGAATTGAG	50-305	18	9	50	1.2637	0.1941	0.3357
Среднее			18.4	5.9	32	1.3813	0.2503	0.4038

Таблица 4. Индексы генетического сходства (над диагональю) и дистанции Нея (под диагональю)

	ЛГВ	ВГА	ЛДА	АГН	ТМБ	КМЛ	ВРЖ	ВЛД	СЛН	ТСА	МРА	ВЕЛ	СРГ	ПСА	А2	УЗН	НКА	БЛД
ЛГВ		0.7442	0.6744	0.7287	0.6744	0.7442	0.7364	0.7054	0.6899	0.7054	0.7132	0.7054	0.7287	0.7132	0.6977	0.6977	0.6744	0.6977
ВГА	0.2955		0.7287	0.7674	0.6977	0.7209	0.7442	0.7442	0.7132	0.7132	0.7364	0.7287	0.6899	0.7209	0.7674	0.6744	0.6822	0.6589
ЛДА	0.3939	0.3165		0.8217	0.8140	0.7597	0.7829	0.7674	0.7829	0.7519	0.7287	0.7209	0.6667	0.6822	0.7132	0.6822	0.6589	0.6357
АГН	0.3165	0.2647	0.1964		0.7442	0.7519	0.7752	0.7442	0.7597	0.7287	0.7364	0.7287	0.7364	0.7054	0.7364	0.7054	0.6822	0.6744
ТМБ	0.3939	0.3600	0.2059	0.2955		0.7752	0.7674	0.7054	0.7364	0.7364	0.7287	0.7364	0.6822	0.6667	0.7132	0.6977	0.6589	0.6357
КМЛ	0.2955	0.3272	0.2748	0.2851	0.2546		0.8837	0.7907	0.7752	0.7287	0.7364	0.6822	0.7054	0.7054	0.7364	0.7364	0.7132	0.7364
ВРЖ	0.3059	0.2955	0.2447	0.2546	0.2647	0.1236		0.8140	0.7984	0.7829	0.7442	0.7209	0.7132	0.7442	0.7287	0.7132	0.7054	0.7132
ВЛД	0.3490	0.2955	0.2647	0.2955	0.3490	0.2348	0.2059		0.8295	0.8760	0.7442	0.7829	0.7597	0.7597	0.7907	0.6822	0.7054	0.6977
СЛН	0.3712	0.3380	0.2447	0.2748	0.3059	0.2546	0.2251	0.1870		0.8140	0.7597	0.7674	0.7597	0.7597	0.7597	0.6822	0.7209	0.6822
ТСА	0.3490	0.3380	0.2851	0.3165	0.3059	0.3165	0.2447	0.1324	0.2059		0.7752	0.8140	0.7907	0.7597	0.7752	0.7132	0.7054	0.7287
МРА	0.3380	0.3059	0.3165	0.3059	0.3165	0.3059	0.2955	0.2955	0.2748	0.2546		0.7442	0.7364	0.7209	0.7364	0.7364	0.7287	0.7209
ВЕЛ	0.3490	0.3165	0.3272	0.3165	0.3059	0.3825	0.3272	0.2447	0.2647	0.2059	0.2955		0.8372	0.7287	0.8217	0.6977	0.7054	0.7132
СРГ	0.3165	0.3712	0.4055	0.3059	0.3825	0.3490	0.3380	0.2748	0.2748	0.2348	0.3059	0.1777		0.7829	0.7984	0.7209	0.7287	0.7209
ПСА	0.3380	0.3272	0.3825	0.3490	0.4055	0.3490	0.2955	0.2748	0.2748	0.2748	0.3272	0.3165	0.2447		0.8450	0.7209	0.7287	0.7364
А2	0.3600	0.2647	0.3380	0.3059	0.3380	0.3059	0.3165	0.2348	0.2748	0.2546	0.3059	0.1964	0.2251	0.1685		0.7364	0.7597	0.7364
УЗН	0.3600	0.3939	0.3825	0.3490	0.3600	0.3059	0.3380	0.3825	0.3825	0.3380	0.3059	0.3600	0.3272	0.3272	0.3059		0.8372	0.7519
НКА	0.3939	0.3825	0.4172	0.3825	0.4172	0.3380	0.3490	0.3490	0.3272	0.3490	0.3165	0.3490	0.3165	0.3165	0.2748	0.1777		0.8372
БЛД	0.3600	0.4172	0.4531	0.3939	0.4531	0.3059	0.3380	0.3600	0.3825	0.3165	0.3272	0.3380	0.3272	0.3059	0.3059	0.2851	0.1777	

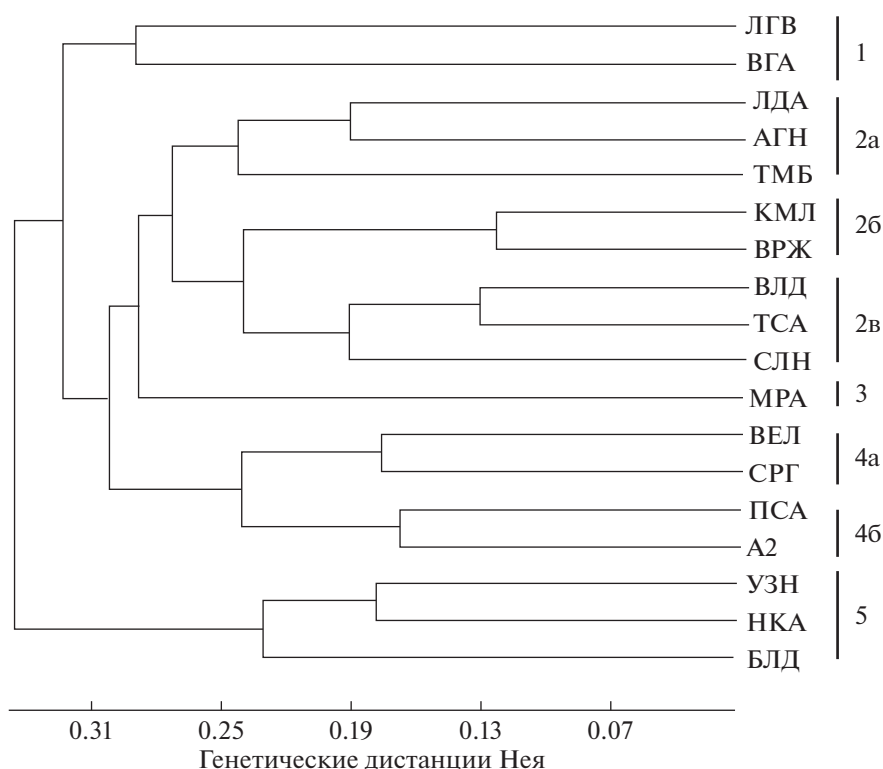


Рис. 2. UPGMA-дендрограмма, основанная на значениях генетических дистанций Нея для исследуемых сортов люцерны.

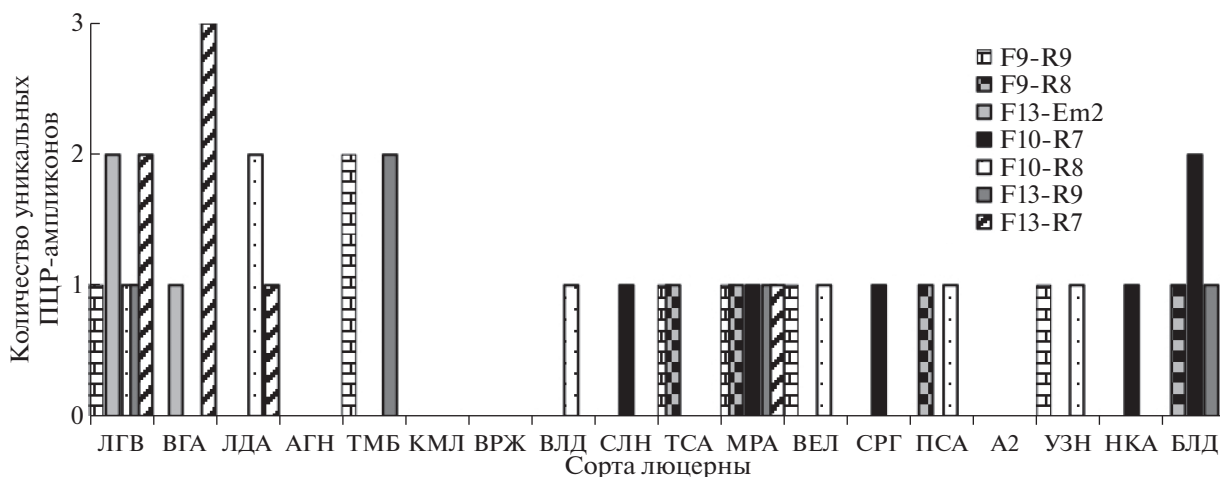


Рис. 3. Информативные комбинации SRAP-праймеров, выявляющие специфические ампликоны в сортах люцерны.

анализ позволил выявить специфические продукты амплификации для 14 из 18 исследуемых сортов (рис. 3).

Так, наибольшим числом комбинаций SRAP-праймеров ($N = 5$) удалось идентифицировать сорта Мира и Луговая 67. Для сортов Агния, Камелия, Воронежская и сортообразца А2 протестированные комбинации не образовали специфических

продуктов. Две пары праймеров (F9-R9 и F10-R8) обнаружили различия в шести исследуемых сортах. Комбинация F13-Em2 позволила идентифицировать два сорта: Луговая 67 и Вега 87. Для некоторых сортов с использованием одной комбинации праймеров одновременно было получено от двух (F13-Em2 и F13-R7 на сорте Луговая 67; F9-R9 на сорте Тамбовчанка; F10-R7 на

сорта Благодать; F10-R8 на сорте Лада) до трех специфических продуктов амплификации (F13-R7 на сорте Вега 87).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время исследования с использованием SRAP-маркеров проведены на большом количестве сельскохозяйственных культур [14, 15]. В частности, этот вид ДНК-маркеров применялся для изучения генетического разнообразия зарубежных видов и сортов люцерны [16–20].

По результатам настоящей работы на сортах люцерны российской селекции уровень полиморфизма равнялся 31.7%. При этом его максимальное значение зафиксировано на комбинации праймеров F13-R7 (50%), а минимальное – на F9-R9 (28%), что свидетельствует о различной эффективности праймерных пар на исследуемых сортах. Эти показатели различаются с данными других авторов. В частности, при изучении генетического разнообразия 15 популяций люцерны [16] уровень полиморфизма составил 90%. В исследованиях Н.В. Rhoima с соавт. [17] анализировались сорта и естественные популяции из Туниса, Казахстана, Сербии, Австралии и США с помощью SRAP-маркеров. В этом случае процент полиморфизма достигал 100%. При изучении сортов люцерны из Саудовской Аравии уровень полиморфизма равнялся 98.3% [18]. В работах 2011 г., проведенных на иранских [19] и китайских [20] сортах люцерны, уровень полиморфизма составил 49 и 40.93% соответственно. Полученные различия по-видимому могут быть связаны с высоким уровнем генетического сходства большинства исследуемых сортов (оригинатор ФНЦ “ВИК им. В.Р. Вильямса”).

Исходя из значения коэффициента генетического сходства, можно сделать вывод о наибольшей степени ДНК-полиморфизма между сортами Сарга и Лада, а также между Пастбищная 88 и Тамбовчанка (0.6667). При этом наибольшее сходство (0.8837) наблюдалось между сортами Камелия и Воронежская 9.

По значениям генетических дистанций Нея наиболее отдаленными оказались сорта Находка (ФНЦ “ВИК им. В.Р. Вильямса”) и Тамбовчанка (ОНО “Моршанская селекционная станция”). Это может быть обусловлено видовой принадлежностью этих сортов и различиями в происхождении. Наименьшая генетическая дистанция выявлена между сортами Камелия и Воронежская 9 (оба сорта отличаются повышенной зимостойкостью). Из 18 анализируемых образцов с использованием маркерной системы SRAP удалось выявить специфические продукты амплификации для 14 сортов. Это свидетельствует о высокой информативности тестируемой маркерной системы. Таким образом, маркерная система SRAP может использоваться

для ДНК-идентификации российских сортов люцерны с целью их последующей паспортизации.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Писковацкий Ю.М., Косолапов В.М., Михалев В.Е. и др. Агротехника возделывания сортов люцерны селекции ВНИИ кормов им. В.Р. Вильямса на семенные и кормовые цели. М.: ФГУ РЦСК, 2008. С. 3–15.
2. Veronesi F., Brummer E.C., Huyghe C. Alfalfa // Fodder Crops and Amenity Grasses. N.Y.: Springer, 2010. P. 395–437.
3. Чесноков Ю.В., Косолапов В.М. Генетические ресурсы растений и ускорение селекционного процесса. М.: Угрешская типография, 2016. 172 с.
4. Писковацкий Ю.М., Ломова М.Г., Соложенцева Л.Ф. и др. Создание перспективного материала люцерны с высокой семенной продуктивностью // Научное обеспечение кормопроизводства и его роль в сельском хозяйстве, экономике, экологии и рациональном природопользовании России: Матер. междунар. науч.-практ. конф., посвя. памяти акад. А.А. Жученко (Лобня, 19–20 июня 2013 г.). М.: Угрешская типография, 2013. С. 97–103.
5. Хлесткина Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции // Вавил. журн. генет. и селекции. 2013. Т. 17. № 4/2. С. 1044–1054.
6. Хлесткина Е.К. Молекулярные методы анализа структурно-функциональной организации генов и геномов высших растений // Вавил. журн. генет. и селекции. 2011. Т. 15. № 4. С. 757–767.
7. Li G., Quiros C.F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica* // Theor. Appl. Genet. 2001. V. 103. № 2–3. P. 455–461. <https://doi.org/10.1007/s001220100570>
8. Osman G., Suleyman K., Kazim A. Diversity and relationships among Turkish okra germplasm by SRAP and phenotypic marker polymorphism // Biologia (Bratislava). 2007. V. 62. № 1. P. 41–45. <https://doi.org/10.2478/s11756-007-0010-y>
9. Lin Z., Zhang X., Nie Y. et al. Construction of a genetic linkage map for cotton based on SRAP // Chin. Sci. Bull. 2003. V. 48. № 19. P. 2064–2068. <https://doi.org/10.1360/03wc0193>
10. Luo Y.X., Du D.Z., Fu G. et al. Inheritance of leaf color and sequence-related amplified polymorphic (SRAP) molecular markers linked to the leaf color gene in *Brassica juncea* // Afr. J. Biotechnol. 2011. V. 10. № 66. P. 14724–14730. <https://doi.org/10.5897/AJB11.1096>

11. *Hao Q., Liu Z.A., Shu Q.Y. et al.* Studies on *Paeonia* cultivars and hybrids identification based on SRAP analysis // *Hereditas*. 2008. V. 145. № 1. P. 38–47. <https://doi.org/10.1111/j.0018-0661.2008.2013.x>
12. *Guo D.L., Luo Z.R.* Genetic relationships of some PCNA persimmons (*Diospyros kaki* Thumb.) from China and Japan revealed by SRAP analysis // *Genet. Resour. Crop. Evol.* 2006 V. 53. № 8. P. 1597–1603. <https://doi.org/10.1007/s10722-005-8717-5>
13. *Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B.* A plant DNA mini-preparation: version II // *Plant Mol. Biol. Rep.* 1983. V. 1. № 4. P. 19–21.
14. *Robarts D.W.H., Wolfe A.D.* Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers: A potential resource for studies in plant molecular biology // *Appl. In Plant Sci.* 2014. V. 2. № 7. P. 1400017. <https://doi.org/10.3732/apps.1400017>
15. *Aneja B., Yadav N.R., Chawla V., Yadav R.C.* Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) molecular marker system and its applications in crop improvement // *Mol. Breeding*. 2012. V. 30. № 4. P. 1635–1648. <https://doi.org/10.1007/s11032-012-9747-2>
16. *Vandemark J.G., Ariss J.J., Bauchan G.A. et al.* Estimating genetic relationships among historical sources of alfalfa germplasm and selected cultivars with sequence related amplified polymorphisms // *Euphytica*. 2006. V. 152. № 1. P. 9–16. <https://doi.org/10.1007/s10681-006-9167-7>
17. *Rhouma H.B., Taski-Ajdukovic K., Zitouna N. et al.* Assessment of the genetic variation in alfalfa genotypes using SRAP markers for breeding purposes // *Chil. J. Agric. Res.* 2017. V. 77. № 4. P. 332–339. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392017000400332>
18. *Al-Faifi S., Migdadi H., Al-Doss A. et al.* Morphological and molecular genetic variability analyses of Saudi Lucerne (*Medicago sativa* L.) // *Crop and Pasture Sci.* 2013. V. 64. № 2. P. 137–146. <https://doi.org/10.1071/CP12271>
19. *Talebi M.B., Hajiahmadi Z., Rahimalek M.* Genetic diversity and population structure of four Iranian alfalfa populations revealed by sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers // *J. Crop. Sci. Biotech.* 2011. V. 14. № 3. P. 173–178. <https://doi.org/10.1007/s12892-011-0030-6>
20. *Yuan Q., Gao J., Gui Z. et al.* Genetic relationships among alfalfa germplasms resistant to common leaf spot and selected Chinese cultivars assessed by sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers // *Afr. J. Biotech.* 2011. V. 10. № 59. P. 12527–12534. <https://doi.org/10.5897/AJB11.901>

Application of SRAP Markers for DNA Identification of Russian Alfalfa Cultivars

A. O. Shamustakimova^a, Y. M. Mavlyutov^{a, *}, and I. A. Klimenko^a

^a*Federal Williams Research Center of Forage Production and Agroecology (FWRC FPA), Moscow oblast, Lobnya, 141055 Russia*

**e-mail: yulian92@mail.ru*

This study was carried out to estimate genetic diversity between cultivars of alfalfa using SRAP marker system (*sequence-related amplified polymorphism*). We tested 25 combinations of SRAP markers and revealed that seven among them was informative for DNA polymorphism identification. These combinations generated 129 PCR products with the percentage of polymorphic bands per pair ranged from 21 to 50%. Specific amplification products were identified for 14 cultivars for genetic certification.

Keywords: genome, alfalfa, SRAP markers, DNA polymorphism, genetic diversity.