

УДК 57.577.21

## ДНК-фингерпринтинг сортов клевера лугового (*Trifolium pratense* L.) на основе SSR-анализа

© 2020 И.А. КЛИМЕНКО<sup>1\*</sup>, В.А. ДУШКИН<sup>1</sup>, В.П. КЛИМЕНКО<sup>1</sup>, А.О. ШАМУСТАКИМОВА<sup>1</sup><sup>1</sup> ФГБНУ «Федеральный научный центр кормопроизводства и агроэкологии имени В.Р. Вильямса» (ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса», Московская область, г. Лобня, 141055

\*e-mail: iaklimenko@mail.ru

Поступила в редакцию 05.05.2020 г.

После доработки 22.06.2020 г.

Принята к публикации 15.11.2020 г.

Представлены результаты экспериментальных исследований по анализу полиморфизма микросателлитных локусов в сортах клевера лугового российской селекции. Определены информативные пары праймеров, которые можно использовать для выявления маркерных признаков при межсортовой дифференциации. На основе данных SSR-фингерпринтов составлены молекулярно-генетические формулы изученных сортов. Образцы геномной ДНК для каждого сорта получали из суммарной навески растительной ткани, содержащей по 30 проростков семян. Для генотипирования использовали 11 пар SSR-праймеров, разработанных для структурного анализа генома клевера лугового. Обнаружены уникальные фрагменты амплификации для сортов Трифон и Топаз по локусу RCS1307, а также для сортов Трио и Марс по локусу RCS3095, которые могут служить в качестве идентификационных ДНК-маркеров. Результаты исследований имеют практическое значение для разработки системы молекулярно-генетической сертификации селекционных достижений, необходимой при оценке качества и генетической однородности семенного материала, для контроля гибридизации в селекционном процессе.

*Ключевые слова:* кормовые культуры, клевер луговой, ДНК-фингерпринтинг, SSR-локусы, сортовая идентификация

**doi:** 10.21519/0234-2758-2020-36-6-55-60

На сегодняшний день селекция становится все более наукоемкой отраслью сельскохозяйственного производства. В селекционный процесс широко внедряются современные разработки в разных областях науки, что приводит к ежегодному появлению большого числа новых сортов растений с улучшенными признаками и ценными хозяйственными свойствами. Для идентификации и паспортизации селекционных достижений необходима эффективная система маркирования, обеспечивающая контроль подлинности и генетической однородности семенного и посадочного материала, надежную защиту авторских прав селекционеров. В настоящее время для этих целей традиционно применяются методы оценки на основе морфологических и биохимических признаков, которые характеризуются трудоемкостью, продолжительностью, зависимостью от условий внешней среды и стадии онтогенеза растения. Значительным преимуществом по этим параметрам обладают молекулярные методы идентификации, так называемый ДНК-фингерпринтинг (fingerprint — определение профиля фрагментов ДНК) [1–4].

Техники анализа, основанные на использовании молекулярных маркеров, позволяют находить различия между сортами на уровне генотипов и отвечают требованиям ООС-теста (теста на отличимость, однородность, стабильность). Отличимость обеспечивается тем, что каждый сорт можно представить в виде уникальной молекулярно-генетической формулы, отличающей его от других сортов. Генотипы конкретного сорта с однородной генетической структурой имеют одинаковые и стабильные ДНК-спектры в каждом рассматриваемом локусе, независимо от года репродукции и места выращивания [5]. ДНК-фингерпринтинг может применяться самостоятельно и в сочетании с традиционными методами сортовой идентификации для решения таких задач, как получение информации о происхождении сортов, оценка их генетического разнообразия и выявление локусов генов, ассоциированных с хозяйственно ценными признаками [6]. Для внедрения методов ДНК-фингерпринтинга в практическую работу селекционера требуется комплексный научный

подход, включающий создание эффективных технологий генотипирования с учетом особенностей растений конкретного вида и выбором оптимальной системы молекулярного маркирования.

В работах по изучению генетического разнообразия видов и сортов важных сельскохозяйственных культур в последние годы широко используются маркерные системы, основанные на вариабельности микросателлитных участков генома. Микросателлиты (SSR — simple sequence repeats) — это тандемные повторы простых последовательностей в структуре ДНК, для которых характерен высокий уровень полиморфизма, что позволяет создать на их основе информативные молекулярные маркеры с кодоминантным характером наследования и хорошей воспроизводимостью результатов анализа [7–10]. Из зарубежных источников литературы известно об использовании микросателлитов для оценки генетической изменчивости сортов, популяций и отдельных генотипов разных видов кормовых культур [11–13]. Для сортов клевера лугового российской селекции такие исследования особенно актуальны, так как до настоящего момента сортовую принадлежность внутри вида определяют только по фенотипическим маркерам, которые не всегда являются надежным индикатором генотипа, и число «удобных» для оценки фенотипических признаков, как правило, ограничено.

В связи с этим цель проведенного нами исследования заключалась в изучении полиморфизма микросателлитных локусов ДНК отечественных сортов клевера лугового (*Trifolium pratense* L.) и разработке молекулярно-генетических формул для межсортовой дифференциации на основе полученных SSR-фингерпринтов.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Растительный материал

Объектом исследований служили 10 сортов клевера лугового разного уровня плоидности: тетраплоиды Марс, Метеор, Тетраплоидный ВИК, Памяти Лисицына и диплоиды Ранний 2, ВИК 77, Топаз, Трио (разработки селекционеров ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса»), а также диплоидные сорта Трифон (селекции НИИ Северо-Востока им. В.Н. Рудницкого, г. Киров) и Атлант (НИИСХ Северного Зауралья, г. Тюмень и СибНИИ кормов, г. Новосибирск). Семена сортов получены из коллекции генофонда ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса».

### ДНК-экстракция

Геномную ДНК для ПЦР выделяли, руководствуясь методикой, известной под названием «bulked segregant analysis» (массовый

сегрегационный анализ) [13–15]. Этот способ предполагает использование в одном образце суммарной навески части растительной ткани нескольких генотипов. Образцы ДНК клевера лугового получали из 30 семидневных проростков семян от каждого сорта с использованием коммерческого набора реагентов «ДНК-Экстрэн-3» (ООО «Синтол», Россия).

### ПЦР-анализ

Для генотипирования были выбраны 11 пар SSR-праймеров к микросателлитным последовательностям генома [16, 17]. Объем реакционной смеси для ПЦР составлял 15 мкл на 1 образец и содержал следующие компоненты: 3 мкл 10× ПЦР-буфер (Taq Turbo Buffer), 0,2 мкл Tag-полимеразы (5 ед./мкл), по 0,1 мкл прямого и обратного праймера (100 мкМ), 1 мкл 50× dNTPs (смесь 10 мМ каждого dNTP) и 1 мкл образца ДНК (20 нг/мкл). Синтез праймеров и поставку реагентов для ПЦР осуществляла компания «Евроген» (Россия).

Аmplification выполняли в термоциклере Bio-Rad iCycler (Bio-Rad, США) в соответствии с программой Touchdown PCR [18]. Полученные ПЦР-продукты разделяли путем электрофореза в высокоразрешающем 4%-ном метафор-агарозном геле (MetaPhor<sup>®</sup> Agarose; Rockland, США) и фотографировали с применением системы гель-документирования microDOC UV (Clever Scientific Ltd, Великобритания). В качестве маркера молекулярной массы использовали 20-bp DNA Ladder (Takara BIO Inc., Япония).

Статистическая обработка результатов проведена с помощью пакета компьютерных программ Microsatellite toolkit и Statistica 7,0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Методика SSR-фингерпринтинга для идентификации сортов включает несколько основных этапов: формирование репрезентативной выборки образцов для анализа; выделение ДНК; ПЦР полученных проб ДНК с SSR-праймерами; разделение продуктов реакции путем электрофореза; определение длины полученных фрагментов амплификации и составление молекулярно-генетической формулы для объекта исследований.

Для проведения сортового анализа из общей массы семян случайным образом отбирают отдельные образцы в количестве, обеспечивающем репрезентативность выборки. Для клевера лугового, как перекрестноопыляемой культуры, характерна высокая гетерогенность биотипов в составе сорта и связанный с этим значительный уровень внутрисортных вариаций.

Молекулярно-генетический анализ такого материала, как правило, требует достаточно большого объема выборки — не менее 30–50 семян от сорта [19, 20]. Для снижения затрат труда и времени можно использовать суммарную навеску части растительной ткани нескольких генотипов в одном образце. В наших исследованиях формировали общую навеску из 30 проростков семян от каждого сорта и выделяли из этого материала ДНК. Образцы ДНК использовали для генотипирования с набором SSR-праймеров, разработанных ранее для анализа клевера лугового на основе экспрессирующихся микросателлитных последовательностей генома [16, 17].

С большей частью испытанных праймеров получены фрагменты амплификации, размер которых варьировал в диапазоне от 111 до 257 п. н. (табл. 1). Результаты ПЦП с праймерными парами RCS1640, TPSSR05 и TPSSR16 были исключены из дальнейшего анализа, так как с них амплифицировались лишь некоторые экспериментальные образцы, полосы продуктов реакции были слабовыраженными и невоспроизводимыми в повторных экспериментах. В общей сложности 8 информативных SSR-локусов позволили выявить 56 аллельных вариантов. Число аллелей варьировало от 5 (RCS3711 и RCS4280) до 11 (RCS3095), в среднем по 7 на локус, что существенно отличается от данных, полученных в работах других исследователей. Так, Dias с соавт. [21] и Dugar & Попов [22], показали, что среднее число аллелей на микросателлитный локус равно 9 и 11 соответственно. Сербские исследователи [23] при анализе сортов клевера лугового разного географического происхождения

с использованием набора из 14 SSR-праймеров обнаружили в среднем по 13,6 аллелей на локус при частоте встречаемости аллеля 0,2 (по результатам оценки российских сортов этот показатель в среднем равнялся 0,3).

Индекс информативности (PIC), характеризующий способность маркера выявлять полиморфизм в изучаемом материале, был достаточно высоким для используемого набора праймеров (0,7 в среднем) и сопоставимым с величиной этого показателя в работах других исследователей. В частности, Gupta и др. [24] при анализе образцов клевера лугового с использованием 36 SSR-праймеров определили вариации PIC в диапазоне 0,3–0,7 со средним значением 0,6.

Полученные данные свидетельствуют об умеренном уровне ДНК-полиморфизма между анализируемыми сортами и соответствуют результатам исследований по клеверу луговому с различными маркерными системами [25–27]. Следовательно, для этого вида характерна более высокая вариабельность между отдельными генотипами внутри популяций по сравнению с уровнем межпопуляционных различий. Это, вероятно, обусловлено ареалом распространения культуры, особенностями репродуктивной системы и селекционного процесса. При этом Kölliker с соавт. [17] обнаружили существенно более высокие показатели межпопуляционных вариаций при SSR-фингерпринтинге клевера лугового, чем определены в нашем исследовании и авторами вышеуказанных работ. Такие данные можно объяснить, как природой конкретных объектов изучения, так и использованием

Таблица 1

**Показатели генетической вариабельности сортов клевера лугового, выявленные с помощью микросателлитных локусов**

**Parameters of genetic variability for red clover cultivars identified using microsatellite loci**

| № п. п. | Локус   | Число аллельных вариантов | Размер фрагментов, п. н. | He   | PIC  | Частота встречаемости аллеля |
|---------|---------|---------------------------|--------------------------|------|------|------------------------------|
| 1       | RCS0131 | 7                         | 204–217                  | 0,88 | 0,82 | 0,2                          |
| 2       | RCS3186 | 8                         | 240–257                  | 0,90 | 0,84 | 0,2                          |
| 3       | RCS1307 | 7                         | 140–173                  | 0,86 | 0,80 | 0,3                          |
| 4       | RCS3711 | 5                         | 147–153                  | 0,76 | 0,74 | 0,4                          |
| 5       | RCS3095 | 11                        | 205–224                  | 0,93 | 0,84 | 0,2                          |
| 6       | RCS2183 | 7                         | 160–183                  | 0,86 | 0,80 | 0,3                          |
| 7       | RCS4280 | 5                         | 111–124                  | 0,73 | 0,63 | 0,7                          |
| 8       | RCS0033 | 6                         | 155–182                  | 0,50 | 0,50 | 0,7                          |
| среднее |         | 7                         |                          | 0,8  | 0,7  | 0,3                          |

*Примечание:* PIC (polymorphism information content) — индекс информативности маркера; He (expected heterozygosity) — ожидаемая гетерозиготность; п. н. — пары нуклеотидов.

*Note:* PIC — polymorphism information content; He — expected heterozygosity, п. н. — base pair.

большого количества микросателлитных локусов для анализа. Очевидно также, что одной их причин отсутствия выраженного полиморфизма между исследованными нами сортами может быть их происхождение (авторство большей части принадлежит селекционерам ФНЦ ВИК) и использование общих или близкородственных источников исходного материала для селекции. Это, по-видимому, привело к определенному сходству в структуре геномов, в частности по числу и размерам микросателлитных локусов. Тем не менее, с двумя из 11 испытанных SSR-праймеров удалось получить сортоспецифичные ПЦР-продукты. Так, микросателлитный локус RCS1307 генерировал уникальные фрагменты амплификации для сортов Трифон (140 п. н.) и Топаз (151 п. н.), а RCS3095 — для сортов Трио (207 п. н.) и Марс (224 п. н.). Таким образом, выявленные ДНК-маркеры можно использовать для идентификации указанных сортов. На основании анализа индивидуальных ДНК-профилей, полученных методом SSR-фингерпринтинга, были составлены молекулярно-генетические формулы, где каждому SSR-маркеру для удобства написания присвоен определенный код в виде прописной буквы латинского алфавита, а цифровым индексом справа обозначен номер выявленных аллелей в соответствии с их размерами (табл. 2 и 3).

Принцип нумерации аллелей по каждому локусу представлен на рис. 1. Фрагмент амплифицированной ДНК с максимальным размером в сравнении с маркером молекулярной массы обозначали цифрой 1 (дорожки 1, 9); по мере уменьшения размера фрагмента цифрами: 2 (дорожка 3), 3 (дорожки 2, 7), 4 (дорожки 4, 8) и т. д.

В результате проведенных исследований показана возможность использования метода SSR-фингерпринтинга для изучения ДНК-полиморфизма сортов клевера лугового из коллекции генофонда ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса» с целью их идентификации и генетической паспортизации. Определен наименее затратный по времени и средствам способ подготовки образцов ДНК для скрининга сортов — «балк-стратегия», основанная на формировании общей навески растительной ткани из случайной выборки проростков семян каждого сорта. Выявлены микросателлитные локусы для использования в качестве идентификационных ДНК-маркеров для сортов Трифон, Топаз, Трио и Марс — RCS1307 и RCS3095.

Таблица 2

**Обозначения микросателлитных локусов для разработки молекулярно-генетических формул сортов клевера лугового**

*Designation of the microsatellite loci for development the molecular-genetic formulas of red clover cultivars*

| SSR-локус | Код локуса |
|-----------|------------|
| RCS0131   | A          |
| RCS3186   | B          |
| RCS1307   | C          |
| RCS3711   | D          |
| RCS3095   | E          |
| RCS4280   | F          |
| RCS2183   | G          |
| RCS0033   | H          |

*Примечание:* RCS — Red Clover SSR (по Sato и др. [16]).

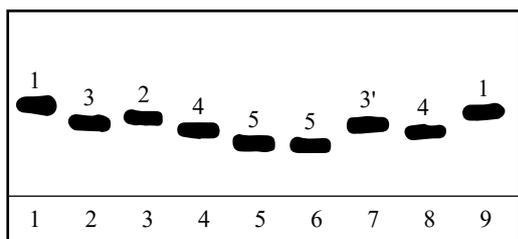
*Note:* RCS — Red Clover SSR (Sato et al. [16]).

Таблица 3

**Молекулярно-генетические формулы сортов клевера лугового**

*Molecular-genetic formulas for red clover cultivars*

| Сорт            | Локус, аллельный вариант (п. н.) |     |     |     |          |          |     |          | Молекулярно-генетическая формула   |
|-----------------|----------------------------------|-----|-----|-----|----------|----------|-----|----------|--|
|                 | A                                | B   | C   | D   | E        | F        | G   | H        |  |
| Ранний 2        | 215                              | 255 | 154 | 153 | 218      | 112      | 174 | 182      | A <sub>5</sub> B <sub>7</sub> C <sub>3</sub> D <sub>5</sub> E <sub>6</sub> F <sub>2</sub> G <sub>3</sub> H <sub>6</sub>                                |
| Марс            | 217                              | 252 | 149 | 151 | 212, 224 | 111, 124 | 176 | 182      | A <sub>7</sub> B <sub>5</sub> C <sub>2</sub> D <sub>4</sub> E <sub>5</sub> E <sub>11</sub> F <sub>1</sub> F <sub>5</sub> G <sub>4</sub> H <sub>6</sub> |
| ВИК 77          | 216                              | 254 | 154 | 150 | 209, 223 | 112, 124 | 177 | 182      | A <sub>6</sub> B <sub>6</sub> C <sub>3</sub> D <sub>3</sub> E <sub>3</sub> E <sub>10</sub> F <sub>2</sub> F <sub>5</sub> G <sub>5</sub> H <sub>6</sub> |
| Топаз           | 216                              | 257 | 151 | 149 | 210, 222 | 112, 124 | 181 | 182      | A <sub>6</sub> B <sub>8</sub> C <sub>5</sub> D <sub>2</sub> E <sub>4</sub> E <sub>9</sub> F <sub>2</sub> F <sub>5</sub> G <sub>6</sub> H <sub>6</sub>  |
| Трифон          | 213                              | 255 | 140 | 147 | 210, 223 | 112, 124 | 181 | 182      | A <sub>3</sub> B <sub>7</sub> C <sub>1</sub> D <sub>1</sub> E <sub>4</sub> E <sub>10</sub> F <sub>2</sub> F <sub>5</sub> G <sub>6</sub> H <sub>6</sub> |
| Трио            | 213                              | 248 | 154 | 147 | 207, 223 | 113, 124 | 181 | 182      | A <sub>3</sub> B <sub>4</sub> C <sub>3</sub> D <sub>1</sub> E <sub>2</sub> E <sub>10</sub> F <sub>3</sub> F <sub>5</sub> G <sub>6</sub> H <sub>6</sub> |
| Метеор          | 214                              | 248 | 149 | 149 | 210, 221 | 114, 124 | 183 | 182      | A <sub>4</sub> B <sub>4</sub> C <sub>2</sub> D <sub>2</sub> E <sub>4</sub> E <sub>8</sub> F <sub>4</sub> F <sub>5</sub> G <sub>7</sub> H <sub>6</sub>  |
| Атлант          | 204                              | 240 | 161 | 149 | 205, 223 | 111      | 160 | 158, 171 | A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> C <sub>6</sub> D <sub>2</sub> E <sub>1</sub> E <sub>10</sub> F <sub>1</sub> G <sub>1</sub> H <sub>3</sub> H <sub>5</sub> |
| Тетра ВИК       | 208                              | 243 | 157 | 147 | 207, 218 | 112      | 160 | 156, 171 | A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>4</sub> D <sub>1</sub> E <sub>2</sub> E <sub>6</sub> F <sub>2</sub> G <sub>1</sub> H <sub>2</sub> H <sub>5</sub>  |
| Памяти Лисицына | 204                              | 244 | 173 | 147 | 220      | 112      | 163 | 155, 164 | A <sub>1</sub> B <sub>3</sub> C <sub>7</sub> D <sub>1</sub> E <sub>7</sub> F <sub>2</sub> G <sub>2</sub> H <sub>1</sub> H <sub>4</sub>                 |



**Рис. 1.** Схематичное изображение принципа нумерации аллелей на электрофореграмме для составления молекулярно-генетических формул сортов клевера лугового.

**Fig. 1.** Scheme of principle for alleles' numeration at the electroforegram for development the molecular-genetic formulas of red clover cultivars.

С помощью технологии микросателлитного генотипирования для каждого объекта исследований получены уникальные SSR-фингерпринты и разработаны молекулярно-генетические формулы, которые можно использовать для определения сортовой принадлежности в семеноводстве, а также в селекционном процессе при создании новых сортов и гибридных форм клевера лугового.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания (проект № 0442-2019-0001 АААА-А19-119122590053-0).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Xu Y., Crouch J.H. Marker-assisted selection in plant breeding: from publication to practice. *Crop Sci.*, 2008, 48, 391–407. doi.org/10.2135/cropsci2007.04.01914
- Мухина Ж.М., Дубина Е.В. Молекулярные маркеры и их использование в селекционно-генетических исследованиях. *Научный журнал КубГАУ*, 2011, 66(2), 1–11. <https://cyberleninka.ru/article/n/molekulyarnye-markery-i-ih-ispolzovanie-v-selektionno-geneticheskikh-issledovaniyah/viewer>
- Хлесткина Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции. *Вавиловский журнал генетики и селекции*, 2013, 17(4/2), 1044–1054. <https://vavilov.elpub.ru/jour/article/view/220/221>
- Сухарева А.С., Кулуев Б.Р. ДНК-маркеры для генетического анализа сортов культурных растений. *Биомика*, 2018, 10(1), 69–84. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-15
- Урбанович О.Ю. ДНК-технологии в растениеводстве — возможности и перспективы. *Наука и инновации*, 2006, 9, 32–36. <https://cyberleninka.ru/article/n/dnk-tehnologii-v-rastenievodstve-vozmozhnosti-i-perspektivy/viewer>
- Чесноков, Ю.В. ДНК-фингерпринтинг и анализ генетического разнообразия у растений. *Сельскохозяйственная биология*, 2005, 40(1), 20–40. <https://readera.org/142133036>
- Хлесткина Е.К., Салина Е.А., Шумный В.К. Генотипирование отечественных сортов мягкой пшеницы с использованием микросателлитных (SSR) маркеров. *Сельскохозяйственная биология*, 2004, 5, 44–52. doi: <https://doi.org/10.18699/VJ15.140>
- Semagn K., Børnstad A., Ndjiondjo M.N. An overview of molecular markers for plants. *Afr. J. Biotechnol.*, 2006, 5(25), 2540–2568. Available online at <http://www.academicjournals.org/AJB>
- Zalapa, J.E., Cuevas, H., Zhu, H., Steffan, S., et al. (2012). Using next-generation sequencing approaches to isolate simple sequence repeat (SSR) loci in the plant sciences. *Am.J. Botany*, 99, 193–208. doi: 10.3732/ajb.1100394
- Чесноков Ю.В., Косолапов В.М. Генетические ресурсы растений и ускорение селекционного процесса. Москва: ООО «Угрешская типография», 2016, 172 С.
- Last L, Widmer F, Fjellstad W, Stoyanova S, Kölliker R. (2013). Genetic diversity of natural orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) populations in three regions in Europe. *BMC Genetics*, 14, 102. doi: 10.1186/1471-2156-14-102
- Yin S., Wang Y., Nan Z. Genetic diversity studies of alfalfa germplasm (*Medicago sativa* L. subsp. *sativa*) of United States origin using microsatellite analysis. *Legume Res.*, 2018, 41(2), 202–207. doi: 10.18805/LR-358
- Liu S., Feuerstein U., Luesink W., Schulze S., et al. DArT, SNP, and SSR analyses of genetic diversity in *Lolium perenne* L. using bulk sampling. *BMC Genetics*, 2018, 19, 10. doi: 10.1186/s12863-017-0589-0
- Quarrie S., Vesna L.J., Kovacevic D., Steed A., Pekic S. Balk-segregant analysis with molecular markers and its use for improving drought resistance in maize. *J. Exp. Botany*, 1999, 50(337), 1299–1306. doi: 10.1093/jexbot/50.337.1299
- Fu Y.-B. Applications of bulking in molecular characterization of plant germplasm: a critical review. *Plant Genet. Resour.*, 2003, 1(2–3), 161–167. doi: 10.1079/PGR200324
- Sato S., Isobe S., Asamizu E., Ohmido N., et al. Comprehensive structural analysis of the genome of red clover (*Trifolium pratense* L.). *DNA Res.*, 2005, 12, 301–364. doi: 10.1093/dnares/dsi018
- Kölliker R., Enkerli J., Widmer F. Characterization of novel microsatellite loci for red clover (*Trifolium pratense* L.) from enriched genomic libraries. *Mol. Ecol. Notes*, 2006, 6, 50–53. doi.org/10.1111/j.1471-8286

18. Don R.H., Cox P.T., Wainwright B.J., Baker K., Mattick J.S. Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.*, 1991, 19, 4008. doi: 10.1093/nar/19.14.4008
19. 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. doi: 10.1007/s001220051176
20. Чесноков Ю.В., Кочерина Н.В., Косолапов В.М. Молекулярные маркеры в популяционной генетике и селекции культурных растений. М.: Изд-во ООО «Угрешская Типография», 2019, 200 С. doi: 10.33814/monography\_1614
21. Dias P.M.B., Julier B., Sampoux J.P., Barre P., Dall'Agno M. Genetic diversity in red clover (*Trifolium pratense* L.) revealed by morphological and microsatellite (SSR) markers. *Euphytica*, 2008, 160, 189–205. doi: 10.1007/s10681-007-9534-z
22. Dugar Yu., Popov V. Genetic structure and diversity of Ukrainian red clover cultivars revealed by microsatellite markers. *Open J. Genet.*, 2013, 3, 235–242. doi: 10.4236/ojgen.2013.34026
23. Radinovic I., Vasiljevic S., Brankovic G., Ahsyee R.S., et al. Molecular characterization of red clover genotypes utilizing microsatellite markers. *Chilean J. Agr. Res.*, 2017, 77(1), 41–47. doi: 10.4067/S0718-58392017000100005
24. Gupta M., Sharma V., Singh S.K., Chahota R.K., Sharma T.R. Analysis of genetic diversity and structure in a genebank collection of red clover (*Trifolium pratense* L.) using SSR markers. *Plant Genet. Resour.*, 2016, 1–4. doi: 10.1017/S1479262116000034
25. Ulloa O., Ortega F., Campos H. Analysis of genetic diversity in red clover (*Trifolium pratense* L.) breeding populations as revealed by RAPD genetic markers. *Genome*, 2003, 46, 529–535. doi.org/10.1139/g03-030
26. Herrmann D., Boller B., Widmer F., Kölliker R. Optimisation of bulked AFLP analysis and its application for exploring diversity of natural and cultivated populations of red clover. *Genome*, 2005, 48, 474–486. doi: 10.1139/g05-011
27. Klimenko I., Razgulayeva N., Gau M., Okumura K., et al. Mapping candidate QTLs related to plant persistency in red clover. *Theor. Appl. Genet.*, 2010, 120, 1253–1263. <http://dx.doi.org/10.1007/s00122-009-1253-5>

## DNA Fingerprinting by SSR-Analyses of Red Clover (*Trifolium pratense* L.) Cultivars

I.A. KLIMENKO<sup>1\*</sup>, V.A. DUSHKIN<sup>1</sup>, V.P. KLIMENKO<sup>1</sup>, and A.O. SHAMUSTAKIMOVA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Federal Williams Research Center of Forage Production & Agroecology, Moscow region, Lobnya, 141055, Russia

\*e-mail: iaklimenko@mail.ru

Received May 5, 2020

Revised June 22, 2020

Accepted November 15, 2020

**Abstract**—The results of experimental studies on polymorphism of 10 red clover cultivars of Russian selection are presented. Informative primer pairs that can be used for the identification of markers during intervariety differentiation were determined. Based on SSR fingerprints, molecular genetic formulas of the studied cultivars were compiled. Samples of genomic DNA of each cultivar were obtained from pooled aliquots of the plant tissue, each containing 30 seedlings. Eleven pairs of SSR primers developed for structural analysis of the red clover genome were used in genotyping. Unique amplification fragments were found with SSR locus RCS1307 for Trifon and Topaz cultivars, as well as with SSR locus RCS3095 for Trio and Mars cultivars, which can serve as identification DNA markers. The results of this study are of practical importance for the molecular genetic certification of breeding achievements, which is necessary to assess the quality and genetic uniformity of seeds and to control hybridization in the breeding process.

**Key words:** forage crops, red clover, DNA fingerprinting, SSR loci, cultivar identification

**Funding**—This study was funded from the federal budget within the framework of a state assignment (project no. 0442-2019-0001 AAAA-A19-119122590053-0).

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-6-55-60