

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 577.21:631.527:633.367

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2018-63-3-298-306>

Поступила в редакцию 26.02.2018

Received 26.02.2018

**Е. Н. Сысолятин¹, Н. В. Анисимова¹, О. Г. Бабак¹, В. С. Анохина²,
И. Ю. Романчук², А. В. Кильчевский¹**

¹Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

²Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

АНАЛИЗ МЕЖСОРТОВОГО ПОЛИМОРФИЗМА ЛЮПИНА ЖЕЛТОГО (*LUPINUS LUTEUS* L.) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ EST-SSR И SRAP-RGA МАРКЕРОВ

Аннотация. Показана эффективность применения EST-SSR маркеров для дифференциации образцов люпина желтого. Отобраны EST-SSR маркеры с высокими и умеренными значениями PIC (0,64–0,49) – 2itg50945, 2itg03938, 2itg20349, 2itg14694, 2itg26293, 2itg45631, пригодные для выявления генетического полиморфизма.

Установлены достоверные корреляции фрагментов EST-SSR профилей с отдельными признаками продуктивности в расщепляющихся гибридных популяциях F₂ от межсортных скрещиваний люпина желтого.

Ключевые слова: люпин желтый, EST-SSR, SRAP-RGA, признаки продуктивности

Для цитирования: Анализ межсортного полиморфизма люпина желтого (*Lupinus luteus* L.) с использованием EST-SSR и SRAP-RGA маркеров / Е. Н. Сысолятин [и др.] // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биял. навук. – 2018. – Т. 63, № 3. – С. 298–306. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2018-63-3-298-306>

E. N. Sysoliatin¹, N. V. Anisimova¹, O. G. Babak¹, V. S. Anokhina², I. Yu. Romanchuk², A. V. Kilchevsky¹

¹Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus,

²Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

ESTIMATION OF EST-SSR AND SRAP-RGA MARKERS FOR GENOTYPING YELLOW LUPIN (*LUPINUS LUTEUS* L.)

Abstract. 14 SRAP-RGA primer combinations and 8 EST-SSR markers were tested on the collection of 10 different yellow lupine samples. The most efficient primers for intravarietal differentiation of yellow lupine were distinguished according their parameters.

Reliable correlations were determined between the presence of EST-SSR fragments and some characteristics of productivity in hybrid (F₂) yellow lupine populations.

Keywords: yellow lupin, marker, EST-SSR, SRAP-RGA, traits of productivity

For citation: Sysoliatin E. N., Anisimova N. V., Babak O. G., Anokhina V. S., Romanchuk I. Yu., Kilchevsky A. V. Estimation of EST-SSR and SRAP-RGA markers for genotyping yellow lupin (*Lupinus luteus* L.). *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2018, vol. 63, no. 3, pp. 298–306 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2018-63-3-298-306>

Введение. Среди актуальных задач агропромышленного комплекса Беларуси – производство качественных высокобелковых кормов. Главным источником обогащения кормов растительным белком являются бобовые культуры, в том числе представители рода *Lupinus*.

Люпин желтый (*L. luteus*) по содержанию белка в семенах и зеленой массе лидирует среди зернобобовых культур. Содержание протеина в семенах может достигать 42–44 %, в сухом веществе зеленой массы – 20 % [1, 2]. Высокое содержание белка, сбалансированного по аминокислотному составу, и практически полное отсутствие ингибиторов трипсина повышают кормовую ценность люпина желтого и определяют преимущества этой культуры в производстве разнообразных видов кормов – травянистых, зернофуража, комбикормов.

Люпин желтый неприхотлив в возделывании, благополучно произрастает без дополнительного внесения минеральных азотных удобрений. Высокая симбиотическая азотфиксация и способность полноценно развиваться на слабокислых почвах обеспечивают преимущество люпина по урожайности зерна, зеленой массы и сбору белка с гектара на бедных почвах по сравнению с другими бобовыми.

Учитывая многочисленные достоинства люпина желтого, очевидна необходимость расширения его посевных площадей и объемов производства. Необходимым условием этого процесса является создание новых современных высокопродуктивных сортов с заданными хозяйственными характеристиками.

Эффективность селекционных программ люпина может быть повышена за счет применения современных молекулярных технологий в сочетании с традиционными методами селекции. Основным препятствием является нехватка необходимых молекулярно-генетических инструментов для селекции люпина желтого. В связи с низким уровнем межсортового генетического полиморфизма у этого вида [2] существует потребность в разработке надежных методов генетической дифференциации для паспортизации образцов и маркирования их хозяйственно ценных признаков.

Повторяющиеся элементы в геноме благодаря своей вариабельности являются удобной мишенью при разработке молекулярных маркеров. Особенно эффективным для решения такого рода задач является использование EST-SSR (expressed sequence tag simple sequence repeat) маркеров. Этот метод основан на анализе микросателлитных повторов, расположенных внутри кодирующих последовательностей ДНК (EST). Об использовании такого типа маркеров сообщается для сельдерея [3], сорго [4], сои [5], хлопка [6], огурца [7], перца [8], ятрофы [9] и других культур. Имеется информация об оценке генетического разнообразия сортов люпина желтого на основе анализа полиморфизма внутривидных микросателлитных повторов [10].

Внутривидная локализация EST-SSR в сочетании с преимуществами микросателлитного анализа делает их эффективными высокоинформативными маркерами, удобными для генетико-селекционных исследований различных культур.

Успешным приемом разработки молекулярных маркеров хозяйственно значимых признаков является методика RGA-ПЦР (resistance gene analogs) с применением вырожденных праймеров к консервативным последовательностям генов, связанных с формированием устойчивости растений к заболеваниям (*R*-гены). Эти праймеры были использованы для выделения с помощью ПЦР аналогов генов устойчивости у желтого [11] и узколистного [12] люпина.

Разрешающая способность методов анализа с применением вырожденных праймеров повышается в комбинации с методом SRAP (sequence-related amplified polymorphism) [13], основанным на амплификации открытых рамок считывания. Так, исследование генома баклажана с использованием различных комбинаций RGA и SRAP праймеров показало высокую эффективность выявления полиморфизма по сравнению с отдельно применяемыми методами RGA и SRAP [14]. В работах с люпином узколистным нами показано, что преимущество метода SRAP-RGA по сравнению с методом генотипирования ISSR обусловлено более высоким значением показателя меры информационного полиморфизма (PIC) [15]. Учитывая вырожденную природу используемых праймеров, метод SRAP-RGA может быть применен на различных культурах для поиска полиморфизма и создания маркеров генов, определяющих устойчивость растений к заболеваниям.

Цель данной работы – оценить эффективность применения методов EST-SSR и SRAP-RGA для генотипирования образцов люпина желтого, выявить связь аллельного состава изученных маркеров с хозяйственно ценными признаками.

Материалы и методы исследования. Объектами исследования служили 10 образцов желтого люпина (*Lupinus luteus* L.) из коллекции БГУ: Надежный, Престиж, Демидовский, Tremosilla, БСХА 382, МЛ, БСХА 13, БСХА 19, Фотон, Владко.

В качестве источника ДНК использовали молодые верхушечные листья растений. Выделение ДНК осуществляли с помощью набора «Нуклеосорб» (ОДО «Праймтех») комплектации С. Растительную ткань предварительно гомогенизировали путем встряхивания с металлическими бусами. Концентрацию полученного раствора ДНК определяли методом спектрофотометрии на приборе NanoDrop 2000.

Для оценки генетического полиморфизма исследуемых образцов люпина желтого были отобраны EST-SSR маркеры, по которым ранее был обнаружен полиморфизм 2itg03938, 2itg27515, 2itg14694, 2itg45631, 2itg26293, 2itg13638, 2itg50945, 2itg20349 [10]. Список использованных в работе EST-SSR праймеров приведен в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. EST-SSR маркеры, использованные для типирования люпина желтого

T a b l e 1. EST-SSR markers used in the study for genotyping yellow lupine

Маркер	Последовательность 5'–3' прямого и обратного праймера	Аннотация [10]
2itg03938	F: CATGTGGGAAGACCAGAAGC R: ACTACGCGCTGCTAATGTCC	Polygalacturonase
2itg27515	F: CATGCGTCCAATCTATCACC R: AGTGGGAAACAAGGAAGTGG	PPR-containing protein
2itg14694	F: AAGTAGGAAGATCGAATATGAACG R: GGGAAAATATCGAGGTTTTCATC	RNA-binding protein
2itg45631	F: AAACCGAATTGTGGATCAGC R: GGGGACTCTGGAAAATCAGG	Alphavirus core protein family
2itg26293	F: CCTGCAGTGGTAGAACCTGG R: GAAGCAAGGTCCACAGAAGG	18S ribosomal RNA gene
2itg13638	F: CCATGGTCATCATTAACCCC R: CGAGTCGAGTTCGTTTACCC	f-box family protein
2itg50945	F: CCAGAACAAGGAGAAGGTTCC R: TTCTTCTTCTCGCAGGC	Zinc finger, Transcription factor
2itg20349	F: ACTAAGGGAAAGGGATTCCGG R: CCAGGCAAGAACAAAAGAGG	LPA2 (low psii accumulation)

EST-SSR ПЦР проводили в реакционной смеси объемом 15 мкл, содержащей следующие компоненты: 1,5 ед. Taq-полимеразы (Dialat), 1×ПЦР-буфер, 2 мМ MgCl₂, 200 мкМ каждого dNTP, 250 пмоль/мкл прямого и обратного праймера, 2,5 мкл тотальной геномной ДНК. Режим амплификации выставляли согласно методике, приведенной в работе [10]. Результаты амплификации визуализировали с помощью капиллярного электрофореза.

Для SRAP-RGA ПЦР использовали праймеры к трансмембранному (TM) домену (5'-ARNGCTARNGGNARNCC-3') и р-loop домену (5'-GGNGGNGTNGGNAANACNAC-3') R-генов устойчивости к заболеваниям [11]. Каждый из этих праймеров был использован в различных комбинациях с 7 SRAP праймерами при постановке реакций амплификации, что в итоге дало 14 комбинаций праймеров. Список использованных SRAP праймеров представлен в табл. 2.

Т а б л и ц а 2. Список SRAP праймеров, использованных в работе

T a b l e 2. The list of SRAP primers, used in the study

Маркер	Последовательность 5'–3'	Ссылка
Me8	TGAGTCCAAACCGGACT	[14]
F12	CGAATCTTAGCCGGAGC	[16]
F16	GATCCAGTTACCGGCAC	[16]
Em12	GACTGCGTACGAATTCTC	[14]
Em5	GACTGCGTACGAATTAAC	[14]
r9	GACACCGTACGAATTTGA	[16]
r14	CGCACGTCCGTAATTAAC	[16]

Реакцию амплификации проводили в смеси объемом 20 мкл. Состав смеси был следующим: 1 ед. Taq-полимеразы (Dialat), 1×ПЦР-буфер, 5 мМ MgCl₂, 200 мкМ каждого dNTP, 500 пмоль/мкл SRAP праймера, 500 пмоль/мкл RGA праймера, 0,5 мкл тотальной геномной ДНК. Использовали рекомендованный N. Mutlu с соавт. [14] режим ПЦР. Полученные продукты амплификации разделяли с помощью агарозного гель-электрофореза (1,5 %-ный гель).

Результаты реакций амплификации были зарегистрированы для всех образцов и занесены в бинарную матрицу, где 0 обозначал отсутствие бэнда (фрагмента), а 1 – его наличие. Первоначальная оценка праймеров была осуществлена путем учета общего количества бэндов в профилях, а также количества полиморфных бэндов и их отношения к общему числу изученных бэндов в профиле.

Для оценки эффективности различных комбинаций праймеров использован параметр «мера информационного полиморфизма» (polymorphism information content, PIC) [17]. Индекс информационного содержания полиморфизма EST-SSR маркеров вычисляли по формуле

$$PIC_i = 1 - \sum_{j=1}^n P_{ji}^2,$$

где P – частота j паттерна для маркера i (суммирование распространяется на n паттернов) [18]. Для мультилокусных маркеров (SRAP-RGA) использовали формулу

$$PIC_i = 2f_i(1 - f_i),$$

где PIC_i – мера информационного полиморфизма локуса i ; f_i – частота, с которой встречался амплифицированный фрагмент; $(1 - f_i)$ – частота, с которой наблюдали отсутствие амплификации фрагмента [17, 19, 20].

Полученную бинарную матрицу использовали для построения филогенетического дерева по методу невзвешенного попарного среднего (UPGMA) с помощью программы DARwin v. 6.0.13 [21]. Дендрограмму строили исходя из данных об эффективности маркеров. Для определения достоверности построенного дерева проведен бутстрап-анализ с выборкой из 1000 реплик.

Результаты и их обсуждение. Капиллярный электрофорез полученных продуктов амплификации EST-SSR праймеров показал, что все 8 использованных маркеров давали четко детектируемые продукты амплификации. Число обнаруженных аллелей варьировалось от 2 (2itg27515, 2itg45631, 2itg13638) до 4 (2itg03938). Основные показатели эффективности дифференциации генотипов с помощью изученных EST-SSR праймеров представлены в табл. 3.

Т а б л и ц а 3. Основные показатели эффективности EST-SSR маркеров
T a b l e 3. Basic efficiency values of EST-SSR markers

Комбинация праймеров	n	PIC
2itg03938	4	0,57
2itg27515	2	0,17
2itg14694	3	0,54
2itg45631	2	0,49
2itg26293	3	0,5
2itg13638	2	0,17
2itg50945	3	0,64
2itg20349	3	0,55

П р и м е ч а н и е. n – общее количество обнаруженных аллелей, PIC – мера информационного полиморфизма.

По всем использованным EST-SSR маркерам среди изученных сортов желтого люпина был обнаружен полиморфизм. Высокий и умеренный уровень показателя PIC отмечен у маркеров 2itg50945, 2itg03938, 2itg20349, 2itg14694, 2itg26293, 2itg45631. Согласно общей тенденции, маркеры с большим количеством аллелей имеют более высокое значение PIC и, соответственно, оказываются более информативными [22]. Однако у маркера 2itg50945 с тремя аллелями значение PIC было выше, чем у маркера 2itg03938 с четырьмя аллелями. Причина этого в том, что аллели маркера 2itg50945 распределены в исследуемых образцах более равномерно [17], чем аллели маркера 2itg03938.

Индекс информационного содержания полиморфизма маркеров 2itg27515 и 2itg13638 был равен 0,17, что соответствует низкому уровню полиморфизма, поскольку у изученных с использованием этих маркеров образцов преобладал один аллель (216 п. н. в случае 2itg27515 и 193 п. н. в случае 2itg13638).

Результаты ДНК-типирования желтого люпина в виде генетических формул представлены в табл. 4.

Первоначальная оценка результатов генотипирования образцов желтого люпина с помощью 14 комбинаций SRAP-RGA праймеров показала, что при данных условиях амплификации со всеми комбинациями праймеров образуются четко детектируемые при гель-электрофорезе продукты. Количество фрагментов в полученных профилях варьировалось от 8 (в комбинации Em12/p-loop)

Т а б л и ц а 4. Результаты EST-SSR типирования люпина желтого

T a b l e 4. The results of EST-SSR genotyping of yellow lupine

Образец	Генетическая формула*
Надежный	A ₂₅₅ B ₂₁₆ C _{267,271} D _{150,155} E ₁₅₃ F _{173,193} G ₂₀₂ H _{188,191}
Престиж	A ₂₈₅ B ₂₁₆ C _{271,285} D _{150,155} E ₁₂₉ F ₁₉₃ G _{199,202} H _{188,191}
Демидовский	A _{249,255} B ₂₁₆ C ₂₇₁ D ₁₅₀ E ₁₅₃ F ₁₉₃ G ₂₀₂ H ₁₉₁
Tremosilla	A ₂₅₅ B ₂₁₆ C ₂₇₁ D _{150,155} E ₁₅₃ F ₁₉₃ G _{199,205} H ₁₈₈
БСХА382	A ₂₅₅ B ₂₁₆ C ₂₆₇ D _{150,155} E ₁₅₃ F ₁₉₃ G _{199,202,205} H _{188,191}
МЛ	A ₂₁₂ B _{207,216} C _{271,285} D ₁₅₅ E ₁₈₃ F ₁₉₃ G _{199,202} H _{181,188}
БСХА 13	A _{249,255} B ₂₁₆ C ₂₇₁ D _{150,155} E ₁₅₃ F ₁₉₃ G _{202,205} H _{188,191}
БСХА 19	A ₂₅₅ B ₂₁₆ C _{267,271} D _{150,155} E ₁₅₃ F ₁₉₃ G ₂₀₂ H _{188,191}
Фотон	A ₂₁₂ B ₂₁₆ C ₂₇₁ D _{150,155} E ₁₈₃ F ₁₉₃ G ₂₀₅ H _{188,191}
Владко	A ₂₅₅ B ₂₁₆ C ₂₈₅ D ₁₅₀ E ₁₅₃ F ₁₉₃ G _{199,202} H ₁₈₈

*A – 2itg03938, B – 2itg27515, C – 2itg14694, D – 2itg45631, E – 2itg26293, F – 2itg13638, G – 2itg50945, H – 2itg20349.

до 19 (в комбинации г14/ТМ). Тем не менее, полиморфные фрагменты были обнаружены только в комбинации Ме8/ТМ (рис. 1). Значение PIC при этом составило 0,5, поскольку единственный полиморфный фрагмент амплифицировался в 50 % случаев.

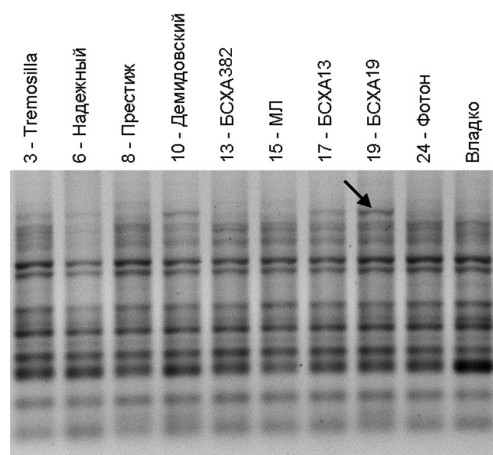


Рис. 1. SRAP-RGA профили разных сортов люпина желтого, комбинация праймеров Ме8/Тм

Fig. 1. SRAP-RGA profiles of different cultivars of yellow lupine, primer combination Me8/Tm

На основании суммарных результатов EST-SSR и SRAP-RGA анализа установлена степень генетического родства образцов коллекции люпина желтого путем построения филогенетического дерева (рис. 2).

Проведенный филогенетический анализ позволил выделить две пары образцов, образующих кластеры, с уровнем бутстрап поддержки более 50. В одну группу вошли образцы желтого люпина Демидовский и БСХА13, во вторую – БСХА19 и Надежный. Остальные сорта оказались генетически более близки, о чем свидетельствуют недостаточно высокие бутстрап значения ветвей.

Как показали проведенные нами исследования, EST-SSR анализ наиболее эффективен для дифференциации генотипов люпина желтого. В связи с этим представлялось интересным проследить возможные взаимосвязи фрагментов EST-SSR профилей с фенотипическими признаками, имеющими хозяйственное значение.

Для этого нами проанализированы три расщепляющиеся гибридные популяции F₂ от скрещиваний сортов люпина желтого Tremosilla × БСХА382, БСХА13 × Tremosilla, БСХА13 × Демидовский. Из этих гибридных популяций была взята случайная выборка растений, у которых учитывали следующие признаки продуктивности: количество бобов на растении, количество фенотипически здоровых и больных семян, масса семян с растения, масса 1000 семян, выживаемость растений в полевых условиях.

Корреляционный анализ гибридных популяций по методу Спирмена (табл. 5) выявил определенные зависимости между аллельным составом EST-SSR маркеров и учитываемыми фенотипическими признаками. В табл. 5 приведены значения ранговых корреляций Спирмена для тех

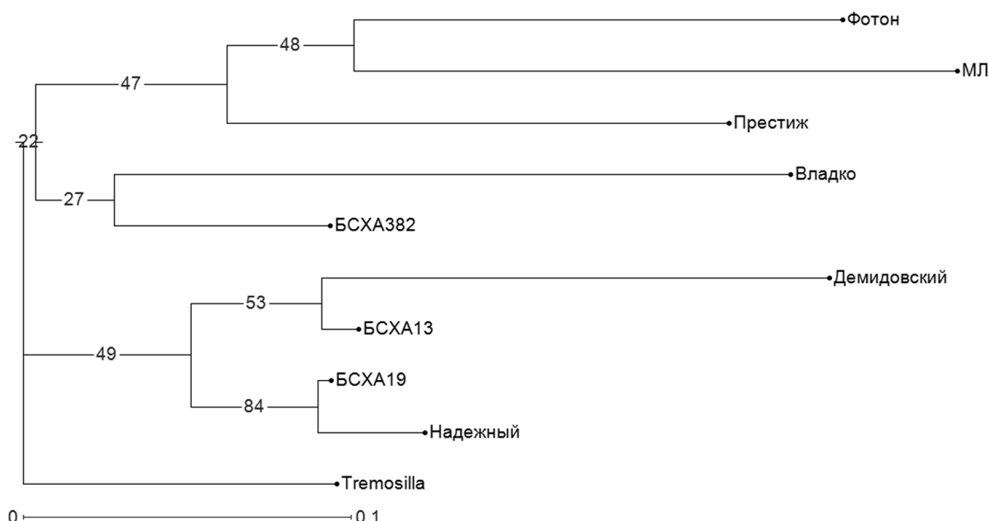


Рис. 2. Дендрограмма образцов желтого люпина, построенная по методу UPGMA на основании совокупных данных EST-SSR и SRAP-RGA анализа

Fig. 2. UPGMA dendrogram of yellow lupine, built on the basis of EST-SSR and SRAP-RGA analysis data

фрагментов EST-SSR профилей, которые показали статистически достоверную связь с изучаемыми нами признаками продуктивности.

Таблица 5. Значения коэффициентов корреляции признаков продуктивности с аллельным составом EST-SSR маркеров в гибридных популяциях F₂ люпина желтого

Table 5. Correlation of productivity traits and EST-SSR allele composition in different hybrid populations F₂ of yellow lupine

Маркер (длина фрагмента)	Коэффициент корреляции по Спирмену (r _s)					Выживаемость
	К-во на растении			Масса, г		
	бобов	больных семян	полноценных семян	семян с растения	1000 семян	
Популяция F ₂ Tremosilla × БСХА382 (23 растения)						
2itg27515 (213 п. н.)	0,61*	Н. о.	0,67*	0,72*	-0,41	0,02
2itg20349 (191 п. н.)	0,55*	Н. о.	0,64*	0,61*	-0,12	-0,10
Популяция F ₂ БСХА13 × Tremosilla (24 растения)						
2itg45631 (150 п. н.)	-0,18	0,59*	-0,10	-0,28	-0,18	-0,08
2itg20349 (188 п. н.)	-0,39	0,00	-0,45	-0,21	0,53*	-0,18
2itg50945 (199 п. н.)	Н. о.	Н. о.	Н. о.	Н. о.	Н. о.	-0,46*
Популяция F ₂ БСХА13 × Демидовский (20 растений)						
2itg45631 (155 п. н.)	-0,48*	-0,24	-0,40	-0,42	-0,04	0,13
2itg50945 (205 п. н.)	0,42	-0,15	0,58*	0,45	-0,30	0,14

Примечание. Н. о. – не определяли, * – различия достоверны при $p < 0,05$.

В популяции F₂ Tremosilla × БСХА382 большее количество бобов ($r_s = 0,55$), полноценных семян ($r_s = 0,64$) и более высокую массу семян с растения ($r_s = 0,61$) имели образцы, несущие аллель 2itg20349 длиной 191 п. н.

В популяции БСХА13 × Tremosilla более высокие значения массы 1000 семян отмечены у растений, имеющих в геномах аллель 2itg20349 длиной 188 п. н. ($r_s = 0,53$), а растения с аллелем 2itg50945 длиной 199 п. н. характеризовались более низкой выживаемостью ($r_s = -0,46$).

Присутствие в геноме аллеля 2itg45631 длиной 155 п. н. отрицательно влияло на количество бобов ($r_s = -0,48$) в популяции БСХА13 × Демидовский, а наличие аллеля 2itg50945 длиной 205 п. н. в этой популяции положительно коррелировало с количеством полноценных семян на растении ($r_s = 0,58$).

При корреляционном анализе всей совокупности гибридных растений без учета специфики комбинации скрещивания (табл. 6) статистически достоверно установлено наличие положительной взаимосвязи между присутствием в геноме образца аллели 2itg27515 (207 п. н.) и массой 1000 семян

($r_s = 0,27$). Растения, несущие аллель этого же маркера размером 213 п. н., формировали большее количество бобов ($r_s = 0,31$), фенотипически здоровых семян ($r_s = 0,40$) и имели более высокую массу семян с растения ($r_s = 0,35$). Присутствие в генотипе аллеля 2itg45631 (150 п. н.) положительно коррелировало с количеством больных семян на растении ($r_s = 0,35$).

Т а б л и ц а 6. Корреляции между EST-SSR маркерами и показателями продуктивности межсортовых гибридов F_2 люпина желтого

Table 6. Correlation of productivity traits and EST-SSR allele composition in intervarietal hybrids F_2 of yellow lupine

Маркер (длина фрагмента)	Коэффициент корреляции Спирмена (r_s)				
	К-во на растении			Масса	
	бобов с семенами	больных семян	полноценных семян	семян с растения	1000 семян
2itg27515 (207 п. н.)	0,13	-0,11	0,15	0,24	0,27*
2itg27515 (213 п. н.)	0,31*	-0,21	0,40*	0,35	-0,23
2itg45631 (150 п. н.)	-0,05	0,35*	-0,07	-0,09	-0,04

Примечание. * – различия достоверны при $p < 0,05$.

Таким образом, выявлены статистически достоверные связи между присутствием в EST-SSR профилях определенных фрагментов и хозяйственно ценными признаками (количество и масса семян с растения, количество бобов на растении, количество больных семян). EST-SSR-маркеры 2itg27515 и 2itg45631 имеют перспективы использования в селекции люпина желтого для выявления высокопродуктивных растений.

Заключение. Результаты анализа рабочей коллекции сортов люпина желтого (*L. luteus* L.) с использованием 8 EST-SSR праймеров и 14 комбинаций SRAP-RGA праймеров позволяют заключить, что более эффективными для выявления внутривидового генетического полиморфизма являются EST-SSR маркеры. Подтверждена пригодность для дифференциации образцов люпина желтого EST-SSR маркеров 2itg50945, 2itg03938, 2itg20349, 2itg14694, 2itg26293, 2itg45631 с высокими и умеренными значениями PIC (0,64–0,49). Из 14 комбинаций SRAP-RGA праймеров 13 показали единообразие полученных ДНК-профилей, что свидетельствует о низком межсортовом полиморфизме этой культуры и недостаточности для его выявления разрешающей способности метода SRAP-RGA.

Обнаружены достоверные корреляционные зависимости между фрагментами EST-SSR профилей и отдельными признаками продуктивности в межсортовых гибридных популяциях F_2 люпина желтого. EST-SSR маркеры 2itg27515, 2itg45631 имеют перспективы использования в селекции люпина желтого для выявления высокопродуктивных генотипов и отбраковки нежелательных.

Список использованных источников

1. Привалов, Ф. И. Перспективы возделывания, селекции и семеноводства люпина в Беларуси / Ф. И. Привалов, В. Ч. Шор // Вес. Нац. Акад. навук Беларусі. Сер. аграр. навук. – 2015. – № 2. – С. 47–53.
2. Development of microsatellite markers in *Lupinus luteus* (Fabaceae) and cross-species amplification in other lupine species / L. B. P. Gonzalez [et al.] // Amer. J. of Botany. – 2010. – Vol. 97, N 8. – P. e72–e74. <https://doi.org/10.3732/ajb.1000170>
3. Use of EST-SSR markers for evaluating genetic diversity and fingerprinting Celery (*Apium graveolens* L.) cultivars / N. Fu [et al.] // Molecules. – 2014. – Vol. 19, N 2. – P. 1939–1955. <https://doi.org/10.3390/molecules19021939>
4. Assessment of genetic diversity in the sorghum reference set using EST-SSR markers / P. Ramu [et al.] // Theoretical and Appl. Genetics. – 2013. – Vol. 126, N 8. – P. 2051–2064. <https://doi.org/10.1007/s00122-013-2117-6>
5. Determination of the genetic diversity of vegetable soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] using EST-SSR markers / G. Zhang [et al.] // J. of Zhejiang University. SCIENCE B. Biomedicine and Biotechnology. – 2013. – Vol. 14, N 4. – P. 279–288. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1200243>
6. Development and characterization of genomic and expressed SSRs for levant cotton (*Gossypium herbaceum* L.) / S. N. Jena [et al.] // Theoretical and Appl. Genetics. – 2012. – Vol. 124, N 3. – P. 565–576. <https://doi.org/10.1007/s00122-011-1729-y>
7. Hu, J. Comparison of genomic SSR and EST-SSR markers for estimating genetic diversity in cucumber / J. Hu, L. Wang, J. Li // Biologia Plantarum. – 2011. – Vol. 55, N 3. – P. 577–580. <https://doi.org/10.1007/s10535-011-0129-0>
8. Identification and development of polymorphic EST-SSR markers by sequence alignment in pepper *Capsicum annuum* (Solanaceae) / Q. Kong [et al.] // Amer. J. of Botany. – 2012. – Vol. 99, N 2. – P. e59–e 61. <https://doi.org/10.3732/ajb.1100347>
9. Development of EST-SSR and genomic-SSR markers to assess genetic diversity in *Jatropha curcas* L. / M. Wen [et al.] // BMC Res. Notes. – 2010. – Vol. 42, N 3. – 8 p. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-3-42>

10. Yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) transcriptome sequencing: molecular marker development and comparative studies / L. B. Parra-González [et al.] // *BMC Genomics*. – 2012. – Vol. 13, N 1. – P. 425. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-425>
11. The *Ncm-1* gene for resistance to Cucumber mosaic virus in yellow lupin (*Lupinus luteus*): molecular studies and marker development : Ph. D. Thesis / D. Li ; Murdoch Univ. – Perth, 2012. – 201 p.
12. A PCR-based molecular marker applicable for marker-assisted selection for anthracnose disease resistance in lupin breeding / M. You [et al.] // *Cellular and Molecular Biology Lett.* – 2005. – Vol. 10, N 1. – P. 123–134.
13. Li, G. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica* / G. Li, C. F. Quiros // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2001. – Vol. 103, N 2–3. – P. 455–461. <https://doi.org/10.1007/s001220100570>
14. Development of SRAP, SRAP-RGA, RAPD and SCAR markers linked with a *Fusarium* wilt resistance gene in eggplant / N. Mutlu [et al.] // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2008. – Vol. 117, N 8. – P. 1303–1312. <https://doi.org/10.1007/s00122-008-0864-6>
15. Оценка эффективности метода SRAP-RGA ПЦР для генотипирования узколистного люпина / Е. Н. Сысолятин [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика : сб. науч. тр. / Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси. – Минск, 2016. – Т. 21. – С. 46–52.
16. Ma, J. X. Genetic diversity of wild *Medicago sativa* by sequence-related amplified polymorphism markers in Xinjiang region, China / J. X. Ma, X. S. Lu, T. M. Wang // *Pakistan J. of Botany*. – 2013. – Vol. 45, N 6. – P. 2043–2050.
17. Чесноков, Ю. В. Оценка меры информационного полиморфизма генетического разнообразия / Ю. В. Чесноков, А. М. Артемьева // Сельскохозяйств. биология. – 2015. – Т. 50, № 5. – С. 571–578.
18. Молекулярные методы паспортизации сортов груши / О. Ю. Урбанович [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика : сб. науч. тр. / Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси. – Минск, 2009. – Т. 9. – С. 160–166.
19. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.) / I. Roldán-Ruiz [et al.] // *Molecular Breeding*. – 2000. – Vol. 6, N 2. – P. 125–134. <https://doi.org/10.1023/A:1009680614564>
20. Seyit, A. K. Comparison of effectiveness of ISSR and RAPD markers in genetic characterization of seized marijuana (*Cannabis sativa* L.) in Turkey / A. K. Seyit, E. H. Erdogan, P. Emine // *Afr. J. of Agr. Res.* – 2012. – Vol. 5, N 21. – P. 2925–2933.
21. Perrier, X. DARwin software [Electronic resource] / X. Perrier, J. P. Jacquemoud-Collet. – 2006. – Mode of access : <http://darwin.cirad.fr/>. – Date of access : 15.07.2015.
22. Hildebrand, C. E. Informativeness of polymorphic DNA markers / C. E. Hildebrand, D. C. Torney, R. P. Wagner // *Los Alamos Science*. – 1992. – N 20. – P. 100–102.

References

1. Privalov F. I., Shor V. Ch. Prospects of cultivation, selection and seed production of lupine in Belarus. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya agrarnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Series of Agrarian Sciences*, 2015, iss. 2, pp. 47–53 (in Russian).
2. Gonzalez L. B. P., Straub S. C. K., Doyle J. J., Ortega P. E. M., Garrido H. E. S., Butler I. J. M. Development of microsatellite markers in *Lupinus luteus* (Fabaceae) and cross-species amplification in other lupine species. *American Journal of Botany*, 2010, vol. 97, no. 8, pp. e72–e74. <https://doi.org/10.3732/ajb.1000170>
3. Fu N., Wang P.-Y., Liu X.-D., Shen H.-L. Use of EST-SSR markers for evaluating genetic diversity and fingerprinting Celery (*Apium graveolens* L.) cultivars. *Molecules*, 2014, vol. 19, no. 2, pp. 1939–1955. <https://doi.org/10.3390/molecules19021939>
4. Ramu P., Billot C., Rami J.-F., Senthilvel S., Upadhyaya H. D., Reddy L. A., Hash C. T. Assessment of genetic diversity in the sorghum reference set using EST-SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 2013, vol. 126, no. 8, pp. 2051–2064. <https://doi.org/10.1007/s00122-013-2117-6>
5. Zhang G., Xu S., Mao W., Hu Q., Gong Y. Determination of the genetic diversity of vegetable soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] using EST-SSR markers. *Journal of Zhejiang University. SCIENCE B. Biomedicine and Biotechnology*, 2013, vol. 14, no. 4, pp. 279–288. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1200243>
6. Jena S. N., Srivastava A., Rai K. M., Ranjan A., Singh S. K., Nisar T., Srivastava M., Bag S. K., Mantri S., Asif M. H., Yadav H. K., Tuli R., Sawant S. V. Development and characterization of genomic and expressed SSRs for levant cotton (*Gossypium herbaceum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 2012, vol. 124, no. 3, pp. 565–576. <https://doi.org/10.1007/s00122-011-1729-y>
7. Hu J., Wang L., Li J. Comparison of genomic SSR and EST-SSR markers for estimating genetic diversity in cucumber. *Biologia Plantarum*, 2011, vol. 55, no. 3, pp. 577–580. <https://doi.org/10.1007/s10535-011-0129-0>
8. Kong Q., Zhang G., Chen W., Zhang Z., Zou X. Identification and development of polymorphic EST-SSR markers by sequence alignment in pepper *Capsicum annuum* (Solanaceae). *American Journal of Botany*, 2012, vol. 99, no. 2, pp. e59–e61. <https://doi.org/10.3732/ajb.1100347>
9. Wen M., Wang H., Xia Z., Zou M., Cheng Lu C., Wang W. Development of EST-SSR and genomic-SSR markers to assess genetic diversity in *Jatropha curcas* L. *BMC Research Notes*, 2010, vol. 42, no. 3, 8 p. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-3-42>
10. Parra-González L. B., Aravena-Abarzúa G. A., Navarro-Navarro C. S., Udall J., Maughan J., Peterson L. M., Salvo-Garrido H. E., Maureira-Butler I. J. Yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) transcriptome sequencing: molecular marker development and comparative studies. *BMC Genomics*, 2012, vol. 13, no. 1, p. 425. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-425>
11. Li D. The *Ncm-1* gene for resistance to Cucumber mosaic virus in yellow lupin (*Lupinus luteus*): molecular studies and marker development. Ph. D. Thesis. Perth, 2012. 201 p.
12. You M., Boersma J. G., Buirchell B. J., Sweetingham M. W., Siddique K. H., Yang H. A PCR-based molecular marker applicable for marker-assisted selection for anthracnose disease resistance in lupin breeding. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 2005, vol. 10, no. 1, pp. 123–134.

13. 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*. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, vol. 103, N 2–3, pp. 455–461. <https://doi.org/10.1007/s001220100570>

14. Mutlu N., Boyaci F. H., Göçmen M., Abak K. Development of SRAP, SRAP-RGA, RAPD and SCAR markers linked with a *Fusarium* wilt resistance gene in eggplant. *Theoretical and Applied Genetics*, 2008, vol. 117, no. 8, pp. 1303–1312. <https://doi.org/10.1007/s00122-008-0864-6>

15. Sysolyatin E. N., Anisimova N. V., Babak O. G., Kil'chevskii A. V. Estimation of SRAP-RGA PCR method efficiency for genotyping narrow-leaved lupin. *Molekulyarnaya i prikladnaya genetika: sbornik nauchnykh trudov* [Molecular and applied genetics: a collection of scientific papers]. Minsk, 2016, vol. 21, pp. 46–52 (in Russian).

16. Ma J. X., Lu X. S., Wang T. M. Genetic diversity of wild *Medicago sativa* by sequence-related amplified polymorphism markers in Xingjiang region, China. *Pakistan Journal of Botany*, 2013, vol. 45, no. 6, pp. 2043–2050.

17. Chesnokov Yu. V., Artem'eva A. M. Assessment of the measure of information polymorphism of genetic diversity. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya = Agricultural biology*, 2015, vol. 50, no. 5, pp. 571–578 (in Russian).

18. Urbanovich O. Yu., Hatskevich A. A., Kozlovskaya Z. A., Kartel N. A. Molecular methods of pear varieties certification. *Molekulyarnaya i prikladnaya genetika: sbornik nauchnykh trudov* [Molecular and applied genetics: a collection of scientific papers]. Minsk, 2009, vol. 9, pp. 160–166 (in Russian).

19. Roldán-Ruiz I., Dendauw J., van Bockstaele E., Depicker A., de Loose M. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). *Molecular Breeding*, 2000, vol. 6, no. 2, pp. 125–134. <https://doi.org/10.1023/A:1009680614564>

20. Seyit A. K., Erdogan E. H., Emine P. Comparison of effectiveness of ISSR and RAPD markers in genetic characterization of seized marijuana (*Cannabis sativa* L.) in Turkey. *African Journal of Agricultural Research*, 2012, vol. 5, no. 21, pp. 2925–2933.

21. Perrier X., Jacquemoud-Collet J. P. DARwin software. 2006. Available at: <http://darwin.cirad.fr/> (accessed: 13.02.2018).

22. Hildebrand C. E., Torney D. C., Wagner R. P. Informativeness of polymorphic DNA markers. *Los Alamos Science*, 1992, no. 20, pp. 100–102.

Информация об авторах

Сысолятин Евгений Николаевич – мл. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: E.Sysolyatin@igc.by

Анисимова Наталья Владимировна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: N.Anisimova@igc.by

Бабак Ольга Геннадьевна – канд. биол. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: O.Babak@igc.by

Анохина Вера Степановна – канд. биол. наук, доцент. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220004, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: anokhina@tut.by

Романчук Ирина Юрьевна – науч. сотрудник. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220004, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: anokhina@tut.by

Кильчевский Александр Владимирович – академик, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: Kilchev@presidium.bas-net.by

Information about the authors

Eugeny N. Sysolyatin – Junior researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: E.Sysolyatin@igc.by

Natalia V. Anisimova – Ph. D. (Biol.), Senior researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: N.Anisimova@igc.by

Olga G. Babak – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Leading researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: O.Babak@igc.by

Vera S. Anokhina – Ph. D. (Biol.), Associate Professor. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Av., 220004, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: anokhina@tut.by

Irina Y. Romanchuk – Researcher. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Av., 220004, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: anokhina@tut.by

Aleksandr V. Kilchevsky – Academician, D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Laboratory. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Kilchev@presidium.bas-net.by