

Ксения Вадимовна Сухинина^{1✉}, Елена Викторовна Дубина², Наталья Валентиновна Репко³,
Виктория Николаевна Давыденко⁴

¹ООО РАТ, Краснодар, Россия

²Федеральный научный центр риса, Краснодар, Россия

^{3,4}Кубанский государственный аграрный университет им. И.Т. Трубилина, Краснодар, Россия

¹kseniya_nosenko@mail.ru

²lenakrug1@rambler.ru

³natalja.repko@yandex.ru

⁴toridavydenko19@yandex.ru

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ iPBS МАРКЕРОВ ДЛЯ АНАЛИЗА ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОТИПОВ ОЗИМОГО ЯЧМЕНЯ

Цель исследования – оценить эффективность использования iPBS-молекулярных маркеров для анализа генотипов озимого ячменя российских сортов современной селекции. Для генотипирования были подобраны 15 сортов озимого ячменя различных оригинаторов. Оценка их генетического разнообразия проводилась с использованием 10 iPBS-маркеров. Для подготовки образцов к выделению ДНК семена озимого ячменя предварительно проращивали в чашках Петри на увлажненной фильтровальной бумаге с использованием термостата, исключив доступ света. Выделение ДНК проводили СТАВ-методом, после чего выделенную ДНК разводили ТЕ-буфером и проверяли концентрацию при помощи флуориметра Qubit. С целью обеспечения высокого выхода амплифицированного продукта использовали следующие условия полимеразной цепной реакции: 5 мин при 94 °С, далее 40 циклов, 30 с при 94 °С, 30 с при 55 °С, 1 мин при 72 °С, 3 мин при 72 °С. Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР проводили в течение 1 ч, используя 2 % ТАЕ – агарозный гель. Для визуализации результатов разделения использовали гель-документирующую систему GelDoc. В результате постановки ПЦР и последующей детекции ее продуктов в диапазоне от 100 до 10000 п.н. четко проявилось 1223 аллеля. Статистическая обработка полученных данных позволила определить степень полиморфности генотипов ячменя на основании РСoA и кластерного анализа, которые в свою очередь показали сходные результаты, разделив образцы на четыре популяции. Полученные результаты дают возможность применять маркерные системы класса iPBS для определения степени полиморфизма генотипов озимого ячменя.

Ключевые слова: озимый ячмень, генетический полиморфизм, MEGA, STRUCTURE

Для цитирования: Сухинина К.В., Дубина Е.В., Репко Н.В., и др. Использование iPBS маркеров для анализа полиморфизма генотипов озимого ячменя // Вестник КрасГАУ. 2025. № 5. С. 47–61. DOI: 10.36718/1819-4036-2025-5-47-61.

Ksenia Vadimovna Sukhinina^{1✉}, Elena Viktorovna Dubina², Natalia Valentinovna Repko³,
Victoria Nikolaevna Davydenko⁴

¹RAT LLC, Krasnodar, Russia

²Federal Scientific Center of Rice, Krasnodar, Russia

^{3,4}Kuban State Agrarian University named after I.T. Trubilin, Krasnodar, Russia

¹kseniya_nosenko@mail.ru

²lenakrug1@rambler.ru

³natalja.repko@yandex.ru

⁴toridavydenko19@yandex.ru

USING iPBS MARKERS TO ANALYSE WINTER BARLEY GENOTYPE POLYMORPHISM

The aim of the study was to evaluate the efficiency of using iPBS-molecular markers for genotype analysis of winter barley varieties of modern Russian selection. Fifteen winter barley varieties of different originators were selected for genotyping. Their genetic diversity was assessed using 10 iPBS-markers. To prepare samples for DNA extraction, winter barley seeds were pre-germinated in Petri dishes on moistened filter paper using a thermostat, excluding access to light. DNA extraction was performed using the CTAB-method, after which the extracted DNA was diluted with TE buffer and the concentration was checked using a Qubit fluorimeter. To ensure a high yield of the amplified product, the following polymerase chain reaction conditions were used: 5 min at 94 °C, then 40 cycles, 30 sec at 94 °C, 30 sec at 55 °C, 1 min at 72 °C, 3 min at 72 °C. Electrophoretic separation of PCR products was carried out for 1 h using 2 % TAE – agarose gel. The GelDoc gel-documenting system was used to visualize the separation results. As a result of the PCR and subsequent detection of its products in the range from 100 to 10,000 bp, 1223 alleles were clearly identified. Statistical processing of the obtained data made it possible to determine the degree of polymorphism of barley genotypes based on PCoA and cluster analysis, which in turn showed similar results, dividing the samples into four populations. The obtained results make it possible to use iPBS class marker systems to determine the degree of polymorphism of winter barley genotypes.

Keywords: winter barley, genetic polymorphism, MEGA, STRUCTURE

For citation: Sukhinina KV, Dubina EV, Repko NV, et al. Using iPBS markers to analyse winter barley genotype polymorphism. *Bulletin of KSAU*. 2025;(5):47-61. (In Russ.). DOI: 10.36718/1819-4036-2025-5-47-61.

Введение. Ячмень (*Hordeum vulgare*) – представитель семейства мятликовых и одна из основных сельскохозяйственных культур, возделываемых по всему миру. Несмотря на широкое территориальное распространение культуры, генотипы сортов, возделываемых в промышленных масштабах, схожи ввиду многолетней направленной селекции [1].

Для расширения генотипа в настоящее время селекционеры все чаще обращают внимание на использование в программах скрещиваний диких и полудиких форм, старых сортов, считающихся родоначальниками селекции ячменя, а также иностранных сортов. Включение в систему скрещиваний генотипически отличающихся родительских форм позволит сформировать не только сорт с новым комплексом заданных признаков, но и получить линии с признаками и свойствами, утраченными в результате многолетней селекционной работы [2].

При этом идентификация каждого отдельно сорта, даже на уровне государственного сортоиспытания, ограничивается лишь морфологическим описанием по фенотипическим признакам, на что уходит достаточно длительное время [3]. Важно помнить, что подавляющее большинство сортовых признаков, в зависимости от климатических условий каждого отдельного года, могут варьировать в достаточно широких пределах. Настоящий факт накладывает свой

отпечаток на сроки создания сорта, его предполагаемый потенциал, а также достоверность наличия в нем интересующего признака [4].

Все это позволяет говорить о целесообразности использования методов молекулярно-генетического анализа в современной систематизации ботанических ресурсов и селекционном процессе в частности.

В настоящее время метод генетического анализа (молекулярного маркирования) для идентификации генотипа признан более достоверным. Он позволяет понять, обладает ли исследуемый образец целевым геном интересующего морфологического признака. Это значительно повышает эффективность селекционной работы и сокращает время, необходимое для создания сорта. Кроме того, при правильном и умелом комплексном сочетании фенотипических и генотипических методов сроки получения современных сортов с заданными характеристиками уменьшаются в разы.

Современные информационные источники обладают внушительным количеством генетических баз, объединяющих в себе исследования ученых всего мира. Также разработано и успешно используется множество молекулярных маркеров, эффективность и надежность которых доказана в исследованиях идентификации генов, отвечающих за фенотипическое проявление хозяйственно ценных признаков [5].

Согласно историческим данным, молекулярные маркеры в селекции растений начали использовать в 1983 г. Такие методы получили название маркер-ориентированной селекции [6]. Принцип работы настоящих методов основывается на установлении прочных, тесных взаимосвязей между геном, отвечающим за фенологическое проявление признака, и молекулярным маркером. Этот способ является не заменой или альтернативой традиционной селекции, а мощным и эффективным дополнительным инструментом в руках ученых на пути к созданию стабильного конкурентоспособного посевного материала российского происхождения.

Использование молекулярных маркеров в селекции основано на принципе генетической связи, так называемого сцепления. Гены, расположенные близко друг к другу на хромосоме, наследуются вместе чаще, чем гены, находящиеся далеко друг от друга [7]. Это явление называется сцепленным наследованием. Если молекулярный маркер тесно сцеплен с целевым геном, контролирующим желаемый признак (например устойчивость к болезням, урожайность, качество продукта), то наличие или отсутствие специфического аллеля маркера может свидетельствовать о наличии или отсутствии желаемого аллеля целевого гена.

В идеальном сценарии селекционеры стремятся идентифицировать маркеры, фланкирующие целевой ген, расположенные по обе стороны от него. Такой подход повышает точность предсказания фенотипа, минимизируя вероятность рекомбинации между маркером и целевым геном [8].

Метод анализа генетического разнообразия растений представляет собой мощный инструмент, успешно применяемый в масштабных исследованиях. Ключевое его преимущество заключается в независимости от предварительного знания полной последовательности генома исследуемых организмов. Это значительно расширяет спектр потенциальных объектов исследования, включая виды с плохо изученным геномом.

Для достижения высокой точности селекционеры проводят картирование генома, чтобы найти маркеры с наибольшей силой сцепления с целевыми генами. Этот процесс включает в себя анализ больших популяций растений, определение фенотипа и генотипа по различным маркерам и использование статистических методов для оценки силы сцепления [9].

Молекулярные маркеры представляют собой участки ДНК с известным местоположением в геноме, которые демонстрируют полиморфизм – вариации в последовательности ДНК между отдельными особями [7]. Этот полиморфизм может быть вызван различными мутациями, такими как однонуклеотидные полиморфизмы (SNPs), вставки-делеции (indels), микросателлиты (STRs) или более крупные структурные вариации. Выбор типа маркера зависит от целей исследования и особенностей генома.

ПЦР и молекулярные маркеры значительно упростили и усовершенствовали селекционные программы, обеспечив возможность эффективного отбора образцов с желаемыми признаками на ранних этапах развития, что существенно сокращает время и затраты на селекцию, а также повышает ее эффективность. Современные методы анализа данных и высокопроизводительные технологии позволяют проводить геномный отбор на беспрецедентном масштабе, открывая новые возможности для улучшения сельскохозяйственных культур.

Молекулярные маркеры, как мощный инструмент современной генетики, эволюционировали от относительно простых и менее точных методов, таких как RAPD и AFLP, до высокоэффективных и информативных, таких как SSR и SNP, которые сегодня активно используются в геномных исследованиях [10].

Существуют и другие группы маркерных систем, однако для проведения филогенетических исследований и установления возможных связей родословных использование iPBS маркеров принято считать наиболее эффективным. Метод iPBS (inter PBS amplification) подразумевает использование праймеров к участку связывания тРНК к последовательностям ретротранспозонов [11].

Свою эффективность в изучении генетического разнообразия iPBS маркеры подтверждают в работах ряда ученых [5]. Простота и доступность использования делает настоящий метод одним из основных при молекулярно-генетическом анализе сельскохозяйственных культур.

Применение системы iPBS-ретротранспозонных маркеров в селекции растений имеет огромный потенциал, особенно в контексте адаптации к абиотическим стрессам. Анализ генетического разнообразия позволяет выявлять генотипы, обладающие повышенной устойчивостью к неблагоприятным условиям окружающей среды. Идентификация таких генотипов, устойчи-

вых к стрессам, позволяет селекционерам создавать новые сорта растений с улучшенными агрономическими характеристиками и большей продуктивностью. Более того, данный метод может использоваться для изучения эволюционных процессов, понимания генетической структуры популяций и оценки их адаптационного потенциала. В целом система iPBS-ретротранспозонных маркеров представляет собой прогрессивный метод с широкими перспективами применения в современной генетике и селекции растений [12].

Все это позволяет использовать систему маркеров iPBS для изучения генетического разнообразия популяционной структуры имеющейся коллекции озимого ячменя, разработки селекционных программ, а также установления степени родства между изучаемыми объектами.

Цель исследований – оценить эффективность использования iPBS молекулярных маркеров для анализа генотипов озимого ячменя российских сортов современной селекции.

Материалы и методы. Для оценки генетического разнообразия 15 сортов озимого ячменя четырех оригинаторов были использованы 10 iPBS праймеров, нуклеотидная последовательность которых представлена в таблице 1. На основании ряда экспериментов в условиях амплификации температура отжига праймеров на уровне 55 °С показала наиболее четкие электрофоретические спектры.

Для оценки генетического разнообразия использовали 15 сортов озимого ячменя российской селекции четырех оригинаторов. Изученные сорта внесены в Государственный реестр селекционных достижений (табл. 2).

Таблица 1

Молекулярные маркеры, использованные в работе
Molecular markers used in the work

Праймер	Последовательность олигонуклеотидов	Температура отжига праймера, °С
2373	GAACCTTGCTCCGATCCCA	55
2074	GCTCTGATACCA	55
2228	CATTGGCTCTTGATACCA	55
2415	CATCGTAGGTGGGCGCCA	55
2230	TCTAGGCGTCTGATACCA	55
2075	CTCATGATGCCA	55
2078	GCGGAGTCGCCA	55
2237	CCCCTACCTGGCGTGCCA	55
2374	CCCAGCAAACCA	55
2375	TGCATCAACCA	55

Таблица 2

Использованные в работе сорта озимого ячменя
Varieties of winter barley used in the work

Сорт	Оригинатор	Разновидность
1	2	3
Рубеж	ФГБНУ НЦЗ им. П.П. Лукьяненко	parallelum
Молот	ФГБНУ НЦЗ им. П.П. Лукьяненко	parallelum
Ларец	ФГБНУ АНЦ «Донской»	parallelum
Каррера	ООО «Агростандарт»	parallelum
Лайс	ООО «Агростандарт»	pallidum
Шелк	ООО «Агростандарт»	pallidum
Сельхоз	ООО «Агростандарт»; ФГБОУ ВО Кубанский ГАУ	parallelum
Агродеум 21	ФГБОУ ВО Кубанский ГАУ	nutans
Агродеум 11	ФГБОУ ВО Кубанский ГАУ	nutans
Тимофей	ФГБНУ АНЦ «Донской»	parallelum
Ерема	ФГБНУ АНЦ «Донской»	parallelum

1	2	3
Жигули	ФГБНУ АНЦ «Донской»	parallelum
Романс	ФГБНУ НЦЗ им. П.П. Лукьяненко	parallelum
Преемник	ФГБНУ НЦЗ им. П.П. Лукьяненко	parallelum
Платон	ФГБНУ НЦЗ им. П.П. Лукьяненко	parallelum

Для подготовки образцов к выделению ДНК семена озимого ячменя предварительно проращивали в чашках Петри на увлажненной фильтровальной бумаге с использованием термостата, исключив доступ света. Выделение ДНК проводили СТАВ-методом, после чего выделенную ДНК разводили ТЕ-буфером и проверяли концентрацию при помощи флуориметра Qubit.

С целью обеспечения высокого выхода амплифицированного продукта использовали следующие условия полимеразной цепной реакции: 5 мин при 94 °С, далее 40 циклов, 30 с при 94 °С, 30 с при 55 °С, 1 мин при 72 °С, 3 мин при 72 °С.

Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР проводили в течение 1 ч, используя 2 % ТАЕ – агарозный гель. Для визуализации результатов разделения использовали геледокументирующую систему GelDoc.

Полученные в результате ПЦР продукты использовали для генотипирования, при этом во внимание принимались лишь четкие электрофоретические полосы или так называемые бенды. Дальнейший анализ в программе MS Excel

подразумевал учет наличия и отсутствия бендов на снимке, наличие полосы принималось за 1, а отсутствие за 0. Затем, используя макрос GenAlex, была проведена обработка методом главных координат (PCoA) [13]. Построена дендрограмма изучаемых генотипов ячменя с использованием программы MEGA11. Программа STRUCTURE позволила провести структурный анализ популяции на основании полученного массива данных [14].

Результаты и их обсуждение. При исследовании генетического разнообразия 15 сортов озимого ячменя использовалось 10 iPBS-маркеров. В результате их применения выявлено, что они обладают разным уровнем полиморфизма (рис. 1–10, где М – маркер молекулярного веса; 1–15 – генотипы растений ячменя).

В результате ПЦР реакций с использованием праймерной пары iPBS 2373, в диапазоне от 100 до 10000 п.н., четко проявились 80 бендов, при этом в исследуемых образцах число аллелей варьировало от 3 до 10 полос.

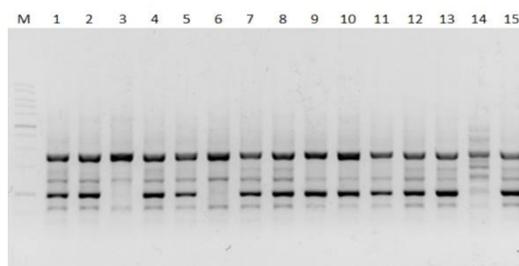


Рис. 1. Визуализация продуктов ПЦР с применением маркера 2373
Visualization of PCR products using marker 2373

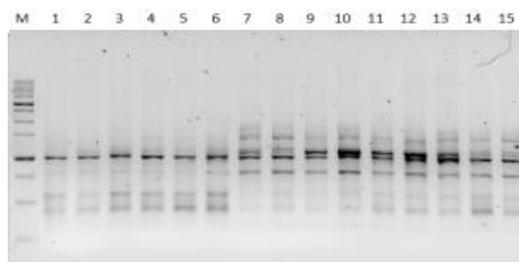


Рис. 2. Визуализация продуктов ПЦР с применением маркера 2074
Visualization of PCR products using marker 2074

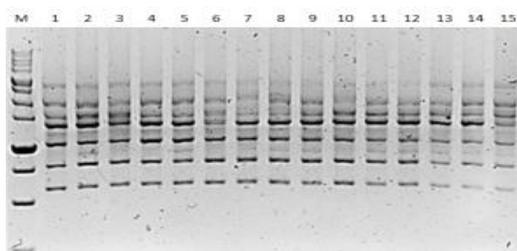


Рис. 3. Визуализация продуктов ПЦР с применением маркера 2228
Visualization of PCR products using marker 2228

Используя маркер iPBS 2228, выделено 122 четких полиморфных аллелей, при этом их диапазон менялся от 2 до 10 в пределах одного генотипа.

Маркер iPBS 2074, как показывает рисунок 2, содержит 114 ДНК-бендов, в среднем 8 аллелей на один генотип.

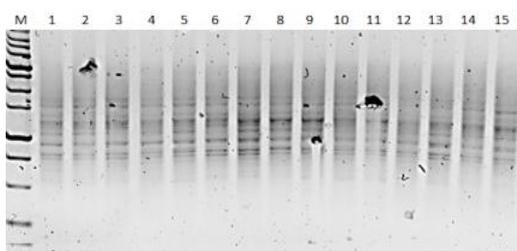


Рис. 4. Визуализация продуктов ПЦР с применением маркера 2415
Visualization of PCR products using marker 2415

Детекция продуктов амплификации с использованием маркера iPBS 2415 позволила визуализировать в общей сложности 112 полос в 15 генотипах. При этом в образцах с 1-го по 9-й число ДНК-бендов достигало 12, с 10-го по 15-й не превышало 9.

Анализ использования праймерной пары 2230 показал 101 бенд, наибольшее количество (9 и 10) наблюдалось в образцах под номерами 10, 13 и 14 соответственно. Наименьшее в образце 15 – 3 аллеля.

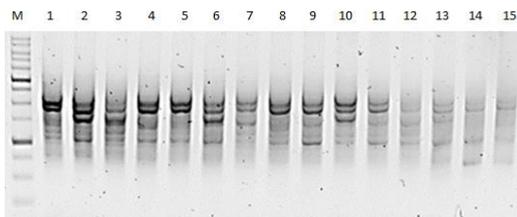


Рис. 5. Визуализация продуктов ПЦР с применением маркера 2230
Visualization of PCR products using marker 2230

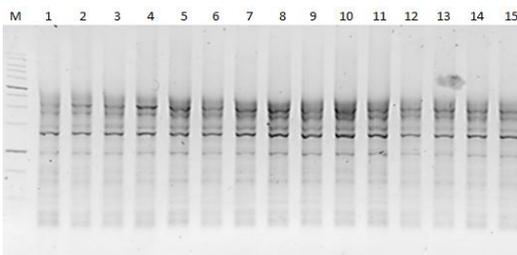


Рис. 6. Визуализация продуктов ПЦР с применением маркера 2075
Visualization of PCR products using marker 2075

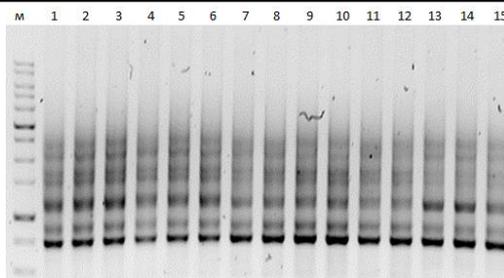


Рис. 7. Визуализация продуктов ПЦР с применением маркера 2078
Visualization of PCR products using marker 2078

Маркер iPBS 2078 позволил увидеть и насчитать 114 бендов на электрофореграмме, при этом число полос в одном генотипе не превышало 10.

От 10 до 16 аллелей в образце было визуализировано при использовании маркера iPBS 2075.

Детекция продуктов амплификации с использованием маркера iPBS 2237 позволила визуа-

лизировать в общей сложности 109 аллелей в 15 генотипах с вариацией от 6 до 10 бендов на образец.

Анализ применения маркера iPBS 2374 в 15 образцах показал 178 электрофоретических полос. При этом следует отметить, что в номерах 8 и 9 число ДНК-бендов не превышало 6, но при этом сформировало 19 бендов в образце номер 3.

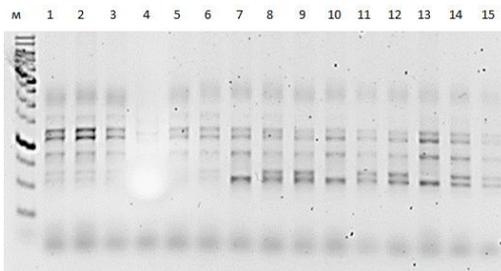


Рис. 8. Визуализация продуктов ПЦР с применением маркера 2237
Visualization of PCR products using marker 2237

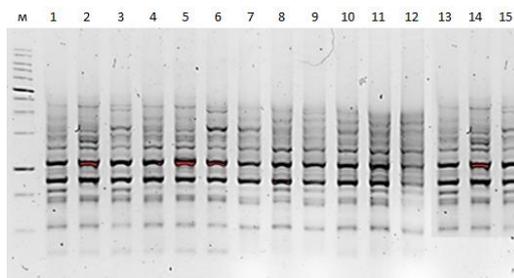


Рис. 9. Визуализация продуктов ПЦР с применением маркера 2374
Visualization of PCR products using marker 2374

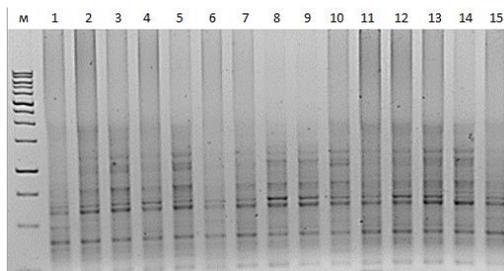


Рис. 10. Визуализация продуктов ПЦР с применением маркера 2375
Visualization of PCR products using marker 2375

От 3 до 12 бендов в электрофоретическом спектре на образец проявилось с применением маркера iPBS 2306.

По итогу проведения комплекса полимеразных цепных реакций с 10 iPBS праймерами, в диапазоне от 100 до 10000 п.н., четко проявились 1223 электрофоретические полосы. При

этом сорт Тимофей показал меньшее значение, сформировав 65 бендов, сорт Каррера показал 95 бендов, превысив показатели всех остальных образцов.

Для расчета генетического разнообразия исследованных генотипов использовался дополнительный макрос MS Excel – AMOVA (табл. 3).

Таблица 3

Результаты анализа генетического разнообразия
Results of the analysis of genetic diversity

Сорт	NP (номер популяции)	НП (кол-во электрофоретических полос на генотип)	TNB (общее кол-во электрофоретических полос)	PPL% (процент полиморфных локусов)	NPB (кол-во частных полос)	I (индекс Шеннона)	h (индекс разнообразия)
Рубеж	1	88					
Молот	1	89					
Платон	1	80					
Преимник	1	72					
Романс	1	74	142	48,56	7	0,279	0,189
Тимофей	2	64					
Ларец	2	92					
Жигули	2	68					
Ерема	2	73	146	59,13	9	0,369	0,257
Каррера	3	95					
Лайс	3	93					
Шелк	3	92	112	39,42	1	0,251	0,175
Сельхоз	4	88					
Агродеум 21	4	80					
Агродеум 11	4	75	113	59,13	22	0,376	0,263
Всего	–	1223	513	51,56	630	0,319	0,221

Данные таблицы 3 показывают, что число аллелей в изучаемых образцах было различным. Анализируя коэффициент полиморфизма среди четырех популяций, стоит отметить, что у второй и четвертой популяций растений он оказался самым высоким и достиг 59,13 %, что говорит о достаточно большом генетическом различии среди образцов настоящих популяций, оригинаторами которых являются ФГБНУ АНЦ «Донской» и ФГБОУ ВО Кубанский ГАУ соответственно. Анализ массива данных выявил, что процент полиморфных локусов в популяциях был достаточно высок – 51,6 %. Однако самые низкие значения показали популяции, состоящие из сортов, оригинатором которых является Агростандарт – 39,42 % и ФГБНУ НЦЗ им. П.П. Лукьяненко (48,56 %), что позво-

ляет сделать вывод о их более однородном генетическом составе относительно двух других популяций. Количество частных полос, или иначе говоря – специфических аллелей, варьировало от 1 в третьей популяции до 22 в четвертой. Первая и вторая популяции показали 7 и 9 аллелей соответственно.

Числовые выражения индексов Шеннона и разнообразия оказались близки в популяциях один и три, а также два и четыре. Для первой популяции – 0,279 и 0,189, для второй – 0,369 и 0,257, для третьей – 0,251 и 0,175, для четвертой – 0,376 и 0,263. Оба параметра показали, что уровень генетического разнообразия четвертой популяции, несмотря на ее малочисленный состав, оказался более высоким относительно других популяций.

Анализ молекулярной дисперсии проводился с учетом внутривидовых и межвидовых различий (рис. 11) и показал, что проанализированные образцы в большей сте-

пени отличались внутри популяции, чем популяции между собой.

Расчет взаимосвязей между генотипами ячменя производился с использованием программы MS Excel (табл. 4).

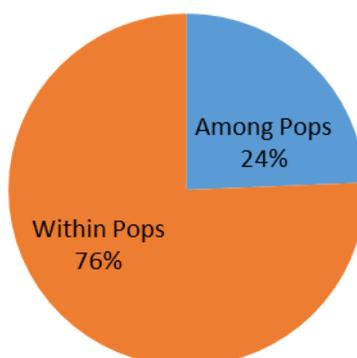


Рис. 11. Процент молекулярной дисперсии генотипов озимого ячменя
Percentage of molecular dispersion of winter barley genotypes

Таблица 4

Матрица коэффициентов сходства различия для генотипов ячменя
Matrix of coefficients of similarity of differences for genotypes of barley

Рубеж	Молот	Ларец	Каррера	Лайс	Шелк	Сельхоз	Агродеум 21	Агродеум 11	Тимофей	Ерема	Жигули	Романс	Преемник	Платон	
0															Рубеж
35	0														Молот
44	41	0													Ларец
59	60	47	0												Каррера
53	58	61	34	0											Лайс
64	59	62	47	45	0										Шелк
68	61	68	49	45	46	0									Сельхоз
86	85	90	89	83	94	78	0								Агродеум 21
81	78	79	90	86	87	73	49	0							Агродеум 11
84	85	84	77	81	76	84	78	83	0						Тимофей
81	68	85	68	74	81	81	85	86	41	0					Ерема
92	97	92	77	83	92	86	74	79	56	67	0				Жигули
92	91	102	89	83	82	84	80	83	58	63	58	0			Романс
100	103	102	91	99	100	88	84	75	76	79	70	66	0		Преемник
102	105	108	107	103	106	96	100	89	94	95	92	90	90	0	Платон

Оценка генетических взаимоотношений между образцами озимого ячменя проводилась с помощью РСoA-анализа (рис. 12). Так, сорта разделились на четыре группы. В первую группу входят сорта, оригинатором которых является НЦЗ им. П.П. Лукьяненко, во вторую – ФГБНУ АНЦ «Донской», в третью – сорта фирмы ООО «Агростандарт» и в четвертую – сорта селекции

ФГБОУ ВО Кубанский ГАУ. Согласно рисунку 12, Каррера, Шелк и Лайс расположены очень близко друг к другу, что говорит о генетическом сходстве. Так как оригинатором этих сортов является ООО «Агростандарт», логично предположить, что их родословные могут содержать генетическую плазму родственных популяций.

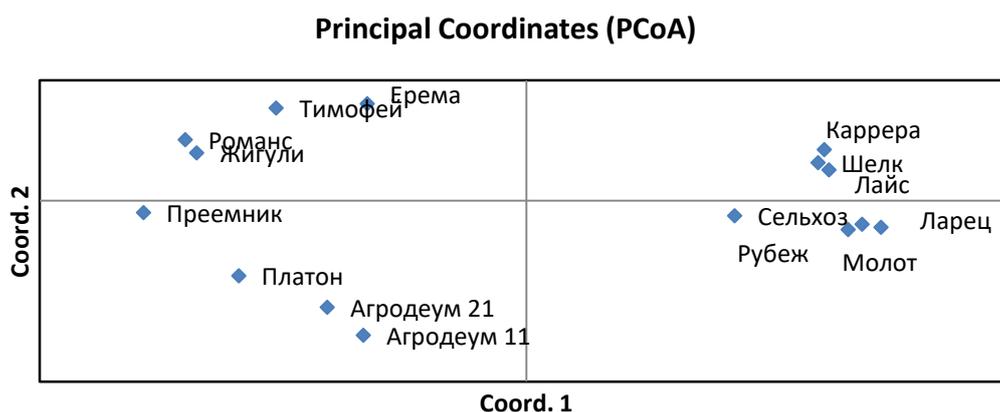


Рис. 12. График анализа 15 генотипов озимого ячменя
Graph of the analysis of 15 genotypes of winter barley

Аналогичную зависимость можно наблюдать у сортов популяции 3 – Агродеум 21 и Агродеум 11. Однако здесь генетическое расстояние выше, особенно у сорта Сельхоз, являющегося результатом совместной селекции ФГБОУ ВО Кубанский ГАУ и ООО «Агростандарт». Сорта Жигули, Тимофей и Ерема селекции ФГБНУ АНЦ «Донской» обладают более отдаленным генетическим расстоянием, за исключением сорта Ларец, который выделился в другой кластер, приближенный к сортам Рубеж и Молот. Сорта селекции НЦЗ им. П.П. Лукьяненко имели самое высокое генетическое расстояние между собой относительно других популяций и распределились по трем из четырех областей графика.

Для кластеризации образцов был выбран метод «Neighbor-Joining» программы MEGA11 [14] (рис. 13). Он позволил разделить генотипы на два больших кластера, и только сорт Платон обособился отдельно от всей изучаемой выборки. В один кластер выделились сорта селекции ООО «Агростандарт» и НЦЗ им. П.П. Лукьяненко, за исключением сорта Ларец. Этот кластер дополнительно подразделяется на еще две подгруппы отдельно, вынося сорта Каррера, Лайс, Шелк и Сельхоз, обладающие устойчивостью к мучнистой росе, карликовой ржавчине и пятнистостям. Ларец, Рубеж и Молот, характеризующиеся высокой морозоустойчивостью, вошли в другую подгруппу.

Другой кластер объединил в себя сорта ФГБНУ АНЦ «Донской» и ФГБОУ ВО Кубанский ГАУ, кроме сортов Преемник и Романс, являющихся интеллектуальной собственностью НЦЗ

им. П.П. Лукьяненко. Взаимосвязанные Тимофей и Ерема, а также Жигули и Романс оказались родственными по структуре ДНК. Преемник, согласно кластерограмме, берет свое генетическое начало из совокупности вышеперечисленных четырех образцов.

Данные кластерного анализа и сформированной дендрограммы показали результаты, сходные с результатами PCoA-анализа.

В обоих случаях четко просматривается разделение на четыре кластера, при этом проследивается генетическая взаимосвязь между сортами селекции ООО «Агростандарт» и НЦЗ им. П.П. Лукьяненко, а также сортов ФГБНУ АНЦ «Донской» и ФГБОУ ВО Кубанский ГАУ.

Следующим этапом наших исследований стал анализ структуры популяции всей выборки сортов ячменя. Программы STRUCTURE и Structure Selector, являясь мощными инструментами для анализа генетических данных и определения распределения генотипов по различным мнимым группам, позволяют визуализировать и интерпретировать генетическую структуру популяций. Количество гипотетических субпопуляций (K) оценивалось с помощью 10 независимых значений (K от 1 до 10) для проверки наилучшего значения ΔK [15]. На рисунке 14 можно увидеть, что при значениях $K = 2$ и $K = 4$ генетические образцы демонстрируют наиболее четкое разделение на группы. Это связано с тем, что именно при этих значениях достигается максимальная высота кривой, что указывает на наибольшую степень уверенности в классификации образцов.

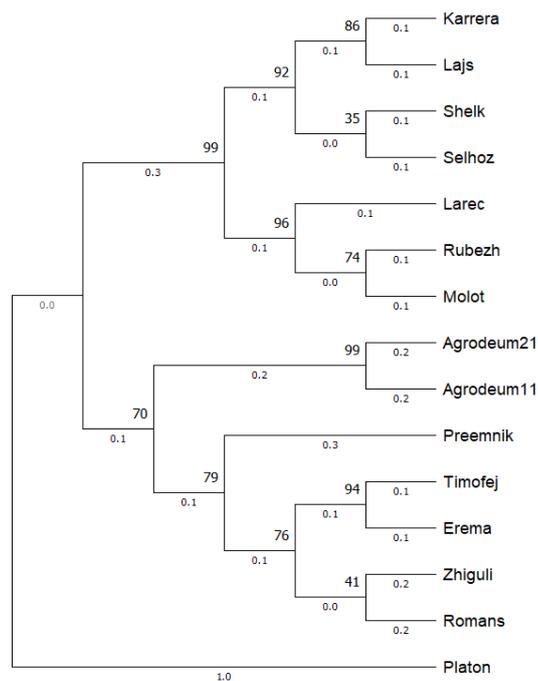


Рис. 13. Кластерный анализ 15 генотипов ячменя методом Neighbor-Joining
Cluster analysis of 15 genotypes of barley by the Neighbor-Joining method

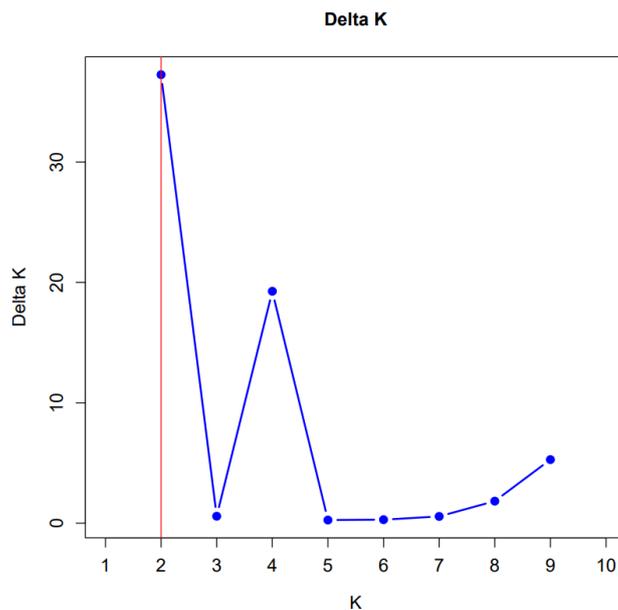


Рис. 14. Количество K групп (Structure Selector)
Number of K groups (Structure Selector)

Важно отметить, что выбор оптимального значения K имеет критическое значение для анализа. Слишком низкое значение может привести к потере информации о структурных различиях между популяциями, в то время как слишком высокое значение может создать искусственную сложность, выделяя группы, которые на самом деле не имеют биологического значения.

Проводя структурный анализ при $K = 2$ (рис. 15, табл. 5), где каждая вертикальная полоса показывает присутствие генотипа одной популяции в генотипе другой, результаты Neighbor-Joining и PCoA подтверждают друг друга, однако при значении $K = 4$ имеет более точные результаты (рис. 16, табл. 5).

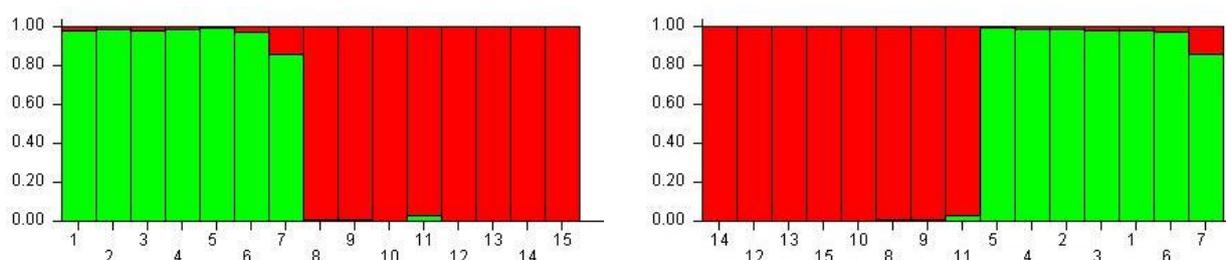


Рис. 15. Генетическая структура 15 генотипов озимого ячменя при $K = 2$
 The genetic structure of 15 genotypes of winter barley at $K = 2$

Таблица 5

Номер и наименование образцов, представленных на рисунках 15 и 16
 The number and name of the samples shown in Figures 15 and 16

Номер образца	Сорт	Номер образца	Сорт	Номер образца	Сорт
1	Рубеж	6	Шелк	11	Ерема
2	Молот	7	Сельхоз	12	Жигули
3	Ларец	8	Агродеум 21	13	Романс
4	Каррера	9	Агродеум 11	14	Преёмник
5	Лайс	10	Тимофей	15	Платон

Гистограмма, представленная на рисунке 15, показывает, что образцы под номерами 1, 2, 3, 4, 6, 7 в большей степени, а генотип 5 полностью представлены первой популяцией. Генотипы 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15 полностью относятся ко второй популяции. Образец под номером 11

относится к популяции два примерно на 80 % (см. рис.15).

В точке 4 наблюдается значение ΔK второе по величине. Соответствующий график разделения изучаемой выборки на четыре мнимых популяции показан на рисунке 16.

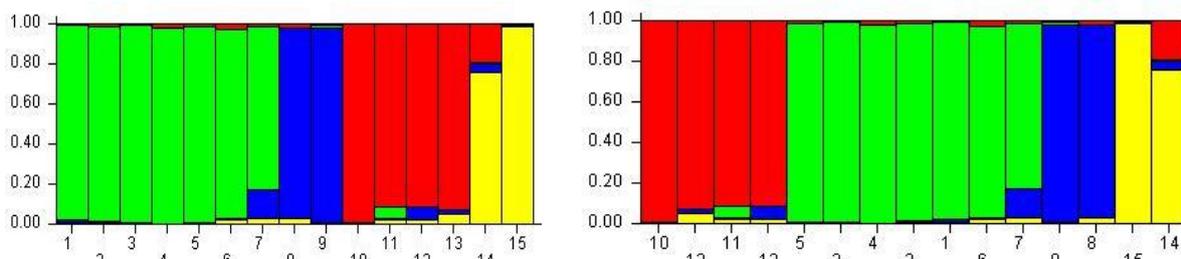


Рис. 16. Генетическая структура 15 генотипов озимого ячменя при $K = 4$
 The genetic structure of 15 genotypes of winter barley at $K = 4$

Важно отметить, что генотипы образцов 1–5, представленные в большей степени одним цветом, четко выделяются среди всего массива. В отдельный кластер можно отнести номера 10–13. Генетически более разнородны сорта 1, 4, 5, 9, 15, содержащие в своем профиле части двух популяции, а образцы 2, 6, 8, 11–14 – трех, и только номер 7 сочетает в себе комплекс генетического материала всех четырех популяций (см. рис. 16).

Полученные данные позволяют предположить, что его селекция на территории Ростов-

ской области и Краснодарского края основывается на двух «школах» ФГБНУ НЦЗ им. П.П. Лукьяненко и ФГБНУ АНЦ «Донской», являющимися основоположниками развития озимого ячменя как культуры не только на территории своих регионов, но и в России в целом. Именно поэтому изучаемая выборка в большей степени разделена на две популяции. При этом четко выделяется четвертая популяция, в которую входят сорта селекции ФГБОУ ВО Кубанский ГАУ. Популяция под номером три, оригинатором сортов которой является ООО «Агро-

стандарт», менее контрастна относительно других и почти полностью соответствует популяции номер один.

Оценить эффективность применения iPBS маркеров для анализа генетического разнообразия изученных сортов озимого ячменя мы смогли после проведения полного и разностороннего анализа генетических взаимоотношений 15 сортов ячменя при использовании 10 iPBS маркеров.

Средние значения, полученные в результате комплекса инструментов статистической обработки геномных данных, подтверждают результаты друг друга и свидетельствуют о богатом генетическом разнообразии изученных нами четырех популяций современных сортов озимого ячменя отечественной селекции.

Анализ молекулярной дисперсии, проведенный с учетом внутривидовых и межвидовых различий, показал значимые ($P < 0,001$) генетические различия внутри (76 %) и между популяциями (24 %) (рис. 11). Это указывает на то, что генетическое разнообразие в основном наблюдается среди сортов, а не популяций. Такие результаты представляют большую значимость, ведь снижение генетического разнообразия внутри популяции грозит утратой ее положительных свойств.

Оценка генетических взаимоотношений между образцами и дендрограмма сгруппировали 15 сортов озимого ячменя в два основных кластера, в каждом из которых образовалось по два подкластера. Так, кластер 1 объединил в себе сорта селекции ФГБНУ НЦЗ им. П.П. Лукьяненко и ООО «Агростандарт», а кластер 2 – сорта селекции ФГБНУ АНЦ «Донской» и ФГБОУ ВО Кубанский ГАУ, что позволяет говорить о их генетической близости. Последующее разделение каждого из этих кластеров на 2 дополнительных подкластера полностью соответствует нашей исходной группировке популяций по наименованию оригинатора.

Важно отметить, что селекция озимого ячменя в России имела свое начало на базе именно этих больших селекционных школ – ФГБНУ НЦЗ им. П.П. Лукьяненко и ФГБНУ АНЦ «Донской», которые можно по праву считать родоначальниками культуры озимого ячменя не только на юге, но и на территории всей нашей страны. Их сорта послужили основой для создания многих современных сортов рассмотренной нами культуры.

Кластеризация, проведенная с помощью STRUCTURE, также разделила 15 сортов озимого ячменя в два основных кластера. На-

большая вероятность того, что данные, объясняющие структуру популяции, были получены при $\Delta K = 2$ (рис. 15), в очередной раз подтверждает, что генетические профили сортов озимого ячменя селекции ФГБОУ ВО Кубанский ГАУ и ФГБНУ АНЦ «Донской», а также ООО «Агростандарт» и ФГБНУ НЦЗ им. П.П. Лукьяненко содержат в себе больше сходной генетической информации. А следующее по величине – значение $\Delta K = 4$, что объясняет наше разделение выборки на 4 популяции по происхождению.

Так, данные, полученные в ходе каждого из этапов исследования, хоть и показывают большее генетическое сходство между группами сортов озимого ячменя селекции ФГБОУ ВО Кубанский ГАУ и ФГБНУ АНЦ «Донской», а также ООО «Агростандарт» и ФГБНУ НЦЗ им. П.П. Лукьяненко, при этом отличают их по целому ряду показателей. Все это свидетельствует об уникальности и разнородности каждой из исследованных популяций.

Подобные исследования проводились рядом ученых по всему миру [4, 5, 7, 8, 11–15]. При этом предметом изучения являлись разнообразные объекты, в т. ч. растения, бактерии и даже животные. По результатам таких научных изысканий группа маркеров iPBS для оценки полиморфизма была признана одним из самых простых, бюджетных и достоверных методов. Ведь именно генетическое разнообразие популяций позволяет вести направленную селекцию и получать все более совершенные конкурентоспособные сорта сельскохозяйственных растений.

Заключение. Обработка генетических данных по 15 сортам озимого ячменя отечественной селекции методами PCoA, Neighbor-Joining и STRUCTURE 2.3.4 показала, что исследуемые образцы распределились сходным образом. Сорта селекции ФГБНУ АНЦ «Донской» и ФГБОУ ВО Кубанский ГАУ в основном разделились на отдельные группы. Генетический профиль сортов ООО «Агростандарт» имел больше сходства с сортами ФГБНУ НЦЗ им. П.П. Лукьяненко.

Из вышесказанного следует, что четкое разделение образцов подтверждает эффективность анализа генотипов озимого ячменя с помощью iPBS маркеров и обосновывает целесообразность использования данного типа маркерных систем для составления селекционных программ, основываясь на отдаленности родства селекционного материала.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Филиппов Е.Г., Донцова А.А., Донцов Д.П., и др. Технология возделывания озимого ячменя: методические рекомендации для специалистов сельскохозяйственного производства и студентов сельскохозяйственных вузов. Саратов: Аграрный научный центр «Донской», 2024. 102 с. EDN: FYNEWH.
2. Kalendar R., Muterko A., Boronnikova S. Retrotransposable Elements: DNA Fingerprinting and the Assessment of Genetic Diversity // *Methods Mol Biol*. 2021. № 2222. P. 263–286. DOI: 10.1007/978-1-0716-0997-2_15.
3. Сухина, К.В., Репко Н.В., Ерешко А.С. Теоретическая модель будущего сортотипа озимого ячменя // *Рисоводство*. 2017. № 1 (34). С. 34–38. EDN: YGWLKV.
4. Haliloğlu K., Türkoğlu A., Öztürk H.I., et al. iPBS-Retrotransposon Markers in the Analysis of Genetic Diversity among Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Germplasm from Türkiye // *Genes (Basel)*. 2022. Vol. 13, № 7. P. 1147. DOI: 10.3390/genes13071147.
5. Baran N., Shimira F., Nadeem, M.A., et al. Exploring the genetic diversity and population structure of upland cotton germplasm by iPBS-retrotransposons markers // *Mol Biol Rep*. 2023. № 50. P. 4799–4811. DOI: 10.1007/s11033-023-08399-0.
6. Дубина Е.В. Молекулярные маркеры в селекции растений. Краснодар: Кубанский ГАУ им. И.Т. Трубилина, 2023. 165 с. EDN: IDUOBU.
7. Vanijajiva O., Pornpongrungrueng P. Inter-primer binding site (iPBS) markers reveal the population genetic diversity and structure of tropical climbing *Cissampelopsis* (Asteraceae) in Thailand // *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*. 2020. Vol. 21, № 9. P. 3919–3928.
8. Корж С.О., Горун О.Л., Явцева Е.И., и др. Анализ генотипов томата с использованием iPBS маркеров // *Рисоводство*. 2023. № 1 (58). С. 82–96. DOI: 10.33775/1684-2464-2023-58-1-82-96. EDN: UHYPVT.
9. Amiteye S. Basic concepts and methodologies of DNA marker systems in plant molecular breeding // *Heliyon*. 2021. Vol. 7, № 10. e08093. DOI: 10.1016/j.heliyon.2021.e08093.
10. Календар Р., Аменов А., Данияров А. Использование генетических маркеров, полученных из ретротранспозонов, для анализа геномной изменчивости у растений // *Функциональная биология растений*. 2018. № 46 (1). С. 15–29. DOI: 10.1071/FP18098.
11. Sagbas H.I., Ercisli S., Aydin M., et al. Evaluation of genetic diversity using iPBS-SCoT marker methods in native hawthorn genetic resources and species identification by using DNA barcoding method // *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2023 Oct 31;69(10):43-55. DOI: 10.14715/cmb/2023.69.10.6.
12. Androsiuk P., Milarska S.E., Dulaska J., et al. The comparison of polymorphism among *Avena* species revealed by retrotransposon-based DNA markers and soluble carbohydrates in seeds // *J Appl Genet*. 2023. Vol. 64, № 2. P. 247–264. DOI: 10.1007/s13353-023-00748-w.
13. Aydın F., Özer G., Alkan M., et al. The utility of iPBS retrotransposons markers to analyze genetic variation in yeast // *Int J Food Microbiol*. 2020. Vol. 325. P. 108647. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108647.
14. Orhan E., Kara D. Use of retrotransposon based iPBS markers for determination of genetic relationship among some *Chestnut Cultivars* (*Castanea sativa* Mill.) in Türkiye // *Mol Biol Rep*. 2023. Vol. 50, № 10. P. 8397–8405. DOI: 10.1007/s11033-023-08697-7.
15. Zhang X., Chen W., Yang Z., et al. Genetic diversity analysis and DNA fingerprint construction of *Zanthoxylum* species based on SSR and iPBS markers // *BMC Plant Biol*. 2024. Vol. 24, № 1. P. 843. DOI: 10.1186/s12870-024-05373-1.

References

1. Filippov EG, Doncova AA, Doncov DP, et al. Tekhnologiya vzdelyvaniya ozimogo yachmenya: metodicheskie rekomendacii dlya specialistov sel'skohozyajstvennogo proizvodstva i studentov sel'skohozyajstvennyh vuzov. Saratov: Agrarnyj nauchnyj centr "Donskoj"; 2024. 102 p. EDN: FYNEWH.
2. Kalendar R, Muterko A, Boronnikova S. Retrotransposable Elements: DNA Fingerprinting and the Assessment of Genetic Diversity. *Methods Mol Biol*. 2021;2222:263-286. DOI: 10.1007/978-1-0716-0997-2_15.

3. Sukhinina KV, Repko NV, Ereshko AS. The theoretical model of the future types of winter barley. *Rice Growing*. 2017;(1):34-38. EDN: YGWLKV.
4. Haliloğlu K, Türkoğlu A, Öztürk HI, et al. iPBS-Retrotransposon Markers in the Analysis of Genetic Diversity among Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Germplasm from Türkiye. *Genes (Basel)*. 2022;13(7):1147. DOI: 10.3390/genes13071147. EDN: LPXHZL.
5. Baran N, Shimira F, Nadeem, MA, et al. Exploring the genetic diversity and population structure of upland cotton germplasm by iPBS-retrotransposons markers. *Mol Biol Rep*. 2023;(50):4799-4811. DOI: 10.1007/s11033-023-08399-0. EDN: MNPJXM.
6. Dubina EV. *Molekulyarnye markery v selekcii rastenij*. Krasnodar: Kubanskij GAU im. I.T. Trubilina; 2023. 165 p. EDN: IDUOBU.
7. Vanijajiva O, Pornpongrungrueng P. Inter-primer binding site (iPBS) markers reveal the population genetic diversity and structure of tropical climbing *Cissampelopsis* (*Asteraceae*) in Thailand // *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*. 2020;21(9): 3919-3928. DOI: 10.13057/biodiv/d210901. EDN: RTVRXN.
8. Korzh SO, Gorun OL, Yavtseva EI. Analysis of tomato genotypes using ipbs markers. *Rice Growing*. 2023;(1):82-96. DOI: 10.33775/1684-2464-2023-58-1-82-96. EDN: UHYPVT.
9. Amiteye S. Basic concepts and methodologies of dna marker systems in plant molecular breeding. *Heliyon*. 2021;7(10):e08093. DOI: 10.1016/j.heliyon.2021.e08093. EDN: MTDHIM.
10. Kalendar R, Amenov A, Daniyarov A. Use of retrotransposon-derived genetic markers to analyse genomic variability in plants. *Funct Plant Biol*. 2018;46(1):15-29. DOI: 10.1071/FP18098.
11. Sagbas HI, Ercisli S, Aydin M, et al. Evaluation of genetic diversity using iPBS-SCoT marker methods in native hawthorn genetic resources and species identification by using DNA barcoding method. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2023 Oct 31;69(10):43-55. DOI: 10.14715/cmb/2023.69.10.6.
12. Androsiuk P, Milarska SE, Dulaska J, et al. The comparison of polymorphism among *Avena* species revealed by retrotransposon-based DNA markers and soluble carbohydrates in seeds. *J Appl Genet*. 2023;64(2):247-264. DOI: 10.1007/s13353-023-00748-w. EDN: UVRNLI.
13. Aydın F., Özer G., Alkan M., et al. The utility of iPBS retrotransposons markers to analyze genetic variation in yeast. *Int J Food Microbiol*. 2020;325:108647. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108647. EDN: ZSGDND.
14. Orhan E, Kara D. Use of retrotransposon based iPBS markers for determination of genetic relationship among some *Chestnut Cultivars* (*Castanea sativa* Mill.) in Türkiye. *Mol Biol Rep*. 2023;50(10):8397-8405. DOI: 10.1007/s11033-023-08697-7. EDN: SSMJZZ.
15. Zhang X, Chen W, Yang Z, et al. Genetic diversity analysis and DNA fingerprint construction of *Zanthoxylum* species based on SSR and iPBS markers. *BMC Plant Biol*. 2024;24(1):843. DOI: 10.1186/s12870-024-05373-1. EDN: DWPXTQ.

Статья принята к публикации 19.03.2025 / The article accepted for publication 19.03.2025.

Информация об авторах:

Ксения Вадимовна Сухинина¹, молекулярный биолог

Елена Викторовна Дубина², заведующая лабораторией информационных, цифровых и биотехнологий, доктор биологических наук

Наталья Валентиновна Репко³, профессор кафедры генетики, селекции и семеноводства, доктор сельскохозяйственных наук

Виктория Николаевна Давыденко⁴, научный сотрудник Центра искусственного климата

Information about the authors:

Ksenia Vadimovna Sukhinina¹, Molecular Biologist

Elena Viktorovna Dubina², Head of the Laboratory of Information, Digital and Biotechnologies, Doctor of Biological Sciences

Natalia Valentinovna Repko³, Professor at the Department of Genetics, Selection and Seed Production, Doctor of Agricultural Sciences

Victoria Nikolaevna Davydenko⁴, Researcher at the Artificial Climate Center