

РАЗРАБОТКА И УНИВЕРСАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ EST-SSR ЖИТНЯКА МОНГОЛЬСКОГО (*AGROPYRON MONGOLICUM* KENG.) НА ОСНОВЕ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ТРАНСКРИПТОМА

ХАНЬ ЦЗЯФАНЬ, ВАН ЦЗИЛУН, ЛИ ЮЙЧЭНЬ, ХУАН СИНТЯНЬ,
ДУ ЦЗИНЬЮЙ, ЧЖАО ЯНЬ

Сельскохозяйственный университет Внутренней Монголии
Хух-Хото, Китайская Народная Республика, 010070

ЛЮ ЯЛИН

Mengcao Ecological Environment (Group),
Хух-Хото, Китайская Народная Республика, 010070

(Поступила в редакцию 20.06.2025)

Растения рода *Agropyron* являются отличным кормом и обладают высокой устойчивостью к стрессу. На основе данных секвенирования транскриптома (*A. Mongolicum* Keng) были случайным образом отобраны и синтезированы 99 пар SSR-праймеров. Эти праймеры были валидированы для пяти различных видов *Agropyron*: *Agropyron Mongolicum* Keng, *A. michnoi*, *A. desertorum*, *A. desertorum* cv. *nordan* и *Agropyron cristatum* × *A. desertorum* cv. *Hycrest*. Были протестированы пять видов изучаемого растения. Целые полосы были успешно амплифицированы 89 парами праймеров, что соответствует эффективности в 90 %. Размеры целевых фрагментов соответствовали результатам секвенирования. Результаты показали, что SSR-маркеры, разработанные на основе данных транскриптома *A. Mongolicum* Keng, обладают практичностью и универсальностью. Эти маркеры заложили прочную основу для оценки генетических ресурсов, картирования, улучшения сортов и анализа генетического разнообразия *Agropyron*.

Ключевые слова: житняк монгольский, секвенирование транскриптома, молекулярный маркер EST-SSR, праймер, ПЦР-амплификация.

Plants of the genus *Agropyron* are excellent forage crops and exhibit high stress tolerance. Based on transcriptome sequencing data (*A. mongolicum* Keng), 99 pairs of SSR primers were randomly selected and synthesized. These primers were validated for five different *Agropyron* species: *Agropyron mongolicum* Keng, *A. michnoi*, *A. desertorum*, *A. desertorum* cv. *nordan*, and *Agropyron cristatum* × *A. desertorum* cv. *Hycrest*. Five species of the studied plant were tested. Whole bands were successfully amplified with 89 primer pairs, corresponding to 90% efficiency. The target fragment sizes were consistent with sequencing results. The results demonstrated that the SSR markers developed on the basis of data of *A. mongolicum* Keng transcriptome are practical and versatile. These markers provide a solid foundation for genetic resource assessment, mapping, cultivar improvement, and genetic diversity analysis of *Agropyron*.

Key words: mongolian wheatgrass, transcriptome sequencing, EST-SSR molecular marker, primer, PCR amplification.

Введение

Житняк монгольский (*Agropyron mongolicum* Keng) является отличной кормовой травой и обладает очень высокой кормовой ценностью. В данном исследовании метод секвенирования транскриптома был использован для высококачественного секвенирования транскриптома житняка. Праймеры для разработки SSR-маркеров были отобраны случайным образом. Обнаружен ряд праймеров SSR с высокой эффективностью амплификации и практичностью, которые удобны для будущего применения в идентификации ресурсов генетического материала того же рода [1–6].

Молекулярные SSR-маркеры, разработанные в этом исследовании на основе секвенирования транскриптома монгольского житняка [7, 8], являются эффективными и практичными. Результаты исследования закладывают основу для дальнейшей разработки молекулярных SSR-маркеров монгольского житняка. Эти маркеры являются базой для анализа разнообразия генетических ресурсов житняка [9, 10, 11], составления генетической карты, оценки генофонда и улучшения сортов.

Основная часть

Объектами исследований служили пять видов житняка, которые были собраны из питомника кормовых ресурсов и кормовой базы Сельскохозяйственного университета Внутренней Монголии (табл. 1).

Таблица 1. Виды житняка

Наименование вида	Латинское название	Источник	Тип
Житняк монгольский	<i>Agropyron mongolicum</i> Keng	Внутренняя Монголия	разновидность
Житняк пустынный	<i>Agropyron desertorum</i> (Fisch.) Schult	Внутренняя Монголия	дикие ресурсы
Житняк пустынный стандартный	<i>Agropyron desertorum</i> CV. <i>nordan</i>	США	разновидность
Гибрид житняка	<i>Agropyron cristatum</i> × <i>A. desertorum</i> cv. <i>Hycrest</i>	США	разновидность
Житняк Михно	<i>Agropyron michnoi</i>	Внутренняя Монголия	разновидность

Экстракция геномной ДНК и синтез праймеров EST-SSR.

Для выделения ДНК использовали свежие и нежные листья 5 видов житняка (стадия озеленения). Навеску массой около 0,10 г от каждого материала, поместить в центробежную пробирку со стальными шариками, быстро заморозить жидким азотом, измельчить шаровой мельницей. Экстрагировать геномную ДНК с помощью набора для экстракции геномной ДНК растений компании Tiangen (центробежная колонка). Определенные действия выполняются в соответствии с инструкцией. Качество ДНК определяли с помощью электрофореза в 1 % агарозном геле, а концентрацию ДНК определяли с помощью ультрафиолетового спектрофотометра DROP 2000.

ПЦР амплификация. ПЦР-амплификация проводилась в объеме 20 мкл [15]. Смесь состояла из 10 мкл Master Mix, 1 мкл прямого и обратного праймеров, 1 мкл матрицы ДНК (разбавленной) и 7 мкл ddH₂O для пополнения всего объема.

Процедура реакции предварительного скрининга 95 °С предварительная денатурация в течение 3 мин; денатурация при 95 °С в течение 30 с, оптимальная температура отжига праймера составляет 55 °С, отжиг составляет 30 с, элонгация 72 °С в течение 30 с, 35 циклов; 72 °С завершающая элонгация в течение 7 минут. Хранить при 4 °С.

Извлечение и обнаружение ДНК. Экстрагированная геномная ДНК житняка была обнаружена с помощью 1 % электрофореза в агарозном геле. Результаты электрофореза показали, что экстрагированная геномная ДНК имела хорошую целостность без явных разрывов и деградации. После электрофореза концентрация и чистота были определены с помощью количественного прибора измерения нуклеиновых кислот. Результаты обнаружения показали, что концентрация геномной ДНК пяти извлеченных видов житняка была высокой, значение OD260/OD280 составляло около 1,8–2,0, и в OD260 был очевидный пик поглощения, чистота была высокой, что подходило для последующей реакции ПЦР-амплификации праймеров молекулярного маркера SSR.

Значения концентрации ДНК пяти видов житняка выглядят следующим образом (табл. 2).

Таблица 2. Результаты теста ДНК

Наименование вида	Нуклеиновая кислота	Группа по эксплуатации	A260(Abs)	A280(Abs)	260/280	260/230
Житняк монгольский	63,7	ng/μL	1,275	0,621	2,05	1,13
Житняк пустынный	44,3	ng/μL	0,885	0,430	2,06	0,87
Житняк пустынный стандартный	46,3	ng/μL	0,927	0,460	2,02	0,93
Гибрид житняка	64,2	ng/μL	1,284	0,644	1,99	1,16
Житняк Михно	135,1	ng/μL	2,701	1,335	2,02	1,55

Последовательность праймеров SSR.

В этом эксперименте, основанном на секвенировании транскриптома житняка монгольского, параметры праймера были разработаны с содержанием GC 40–60 %, температурой отжига 50–60 °С, длиной праймера 18–25 п.н., а целевой фрагмент, как ожидается, будет более 50 п.н.

Таблица 3. Информация о 99 парах SSR- праймеров

№ п.п.	Номер праймера	Повторяющийся мотив	Нуклеотидная последовательность праймеров (5'-3')	Нуклеотидная последовательность праймеров (5'-3')
1	CL1017	TTTG	CAGCATATCAACACAGACAAT	TTTTTGGATTCTGCAGTCTCAGT
2	CL1018	TC	GCACCTATGTAGATGGCAACT	AGAGAGGAAAGTCCATTTCGATT
3	CL101	AGC	CCACCAACCTCTCTCTGTAT	GTTACCGATTTGACAGCGAAGT
4	CL103	GCCTCC	GAACATCGGCTACGAGTACG	GTCCTTCTTCAGCTGCTTCTTG
5	CL1064	CGT	CGTCTGCTGCATTGTAGC	ACGGACAGCTTCTGCTCACT
6	CL1073	TGC	TCTTGTCTCTGTTGTACCGAA	TGTCGACTTCCATGATTAGAT
7	CL1085	GGC	AGATCCACAGATCCAAATCCA	CGATCGAGGAGACGAAACTAAT
8	CL1087	CGC	TTACCTTGATCTGGTACAGCT	GTCGCTGTAGGGGGCTTC
9	CL1111	GGT	GAAATCTTTCACACGTAGGCA	ATATTGCACTTTTCATTTCTTCCG
10	CL1121	CGG	CTTAAATCTGAGTGATGGCCT	CTCCTCTCTCTGCCCTAAATC
11	CL1140	CT	CTCTGAATCTGAATCTTGTTG	CATGGGGACTACAAAATGAACA
12	CL1172	CGC	AACTTGCGCACGAACGAC	GTGACTCTGGAGGACGACAAC
13	CL1193	AG	TTCTTCAGTTCAGCAAACATG	AGTGGAGGTGCAGGGTAGAAG
14	CL1237	TGC	CCTCTCTGAGTCTCTGTGCTTG	GGTCTGGTTCTCCAAGAAAGAA
15	CL1242	TA	GCTGATTGCTGGGAATATGAG	AAGATTCTGGTGAGACAGAGTG
16	CL1244	TGC	ATCTCTAAATGCCAACAGGTC	GATGCTTGTTGGTGATCTTCCT
17	CL1278	AGC	GGCACAATGAATCCCAGAGA	CATCATGGGGATATGGTTAAAT
18	CL1298	CA	ACTGATCGGCATCATCTTGTA	CTCAAAAGATCTGTCCCCAGTA
19	CL1317	CGG	GGACTTCTGCATCGCCATC	GAGGTCCCGACGCTAGAG
20	CL1343	GCC	GCTTTAATCCACACTTCCGTC	CCGTGGTAGCGACTGCTG

21	CL1348	CCG	AGCAGCTACCTCTGCGACA	ACGCAGAGCTTGGCGTTG
22	CL1361	TCC	AGGATTTATCGCCTTGGACAC	CTCGGAGAGGCAAAAAGAAAAG
23	CL1367	CTT	AACCTGCCAGTATGCTTGAAA	GGATCTTCTGTACGATGATTTG
24	CL1403	GTC	GATACTGCTAAATCTCGGCTT	ATTGTTCTAAGGAACCCGAAAT
25	CL1440	AGG	AGTTAGAGACGGCAGAGAGG	CCCGTCACACCTCAGCTC
26	CL1454	GA	GGAGAGGATCAAAGAAGAGG	ACTATCGACCGACACATCCAG
27	CL1458	TG	GTGGTGCAATCTTTGGATAAG	TCTTGTGTTGGCTGCTTCTG
28	CL1497	CGA	CTTCTGCTCACCATGGGCAC	CTCATTTTCTTCCGTTGCCTC
29	CL1520	AAGG	TACTTGTCAAGAGAAGGAACG	ACCAAATCAAGGAACCAAGCTA
30	CL1533	CCT	ATGGTTCCGTACAGTTTGCC	GAGAGTTCTCGGCTTGTAATCA
31	CL1571	TC	ACCTGGAGGTTTCTCAAGCACT	GTACCACTACCACTGCATCATC
32	CL1602	CCA	ATGAAAAGGAGCTTCAGCCAT	ACCGAAGTAATTAACGACCAA
33	CL1680	GAG	GTCCGCGCAAAAAGGTGTC	CACGACCTTCGCGCTATC
34	CL168	CTG	AACCCCGACCATGATAAGAA	GTTTCACTACGGGTTTGGTCAT
35	CL1695	CGG	GCTTGCTGGAAGTCGAGG	ACACGACGTGGACCACCAT
36	CL1709	GA	AAGGAAGAAGAAGCAGCAAA	AGGAGAAAAGAAAATCGGTGAA
37	CL1728	CCG	CAAGGAGGACAAGAAGGACG	CTGTGGTTGTGGTAGTACGGGT
38	CL1754	GGA	TCTATTTGCTCGACTCTAGGC	GCCGTACTGGCAATAGAGTACA
39	CL1760	GCT	GCTCCGTTATTCATGTGATGT	CACCAGAGAAGTTCAAGGAAG
40	CL1765-1	GAG	AGGTCCTACTACGAAGACGGC	GTCCGAGGTCAAGGAAGTCAG
41	CL1765-2	CCT	GTCGAGCAGCAACCACGAC	CCCTGTTAAATTTTGTAAAGAAC
42	CL1774-2	GCTTCT	TTTTAGAAAATGAAGCGACCC	CATAAAAGTTCTGGACGCTTTG
43	CL1774	AGC	GCTCACTCCATAAGCACTCAA	AGGTTGTCGACTATGCCTTGAT
44	CL1801	CT	CATACGATTCTTGCTCGATTT	TTTGGATTGATTGTGTGTCAGTCA
45	CL1813	GGC	GAACGAACGATTGGTTTATTG	GGTACCCTGTGGAGGAGGAGTA
46	CL1829	CGG	CTTGAGCTAGCCGAGGAGC	CTTCTCTCGATCATCCTGAC
47	CL182-1	AAC	CTAACTCCTGGCAAAGAGACC	CACCTCCATGCTCCATACTTTAC
48	CL182	TTG	CACCTCCATGCTCCATACTTT	TCTATCCGCTTGATATCGAATGT
49	CL1837	AGG	TACGAGGTTGTCCTCACTGAT	CAATTCCATCTCATTTCCACAAC
50	CL1859	GCT	ACGGAGCTCTCGTCCCTG	CAAACCCTAAGCCAGCCAG
51	CL1875	TGG	AGCGAAGCCACGATAGGAT	ACCAACGGATAAGATAGACCCA
52	CL1915	GCT	GTTAGCCTTGACACAAGGAGTC	GAGCATAAAGCAGTACAAATGC
53	CL1925	CCT	GGGAATAGTTCGTCTCTGTTT	GCTGGTCTGGACGAGCAC
54	CL1934	CGG	CAGCTTCAGCACGTCCAC	GAAGCTAGCTAGGCAGTCACCA
55	CL1937	TCC	AGAGCGGGAGCTAGGGTTC	GACCTGGAGGTCTTCTTCCC
56	CL1941	AT	GCTTTCGTCTACAGAGAAGA	CTTCGGCTAATTACGTTTACGG
57	CL1944	CGG	ATTGGAGACGGTTGTGTCC	TCTTCTCCTTCTTCACCTTGTTG
58	CL1950	TCG	GCTTGTTCTTCTTCTGCGGTT	GAATCTTCGAAAGACGACCTGT
59	CL1952	GCG	CAAGGATTACAGCTCCTACAA	AAGTAGTCGAACGACTCGATGT
60	CL1964	CAGT	ATGGCTGATCTGATTTGAAGA	GTTGTTGTGAGTGGAGGCAGTA
61	CL1967	ATCAA	CATCTTTTGATGATCCTGGTG	AGGGTGCTTGCTAATCTAGGAC
62	CL1980	CTC	CCTGGTGATCCTCTCCTCCT	TAAACTAACTGATACTTCCGGG
63	CL1987	CGC	CAATGGTCGATTCGTACGTG	ACAGGCTGCTGGTGTGT
64	CL2032	CT	TTTCCACTACCATAATTTC	CACACATTGCTGTGTGTGGAGA
65	CL2039	TC	TCCTCGGTTTCAGATAAGTCTT	TCACAATGATTCACAAAAGAAC
66	CL2044	GA	CTTGAGTCTGAAGTGAAGTGG	TGCTCTTCAATCAAGCAATACA
67	CL206	TG	CAAAGTGAAGGGGTTTTCTCC	TGTCGACAACCAGATCATCATT
68	CL2086	CCT	CAGCTTCAGCGTGTGCGAT	CTGAACCTGCTCTTCTTCACCT
69	CL2090	AC	AGGCACACATCAACACACAT	TCGCCTCTCTTTTCTTCTCTCT
70	CL210	TTC	GACCTATGACTGATGGTCACA	CCTCTTGCAGAAGTAGCAATGT
71	CL2113	CGA	TCCTTCGTCTCCATCTACGTC	CGGTCTTTGCGGAGTAGGA
72	CL2114-1	GAG	TGAAGAGAAGGAGGAAGTGA	AGTCTCGATCTCGTAGAATCCC
73	CL2114-2	CCG	GGGATTCTACGAGATCGAGAC	CAAAGGCTTCAACAAAAACAG
74	CL2114-3	GGC	CTCAAAGGCTTCAACAAAAAC	GGGATTCTACGAGATCGAGACT
75	CL2114-4	GGC	AAGGCTTCAACAAAAACAGA	GGGATTCTACGAGATCGAGACT
76	CL2120	GC	ATCATCAGGGTAGCCAGACA	ATATGATCGATCCACACGAGAG
77	CL2136	TGCA	TTTTGGAGTGGTACACTTGTT	TAATAAGTAGCACGCATTACGC
78	CL2140	AGC	CACGTACCCAGTGTGGAGG	GAGTACGAGTACGGAGATGATC
79	CL2212	AAAC	CTACCTGACAGGCTGACACAA	GCTGTGAAATTGTGAATAGGGA
80	CL2256	GCC	CATCCAGCAGCTCTCCTACC	CATGCCTGTACTGGTTGAGGT
81	CL2259	GA	CTAATTAATCCTCCTGCTCAG	CACCAGCTGGCACATCAC
82	CL2259-1	GA	CATACCCGCTAATTAATCCTC	AAAAGCAGAGAAGAAGTTGTG

83	CL2270	CCCTT	GCAGGAGATTGAAATGTAATG	CCTCACCTTCTCTTCTCTCTCT
84	CL2309	TGC	TTCCCCCTCCTTTGTATACAGC	ACTGAAGACCATCAACAGAAG
85	CL2311	GCA	CAAACCTGTGTCAATTCTTGAG	AGAAAGCTTGTGTGCTCCGTA
86	CL2324	CA	GACTGCAAGTAGCAGGAGAG	CAGGAAGGTACCAGATCGAGA
87	CL2331	CCG	ATTTCGTGAGGATGTCTATGG	ATGGGTGAGGACCTCTTCTG
88	CL2333	CAC	CACCAGCACCAGCAACAG	AGAATTCACAGCAACATCAAGT
89	CL233	GCG	GATCCTAGCCATGATGGTATG	GCTTGCCTCCACTTTTGTAG
90	CL2352	CCT	ATTAAAGCCCTCTTCCACTTC	GCGGCACTTATAGGAGAATGAC
91	CL2364	AGA	CGCTGAACAGCCAAGATAAT	TATCTATCTGGCATTCTGGCTCT
92	CL2379	GAGTGG	CTGGGAGTGGTGGGTTGC	GACCAGGACACACTCTTTGAGT
93	CL2434	TCG	ATCATCTGGCTCCACCTCAG	CTCGGCACCAGCATGTTC
94	CL2441	TTG	CGAATTGAGCAGAAAAGAAG	ATATTTTGTAGGGCTCATGGAG
95	CL2449	CCA	GTCCACGCTTTGCTCTCC	GAGGTATTTTCGTGGTGTTCAT
96	CL2452	GCCG	AGCAGCAGCTAGCTATCTCAA	CTTTTCTCTTTTCGGAGCATCT
97	CL2452-1	AACC	AGATGCTCCGAAAAGAAGAA	TAAGGGGGTGTGAAGTGATAAT
98	CL2456	CGG	GTTGCTGTCGCTGAAGTAGAA	GGCAGGCTCTCACATCTCC
99	CL2476	ACC	GTCTTCAATGATCCGTTTACC	CTAAGCTGCACGAGATGGC

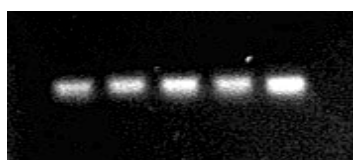
Анализ эффективности праймеров SSR. ПЦР-амплификация геномной ДНК 5 видов житняка была выполнена с помощью 99 пар праймеров. Результаты показали, что 89 пар праймеров амплифицировали четкие полосы, а 10 пар не амплифицировали продукты. Критерии успешной разработки маркеров заключаются в том, что праймеры для скрининга являются эффективными праймерами до тех пор, пока амплифицируется четкая полоса в житняке монгольском. Эти праймеры имеют большое значение для идентификации генетического материала житняка. Результаты амплификации пяти материалов из следующих 89 пар праймеров представлены на рисунке 1 (рис. 1).

Проверка праймеров SSR. Праймеры SSR, разработанные на основе данных транскриптома житняка монгольского, также амплифицируют четкие и очевидные полосы в других видах житняка, что указывает на то, что праймеры SSR для житняка обладают высокой универсальностью среди видов житняка и могут быть использованы для изучения и идентификации родственных связей растений или сортов житняка.

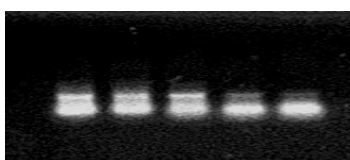
Результаты ПЦР-амплификации.

В последние годы развиваются технологии высокопроизводительного секвенирования, такие как технология секвенирования транскриптома (RNA-seq, RNA-sequence), которая определяет последовательность кДНК транскриптома, чтобы выявить все гены или EST (EST, expressed sequence tag) в растительных тканях или клетках [16, 17, 18]. Эта технология широко используется во многих исследованиях растений. Большое количество молекулярных маркеров EST-SSR было разработано и использовано на основе секвенирования транскриптома в этом эксперименте, чтобы проверить точность и надежность данных секвенирования транскриптома. Целевая полоса, амплифицированная ПЦР, обнаруженная электрофорезом в агарозном геле (рис 1), соответствовала ожидаемому размеру целевого фрагмента.

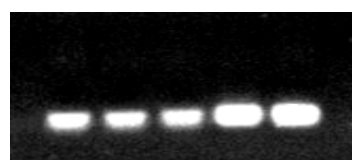
Десять пар праймеров не получили результатов амплификации. Причина может заключаться в том, что в процессе предварительного скрининга праймеров в процедуре амплификации не проводился тонкий градиентный скрининг, но непосредственно основывался на температуре отжига разработанных праймеров SSR и на предыдущих исследованиях анализа SSR различных растений. Возможно, для некоторых праймеров оптимальная температура отжига не была найдена, что могло привести к некоторой неэффективной и неспецифической амплификации [19, 20, 21].



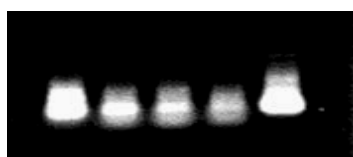
CL1017



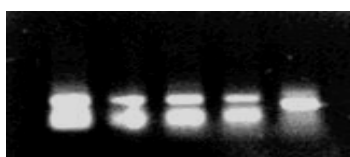
CL1018



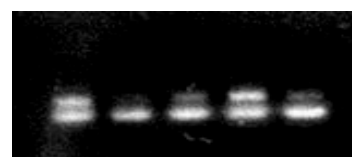
CL101



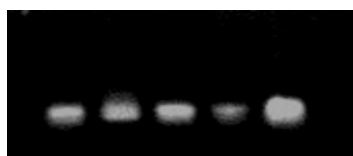
CL103



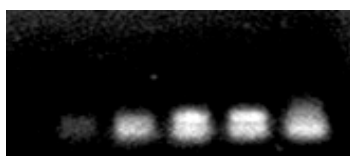
CL1064



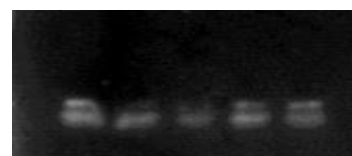
CL1073



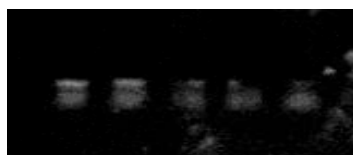
CL1085



CL1087



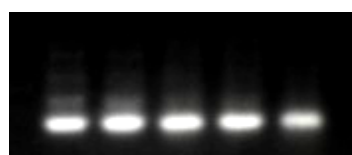
CL1111



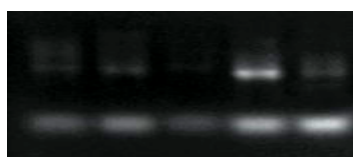
CL1121



CL1140



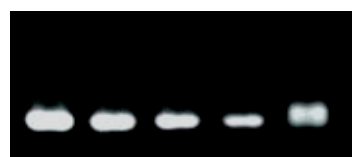
CL1172



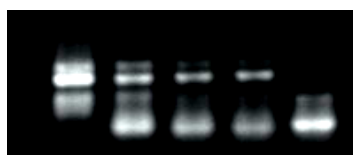
CL1193



CL1237



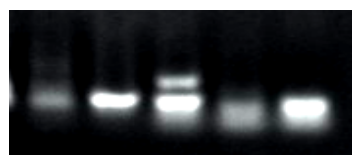
CL1242



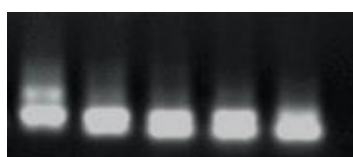
CL1244



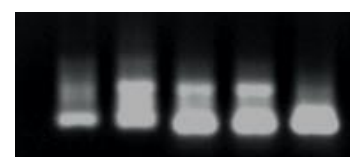
CL1278



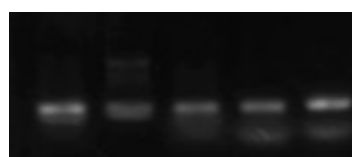
CL1298



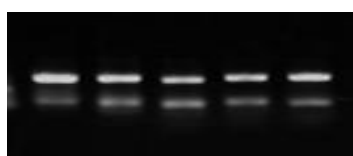
CL1317



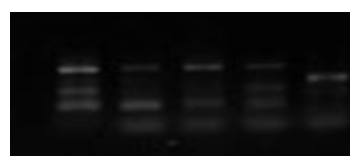
CL1343



CL1348



CL1361



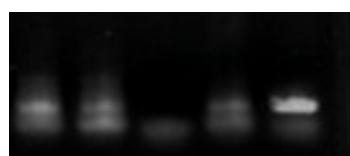
CL1367



CL1403



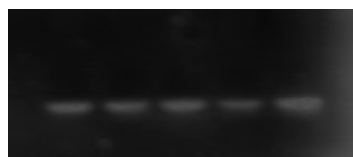
CL1454



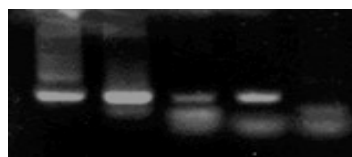
CL1497



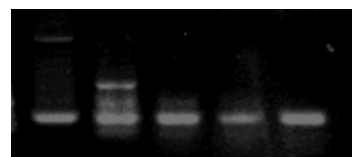
CL1520



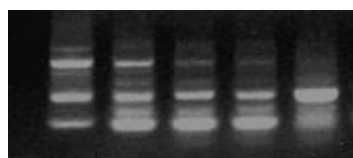
CL1533



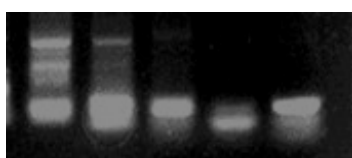
CL1571



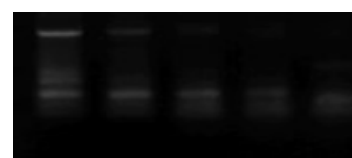
CL1602



CL1680



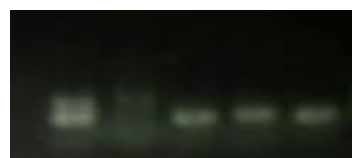
CL168



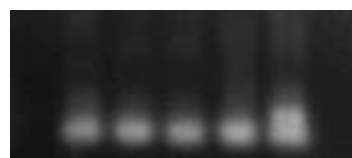
CL1695



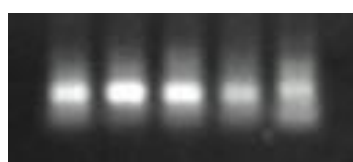
CL1774



CL1801



CL1829



CL182-1



CL182



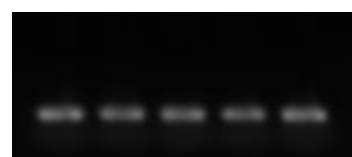
CL1837



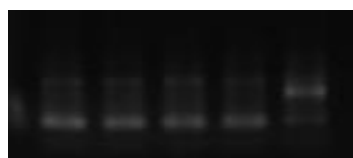
CL1859



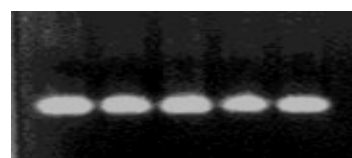
CL1875



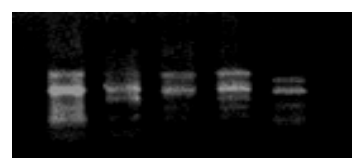
CL1915



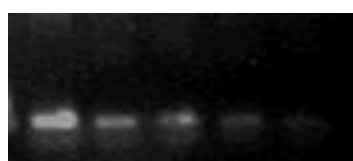
CL1925



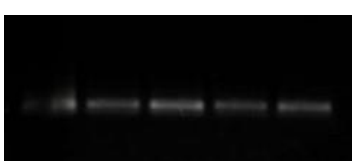
CL1937



CL1941



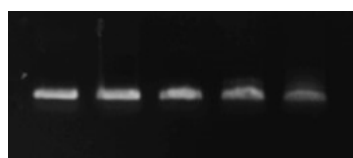
CL1944



CL1950



CL1952



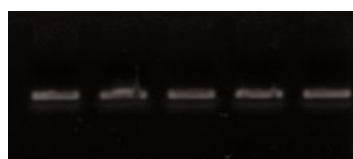
CL196



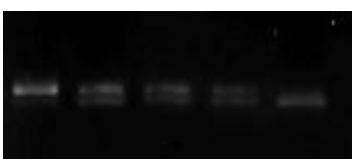
CL1967



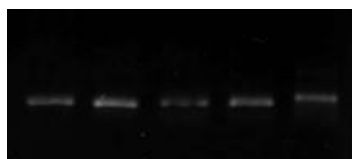
CL1980



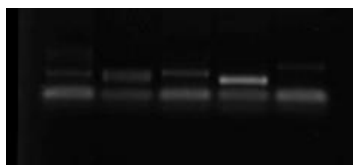
CL2032



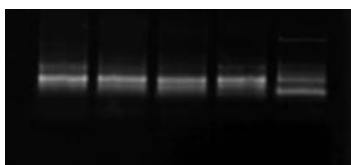
CL2039



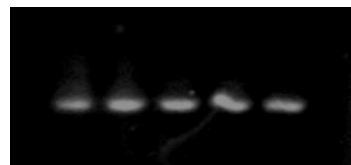
CL2044



CL206



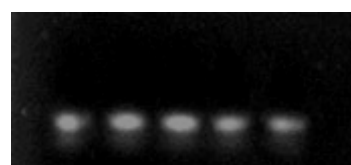
CL2086



CL2090



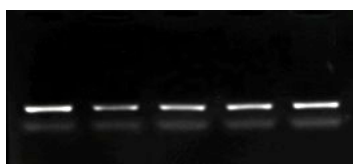
CL210



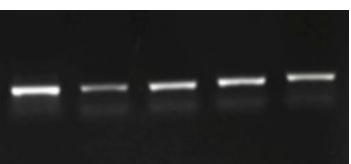
CL2113



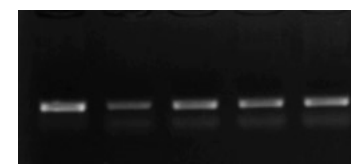
CL2114-1



CL2114-2



CL2114-3



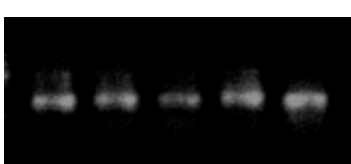
CL2114-4



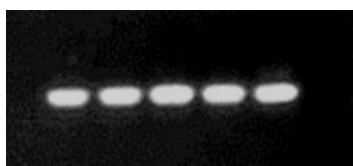
CL2120



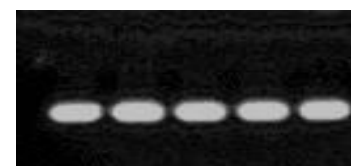
CL2140



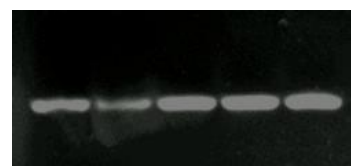
CL2212



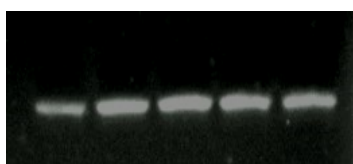
CL2256



CL2259



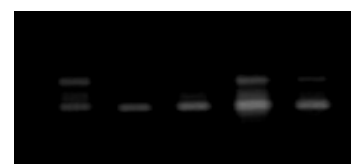
CL2270



CL2309



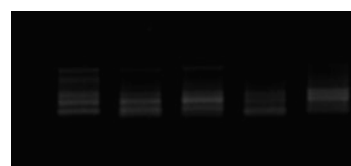
CL2311



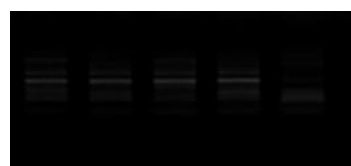
CL2324



CL2331



CL2333



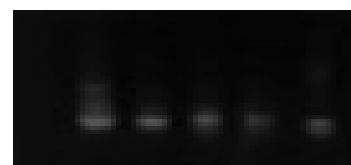
CL233



CL2352



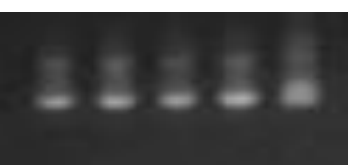
CL2364



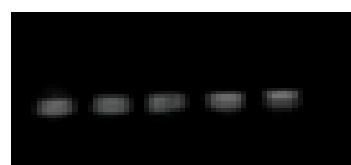
CL2434



CL2441



CL2449



CL2452

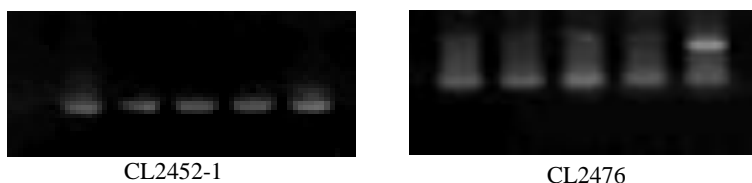


Рис. 1. Результаты амплификации 89 пар праймеров для 5 видов житняка

Повторяющиеся мотивы и частоты локусов SSR.

Таблица 4. Статистические результаты данных SSR транскриптома монгольского житняка

Число повторов	Мононуклеотидные повторы	Динуклеотидные повторы	Тринуклеотидные повторы	Тетрануклеотидные повторы	Пентануклеотидные повторы	Гексануклеотидные повторы
4	0	0	0	0	495	269
5	0	0	3780	327	54	0
6	0	973	1578	65	0	0
7	0	530	775	0	0	0
8	0	337	81	1	0	0
9	0	219	0	0	0	0
10	0	202	0	0	0	0
11	0	205	0	0	0	0
12	190	18	0	0	0	0
13	124	0	0	0	0	0
14	57	0	0	0	0	0
15	68	0	0	0	0	0
16	40	1	0	0	0	0
17	30	0	0	0	0	0
18	7	0	0	0	0	0
19	14	0	0	0	0	0
20	10	0	0	0	0	0
21	40	0	0	0	0	0
22	44	0	0	0	0	0
23	37	0	0	0	0	0
24	2	0	0	0	0	0
Итого	663	2485	6214	393	549	269

Анализируя данные типы повторяющихся мотивов, полученные из транскриптома житняка монгольского при помощи 99 SSR-праймеров, отмечается наличие в генотипе широкого разнообразия повторяющихся последовательностей от мононуклеотидных до гексануклеотидных повторов (табл. 4). Повторяющихся мотивов с 4–6 нуклеотидами в транскриптоме житняка монгольского встречается меньше, но с большим диапазоном, чем с 1–3 нуклеотидными повторами, что может служить основанием для положительной корреляцией полиморфизма, выявленного с использованием SSR-маркеров и количества повторяющихся мотивов (рис. 2).

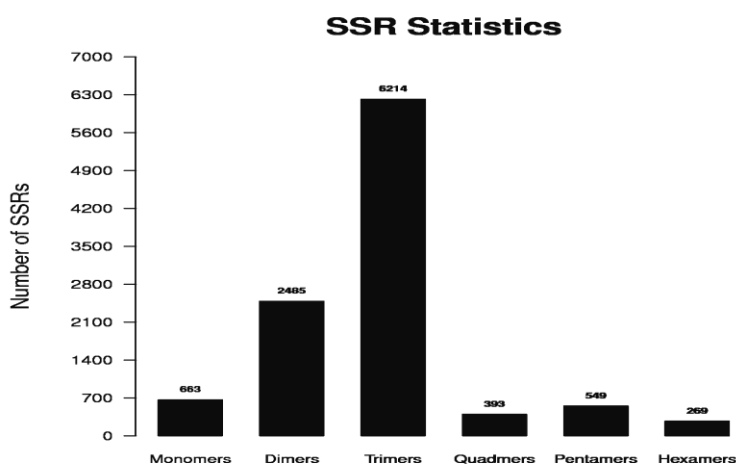


Рис. 2. Последовательности транскриптома житняка монгольского

Наиболее распространенный является тринуклеотидный повтор. Динуклеотидные повторы являются следующими по распространению. Пента и гексануклеотидные повторы встречаются реже [22–27].

Заключение

В этом исследовании было впервые разработано 99 пар праймеров EST-SSR с использованием данных последовательности транскриптома монгольского житняка, из которых 89 пар были эффективными и универсальными для других четырех видов житняка. Результаты этого эксперимента не только обеспечивают основу для дальнейшего развития SSR-маркеров житняка монгольского, но также расширяют коллекции молекулярных маркеров для анализа генетического разнообразия и размножения с использованием этих маркеров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Разработка молекулярных маркеров SSR и оценка генетического разнообразия транскриптома суданской травы [J] / Чжу Юнцзюнь, Пэн Дандан, Линь Чаовэнь и др. Чжу Юнцзюнь, Пэн Дандан, Линь Чаовэнь [и др.] // Журнал травяной промышленности. – 2018. – №5.
2. Стратегия секвенирования транскриптома (PHK-секвенирование) и ее данные должны быть использованы в разработке молекулярных маркеров [J] / Ли Сяобай, Сян Лин, Луо Цзе [и др.] // Китайский журнал клеточной биологии. – 2013. – №35(5): 720–726.
3. Ли Рую. Повторение простой последовательности (SSR) и его применение в исследованиях сельскохозяйственных культур [J] / Ли Рую // Shandong Agricultural Science. – 1999. – №4: 44–48.
4. Лю Юйчжоу. Исследование генетического разнообразия ресурсов зародышевой плазмы мармелада[D] / Лю Юйчжоу // Хуаньский сельскохозяйственный университет. – 2015.
5. Цзян Шаохун. Исследование генетической карты маркеров SSR сои [J] / Цзян Шаохун // Научно-техническая информация (научное обучение и исследования). – 2007. – №17.
6. Хуан Хайянь. Разработка праймеров EST-SSR и генетическое разнообразие *Eucommia ulmoides* [D] / Хуан Хайянь. – Пекин: Китайская академия лесных наук, 2013.
7. Молекулярное разведение *Dactylis grass* [J] / Тан Лу, Чжан Синьцзюнь, Хуан Линкай [и др.] // Наука о травянистых растениях – 2018. – №9: 2230–2240.
8. Разработка маркера Genomic-SSR для генома *Dactylis grass* [J] / Ли Цзи, Хуан Линкай, Цзинь Меня [и др.] // Молекулярная селекция растений. – 2017. – 10: 237–245.
9. Анализ генетического разнообразия RAPD и ISSR 20 зародышевой плазмы люцерны в Синьцзяне [J] / Ма Цзиньсин, Ян Чжуаньчжуан, Чжан Цзюй [и др.] // Журнал Юньнаньского сельскохозяйственного университета (естественные науки). – 2018. – 33(04): 9–19.
10. Чжан Сибинь. Генетическое разнообразие молекулярных маркеров SSR различных солеустойчивых люцерны [D]. 2018.
11. Анализ генетического разнообразия маркеров SSR в ресурсах зародышевой плазмы *Miscanthus sinensis* в Китае [J] / Сяо Лян, Сюэ Де, Цзян Цзяньсюн [и др.] // Журнал генетических ресурсов растений. – 2013 (1): 36–41.
12. Прогресс в исследованиях методов экстракции ДНК растений в молекулярных маркерах [J] / Лю Тас, Лин Лимэй, Гонг Лимин [и др.] // Zhongnan Pharmaceutical. – 2005 (06): 370–373.
13. Хуан Юнлянь. Исследование экспериментальной технологии электрофореза в агарозном геле [J]. Журнал Чжэньцзянского педагогического университета, 2009, 30 (06): 83–85.
14. Chang Bingmei, Zhang Dong, Li Meining, et al. Применение нового красителя нуклеиновой кислоты в электрофорезе в агарозном геле [J]. Современная профилактическая медицина, 2010, 37 (19): 3717–3718 + 3720.
15. Xiao-Yan Zhang, Wei-Xiang Shen & Jun Gao. обнаружение резистентности *Helicobacter pylori* к кларитромицину в слизистой оболочке желудка с помощью системы амплификации рефрактерных мутаций в сочетании с количественным рст[J] в реальном времени. Cancer Medicine, 2019, 8(4).
16. Ван Цзюэ, Лю Ман, Лю Линьюнь, Чан Чжи. Универсальный анализ маркеров EST-SSR в луговой феску и многолетнем райграсе [J]. Acta Grassland. – 2021. – 29(09): 1900–1908.
17. Разработка нового набора маркеров EST-SSR пшеницы и их применение в построении генетических карт [J] / Лу Бинбин, Дай Чан, Пэн Чжэнсун, ЯМАМОТО Наоки, У Ичао, Вэй Шухун, Ян Зайцзюнь // Северо-Китайский сельскохозяйственный журнал. – 2020. – 35(04): 57–63.
18. Разработка и проверка маркеров EST-SSR для бобов Цинхай-Тибет на основе секвенирования транскриптома [J] / Ван Инфан, Чжан Емэн, Лю Дэмэй, Шэнь Инфан, Ван Хайцин // Наука о травянистых растениях. – 2020. – 37(04): 718–727.
19. Анализ различий в качественных признаках и генетического разнообразия сортов ароматного риса *Japonica* на основе маркеров SNP[J] / Чжао Ичжоу, Ни Шаньцзюнь, Чжан Чжан, Ли Синь, Мао Тин, Чжан Лили, Лю Янь, Лю Фуцай // Ляонинская сельскохозяйственная наука. – 2020. – №1.
20. Анализ генетического разнообразия ресурсов ароматного риса в провинции[J] / Чжао Фэнминь, Ли Сюпин, Сюэ Цзинфан, Ван Линань, Ма Вэньдун, Чжан Сяньго, Шань Лили, Го Цзюньсян // Молекулярная селекция растений. – 2020. – №12.
21. Генетический анализ аромата риса *Wuyudao* № 4 и скрининг молекулярных маркеров SSR [J] / Лю Хайин, Ян Чжунлянь, Лю Хуэй, Лэн Чунью, У Личэн, Сюй Чжэньхуа, Юй Яньминь, Лай Юнцай // Хэйлунцзянская сельскохозяйственная наука. – 2021. – №6: 5–9.
22. Анализ локусов SSR и разработка полиморфных праймеров на основе генома *Erigeron breviscapus*[J] / Лю Сунвэй, Лу Инчунь, Сун Ваньлин [и др.]. – Молекулярная селекция растений. – 2018. – №12.
23. Анализ локусов SSR и разработка молекулярных маркеров на основе секвенирования транскриптома [J] / Лю Хэ Хуэйвэнь, Лю Цзюньюй, Гуань Миньхуа, Ли Цзи, Цзэн Сунцзюнь, У Куньлинь // Молекулярная селекция растений. – 2021: 1–13.
24. Разработка и универсальный анализ маркеров EST-SSR для *Acer verde* на основе последовательности транскриптома [J] / Му Ин, Бай Юньхай, У Цзин, Доу Дэцюань, Чжан Жуйи // Молекулярная селекция растений. – 2021: 1–18.
25. Анализ характеристик локусов SSR на основе данных транскриптома плодов ежевики [J] / У Яцюн, Чжан Чуньхун, Ян Хайянь, Лу Ляньфэй, Ли Вэйлинь, У Вэньлун // Молекулярная селекция растений. – 2021: 1–10.
26. Анализ информации о локусах SSR в транскриптом *Alisma* [J] / Цинь Ся, Линь Вэньцзинь, Вэнь Сянюэ, У Шуаншуан, Сюй Жунцин, Вэй Даочжи // Молекулярная селекция растений. – 2021: 1–14.
27. Анализ локусов ассоциации признаков, связанных с содержанием сахара в мясистых корнях редьки [J] / Гао Минган, Лю И, Ван Жуйхуа, Хань Минь, Ли Юаньюань // Журнал Северо-Западного университета сельского и лесного хозяйства (издание естественных наук). – 2022. – №5: 1–1.