

DOI 10.33952/2542-0720-2021-3-27-9-19

УДК 633.521:631.527

Базанов Т. А., Ущাপовский И. В., Логинова Н. Н., Смирнова Е. В., Михайлова П. Д.

**ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА СОРТОВ КОНОПЛИ  
ПОСЕВНОЙ РОССИЙСКОЙ СЕЛЕКЦИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ  
ISSR–МАРКЕРОВ**

ФГБНУ «Федеральный научный центр лубяных культур»

**Реферат.** Современное коноплеводство предъявляет высокие требования к эффективности селекции и надёжности семеноводства конопли посевной (*Cannabis sativa* L. subsp. *sativa*), поэтому актуальным становится изучение генетического полиморфизма, межсортовой и внутрисортовой изменчивости, особенностей формирования фонда доступного генетического разнообразия культуры. Цель исследований – изучение генетического полиморфизма ряда современных российских сортов технической конопли с использованием молекулярных ISSR-маркеров. Исследования проведены в 2021 г. в лаборатории молекулярно-генетических исследований и клеточной селекции ФНЦ ЛК. Изучено 10 сортов конопли посевной российской селекции из коллекции Территориального обособленного структурного подразделения Федерального научного центра лубяных культур – Пензенского исследовательского института сельского хозяйства: Милена, Вера, Сурская, Надежда, Ингрета, Диана, Юлиана, Гентус, Димра, Марго. ДНК выделяли из отдельных семян методом СТАВ. При постановке ПЦР использовали 20 ISSR-праймеров, продукты амплификации разделяли в агарозном геле. Определено 99 аллелей размером 430–1500 п.н., при этом генетический профиль каждого образца индивидуален. Кластерный анализ и дендрограмма генетического подобия позволили выявить наличие внутри- и межсортового генетического полиморфизма, визуализировать филогенетические отношения сортов. Образцы сформировали плотные внутрисортовые группы и распределились на три межсортовых кластера. Наличие в родословных изученных сортов сходных компонентов скрещивания связано с особенностью выявленной кластеризации и обуславливает предпосылки формирования генетической узости современных сортов конопли посевной. Набор из 20 использованных ISSR-маркеров отличается хорошей разрешающей способностью для изучения генетического полиморфизма конопли посевной. У 10 сортов конопли посевной среднерусского типа выявлен внутрисортовой полиморфизм со средней генетической дистанцией 0,14 и межсортовой полиморфизм с дистанцией 0,61. По результатам кластерного и факторного анализов, показавших сходство выводов, образцы распределились на три основных кластера, в основном, отличающихся оригинальностью сорта. Изучение полиморфизма ДНК семян сорта Диана, полученных при репродукции двух лет, указывает на его генетическую стабильность.

**Ключевые слова:** конопля посевная, молекулярные маркеры, ISSR, ПЦР, генетический полиморфизм, селекция.

**Для цитирования:** Базанов Т. А., Ущাপовский И. В., Логинова Н. Н., Смирнова Е. В., Михайлова П. Д. Изучение генетического полиморфизма сортов конопли посевной российской селекции с применением ISSR-маркеров // Таврический вестник аграрной науки. 2021. № 3(27). С. 9–19. DOI: 10.33952/2542-0720-2021-3-27-9-19.

**For citation:** Bazanov T. A., Uschapovsky I. V., Loginova N. N., Smirnova E. V., Mikhailova P. D. Study of genetic polymorphism of russian origin hemp cultivars with the use of ISSR-markers // Taurida Herald of the Agrarian Sciences. 2021. No. 3(27). P. 9–19. DOI: 10.33952/2542-0720-2021-3-27-9-19.

### Введение

Конопля посевная (*Cannabis sativa* L. subsp. *sativa*) – древнейшая техническая культура комплексного использования, традиционно выращивалась для получения волокна и масла. Существующие последние полвека ограничения по возделыванию конопли связаны с высоким (15–20 %) содержанием психотропного соединения тетрагидроканнабинола (ТГК) в растениях конопли подвида индика (*Cannabis sativa* subsp. *indica* (Lam.) E. Small & Cronquist). В Российской Федерации законодательно разрешено промышленное возделывание конопли посевной, в растениях которой содержится 0,1 % ТГК. Результаты работы отечественных селекционеров позволили получить высокопродуктивные сорта конопли с низким уровнем психоактивного каннабинола, включенные в список Госсорткомиссии [1]. С начала XXI столетия в мире растет интерес к выращиванию технической конопли (конопли посевной), которая используется в производстве сотен видов различной промышленной, пищевой и медицинской продукции [2, 3]. В последние три года в России площадь возделывания конопли посевной превышает 10 тыс. га. Наиболее востребованными сортами в настоящее время являются сорта конопли посевной среднерусского типа Вера, Надежда и Сурская селекции ФГБНУ ФНЦ ЛК (35, 18 и 15 % соответственно, от общей площади, засеянной коноплей в 2020 г. в России).

Рост производства технической конопли определяет актуальность дальнейшей селекционной работы по созданию новых продуктивных сортов культуры, устойчивых к стрессовым факторам среды. Сложности селекционной работы с коноплей связаны с ее биологическими особенностями – наличием в качестве метаболита психоактивного каннабинола, двудомностью, внутрисортовой гетерозиготностью, высокой степенью пластичности от условий окружающей среды [4]. Кроме того, работа селекционеров и производителей конопли посевной в разных странах законодательно ограничена пределом содержания ТГК в растениях 0,1–0,3 %, что приводит к необходимости использования более точных и современных методов селекции [5].

Морфологическая различимость сортов технической конопли достаточно сложна вследствие ограниченности генетического материала, отвечающего требованиям по биохимическому составу. Изучение особенностей генетического полиморфизма, в том числе внутрисортового, у *C. sativa* является одной из важных задач селекции конопли и сохранения генетических ресурсов этой культуры [6]. Генетическая дифференциация сортов различного происхождения необходима для определения их селекционной ценности, создания фондов отбора и хранения.

«Молекулярные инструменты» все чаще используются в различных направлениях селекции и на разных этапах селекционной работы [7]. Так, генетический полиморфизм современных сортов конопли может быть изучен с помощью применения разнообразных молекулярно-генетических маркеров. Для исследований такого сложного объекта, как конопля, ISSR-маркеры могут быть рассмотрены в качестве адекватного инструмента. Они представляют собой области, амплифицированные праймерами, связывающимися непосредственно с простыми повторяющимися последовательностями в геноме растения, и поэтому имеют преимущества. Для анализа этого типа молекулярных маркеров не требуется никакой информации о последовательности. Они генерируют определенный паттерн полос, полезный для оценки генетической изменчивости среди различных образцов *C. sativa* [8]. С помощью ISSR-маркеров можно фиксировать и количественно определять генетические вариации в популяции, отражающие результаты изменений на разных этапах эволюции [9]. Также ISSR маркеры нашли успешное

применение в исследовании задач оценки генетической стабильности и пластичности растений [10].

Использование молекулярно–генетических подходов позволит усовершенствовать методологию селекционного процесса конопли посевной.

**Цель исследований** – изучение генетического полиморфизма ряда современных российских сортов технической конопли с использованием молекулярных ISSR-маркеров.

#### Материалы и методы исследований

Работа выполнена в 2021 г. в лаборатории молекулярно-генетических исследований и клеточной селекции ФГБНУ ФНЦ лубяных культур.

Материалом для исследования послужили 10 сортов однодомной технической конопли среднерусского типа, включенных в Государственный реестр селекционных достижений Российской Федерации. Перечень сортов с указанием оригинаторов приведен в таблице 1. Образцы взяты из коллекции Территориального обособленного структурного подразделения Федерального научного центра лубяных культур – Пензенского исследовательского института сельского хозяйства. 2020 г. репродукции. Сорт Диана представлен двумя образцами 2020 и 2018 гг. репродукции.

**Таблица 1 – Исследованные сорта конопли**

Сорт	Год регистрации в списке сортов Госсорткомиссии	Оригинатор
Милена	2020	ООО «Коноплекс», г. Москва.
Вера	2009	ФГБНУ ФНЦ лубяных культур, г. Тверь; ООО «Коноплекс», г. Москва.
Сурская	2005	
Надежда	2009	
Ингрета	1999	ФГБНУ ФАНЦ Северо–востока им. Н.В. Рудницкого, г. Киров; ФГБНУ ФНЦ лубяных культур, г. Тверь.
Диана	1994	ФГБНУ ФАНЦ Северо–востока им. Н.В. Рудницкого, г. Киров; ФГБНУ ФНЦ лубяных культур, г. Тверь; ООО «Мордовские пенькозаводы», г. Инсар.
Юлиана	2005	ФГБНУ ФАНЦ Северо–востока им. Н.В. Рудницкого, г. Киров; ИП Глава КФХ Пономаренко А.И., Псковская обл.
Гентус	2010	
Димра	2016	
Марго	2007	

Исследования вели с использованием семян представленных сортов. Каждый сорт был представлен пятью семенами. Семена по отдельности помещали в 1,5 мл микроцентрифужную пробирку с 400 мкл ddH<sub>2</sub>O, не содержащей нуклеаз. Затем семена нагревали при 55 °С в твердотельном термостате в течение 1 ч, далее измельчали с помощью гомогенизатора MiniLys с использованием стальных шариков до полного разрушения семян. ДНК из измельченного семенного материала извлекали с использованием метода СТАВ [11] с многократными отмывками изоамиловым и этиловым спиртом для очистки от белков и жиров. Концентрацию и качество ДНК определяли с помощью спектрофотометра Implen NanoPhotometer NP80. ДНК разбавляли до концентрации 10 нг/мкл.

Для ISSR-маркирования было использовано 20 праймеров, показавших хорошие результаты в работах [8–10] (таблица 2).

Реакционная смесь для проведения ПЦР объемом 25 мкл состояла из следующих компонентов: 30 нг исследуемой ДНК, 2,5 мкМ MgCl<sub>2</sub>, 200 мкМ dNTP, 1

единицу Taq-полимеразы, количества праймеров отличались и подбирались экспериментально.

Аmplification проводили на термоциклере T100 MyCycler™ (Bio-Rad Laboratories, Inc.) по следующей программе: начальная денатурация – 3 мин при 95 °C; затем 30 циклов: денатурация при 95 °C – 30 с, отжиг праймера в течение 30 с при температуре 58 °C, элонгация при 72 °C – 45 с; терминальная элонгация – 5 мин 72 °C.

ДНК-ампликоны дифференцировали в 1,5 % агарозном геле при 100 В в течение 2 ч в буфере TAE. Общие и полиморфные полосы и размеры полос оценивали с помощью GelAnalyser.

**Таблица 2 – Используемые ISSR-маркеры**

Кодировка	Последовательность	Кодировка	Последовательность
ISSR-1	CTCTCTCTCTCTCTTTG	ISSR-11	GAGAGAGAGAGAGAGAC
ISSR-2	CACACACACAGT	ISSR-12	GAGAGAGAGAGAGAGAA
ISSR-3	AGAGAGAGAGAGAGGT	ISSR-13	CACACACACACACAAA
ISSR-4	ACACACACACACACTG	ISSR-14	ACACACACACACACACC
ISSR-5	ACACACACACACACACCA	ISSR-15	AGAGAGAGAGAGAGAGCT
ISSR-6	AGAGAGAGAGAGAGAGCA	ISSR-16	AGAGAGAGAGAGAGAGTT
ISSR-7	ACACACACACACACAAA	ISSR-17	ACACACACACACACACCG
ISSR-8	ACACACACACACACACTA	ISSR-18	AGAGAGAGAGAGAGAGA
ISSR-9	AGAGAGAGAGAGAGAGT	ISSR-19	AGAGAGAGAGAGAGAGG
ISSR-10	AGAGAGAGAGAGAGAGC	ISSR-20	AGAGAGAGAGAGAGAGCC

Бинарные данные присутствия – отсутствия маркеров ISSR были проанализированы как доминантные маркеры с надстройки GenAlEx 6.5. Для оценки полиморфизма использован индекс PIC (Polymorphic Index Content), рассчитанный с использованием уравнения, предложенного для доминантных маркеров [12]:

$$PIC_i = 2 * f_i(1 - f_i) \quad (1)$$

где  $f_i$  – частота присутствующего аллеля, а  $(1 - f_i)$  – частота отсутствующего аллеля.

Генетическая дистанция D рассчитывалась по Нею [13, 14]. D основана на идентичности генов между двумя популяциями:

$$D = -\log_e I \quad (2)$$

где I – нормализованная идентичность генов между двумя популяциями [13]. I была нормализована на основе линейной корректировки аллельного множества на неравное количество образцов на каждый исследованный сорт [15].

Для построения дендрограммы генетического подобиya использовали программное обеспечение DARwin v. 6 (DARwin software).

### Результаты и их обсуждение

Полученные результаты ISSR-анализа позволили определить количество и размер аллелей с расчетными статистическими параметрами уровня полиморфизма и информационного содержания маркеров (таблица 3).

В целом у 55 индивидуальных образцов десяти сортов конопли было определено 99 аллелей. Праймеры ISSR-2, ISSR-11, ISSR-17 не дали видимых полос. Размер аллелей для праймеров ISSR варьировал в пределах 430–1500 п.н. Каждый исследованный индивидуальный образец имел свой уникальный набор аллелей. Число полос, амплифицированных праймерами ISSR, варьировало от одной для ISSR-20 до 15-ти для ISSR-15, при этом среднее значение составило 4,95. Частота встречаемости аллелей микросателлитных локусов в изученной выборке

варьировала в пределах 0,4–93,2 %. Примененная линейка маркеров продемонстрировала высокие значения информационного содержания, что подтверждается значениями уровня полиморфизма и показателя информационного содержания (PIC). Диапазон значений PIC составил 0,1103–0,3715, при среднем значении 0,2055.

**Таблица 3 – Характеристика полиморфных ISSR локусов**

ISSR-маркер	Размер полос, п.н.	Количество полос / полиморфных полос	Полиморфизм, %	PIC
ISSR-1	780 – 850	2/1	50	0,3560
ISSR-2	–	0	0	0
ISSR-3	500 – 1400	5/4	80	0,2297
ISSR-4	930 – 1230	2/2	100	0,1324
ISSR-5	600 – 1380	7/5	71,42	0,3121
ISSR-6	840 – 1320	4/4	100	0,1103
ISSR-7	450 – 1020	6/5	83,33	0,2721
ISSR-8	900 – 1030	2/2	100	0,3715
ISSR-9	480 – 1100	10/9	90	0,3207
ISSR-10	550 – 1150	4/3	75	0,1103
ISSR-11	–	0	0	0
ISSR-12	450 – 1200	11/9	81,81	0,3114
ISSR-13	430 – 1060	8/7	87,5	0,1456
ISSR-14	450 – 1500	10/10	100	0,3293
ISSR-15	470 – 1360	15/15	100	0,2878
ISSR-16	600 – 880	5/5	100	0,2714
ISSR-17	–	0	0	0
ISSR-18	480 – 940	4/4	100	0,2137
ISSR-19	500 – 700	3/3	100	0,1652
ISSR-20	690	1/1	100	0,1711
Среднее значение		4,95/4,45	75,95	0,2055

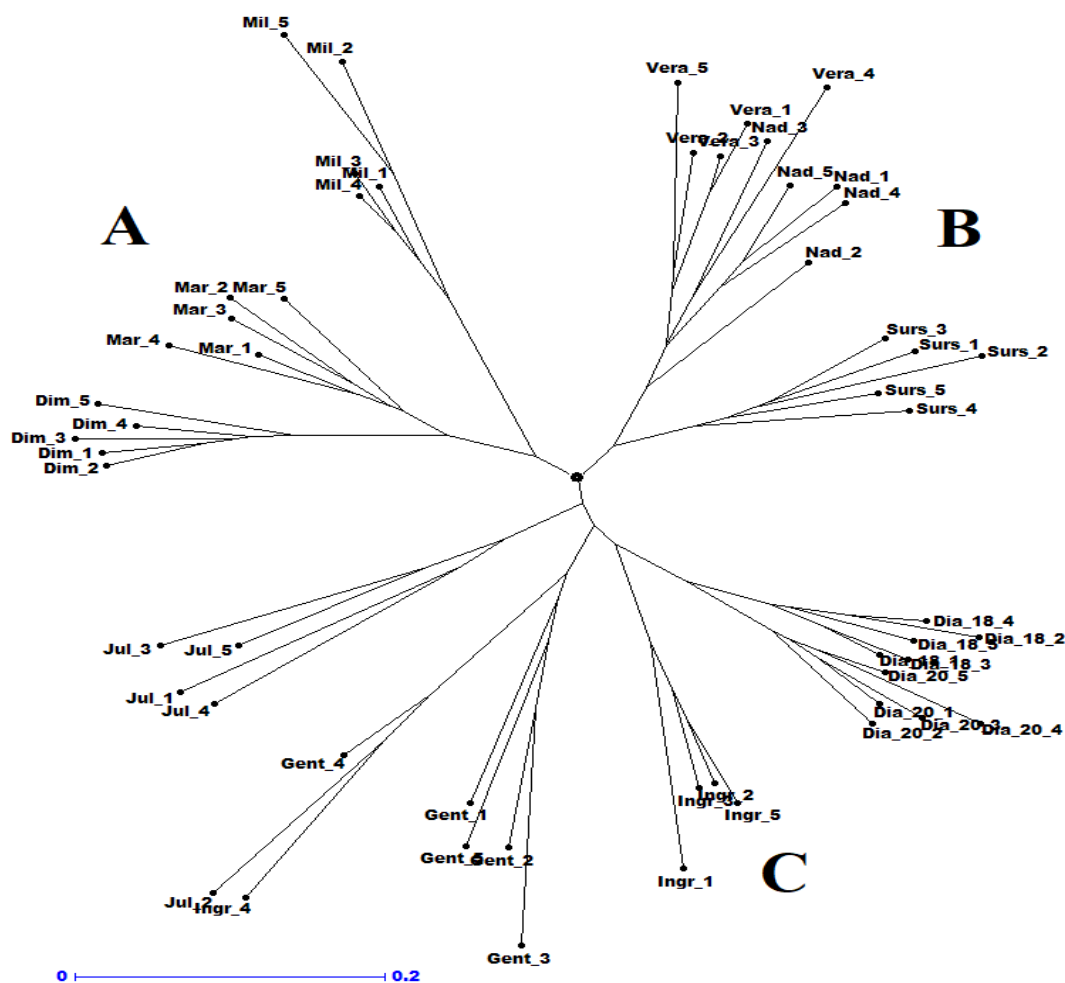
Полученные в исследовании результаты характеризуют использованную систему ISSR-маркеров как результативную для решения задач по изучению генетического разнообразия технической конопли, позволяющую различать генотипы на молекулярном уровне.

Используя рассчитанные значения генетической дистанции  $D$ , методом «neighbor joining method» [14] был выполнен кластерный анализ и построена дендрограмма генетического подобия для изучения филогенетических отношений между изученными образцами (рисунок 1).

Каждый исследованный образец имеет свой уникальный набор аллелей. Видно, что генетические профили каждого образца объединяются в отдельные сортовые группы, показывая небольшой внутрисортовой полиморфизм. Средняя генетическая дистанция между образцами внутри сортовых групп составила 0,14, а между сортами – 0,61. Сформированные сортовые группы, в свою очередь, распределяются по кластерам. Исследованные сорта конопли разделились на три основных кластера, обозначенные на рисунке 1 буквами А, В и С.

Кластер А содержит три сорта: Димра, Марго и Милена. Это желтостебельные сорта среднерусской конопли. Основным разработчиком сортов Димра и Марго выступал ФАНЦ Северо-Востока им. Н. В. Рудницкого. Используемые в работе локусы характеризуют генетическую близость данных сортов, как минимум по одному показателю. Это раннеспелые сорта с похожими характеристиками волокна. Такая близость генотипов в некоторых случаях может быть связана с использованием в системах скрещивания родственного исходного материала.





**Рисунок 1 – Дендрограмма генетического подобию сортов конопли**

*Примечание.* буквами А, В и С обозначены три основных кластера распределения сортовых групп.

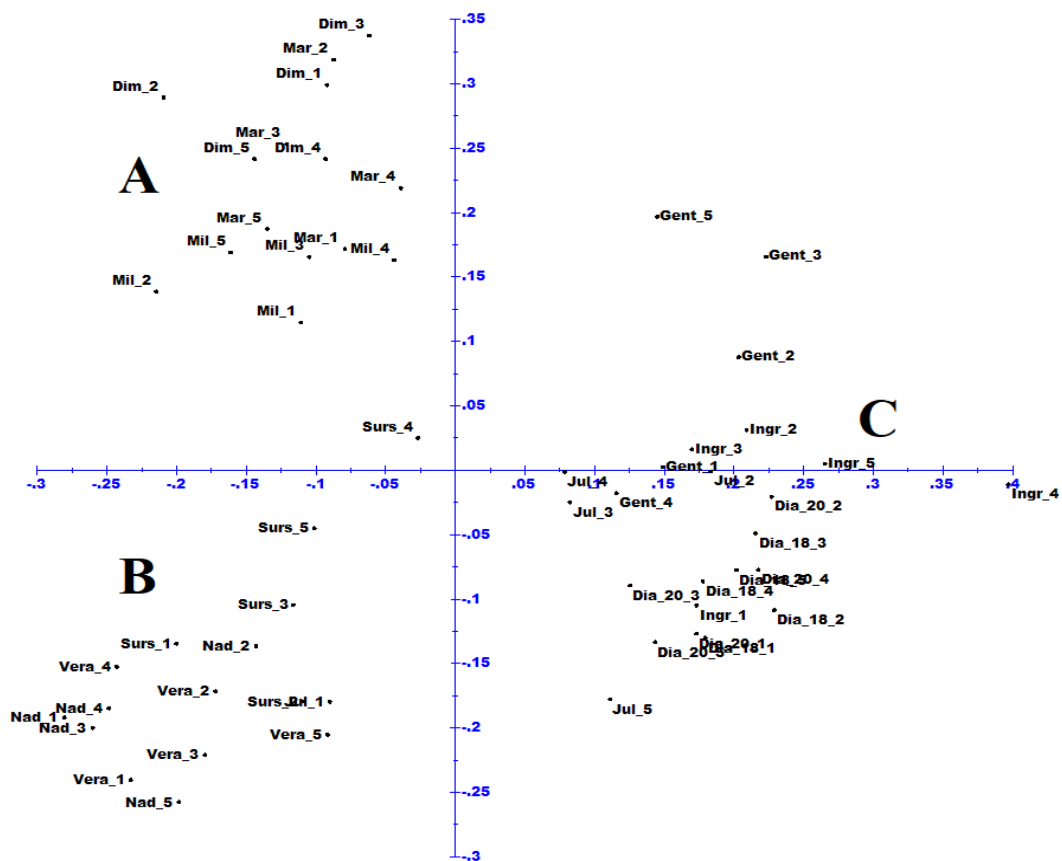
Группирование сортов и линий различных культур в такого рода исследованиях связывают как правило с оригинатором, использующим близкие комбинации скрещивания [16, 17]. Это отмечено и в результатах данного исследования.

В кластер В вошли три сорта селекции ФНЦ ЛК: Вера, Надежда, Сурская. Эти зеленостебельные среднеспелые сорта объединяет то, что они получены методом кроссбридинга однодомных сортов конопли ЮСО-31 в различных комбинациях. Следует отметить, что Вера и Надежда демонстрируют сильную генетическую близость и представляют слабо разделенную сортовую группу. Они получены в один временной период из простых родительских комбинаций. Сорт Сурская выведен из сложной комбинации южноспелых одно- и двудомных сортов конопли в более ранний период времени.

Самый большой кластер С объединяет в себе оставшиеся исследованные образцы. Все эти сорта группируются по принадлежности к основному оригинатору – ФАНЦ Северо-Востока им. Н. В. Рудницкого. Сорт Диана, взятый для исследования в виде образцов двух годов репродукции, демонстрирует небольшие изменения их генетического профиля, средняя генетическая дистанция между образцами двух репродукций составляет 0,18. Однако эти изменения не позволяют

сорта отдаляться от исходной сортовой группы, поэтому можно сделать вывод о достаточно высокой генетической стабильности сорта. Подобного рода исследования могут оказаться важными для контроля качества семенного материала, согласно стандартам по однородности и стабильности.

Иерархический алгоритм является неотъемлемой частью кластерного анализа и предполагает обязательное существование упорядоченной архитектуры между исследуемыми объектами. Повышение достоверности аналитической обработки данных связано с дополнительными методами математического анализа. Поэтому в дополнение к кластерному анализу был применен метод факторного анализа – метод главных компонент («principal component analysis, PCA»). Этот метод не предполагает существования упорядоченных взаимоотношений между объектами анализа [18]. Проведенный анализ полученных ISSR-маркеров представлен на рисунке 2. Расположение исследованных объектов в диаграмме подтверждает ранее сделанный вывод о распределении исследованных сортов конопли по трем основным кластерам, порядок нахождения сортовых групп в кластерах не нарушается.



**Рисунок 2 – Распределение сортообразцов конопли посевной по данным PCA-метода**

Выявленный с помощью ISSR маркеров полиморфизм демонстрирует определенную генетическую узость существующих сортов конопли, что может оказаться неблагоприятным фактором при перспективном развитии отрасли коноплеводства. Проблема генетической узости сортов актуальна для большинства сельскохозяйственных культур и для ее выявления все чаще используют различные молекулярно-генетические маркеры [19, 20].

В селекционной работе с коноплей необходимо использовать более широкий набор родительских форм, вовлекать в скрещивания зарубежные сорта и генотипы, использовать гибридизацию между подвидами, с последующими отборами по биохимическим показателям до допустимой законом нормы.

#### Выводы

В ходе исследования выявлен внутрисортной полиморфизм в изученных сортах, средняя генетическая дистанция между отдельными образцами составила 0,14. Выявлена узость генетического пула сортов со средней генетической дистанцией 0,61. Обнаружено, что исследованные сорта распределяются по трем основным кластерам, характеризующимся по селекционному центру, морфологическим признакам и исходному родительскому материалу. На примере сорта Диана показана возможность контроля генетической стабильности семенного материала конопли посевной. ISSR-маркеры показали себя перспективным инструментом для изучения генетического полиморфизма сортов и коллекционных образцов конопли.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках темы FGSS–2019–0023 Государственного задания ФГБНУ ФНЦ ЛК.*

#### Литература

1. Серков В. А., Бакулова И. В., Плужникова И. И., Криушин Н. В. Новые направления селекции и совершенствование технологии семеноводства конопли посевной. Монография. Пенза: Пензенский государственный аграрный университет, 2019. С. 155.
2. Cherney J., Small E. Industrial Hemp in North America: Production, Politics and Potential // *Agronomy*. 2016. Vol. 6(58). DOI: 10.3390/agronomy6040058.
3. Small E. Classification of *Cannabis sativa* L. in relation to agricultural, biotechnological, medical and recreational utilization // In book: *Cannabis sativa* L. – Botany and Biotechnology. Springer, Cham. 2017. P. 1–62. DOI: 10.1007/978-3-319-54564-6\_1
4. Onofri C., Mandolino G. Genomics and Molecular Markers in *Cannabis sativa* L. // In book: *Cannabis sativa* L. – Botany and Biotechnology. Springer, Cham, 2017. P. 319–342. DOI: 10.1007/978-3-319-54564-6\_15.
5. Серков В. А., Климова Л. В., Данилов М. В. Формирование перспективного селекционного материала для создания безнаркотических сортов конопли посевной // *Нива Поволжья*. 2018. № 3 (48). С. 62–67. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/formirovanie-perspektivnogo-selektionnogo-materiala-dlya-sozdaniya-beznarkoticheskikh-sortov-konopli-posevnoy> (дата обращения 27.09.2021).
6. Григорьев С. В. Новые источники селекционно значимых признаков конопли из коллекции ВИР // *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2018. Т. 179. № 4. С. 50–57. DOI: 10.30901/2227-8834-2018-4-50-57.
7. Bhargava A., Srivastava S. Plant breeding // In book: *Participatory Plant Breeding: Concept and Applications*. Springer, Singapore. 2019. P. 29–68. DOI: 10.1007/978-981-13-7119-6\_2.
8. Kojoma M., Iida O., Makino Y., Sekita S., Satake M. DNA fingerprinting of *Cannabis sativa* using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification // *Planta Medica*. 2002. Vol. 68. No. 1. P. 60–63. DOI: 10.1055/s-2002-19875.
9. Zhang L. G., Chang Y., Zhang X. F., Guan F. Z., Yuan H. M., Yu Y., Zhao L. J. Analysis of the genetic diversity of Chinese native *Cannabis sativa* cultivars by using ISSR and chromosome markers // *Genetic and Molecular Research*. 2014. Vol. 13. No. 4. P. 10490–10500. DOI: 10.4238/2014.December.12.10.
10. Lata H., Chandra S., Techen N., Khan I.A., ElSohly M.A. Molecular analysis of genetic fidelity in *Cannabis sativa* L. plants grown from synthetic (encapsulated) seeds following *in vitro* storage // *Biotechnology Letters*. 2011. Vol. 33. No. 12. P. 2503–2508. DOI: 10.1007/s10529-011-0712-7.
11. Murray M. G., Thompson W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // *Nucleic Acids Research*. 1980. Vol. 8. No. 19. P. 4321–4326. DOI: 10.1093/nar/8.19.4321.
12. Anderson A., Churchill G. A., Autrique J. E., Tanksley S. D., Sorrells M. E. Optimizing parental selection for genetic linkage maps // *Genome*. 1993. Vol. 36. No. 1. P. 181–186. DOI: 10.1139/g93-024.
13. Nei M. Genetic distance between populations // *The American Naturalist*. 1972. Vol. 106. No. 949. P. 283–292. DOI: 10.1086/282771.



14. Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations // Proceeding of the National Academy of Sciences. 1973. Vol. 70. No. 12. P. 3321–3323. DOI: 10.1073/pnas.70.12.3321.
15. Leberg P. L. Estimation of allelic richness: effects of sample size and bottlenecks // Molecular Ecology. 2002. Vol. 11. No. 11. P. 2445–2449. DOI: 10.1046/j.1365-294X.2002.01612.x.
16. He X., Bjornstad A. Diversity of North European oat analyzed by SSR, AFLP and DArT markers // Theoretical and Applied Genetics. 2012. No. 125. P. 57–70. DOI: 10.1007/s00122-012-1816-8.
17. Paczos–Grzęda E. M., Bednarek P. T., Koroluk A. Zastosowanie markerów silicoDArT do oceny polimorfizmu międzyodmianowego // Folia Pomeranae Universitatis Technologiae Stetinensis Agricultura, Alimentaria, Piscaria et Zootechnica. 2014. No. 30. P. 75–84.
18. Rozalia G. M. Q–Factor Analysis (Q–Methodology) as data analysis technique // Annals of the University of Oradea, Economic Science Series. 2008. Vol. 17. No. 4. P. 871–876. [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://www.researchgate.net/publication/260284343\\_Q\\_-\\_methodology\\_Q\\_factor\\_analysis\\_-\\_particularities\\_and\\_theoretical\\_considerations\\_for\\_marketing\\_data](https://www.researchgate.net/publication/260284343_Q_-_methodology_Q_factor_analysis_-_particularities_and_theoretical_considerations_for_marketing_data) (дата обращения 27.09.2021).
19. Soriano J. M., Villegas D., Aranzana M. J., García Del Moral L. F., Royo C. Genetic structure of modern durum wheat cultivars and mediterranean landraces matches with their agronomic performance // PLoS ONE. 2016. No. 11. Art. No. e0160983. DOI: 10.1371/journal.pone.0160983.
20. Cieplak M., Okoń S., Werwińska K. Genetic similarity of *Avena sativa* L. varieties as an example of a narrow genetic pool of contemporary cereal species // Plants. 2021. Vol. 10. No. 7. DOI: 10.3390/plants10071424.

## References

1. Serkov V. A., Bakulova I. V., Pluzhnikova I. I., Kriushin N. V. New directions of breeding and improvement of seed production technology for hemp plant. Monograph. Penza: Penza State Agrarian University, 2019. P. 155.
2. Cherney J., Small E. Industrial hemp in North America: production, politics and potential // Agronomy. 2016. Vol. 6(58). DOI: 10.3390/agronomy6040058.
3. Small E. Classification of *Cannabis sativa* L. in relation to agricultural, biotechnological, medical and recreational utilization // In book: *Cannabis sativa* L. – Botany and Biotechnology. Springer, Cham, 2017. P. 1–62. DOI: 10.1007/978-3-319-54564-6\_1.
4. Onofri C., Mandolino G. Genomics and molecular markers in *Cannabis sativa* L. // In book: *Cannabis sativa* L. – Botany and Biotechnology. Springer, Cham, 2017. P. 319–342. DOI: 10.1007/978-3-319-54564-6\_15.
5. Serkov V. A., Klimova L. V., Danilov M. V. The formation of promising breeding material to create drug-free varieties of seeding hemp // Niva Povolzhya. 2018. Vol. 3. No. 48. P. 62–67. [Electronic resource]. Access point: <https://cyberleninka.ru/article/n/formirovanie-perspektivnogo-selektcionnogo-materiala-dlya-sozdaniya-beznarkoticheskikh-sortov-konopli-posevnoy> (reference's date 27.09.2021).
6. Grigoryev S. V. New sources of agriculturally valuable traits in hemp from the VIR collection for cultivar development// Proceedings on applied botany, genetics and breeding. 2018. Vol. 179. No. 4. P. 50–57. DOI: 10.30901/2227-8834-2018-4-50-57.
7. Bhargava A., Srivastava S. Plant breeding // In book: Participatory Plant Breeding: Concept and Applications. Springer, Singapore. 2019. P. 29–68. DOI: 10.1007/978-981-13-7119-6\_2.
8. Kojoma M., Iida O., Makino Y., Sekita S., Satake M. DNA fingerprinting of *Cannabis sativa* using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification // Planta Medica. 2002. Vol. 68. No. 1. P. 60–63. DOI: 10.1055/s-2002-19875.
9. Zhang L. G., Chang Y., Zhang X. F., Guan F. Z., Yuan H. M., Yu Y., Zhao L. J. Analysis of the genetic diversity of Chinese native *Cannabis sativa* cultivars by using ISSR and chromosome markers // Genetic and Molecular Research. 2014. Vol. 13. No. 4. P. 10490–10500. DOI: 10.4238/2014.December.12.10.
10. Lata H., Chandra S., Techen N., Khan I.A., ElSohly M.A. Molecular analysis of genetic fidelity in *Cannabis sativa* L. plants grown from synthetic (encapsulated) seeds following *in vitro* storage // Biotechnology Letters. 2011. Vol. 33. No. 12. P. 2503–2508. DOI: 10.1007/s10529-011-0712-7
11. Murray M. G., Thompson W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // Nucleic Acids Research. 1980. Vol. 8. No. 19. P. 4321–4326. DOI: 10.1093/nar/8.19.4321.
12. Anderson A., Churchill G. A., Autrique J. E., Tanksley S. D., Sorrells M. E. Optimizing parental selection for genetic linkage maps // Genome. 1993. Vol. 36. No. 1. P. 181–186. DOI: 10.1139/g93-024.
13. Nei M. Genetic distance between populations // The American Naturalist. 1972. Vol. 106. No. 949. P. 283–292. DOI: 10.1086/282771.
14. Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations // Proceeding of the National Academy of Sciences. 1973. Vol. 70. No. 12. P. 3321–3323. DOI: 10.1073/pnas.70.12.3321.
15. Leberg P. L. Estimation of allelic richness: effects of sample size and bottlenecks // Molecular Ecology. 2002. Vol. 11. No. 11. P. 2445–2449. DOI: 10.1046/j.1365-294X.2002.01612.x.

16. He X., Bjornstad A. Diversity of North European oat analyzed by SSR, AFLP and DArT markers // Theoretical and Applied Genetics. 2012. No. 125. P. 57–70. DOI: 10.1007/s00122-012-1816-8.
17. Paczos–Grzęda E. M., Bednarek P. T., Koroluk A. Zastosowanie markerów silicoDArT do oceny polimorfizmu międzyodmianowego // Folia Pomeranae Universitatis Technologiae Stetinensis Agricultura, Alimentaria, Piscaria et Zootechnica. 2014. No. 30. P. 75–84.
18. Rozalia G. M. Q–Factor Analysis (Q–Methodology) as data analysis technique // Annals of the University of Oradea, Economic Science Series. 2008. Vol. 17. No. 4. P. 871–876. [Electronic resource]. Access point: [https://www.researchgate.net/publication/260284343\\_Q\\_methodology\\_Q\\_factor\\_analysis\\_particularities\\_and\\_theoretical\\_considerations\\_for\\_marketing\\_data](https://www.researchgate.net/publication/260284343_Q_methodology_Q_factor_analysis_particularities_and_theoretical_considerations_for_marketing_data) (reference's date 27.09.2021).
19. Soriano J. M., Villegas D., Aranzana M. J., García Del Moral L. F., Royo C. Genetic structure of modern durum wheat cultivars and mediterranean landraces matches with their agronomic performance // PLoS ONE. 2016. No 11. Art. No. e0160983. DOI: 10.1371/journal.pone.0160983.
20. Cieplak M., Okoń S., Werwińska K. Genetic similarity of *Avena sativa* L. varieties as an example of a narrow genetic pool of contemporary cereal species // Plants. 2021. Vol. 10. No. 7. DOI: 10.3390/plants10071424.

UDC 633.521:631.527

Bazanov T. A., Uschapovsky I. V., Loginova N. N., Smirnova E. V., Mikhailova P. D.

### **STUDY OF GENETIC POLYMORPHISM OF RUSSIAN ORIGIN HEMP CULTIVARS WITH THE USE OF ISSR–MARKERS**

**Summary.** Nowadays, hemp production places high demands on the efficiency of breeding and the reliability of seed multiplication of hemp (*Cannabis sativa* L. subsp. *Sativa*). Therefore, a detailed study of genetic polymorphism, intervarietal and intravarietal variability, and the peculiarities of the formation of the fund of available genetic diversity of culture becomes urgent. The aim was to study the genetic polymorphism of some modern Russian species of industrial hemp using molecular ISSR markers. Experimental data were obtained in 2021 in the laboratory of molecular-genetic researching and cell selection of the Federal Research Center of Bast Crops. We studied ten varieties of hemp of Russian breeding from the collection of Penza Unit of Federal Research Center for Fiber Crops: 'Milena', 'Vera', 'Surskaya', 'Nadezhda', 'Ingreda', 'Diana', 'Juliana', 'Gentus', 'Dimra', 'Margo'. DNA was isolated from individual seeds by the CTAB method. When setting up PCR, 20 ISSR primers were used; amplification products were separated in agarose gel. A total of 99 alleles of 430–1500 bp were identified, the genetic profile of each studied sample turned out to be individual. Cluster analysis and genetic similarity dendrogram construction made it possible to reveal the presence of intra- and intervarietal genetic polymorphism, visualize the phylogenetic relationships of the studied species. The studied samples formed dense intravarietal groups and were divided into three intervarietal clusters. The presence of similar components of crossing in the pedigrees of the studied varieties is associated with the peculiarity of the identified clustering and determines the prerequisites for the formation of the genetic narrowness of modern varieties of cannabis. The set of 20 used ISSR-markers is distinguished by good resolution for studying the genetic polymorphism of hemp. Intravarietal polymorphism with an average genetic distance of 0.14 and intervarietal polymorphism with a distance of 0.61 were revealed in 10 cultivars of hemp of the Central Russian type. According to the results of cluster and factor analyzes, which showed the similarity of conclusions, the samples were divided into three main clusters, mainly differing in the originator of the variety. The study of DNA polymorphism of seeds of the 'Diana', obtained after reproduction of two years, indicates its genetic stability.

**Keywords:** hemp, molecular markers, ISSR, PCR, genetic polymorphism, breeding.

Базанов Тарас Александрович, кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией молекулярно-генетических исследований и клеточной селекции, ФГБНУ Федеральный научный центр лубяных культур; 170041, Россия, г. Тверь, Комсомольский проспект, 17/56; e-mail: t.bazanov@fncl.ru.

Ущাপовский Игорь Валентинович, кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований и клеточной селекции, заместитель директора по научной работе, ФГБНУ Федеральный научный центр лубяных культур; 170041, Россия, г. Тверь, Комсомольский проспект, 17/56; e-mail: i.uschapovsky@fncl.ru.

Логинова Наталья Николаевна, научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований и клеточной селекции, ФГБНУ Федеральный научный центр лубяных культур; 170041, Россия, г. Тверь, Комсомольский проспект, 17/56; e-mail: n.loginova@fncl.ru.

Смирнова Екатерина Витальевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований и клеточной селекции, ФГБНУ Федеральный научный центр лубяных культур; 170041, Россия, г. Тверь, Комсомольский проспект, 17/56; e-mail: ev.smirnova@fncl.ru.

Михайлова Полина Дмитриевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований и клеточной селекции, ФГБНУ Федеральный научный центр лубяных культур; 170041, Россия, г. Тверь, Комсомольский проспект, 17/56; e-mail: p.mikhaylova@fncl.ru.

Bazanov Taras Aleksandrovich, Cand. Sc. (Chem.), leading researcher, head of the Laboratory of the molecular-genetic researching and cell selection, FSBSI Federal Research Center of Bast Crops; 17/56, Komsomolsky ave., Tver, 170041, Russia; e-mail: t.bazanov@fncl.ru.

Uschapovsky Igor Valentinovich, Cand. Sc. (Biol.), docent, leading researcher of the Laboratory of the molecular-genetic researching and cell selection, FSBSI Federal Research Center of Bast Crops; 17/56, Komsomolsky ave., Tver, 170041, Russia; e-mail: i.uschapovsky@fncl.ru.

Loginova Natalya Nikolaevna, researcher of the Laboratory of the molecular-genetic researching and cell selection, FSBSI Federal Research Center of Bast Crops; 17/56, Komsomolsky ave., Tver, 170041, Russia; e-mail: n.loginova@fncl.ru.

Smirnova Ekaterina Vitalyevna, junior researcher of the Laboratory of the molecular-genetic researching and cell selection, FSBSI Federal Research Center of Bast Crops; 17/56, Komsomolsky ave., Tver, 170041, Russia; e-mail: ev.smirnova@fncl.ru.

Mikhailova Polina Dmitrievna, junior researcher of the Laboratory of the molecular-genetic researching and cell selection, FSBSI Federal Research Center of Bast Crops; 17/56, Komsomolsky ave., Tver, 170041, Russia; e-mail: p.mikhaylova@fncl.ru.

*Дата поступления в редакцию – 01.09.2021.*

*Дата принятия к печати – 15.10.2021.*