

СЕЛЕКЦИЯ, СЕМЕНОВОДСТВО И БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ/PLANT BREEDING, SEED PRODUCTION AND BIOTECHNOLOGY

DOI: <https://doi.org/10.60797/JAE.2025.64.14>

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ РАСТЕНИЙ ЛЮЦЕРНЫ НА ОСНОВЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТРАНСПОЗАЗЫ TN5 ПРИ ПОДГОТОВКЕ ТРАНСКРИПТОМНЫХ БИБЛИОТЕК

Научная статья

Барсуков Н.М.¹, Климов К.А.², Краснова В.А.³, Коваленко В.Л.⁴, Москаленко О.Д.⁵, Пушкова Е.Н.⁶, Краснов Г.С.⁷, Дмитриев А.А.⁸, Мельникова Н.В.^{9,*}

¹ ORCID : 0009-0000-6303-3326;⁶ ORCID : 0000-0002-6071-5919;⁸ ORCID : 0000-0002-6827-9584;⁹ ORCID : 0000-0001-8083-3018;

^{1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9} Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Российская Федерация

* Корреспондирующий автор (mnv-4529264[at]yandex.ru)

Аннотация

Люцерна (*Medicago sativa* L.) — многолетняя бобовая культура, являющаяся одним из наиболее значимых кормовых растений. Люцерна характеризуется преимущественно перекрестным типом опыления, и каждый сорт является популяцией. В связи с этим актуально определение внутрисортного генетического разнообразия, выбор наиболее типичных представителей сорта, а также определение генетической близости сортов люцерны с учетом их гетерогенности.

Нами разработан подход, основанный на секвенировании кДНК-библиотек, подготовленных с использованием транспозазы Tn5, для генотипирования индивидуальных растений люцерны. Данный подход позволяет существенно снизить затраты на создание кДНК-библиотек и в разы сократить время, необходимое для их пробоподготовки, по сравнению с классическими подходами. С использованием разработанного подхода проведен анализ 54 растений сортов *M. sativa* subsp. *sativa* Verneuil и Mulfeuil и сорта *M. sativa* nothosubsp. *varia* Люся. Исследованные растения разделились на три кластера в соответствии с сортовой принадлежностью. Сорта Verneuil и Mulfeuil, относящиеся к одному подвиду, оказались генетически ближе друг к другу, чем к сорту Люся. Также показано, что для сортов Verneuil и Mulfeuil тип материала, из которого проводили выделение РНК (семядоли или целые проростки), не вносил существенного вклада в оценку генетической близости растений, в то время как для сорта Люся обособился подкластер целых проростков. Растения сорта Люся характеризовались большим генетическим разнообразием по сравнению с сортами Verneuil и Mulfeuil, что может объясняться недавним созданием этого сорта, представляющего собой сложнгибридную форму.

Таким образом, подход по подготовке кДНК-библиотек для генотипирования индивидуальных растений люцерны с применением транспозазы Tn5 позволил получить логичные результаты и показал высокую эффективность. Разработанный подход по генотипированию растений может быть использован при оценке родства сортов люцерны, определения внутрисортного разнообразия, отбраковки нетипичных для сорта растений и выбора наиболее перспективных для использования в исследовательской и селекционной работе генотипов.

Ключевые слова: люцерна, *Medicago sativa*, генотипирование, транспозаза Tn5, секвенирование транскриптомов.

GENOTYPING OF ALFALFA PLANTS BASED ON THE USE OF TN5 TRANSPOSSASE IN THE PREPARATION OF TRANSCRIPTOMIC LIBRARIES

Research article

Barsukov N.M.¹, Klimov K.A.², Krasnova V.A.³, Kovalenko V.L.⁴, Moskalenko O.D.⁵, Pushkova E.N.⁶, Krasnov G.S.⁷, Dmitriev A.A.⁸, Melnikova N.V.^{9,*}

¹ ORCID : 0009-0000-6303-3326;⁶ ORCID : 0000-0002-6071-5919;⁸ ORCID : 0000-0002-6827-9584;⁹ ORCID : 0000-0001-8083-3018;

^{1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9} Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

* Corresponding author (mnv-4529264[at]yandex.ru)

Abstract

Alfalfa (*Medicago sativa* L.) is a perennial legume crop and one of the most important fodder plants. Alfalfa is characterised by predominantly cross-pollination, and each variety is a population. In this regard, it is important to determine intraspecific genetic diversity, select the most typical representatives of the variety, and identify the genetic proximity of alfalfa varieties, taking into account their heterogeneity.

We have developed an approach based on sequencing cDNA libraries prepared using Tn5 transposase for genotyping individual alfalfa plants. This method significantly reduces the cost of creating cDNA libraries and cuts the time required for sample preparation compared to traditional methods. Using the developed method, 54 plants of the varieties *M. sativa* subsp. *sativa* Verneuil and Mulfeuil and the variety *M. sativa* nothosubsp. *varia* Lyusya were analysed. The studied plants were

divided into three clusters according to their variety. The Verneuil and Mulfeuil varieties, belonging to the same subspecies, were found to be genetically closer to each other than to the Lyusya variety. It was also shown that for the Verneuil and Mulfeuil varieties, the type of material from which RNA was extracted (cotyledons or whole seedlings) did not contribute significantly to the evaluation of the genetic proximity of plants, while for the Lyusya variety, a subcluster of whole seedlings was isolated. Lyusya plants were characterised by greater genetic diversity compared to the Verneuil and Mulfeuil varieties, which may be explained by the recent creation of this variety, which is a complex hybrid form.

Thus, the approach to preparing DNA libraries for genotyping individual alfalfa plants using Tn5 transposase yielded logical results and demonstrated high efficiency. The developed method for plant genotyping can be used to evaluate the relationship between alfalfa varieties, determine intraspecific diversity, reject plants that are atypical for the variety, and select the most promising genotypes for use in research and selection work.

Keywords: alfalfa, *Medicago sativa*, genotyping, Tn5 transposase, transcriptome sequencing.

Введение

Люцерна (*Medicago sativa* L.) — многолетняя бобовая кормовая культура, широко используемая в мире. Ее ценность в кормопроизводстве во многом определяется высоким уровнем питательных веществ и качественным аминокислотным составом [1]. Современные сорта люцерны содержат от 16,0% до 23,5% сырого белка в фазу бутонизации-цветения [2]. По содержанию лимитирующей аминокислоты — лизина (6,2–11,7 г/кг) — люцерна превосходит зерновые культуры, такие как пшеница, ячмень и кукуруза [3].

На фоне активного прироста населения в развивающихся странах усиливается проблема нехватки белка и повышается антропогенная нагрузка на экосистемы [1], [4], [5]. Потенциальным решением этих проблем может стать люцерна. Сочетая в себе высокий урожай зеленой массы с продуктивным долголетием, она обеспечивает стабильный сбор урожая на протяжении нескольких лет [6]. Обладая способностью к азотфиксации и глубоко разветвленной корневой системой, люцерна помогает восстановлению пахотных земель, повышая плодородие и снижая эрозию [1], [6], [7]. Она также отличается широкими адаптивными возможностями, позволяющими выращивать ее в разнообразных климатических и почвенных условиях [8], [9].

Люцерна характеризуется преимущественно перекрестным типом опыления, что обуславливает ее высокую генетическую гетерогенность [10], [11]. Поскольку каждый сорт является популяцией, а не чистой линией, среди растений поддерживается высокая гетерозиготность [12]. В связи с этим определение внутрисортного генетического разнообразия и близости различных сортов с учетом их гетерогенности и выбор наиболее типичных представителей сорта играет важную роль в фундаментальных и прикладных исследованиях люцерны, а также ее селекции.

Эффективным подходом для генотипирования растений является секвенирование полных геномов, однако недостатком данного метода являются высокие затраты на анализ одного образца. Секвенирование не полных геномов, а определенных их участков, например, генов рибосомной РНК или регионов хлоропластных геномов существенно сокращает стоимость исследования одного образца и достаточно широко используется при оценке генетической близости растений, однако ограничением для применения данного метода является недостаточный уровень полиморфизма этих последовательностей у близкородственных образцов. Еще одним распространенным подходом для генотипирования растений является секвенирование библиотек с уменьшенной сложностью генома, позволяющее получить данные только для случайного набора участков генома и существенно снизить затраты на один образец по сравнению с полногеномным секвенированием, однако часто требуется выбор оптимальных рестриктаз и оптимизация методики для определенного вида/рода растений. Весьма эффективным подходом является секвенирование значительного числа определенных предварительно выбранных генов, полиморфизм которых позволяет достаточно полно охарактеризовать разнообразие изучаемых образцов растений, однако для разработки таких наборов генов требуется масштабный биоинформатический анализ и оптимизация методик «вытаскивания» нужных генов из генома [13].

Существуют также подходы для генотипирования растений, основанные на секвенировании транскриптомов, позволяющие определить последовательности всех экспрессирующихся в определенной ткани или органе генов, и этот метод эффективен для изучения полиморфизмов в белок-кодирующих генах. Затраты на такие исследования при использовании коммерческих наборов реактивов остаются весьма высокими, однако разработаны методики для пробоподготовки кДНК-библиотек для секвенирования, основанные на использовании транспозазы Tn5, позволяющие существенно снизить затраты на один образец [14], [15], [16].

Целью нашей работы являлась разработка подхода, основанного на секвенировании кДНК-библиотек, подготовленных с использованием транспозазы Tn5, для генотипирования индивидуальных растений люцерны с целью оценки внутрисортного полиморфизма.

Методы и принципы исследования

Выращивание растений люцерны и выделение РНК

Для генотипирования использовали растения сортов *Medicago sativa* L. subsp. *sativa* Verneuil и Mulfeuil, а также перспективного сорта *Medicago sativa* L. nothosubsp. *varia* (Martyn) Arcang. Люся. Современная популяция сорта Люся представляет собой сложнгибридную форму, созданную скрещиванием сортов Агния, Palava и образца 506/13. Она характеризуется высокой адаптивностью и выраженной симбиотической активностью. В то же время, сорта Verneuil и Mulfeuil представляют ранние формы *M. sativa* subsp. *sativa*. Семенной материал получен из коллекции ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова» (Санкт-Петербург).

Семена люцерны сортов Verneuil, Mulfeuil и Люся подвергли скарификации и разделили на две части. Одну сразу высевали в горшки с грунтом и искусственным освещением (16 часов день/8 часов ночь), а вторую помещали в чашки Петри с 0,05% раствором фунгицида Maxim (Syngenta, Франция). На седьмой день из чашек Петри отбирали

проростки для 9 индивидуальных растений каждого сорта, а из горшков — пары раскрытых семядолей также для 9 индивидуальных растений каждого сорта. Собранный растительный материал измельчали в 1,5 мл пробирках в жидком азоте одноразовым пестиком, который закрепляли в дрели-шуруповёрте DF332D (Makita, Япония). Выделение РНК проводили набором HiPure Plant RNA Mini Kit (Magen, Китай). Качество выделенной РНК оценивали методом электрофореза в 1,5% агарозном геле, а концентрацию — на флуориметре Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, США).

Подготовка и секвенирование кДНК-библиотек

В качестве основы при разработке методики подготовки кДНК-библиотек с использованием транспозазы Tn5 для высокопроизводительного секвенирования растений люцерны использованы подходы из нескольких ранее опубликованных статей [16], [17], [18], [19]. В результате разработан описанный ниже протокол.

Для выделения фракции мРНК использовали 250 нг тотальной РНК в 5 мкл воды. К РНК добавляли 2 мкл праймера dT30VN (10 мкМ) (5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN-3') (ДНК-Синтез, Россия). Смесь инкубировали 2 мин при 70 °С и немедленно охлаждали на льду. Реакцию обратной транскрипции проводили в 15,5 мкл реакционной смеси следующего состава: 3 мкл 5× First Strand Buffer (Евроген, Россия), 1,5 мкл смеси dNTP (10 мМ каждого) (Евроген), 1,5 мкл DTT (20 мМ) (Евроген) и 1,5 мкл ингибитора РНКаз (5 ед/мкл) (Синтол, Россия). Смесь перемешивали на вортексе и добавляли по 7 мкл к образцу РНК. Затем вносили 1 мкл обратной транскриптазы Mint (200 ед/мкл) (Евроген). Инкубацию проводили 1 ч 30 мин при 42 °С, затем 15 мин при 70 °С, после чего пробы охлаждали на льду.

Подготовка кДНК-библиотек основывалась на использовании фермента Smart Транспозазы Tn5 (diaGene, Россия), позволяющего одновременно фрагментировать гетеродуплекс РНК-ДНК и присоединять к получившимся фрагментам двуцепочечные адаптеры, необходимые для дальнейшей пробоподготовки:

5'-[phos]CTGTCTCTTATACACATCT-3' + 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3',

5'-[phos]CTGTCTCTTATACACATCT-3' + 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-3'.

Реакцию тагментации проводили в объеме 10 мкл, содержащем 2 мкл 5× TAPS-буфера (50 мМ TAPS-NaOH (Acros Organics, США), 25 мМ MgCl₂ (Sigma-Aldrich, США), 50% v/v DMF (Sigma-Aldrich) (pH 8,5), 0,25 мкл Tn5 (diaGene) и 7,8 мкл продукта обратной транскрипции. Смесь готовили на льду, инкубировали 7 мин при 55 °С, затем охлаждали на льду. После этого добавляли 5 мкл 0,2 % SDS (Sigma-Aldrich), инкубировали 7 мин при 55 °С и вновь охлаждали.

Продукты реакции разводили в два раза. Восстановление разрывов в РНК после тагментации проводили в 11,5 мкл реакционной смеси, включающей 2 мкл 5× First Strand Buffer (Евроген), 1 мкл dNTP (10 мМ каждого) (Евроген), 0,5 мкл обратной транскриптазы Mint (200 ед/мкл) (Евроген) и 8 мкл продукта реакции тагментации. Инкубацию проводили 15 мин при 42 °С и 15 мин при 70 °С, после чего пробы охлаждали.

Для добавления адаптерных последовательностей и двойных индексов проводили ПЦР с использованием универсальных праймеров Nextera XT v2:

5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC[i5]TCGTCGGCAGCGTC-3',

5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT[i7]GTCTCGTGGGCTCGG-3' (Illumina, США), где i5 и i7 – 8-нуклеотидные баркоды.

Реакцию амплификации проводили в 20 мкл смеси, содержащей 0,4 ед/мкл полимеразы KAPA (Roche, Швейцария), 1× буфер KAPA, 0,4 мкМ каждого праймера (i5, i7) (Евроген), 0,3 мМ каждого dNTP (Roche) и 5 мкл кДНК. Программа амплификации: 72 °С — 5 мин; 98 °С — 2 мин 45 с; 20 циклов (98 °С — 15 с, 62 °С — 30 с, 72 °С — 1 мин 30 с). Амплификацию выполняли на амплификаторе MiniAmp Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific).

Качество кДНК-библиотек оценивали электрофорезом в 2%-агарозном геле, а концентрацию — на флуориметре Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific).

кДНК-библиотеки смешивали эквимолярно и очищали на магнитных шариках MagicPure Size Selection DNA Beads (TransGen Biotech, Китай) в соотношении 1:1,5 (образец:шарики). Затем проводили селекцию по размеру фрагментов согласно инструкции производителя для получения кДНК-библиотек с размером вставки 400–500 п.н.

Концентрацию и качество подготовленных библиотек оценивали на флуориметре Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific) и капиллярном электрофорезе Qsep1-Plus (BioOptic, Тайвань). Секвенирование проводили на платформе NextSeq 2000 (Illumina) с длиной прочтений 100+100 н.

Анализ данных секвенирования

Анализ данных секвенирования проводили с использованием PPliner [20]. Прочтения обрезали по качеству, а также удаляли остаточные фрагменты адаптеров при помощи Trimmomatic 0.39 [21] с параметрами TRAILING:24, SLIDINGWINDOW:4:14, MINLEN:40. Далее прочтения картировали на геном *M. sativa* (National Genomics Data Center (NGDC), проект PRJCA033031, сборка генома GWHFIBZ000000000.2) [22] при помощи STAR 2.7.9a [23] с подключенной GTF-аннотацией, с удалением новых (не аннотированных в GTF) неканонических сплайс-границ. После процессинга и сортировки BAM-файлов проводили процедуру разделения прочтений, пересекающих границы экзонов, при помощи GATK SplitNCigarReads 4.2.4.0. Маркировка дуплицированных прочтений не проводилась. Далее выполняли поиск ДНК-полиморфизмов при помощи freeBayes 1.3.2 [24] (с пороговым покрытием 5, пороговой частотой альтернативного аллеля (VAF) = 0.2). Замены фильтровали по Phred Quality > 50. Далее на основе профилей встречаемости ДНК-полиморфизмов (а именно частот альтернативных аллелей, VAF) рассчитывали попарные Евклидовы расстояния между образцами, и затем проводили иерархическую кластеризацию образцов с использованием метода Варда (D2). Визуализацию дендрограмм проводили в iTOL.

Результаты и обсуждение

С использованием описанного выше подхода для сортов люцерны Verneuil, Mulfeuil и Люся подготовлено 54 кДНК-библиотеки. Для каждого сорта половина кДНК-библиотек получена для семядолей, а половина — для целых проростков. кДНК-библиотеки секвенировали на платформе Illumina и в среднем для каждой кДНК-библиотеки получили по 5 млн парноконцевых прочтений. Данные депонированы в NCBI Sequence Read Archive, проект

PRJNA1356923. Выполнили картирование полученных транскриптомных данных на геном *M. sativa* (NGDC, GWHFIBZ000000000.2) [22], и в среднем доля картированных прочтений составила 78%.

Далее провели поиск ДНК-полиморфизмов в полученных для каждого образца люцерны транскриптомных данных и на их основе выполнили кластеризацию образцов (рис. 1). Как видно из представленной на рисунке дендрограммы, все образцы разделились на три кластера в соответствии с сортовой принадлежностью (образцы сорта Mulfeuil содержат в своем названии сокращение Mul, сорта Verneuil — Ver, а сорта Люся — Luc). При этом сорта Verneuil и Mulfeuil оказались генетически ближе друг к другу, а не к сорту Люся, что вполне логично, так как Verneuil и Mulfeuil относятся к подвиду *M. sativa* subsp. *sativa*, а Люся — к *M. sativa* nothosubsp. *varia*. Что касается разделения образцов в соответствии с растительным материалом, из которого выделяли РНК для подготовки кДНК-библиотек (семядоли или целые проростки), то его не произошло для сортов Verneuil и Mulfeuil, относящихся к ранним селекционным формам *M. sativa* subsp. *sativa*, а для сорта Люся, относящегося к *M. sativa* nothosubsp. *varia*, обособился подкластер образцов целых проростков (на дендрограмме целые проростки обозначены буквой Рв начале названия образца), в то время как образцы семядолей (обозначены буквой Св начале названия образца) не образовали четко обособившегося подкластера. Люся, в отличие от Verneuil и Mulfeuil, относится к другому подвиду люцерны, и с этим могут быть связаны более выраженные отличия ее целых проростков от семядолей на уровне экспрессии. Это, в свою очередь, могло внести вклад в то, данные о ДНК-полиморфизмах каких генов были получены, что и привело к некоторому обособлению образцов целых проростков. Также стоит отметить, что образцы сорта Люся характеризовались большим генетическим разнообразием по сравнению с образцами сортов Verneuil и Mulfeuil, что может объясняться недавним созданием этого сорта, представляющего собой сложногогибридную форму.

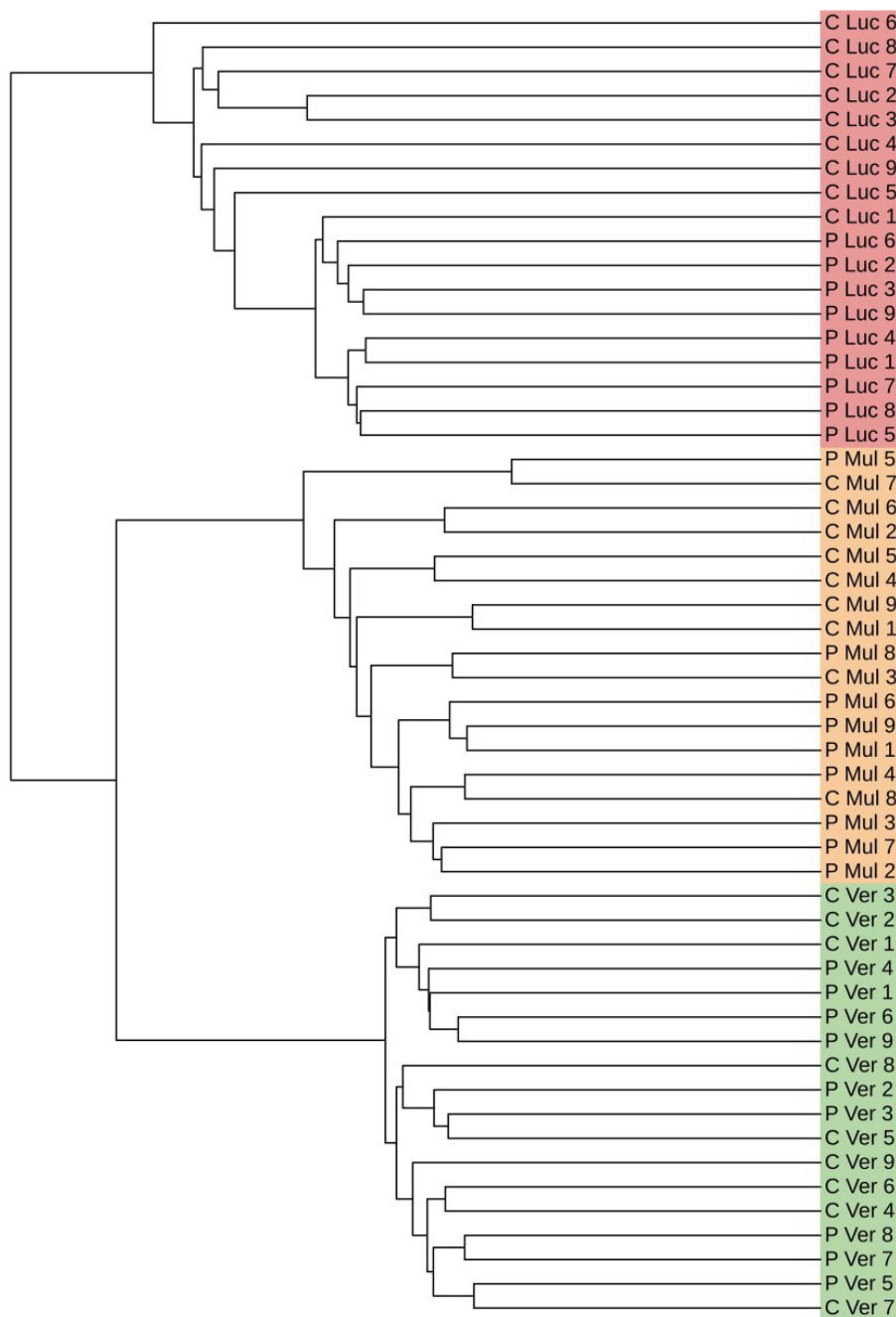


Рисунок 1 - Кластеризация образцов люцерны сортов Verneuil (Ver), Mulfueil (Mul) и Люся (Luc) на основе ДНК-полиморфизмов в данных секвенирования транскриптомов семядолей (обозначены буквой С в начале названия образца) и целых проростков (обозначены буквой Р в начале названия образца)

DOI: <https://doi.org/10.60797/JAE.2025.64.14.1>

Примечание: для каждого сорта в анализ вошло по 18 растений

Таким образом, подход по подготовке кДНК-библиотек для генотипирования индивидуальных растений люцерны с применением транспозазы Tn5 позволил получить логичные результаты и показал высокую эффективность. Известно, что транспозаза Tn5 фрагментирует двуцепочечную ДНК и присоединяет к полученным фрагментам ДНК связанные с ней олигонуклеотиды. В случае подготовки ДНК-библиотек для высокопроизводительного секвенирования используются олигонуклеотиды, необходимые для амплификации ДНК-библиотек и их последующего высокопроизводительного секвенирования на выбранной платформе (в нашем случае Illumina) [25]. Позже было показано, что Tn5 способна фрагментировать не только двуцепочечную ДНК, но и гетеродуплекс РНК-ДНК [16], [17], [18], что позволяет использовать ее при подготовке кДНК-библиотек для фрагментации гетеродуплекса мРНК-кДНК, получаемого после реакции обратной транскрипции. Подход с применением Tn5 позволяет существенно снизить затраты на создание кДНК-библиотек и в разы сократить время, необходимое для их пробоподготовки, по сравнению с классическими подходами, использующими лигирование адаптеров.

Закключение

Нами разработан эффективный подход по генотипированию растений люцерны, основанный на использовании транспозазы Tn5 при подготовке кДНК-библиотек для высокопроизводительного секвенирования и дальнейшего анализа ДНК-полиморфизмов в экспрессирующихся в исследуемых образцах генах. Данный подход может быть использован при оценке родства сортов люцерны, определения внутрисортного разнообразия, отбраковки нетипичных для сорта растений и выбора наиболее перспективных для использования в исследовательской и селекционной работе генотипов. Кроме того, предложенный подход, помимо данных о ДНК-полиморфизмах в генах, также позволяет получить информацию об уровнях экспрессии генов в исследуемых образцах, что может быть использовано в молекулярно-генетических исследованиях.

Финансирование

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации для НЦМУ ИМБ РАН «Высокотехнологичная биоэкономика», соглашение № 075-15-2025-582 от 24.06.2025 г.

Конфликт интересов

Не указан.

Рецензия

Все статьи проходят рецензирование. Но рецензент или автор статьи предпочли не публиковать рецензию к этой статье в открытом доступе. Рецензия может быть предоставлена компетентным органам по запросу.

Funding

This research was financially supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation to the EIMB RAS Center for High-tech Bioeconomy, agreement number 075-15-2025-582.

Conflict of Interest

None declared.

Review

All articles are peer-reviewed. But the reviewer or the author of the article chose not to publish a review of this article in the public domain. The review can be provided to the competent authorities upon request.

Список литературы на английском языке / References in English

1. Undersander D. Economic Importance, Practical Limitations to Production, Management, and Breeding Targets of Alfalfa / D. Undersander // The Alfalfa Genome. — Cham : Springer International Publishing, 2021. — P. 1–11.
2. Tucak M. Improvement of Forage Nutritive Quality of Alfalfa and Red Clover through Plant Breeding / M. Tucak, M. Ravlić, D. Horvat [et al.] // Agronomy. — 2021. — Vol. 11. — № 11. — P. 2176.
3. Lysine // INRAE-CIRAD-AFZ Feed tables. — 2017. — URL: <https://www.feedtables.com/content/lysine> (accessed: 03.11.2025).
4. Kim S.W. Meeting Global Feed Protein Demand: Challenge, Opportunity, and Strategy / S.W. Kim, J.F. Less, L. Wang [et al.] // Annual Review of Animal Biosciences. — 2019. — Vol. 7. — P. 221–243.
5. Van Eenennaam A.L. Addressing the 2050 demand for terrestrial animal source food / A.L. Van Eenennaam // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 2024. — № 121 (50). — P. e2319001121.
6. Putnam D. Profitable Alfalfa Production Sustains the Environment / D. Putnam, E. Meccage // 51st California Alfalfa & Forage Symposium. — San Diego, California, USA : University of California Cooperative Extension, Department of Plant Sciences, University of California, Davis, 2022. — P. 20–30.
7. Song X. Long-Term Growth of Alfalfa Increased Soil Organic Matter Accumulation and Nutrient Mineralization in a Semi-Arid Environment / X. Song, C. Fang, Z.-Q. Yuan [et al.] // Frontiers in Environmental Science. — 2021. — № 9. — 649346 p.
8. Liu X. Thriving in a salty future: morpho-anatomical, physiological and molecular adaptations to salt stress in alfalfa (*Medicago sativa* L.) and other crops / X. Liu, J.T.M. Elzenga, J.H. Venema [et al.] // Annals of Botany. — 2024. — № 134 (7). — P. 1113–1130.
9. Daud M. Understanding abiotic stress in alfalfa: physiological and molecular perspectives on salinity, drought, and heavy metal toxicity / M. Daud, H. Qiao, S. Xu [et al.] // Frontiers in Plant Science. — 2025. — № 16. — 1627599 p.
10. Chen M. Pollen limitation and resource limitation affect the reproductive success of *Medicago sativa* L. / M. Chen, X.A. Zuo // BMC Ecology. — 2018. — Vol. 18. — № 1. — 28 p.
11. Chen M. Pollinator activity and pollination success of *Medicago sativa* L. in a natural and a managed population / M. Chen, X.Y. Zhao, X.A. Zuo // Ecology and Evolution. — 2018. — Vol. 8. — № 17. — P. 9007–9016.
12. Nagl N. Estimation of the genetic diversity in tetraploid alfalfa populations based on RAPD markers for breeding purposes / N. Nagl, K. Taski-Ajdukovic, G. Barac [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. — 2011. — Vol. 12. — № 8. — P. 5449–5460.
13. Dodsworth S. Hyb-Seq for Flowering Plant Systematics / S. Dodsworth, L. Pokorny, M.G. Johnson [et al.] // Trends in Plant Science. — 2019. — Vol. 24. — № 10. — P. 887–891.
14. Bjornson M. Low-cost and High-throughput RNA-seq Library Preparation for Illumina Sequencing from Plant Tissue / M. Bjornson, K. Kajala, C. Zipfel [et al.] // Bio-Protocol. — 2020. — Vol. 10. — № 20. — e3799 p.
15. Picelli S. Full-Length Single-Cell RNA Sequencing with Smart-seq2 / S. Picelli // Methods in Molecular Biology. — 2019. — № 1979. — P. 25–44.
16. Di L. RNA sequencing by direct tagmentation of RNA/DNA hybrids / L. Di, Y. Fu, Y. Sun [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 2020. — Vol. 117. — № 6. — P. 2886–2893.
17. Lu B. Transposase-assisted tagmentation of RNA/DNA hybrid duplexes / B. Lu, L. Dong, D. Yi [et al.] // eLife. — 2020. — № 9. — e54919 p.

18. Lu B. TRACE-seq: Rapid, Low-Input, One-Tube RNA-seq Library Construction Based on Tagmentation of RNA/DNA Hybrids / B. Lu, C. Yi // *Current Protocols*. — 2023. — № 3 (4). — e735 p.
19. Pushkova E.N. Selection of Flax Genotypes for Pan-Genomic Studies by Sequencing Tagmentation-Based Transcriptome Libraries / E.N. Pushkova, E.V. Borkhert, R.O. Novakovskiy [et al.] // *Plants*. — 2023. — Vol. 12. — № 21. — 3725 p.
20. Krasnov G.S. PPLine: An Automated Pipeline for SNP, SAP, and Splice Variant Detection in the Context of Proteogenomics / G.S. Krasnov, A.A. Dmitriev, A.V. Kudryavtseva [et al.] // *Journal of Proteome Research*. — 2015. — Vol. 14. — № 9. — P. 3729–3737.
21. Bolger A.M. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data / A.M. Bolger, M. Lohse, B. Usadel // *Bioinformatics*. — 2014. — Vol. 30. — № 15. — P. 2114–2120.
22. Zhang H. Chromosome-scale haplotype-resolved genome assembly of the autotetraploid alfalfa cultivar Bolivia / H. Zhang, L. Zhou, H. Zhao [et al.] // *Plant Biotechnology Journal*. — 2025. — Vol. 23. — № 11. — P. 4773–4775.
23. Dobin A. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner / A. Dobin, C.A. Davis, F. Schlesinger [et al.] // *Bioinformatics*. — 2013. — Vol. 29. — № 1. — P. 15–21.
24. Garrison E. Haplotype-based variant detection from short-read sequencing / E. Garrison, G. Marth // *arXiv:1207.3907v2 [q-bio.GN]*. — 2012. — 9 p.
25. Picelli S. Tn5 transposase and tagmentation procedures for massively scaled sequencing projects / S. Picelli, A.K. Bjorklund, B. Reinius [et al.] // *Genome Research*. — 2014. — № 24 (12). — P. 2033–2040.