

Оценка генетического разнообразия сортов и линий гороха с помощью SSR-анализа

DOI: 10.30901/2227-8834-2020-3-70-80

УДК 633.358:57.088.1


Поступление/Received: 25.06.2020

Принято/Accepted: 21.09.2020



К. П. ГАЙНУЛЛИНА^{1, 2*}, Б. Р. КУЛУЕВ¹,
Ф. А. ДАВЛЕТОВ²

¹ Институт биохимии и генетики Уфимского
федерального исследовательского центра РАН,
450054 Россия, г. Уфа, пр. Октября, 71

*  karina28021985@yandex.ru

² Башкирский научно-исследовательский институт
сельского хозяйства Уфимского федерального
исследовательского центра РАН,


450059 Россия, г. Уфа, ул. Р. Зорге, 19

 davletovfa@mail.ru

Genetic diversity assessment in pea cultivars and lines using the SSR analysis

K. P. GAINULLINA^{1, 2*}, B. R. KULUEV¹,
F. A. DALETOV²

¹ Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Federal
Research Center of the Russian Academy of Sciences,
71 Oktyabrya Ave., Ufa 450054, Russia

*  karina28021985@yandex.ru

² Bashkir Research Institute of Agriculture
of Ufa Federal Research Center
of the Russian Academy of Sciences,

19 R. Zorge St., Ufa 450059, Russia

 davletovfa@mail.ru

Актуальность. Горох является основной зернобобовой культурой в Республике Башкортостан и широко распространённой во всем мире. Ключевую роль в селекции новых сортов гороха играет исходный материал, источником которого служат коллекции генетических ресурсов, отражающие фенотипическое и генотипическое разнообразие *Pisum sativum* L. Для изучения ДНК-полиморфизма различных генетических объектов, в том числе гороха, с успехом используются SSR-маркеры. Тем не менее распределение аллелей ряда микросателлитов в генотипах отдельных линий и сортов этой ценной зернобобовой культуры остается практически не исследованным. **Материалы и методы.** Проведено изучение молекулярно-генетического полиморфизма 40 образцов гороха по-севного различного эколого-географического происхождения из коллекции генетических ресурсов ВИР, а также региональной селекции. Микросателлитный анализ выполнялся с использованием пяти SSR-маркеров из геномной библиотеки микросателлитов (Agrogene®, Франция). **Результаты.** Все маркеры давали четкие электрофоретические профили и позволили амплифицировать от 2 (AB53) до 9 (AA355) аллелей на локус. Было выявлено 26 аллелей, в среднем 5,2 аллелей на локус. Индекс полиморфизма варьировал от 0,39 для локуса AB53 до 0,82 для локуса AA355, в среднем составляя 0,60. Совокупность использованных в работе SSR-маркеров позволила однозначно идентифицировать каждый из изученных генотипов гороха. Вычисленные генетические расстояния были использованы для построения дендрограммы, демонстрирующей распределение генотипов в соответствии с их генетической близостью. **Заключение.** При изучении исходного материала для селекции гороха методом SSR-анализа нами были получены данные, которые позволяют расширить представление о генетической структуре коллекции и полиморфизме изученных образцов. Результаты генотипирования сортов и линий могут быть использованы для их паспортизации, а также при подборе родительских пар для гибридизации.

Ключевые слова: *Pisum sativum*, генетические ресурсы, микросателлитные маркеры, полиморфизм, генетическое сходство.

Background. Pea is the main leguminous crop in the Republic of Bashkortostan and widespread all over the world. The key role in the breeding of new pea cultivars is played by source material representing the phenotypic and genotypic diversity of *Pisum sativum* L., searched for in plant genetic resources collections. SSR markers are successfully used to study the DNA polymorphism of various genetic objects, including pea. However, the distribution of a number of microsatellite alleles in the genotypes of specific lines and cultivars of this valuable pulse crop remains practically unexplored. **Materials and methods.** Molecular genetic polymorphism was studied in 40 pea cultivar accessions of different ecological and geographical origin from the Vavilov Institute's genebank of plant genetic resources or developed at regional breeding centers. Microsatellite analysis was performed using 5 SSR markers from the genomic library of microsatellites (Agrogene®, France). **Results.** All markers delivered good electrophoretic profiles and helped to amplify a number of alleles per locus varying from 2 (AB53) to 9 (AA355). The total number of alleles was 26, while the average number of alleles per locus was 5.2. The polymorphism information content (PIC) varied from 0.39 for locus AB53 to 0.82 for locus AA355, with the mean value of 0.60. The set of SSR markers used in the work made it possible to individualize each of the studied pea genotypes. The measured genetic distances were used to draw a dendrogram showing the distribution of genotypes according to their genetic relationship. **Conclusion.** Through studying the source material for pea breeding by the SSR analysis the data were obtained that provide additional information about the genetic structure of the collection and the polymorphism of the studied cultivar accessions. The results of genotyping pea cultivars and lines can be used for their genetic identification or to select parental pairs for hybridization.

Key words: *Pisum sativum*, genetic resources, microsatellite markers, polymorphism, genetic relationship.

Введение

Горох посевной (*Pisum sativum* L.) – широко распространенная во всем мире зернобобовая культура, которая является одним из главных источников растительного белка (Davletov, 2008; Dyachenko et al., 2014). В России горох успешно выращивают в разных почвенно-климатических условиях: на севере – до приполярной зоны, а на юге, западе и востоке – до государственных границ нашей страны. Это одна из культур, имеющая значительный высотный предел распространения в России – до 2000–2480 м н. у. м. (Shelepina, Shchurov, 2010). Ареал и зоны возделывания гороха свидетельствуют о его большой экологической пластичности (Davletov et al., 2014). Включение гороха в севообороты стало важным фактором энергосбережения, поскольку позволяет увеличить объемы производства зерна, богатого белком, как для продовольственных, так и для кормовых целей, а также повысить плодородие почв благодаря симбиозу склубеньковыми бактериями, способными фиксировать атмосферный азот (Popozukhin et al., 2016).

Агроклиматические условия Республики Башкортостан (РБ) способствуют получению зерна гороха с хорошими товарными качествами, поэтому горох на данной территории по праву считается традиционной культурой, а история его возделывания начинается еще в первой половине XIX века. В 70–80-е гг. XX столетия площади посевов гороха в республике были максимальными и составляли 290–300 тыс. га. В последние годы посевные площади гороха сократились до 55–60 тыс. га (Gainullina, Davletov, 2018). Важным резервом увеличения производства гороха является селекция (Govogov, 1937; Makasheva, 1979; Lihacheva, Gimaletdinova, 2014). Причем существенная роль в селекции новых высокопродуктивных сортов гороха отводится исходному материалу, принадлежащему к различным эколого-географическим группам, в значительной степени различающимся по устойчивости к абиотическим и биотическим факторам среды, продолжительности вегетационного периода, продуктивности (Davletov et al., 2011). На протяжении многих лет в Чишминском селекционном центре по растениеводству (пгт. Чишмы, РБ) используется принцип подбора родительских пар методом контрастных признаков, в основе которого лежит генетическая отдаленность (Davletov, Gainullina, 2011). Применение современных методов молекулярной генетики позволяет снизить трудоемкость селекционной работы, сократить время анализа и дополнить результаты полевой оценки генетического разнообразия образцов, используемых в качестве исходного материала для селекции гороха.

Как показано рядом исследований, одними из удобных ДНК-маркеров для выявления генетического полиморфизма являются микросателлиты, которые представляют собой простые tandemно повторяющиеся последовательности (Simple Sequence Repeat, SSR), состоящие из мономеров длиной от 1 до 6 пар оснований. При этом для многих культурных растений установлено, что динуклеотидные повторы встречаются в их геномах чаще остальных (Zhang et al., 2007; Qu, Liu, 2013). Как правило, микросателлиты относятся к эухроматиновой части генома, и темпы их мутирования очень высоки, что обуславливает существование множественных кодоминантных аллелей (Tautz, 1989; Sulitova, 2004). В настоящее время имеются данные о распространенности микросателлитов в геномах различ-

ных видов растений, особенностях их локализации в кодирующих и не кодирующих участках. Работы по изучению молекулярно-генетического полиморфизма разных видов культурных растений с помощью микросателлитных маркеров активно ведутся как в России, так и за рубежом (Awadalla, Ritland, 1997; Guyomarc'h et al., 2002; Abdel-Mawgood et al., 2006; Guchetl et al., 2007; Boronnikova, 2009; Khlestkina, 2013). В геноме гороха посевного также было обнаружено большое число микросателлитных локусов, создана геномная библиотека микросателлитов Agrogene® (Moissy Cramayel, Франция), однако прогресс в разработке эффективных микросателлитных маркеров и маркер-ориентированной селекции значительно замедляется из-за большого размера генома гороха (4,45 Гб), превосходящего размер других модельных генетических объектов из числа бобовых – люцерны усеченной (*Medicago truncatula* Gaertn.) и сои (*Glycine max* (L.) Merr.) – в 9 и 4 раза соответственно (Yang et al., 2015). Остается практически не исследованным распределение аллелей микросателлитных локусов в генотипах отдельных линий и сортов гороха, что ограничивает практическое применение SSR-маркеров (Loridon et al., 2005). В то же время существует необходимость идентификации ценных и перспективных образцов гороха различного эколого-географического происхождения, что обеспечит правильный подбор родительских пар при планировании скрещиваний, сократит временные затраты на создание новых сортов и повысит эффективность генетического прогнозирования и селекции. Кроме того, решение данной проблемы будет способствовать сохранению генофонда гороха, выявлению филогенетических связей, прогрессу в картировании хромосом, паспортизации, контроле генетической чистоты сортов и линий, оценке уровня гибридности, контроле происхождения семенного материала, защите авторских прав селекционеров.

Был проведен ряд исследований по вопросу возможности применения SSR-маркеров для гороха, который подтверждает их высокую эффективность для определения генетического разнообразия и степени генетического родства, идентификации и паспортизации сортов и линий данной культуры (Dribnokhodova, Gostimsky, 2009; Jain et al., 2014). Также микросателлитные маркеры успешно применяются для поиска ассоциаций с хозяйственно ценными признаками. Так, например, более 100 анонимных SSR-маркеров применяли для поиска ассоциаций с содержанием минеральных веществ в семенах гороха (Ma et al., 2017). По SSR-маркерам, фланкирующим гены устойчивости к бурой ржавчине, были идентифицированы генотипы сортов гороха, отличающихся по степени восприимчивости к данному патогену (Singh et al., 2015). Тем не менее до сих пор не определен набор микросателлитов для генетической идентификации сортов и линий гороха различного географического происхождения и направления использования (зернового, овощного, кормового), поэтому любые исследования SSR-маркеров гороха, в том числе подразумевающие генотипирование сортов региональной селекции, представляются актуальными. В связи с этим целью исследования стало изучение генетического полиморфизма сортов и линий гороха посевного различного эколого-географического происхождения, в том числе районированных в агроклиматических условиях Предуральской степной зоны Республики Башкортостан, по микросателлитным маркерам.

Материалы и методы

Исследования проводились в 2018–2019 гг. Полевые опыты закладывались в лаборатории селекции и семеноводства зернобобовых культур Чишминского селекционного центра по растениеводству Башкирского научно-исследовательского института сельского хозяйства Уфимского федерального исследовательского центра РАН (НИИСХ УФИЦ РАН). Анализ молекулярно-генетического полиморфизма проводился в лаборатории геномики растений Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН (ИБГ УФИЦ РАН).

Материалом для исследования послужили 25 образцов гороха посевного из коллекции генетических ресурсов растений Всероссийского института генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), а также 8 сортов и 7 линий селекции Башкирского НИИСХ Уфимского федерального исследовательского центра РАН (НИИСХ УФИЦ РАН), представленных в таблице 1. Посев в коллекционном питомнике проводили селекционной сеялкой СКС-6-10. Площадь делянки – 3 м². Площадь питания растений – 20 × 5 см.

Данные о продолжительности вегетационного периода, массе семян с растения приведены на основе результатов фенологических наблюдений и структурного анализа образцов в 2017–2019 гг. По каждому сорту или линии после уборки отбирали пробные снопы. После просушки снопов проводили анализ 20 растений каждого сорта или линии по хозяйственно ценным признакам. При проведении фенологических наблюдений отмечали дату всходов, цветения и полной спелости. За начало каждой фазы принимали день, когда в нее вступают 10–15% растений, а за полное наступление фазы – 75% растений. На основании полученных данных по каждому образцу определяли продолжительность полного вегетационного и межфазных периодов.

Молекулярно-генетический анализ образцов гороха проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) по SSR-локусам AA5, AA200, AA255, AA355, AB53, AD61, D21, взятым из геномной библиотеки микросателлитов Agrogene® (Moissy Cramayel, Франция). В дальнейшем локусы AA5 и AD61 были исключены из исследования из-за низкой воспроизводимости результатов. Семена гороха проращивали в чашках Петри. ДНК выделяли из 5–7-дневных проростков с помощью набора Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Литва). При

выделении ДНК использовали по 96–100 мг гомогенизированных тканей проростков. Для выявления возможного внутрисортного полиморфизма анализировали по пять растений каждого сорта или линии. ПЦР проводили в амплификаторе T-100 (Bio-Rad Laboratories, США). Конечный объем реакционной смеси составлял 20 мкл и содержал 1 мкл раствора тотальной геномной ДНК, 7,5 мкл раствора Dream Taq™ PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Литва), по 2 мкл каждого из пары праймеров («Евроген», Россия) и 7,5 мкл стерильной деионизированной воды.

Амплификация проводилась по следующей программе: начальная денатурация при 94°C – 4 мин; 35 циклов: денатурация при 94°C – 30 с, отжиг праймеров при $T_m \pm 2^\circ\text{C}$ – 30 с, элонгация при 72°C – 1 мин; конечная элонгация при 72°C – 10 мин. Температуру плавления праймеров (T_m) определяли с помощью программы PrimerSelect (DNASStar, США). ПЦР с каждым образцом по каждой паре праймеров проводили не менее трех раз.

Продукты амплификации разделяли методом вертикального электрофореза в камере VE-20 («Хеликон», Россия) в 10% полиакриламидном геле в течение 4–6 часов при напряжении 400 В. Визуализацию и документирование результатов электрофореза осуществляли при помощи трансиллюминатора ECX-F15M (Vilber Lourmat, Франция) и видеосистемы «Взгляд» («Хеликон», Россия) с помощью программного обеспечения Gel Imager-2.

Информативность изученных SSR-маркеров оценивали по величине PIC (Polymorphism Information Content). Кластерный анализ проводили методом ближайшего соседа путем вычисления матрицы нормированных евклидовых расстояний с помощью программы StatSoft® STATISTICA 13.3.

Результаты

В результате молекулярно-генетического исследования 40 образцов гороха посевного методом SSR-ПЦР нами были получены данные по аллельному состоянию пяти микросателлитных локусов (AA200, AA255, AA355, AB53, D21). На рисунке 1 представлена электрофореграмма продуктов амплификации локуса AA355. Все проанализированные образцы отличались уникальным сочетанием аллелей, что дало возможность использовать рассмотренные в работе маркеры для идентификации изученной выборки.

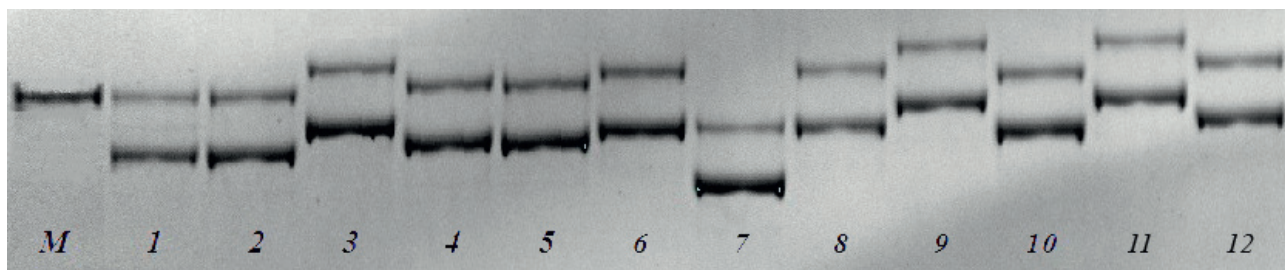


Рис. 1. Электрофоретические спектры сортов и линий гороха, полученные при амплификации SSR-локуса AA355:

M – маркер GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder, фрагмент 200 пар нуклеотидов;
1 – Чарльстон; 2 – к-7779; 3 – к-6299; 4 – к-7992; 5 – к-6753; 6 – Л-29477; 7 – к-8750; 8 – Флагман; 9 – к-7044;
10 – к-6017; 11 – к-8500; 12 – к-6548

Fig. 1. Electrophoretic patterns of pea cultivars and lines produced by amplification of SSR locus AA355:

M – GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder, 200 bp fragment;
1 – Charlston; 2 – k-7779; 3 – k-6299; 4 – k-7992; 5 – k-6753; 6 – L-29477;
7 – k-8750; 8 – Flagman; 9 – k-7044; 10 – k-6017; 11 – k-8500; 12 – k-6548

Таблица 1. Характеристика изученных сортов и линий гороха
Table 1. Characteristics of the studied pea cultivars and lines

Сорт, линия, № по каталогу ВИР / Cultivar, line, VIR catalogue number	Происхождение / Origin	Тип листа / Leaf type	Осыпаемость семян / Seed shattering	Продолжительность периода ве- гетации (среднее ± стандартное отклонение), сутки / The growing season duration (mean ± standard deviation), days	Масса семян с растения (среднее ± стандартное от- клонение), г Seed weight per plant (mean ± standard deviation), g
Ирэндек	Башкортостан	листочковый	осыпающиеся	60,7 ± 2,6	2,1 ± 0,2
Кормовой 5	Башкортостан	листочковый	неосыпающиеся	61,0 ± 2,9	2,6 ± 0,4
Памяти Хангильдина	Башкортостан	усатый	неосыпающиеся	61,7 ± 2,6	3,3 ± 0,3
Чишминский 75	Башкортостан	листочковый	неосыпающиеся	61,0 ± 2,3	3,8 ± 1,3
Чишминский 80	Башкортостан	листочковый	неосыпающиеся	60,3 ± 3,2	3,3 ± 0,5
Чишминский 95	Башкортостан	листочковый	неосыпающиеся	61,3 ± 2,3	3,4 ± 0,3
Чишминский 229	Башкортостан	листочковый	неосыпающиеся	63,0 ± 3,1	4,1 ± 0,2
Шихан	Башкортостан	листочковый	неосыпающиеся	60,7 ± 2,6	3,2 ± 0,5
Л-26742 ((Уладовский юбилейный × Шихан) × Шихан)	Башкортостан	усатый	неосыпающиеся	62,0 ± 2,6	3,2 ± 0,5
Л-27262 (к-7779 × Труженик)	Башкортостан	усатый	неосыпающиеся	60,7 ± 3,0	2,8 ± 0,2
Л-29477 (Усач × Кормовой 5)	Башкортостан	усатый	неосыпающиеся	59,3 ± 2,4	1,8 ± 0,4
Л-29825 (Л-27264 × Кормовой 5)	Башкортостан	усатый	неосыпающиеся	59,7 ± 2,6	2,4 ± 0,8
Л-29865 (Усач × Чишминский 95)	Башкортостан	усатый	неосыпающиеся	59,3 ± 2,6	2,2 ± 0,7
Л-30346 (Чишминский 229 × Л-27266)	Башкортостан	усатый	неосыпающиеся	60,0 ± 2,5	2,3 ± 0,5
Л-30735 (Л-26742 × Чишминский 80)	Башкортостан	листочковый	неосыпающиеся	61,2 ± 2,6	3,2 ± 0,3
Зеленозерный 1	Воронежская обл.	листочковый	осыпающиеся	62,7 ± 2,4	3,2 ± 0,4
Флаванда	Кировская обл.	листочковый	осыпающиеся	62,0 ± 2,6	3,2 ± 0,7
Флагман	Самарская обл.	листочковый	осыпающиеся	61,0 ± 2,3	2,3 ± 0,5
к-8714	Адыгея	усатый	неосыпающиеся	61,3 ± 2,3	2,4±0,5
Неосыпающийся 1	Украина	листочковый	неосыпающиеся	61,5 ± 2,4	3,0±0,4

Таблица 1. Окончание
Table 1. The end

Сорт, линия, № по каталогу ВИР / Cultivar, line, VIR catalogue number	Происхождение / Origin	Тип листа / Leaf type	Осыпаемость семян / Seed shattering	Продолжительность периода ве- гетации (среднее ± стандартное отклонение), сутки / The growing season duration (mean ± standard deviation), days	Масса семян с растения (среднее ± стандартное от- клонение), г Seed weight per plant (mean ± standard deviation), g
Прикульский 380	Латвия	листочковый	неосыпающиеся	64,7 ± 2,2	2,1 ± 0,4
Топаз	Украина	листочковый	осыпающиеся	61,7 ± 2,6	3,3 ± 0,3
Труженик	Украина	листочковый	неосыпающиеся	61,0 ± 2,9	3,0 ± 0,1
Усатый 90	Украина	усатый	неосыпающиеся	62,3 ± 2,7	2,5 ± 0,3
Усач	Украина	усатый	неосыпающиеся	61,3 ± 2,6	2,7 ± 0,3
Харвус 1	Украина	усатый	неосыпающиеся	61,7 ± 2,6	2,7 ± 0,2
Чарльстон	Англия	усатый	осыпающиеся	64,0 ± 0,0	3,2 ± 0,0
к-5073	Нидерланды	листочковый	осыпающиеся	62,3 ± 2,5	2,6 ± 0,5
к-6017	Франция	листочковый	осыпающиеся	64,3 ± 3,3	2,0 ± 0,4
к-6299	Марокко	листочковый	осыпающиеся	64,7 ± 3,0	2,2 ± 0,2
к-6548	Индия	листочковый	осыпающиеся	61,7 ± 3,0	2,2 ± 0,3
к-6753	Чехия	листочковый	осыпающиеся	60,0 ± 2,6	3,3 ± 0,5
к-7044	Ливия	листочковый	осыпающиеся	63,3 ± 3,3	2,0 ± 0,1
к-7779	Англия	многократно непарноперистый	осыпающиеся	62,0 ± 2,6	2,8 ± 1,1
к-7899	Дания	листочковый	осыпающиеся	62,6 ± 2,6	2,8 ± 0,4
к-7992	Корея	листочковый	осыпающиеся	61,0 ± 2,1	3,0 ± 0,3
к-8289	Нидерланды	усатый	осыпающиеся	63,3 ± 3,3	2,8 ± 0,5
к-8500	Белоруссия	листочковый	неосыпающиеся	61,7 ± 3,0	3,0 ± 0,6
к-8750	Португалия	листочковый	осыпающиеся	61,3 ± 2,9	3,3 ± 0,3
к-8814	США	листочковый	осыпающиеся	62,0 ± 2,6	3,0 ± 0,3

Всего в результате амплификации пяти микросателлитных локусов было выявлено 26 аллелей, в среднем 5,2 аллелей на локус, что согласуется с литературными данными о высоком уровне полиморфизма SSR-маркеров (Loridon et al., 2005). Число аллелей, амплифицированных в каждом из локусов, варьировало от 2 (AB53) до 9 (AA355).

Также для исследованных SSR-локусов был рассчитан индекс полиморфизма, который составлял в среднем 0,60 и в зависимости от локуса варьировал от 0,39 (AB53) до 0,82 (AA355). Считается, что чем больше величина PIC для данного локуса, тем информативнее оказывается он в качестве маркера для оценки генетического разнообразия и сортовой идентификации. Принята следующая градация величин PIC: при $PIC > 0,5$ локус очень информативен, при $0,5 > PIC > 0,25$ достаточно информативен и при $PIC < 0,25$ наименее информативен (Botstein et al., 1980). В соответствии с этой классификацией в наших исследованиях наиболее информативными оказались микросателлитные локусы AA255 ($PIC = 0,57$), AD61 ($PIC = 0,70$), AA5 ($PIC = 0,70$), D21 ($PIC = 0,77$), AA355 ($PIC = 0,82$).

На основе полученных данных молекулярно-генетического исследования образцов гороха посевного был проведен кластерный анализ методом ближайше-

го соседа путем вычисления матрицы нормированных евклидовых расстояний и построена дендрограмма (рис. 2), отражающая генетическое разнообразие и демонстрирующая характер группирования изученных образцов.

Обсуждение результатов

Для интерпретации полученной в ходе работы дендрограммы были использованы знания о происхождении образцов и их оценке по морфобиологическим и хозяйственно ценным признакам. В основном нам были доступны родословные сортов и линий местной селекции, что позволило проанализировать их взаимное расположение на дендрограмме. В первую очередь стоит отметить изолированность зарубежного образца к-5073 из коллекции генетических ресурсов гороха ВИР – единственного сорта овощного направления использования ('Rondo') среди изученных нами в данной работе, выведенного в Нидерландах и широко распространенного в этой стране, а также в Бельгии и Франции 1940–1950-х гг., где он оказался самым надежным и самым продуктивным сортом (De Naap, 1954). Сложнее объяснить обособленность линии местной селекции Л-29477, находящейся в составе группы, которая

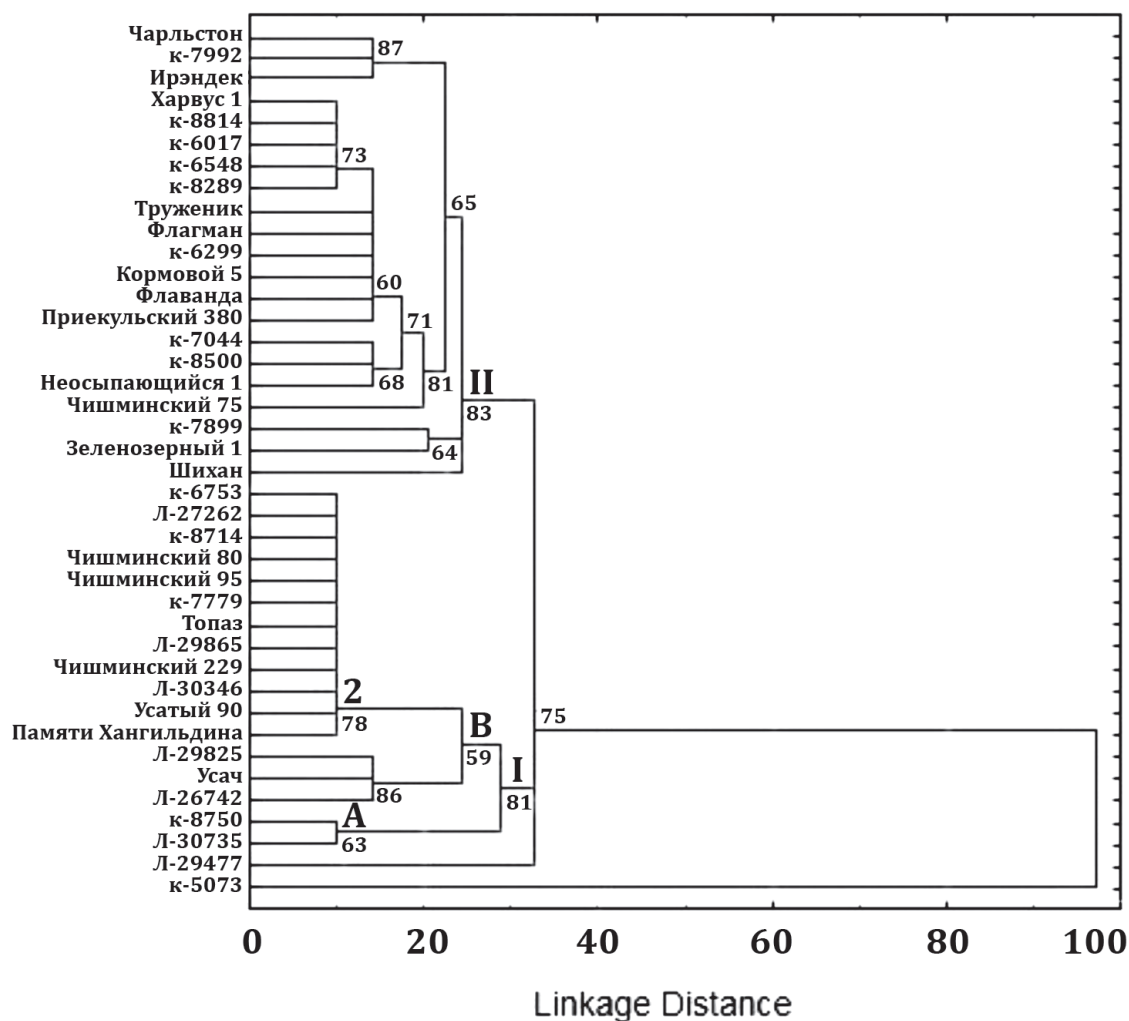


Рис. 2. Дендрограмма генетического сходства 40 сортов и линий гороха на основе данных SSR-анализа (приведены значения bootstrap-поддержки, превышающие 50)

Fig. 2. A dendrogram showing the genetic relationships among 40 pea cultivars and lines based on the data of the SSR analysis (bootstrap support values greater than 50 are shown)

включает оставшиеся 39 образцов, но вместе с тем отделившейся от двух больших кластеров I и II, содержащих 17 и 21 образец соответственно. В то же время данная линия располагается по соседству с кластером I, представленным преимущественно близкими ей сортами и линиями, также выведенными в Чишминском селекционном центре по растениеводству. В кластер I входит и зарубежный сорт 'Усач', выбранный в качестве материнской формы при создании линии Л-29477 (см. рис. 2).

В целом большой кластер I (см. рис. 2) включает в себя десять из пятнадцати изученных образцов местной селекции. В данную группу входят несколько зарубежных образцов: 'Усач', который был использован в качестве материнского компонента при создании линий Л-29865 (в качестве отцовского компонента выступал сорт 'Чишминский 95', находящийся также в кластере I) и в качестве отцовского компонента при выведении сорта 'Памяти Хангильдина' (материнский компонент представлен сортом 'Чишминский 95'); сорт 'Усач' 90', близкий по ряду морфологических и хозяйственно ценных признаков (и, предположительно, по родословной) сорту 'Усач'; 'Топаз', являющийся материнской формой высокопродуктивного сорта местной селекции 'Чишминский 95' (отцовская форма – сорт 'Шихан'); к-7779, имеющийся в родословной линии Л-27262. Также в большом кластере I располагается линия Л-30735 и ее родители: Л-26742 и 'Чишминский 80'. Сорт 'Чишминский 229', участвовавший в создании линии Л-30346, находится по соседству с ней в одном минорном кластере IB2, отмеченном на дендрограмме.

Кроме того, кластер I объединил семь из восьми высокопродуктивных образцов и шесть из девяти наиболее скороспелых. Еще один скороспелый образец – линия местной селекции Л-29477 – располагается удаленно от больших кластеров I и II, но тяготеет к кластеру I. Указанная линия также является одной из четырнадцати исследованных нами усатых форм. Еще девять образцов безлисточкового морфотипа сосредоточились непосредственно в большом кластере I.

Большой кластер II (см. рис. 2) включает в себя в основном образцы инорайонной отечественной и за-

рубежной селекции, большинство из которых созданы и адаптированы к возделыванию в условиях от умеренно-континентального до субтропического и тропического климата. Также в кластер II вошли три сорта местной селекции 'Ирэндек', 'Шихан', 'Чишминский 75', созданные в Чишминском селекционном центре на начальных этапах селекции с привлечением исходного материала зарубежного происхождения. Вероятно, их положение на дендрограмме среди изученных нами зарубежных и инорайонных отечественных образцов не является случайным. Так, например, местный сорт 'Шихан' был создан на основе зарубежного сорта 'Прикульский 380', находящегося с ним в одной большой группе (кластер II). Сорт 'Чишминский 75' и его родительские формы 'Неосыпающийся 1' и 'Ирэндек' тоже располагаются в кластере II, причем первые два сорта в непосредственной близости друг от друга. Кроме того, известно (Davletov, 2008), что в родословной сорта 'Чишминский 75' и его материнской формы 'Ирэндек' присутствовали сорта зарубежной селекции 'Торсдаг' (Швеция) и 'Нотс-Эксцельсиор' (США). Укосно-зерновой сорт 'Кормовой 5', также входящий в кластер II, был выведен непрерывным индивидуальным отбором из сорта 'Чишминский 75', родословная для которого приведена выше (Davletov, 2008).

Большинство (тринадцать из восемнадцати) изученных нами образцов гороха с осыпающимися семенами (ген *Def*) объединены в большом кластере II (см. рис. 2).

Заключение

Таким образом, нами впервые в Республике Башкортостан было проведено изучение сортов и линий гороха различного эколого-географического происхождения с использованием полиморфных микросателлитных маркеров AA200, AA255, AA355, AB53, D21. Была подтверждена высокая эффективность данных маркеров для исследования генетического полиморфизма гороха посевного. В результате генотипирования 40 образцов гороха была получена база данных (табл. 2) по аллельным состояниям исследованных SSR-маркеров, которая может быть использована для генетической паспортизации.

Таблица 2. Результаты генотипирования изученных сортов и линий гороха

Table 2. Results of genotyping the studied pea cultivars and lines

Сорт, линия, № по каталогу ВИР / Cultivar, line, VIR catalogue number	SSR-маркер / SSR marker				
	AA 200	AA 255	AA 355	AB 53	D 21
Чишминский 95	C, D	A, B	D, I	A, B	A, E
Ирэндек	C	C	E, H	A, B	H
Кормовой 5	D	B, C	E, F	A, B	F
Памяти Хангильдина	B, D	B	E, I	A, B	A
Чишминский 75	C, D	C	E, I	B	F, H
Чишминский 80	D	A, B	A, D	A, B	E, H
Чишминский 229	D	B, C	D, I	B	F, H
Шихан	C	A, C	A, D	B	E
Л-26742	B, C	A, C	D, I	B	B, E

Таблица 2. Окончание
Table 2. The end

Сорт, линия, № по каталогу ВИР / Cultivar, line, VIR catalogue number	SSR-маркер / SSR marker				
	AA 200	AA 255	AA 355	AB 53	D 21
Л-27262	D	B, C	E, H	A, B	A, F
Л-29477	B, D	B	E, I	A, B	A, F
Л-29825	B, D	B	E, I	B	A, F
Л-29865	B, D	B	E, I	B	A
Л-30346	D	B, C	E, I	A, B	F
Л-30735	B, D	B, C	D, I	A, B	B, H
Зеленозерный 1	D	B	A, D	A, B	H
Флаванда	D	C	E, I	B	H
Флагман	D	B	E, I	A, B	F
К-8714	D	B	D, H	A, B	A
Неосыпающийся 1	D	C	D, I	B	F
Прикульский 380	D	C	D, I	A, B	E
Топаз	D	B	E, I	A, B	A
Труженик	D	B	E, I	B	F
Усатый 90	D	B	E, I	B	B
Усач	B	B	E, I	B	A
Харвус 1	D	C	D, H	B	H
Чарльстон	B	B	D, H	A, B	H
к-5073	A	D	M, P	B	L
к-6017	D	B	D, H	A, B	H
к-6299	D	B	F, J	B	H
к-6548	D	B	D, H	B	G
к-6753	D	A	D, H	A, B	A
к-7044	D	A	F, J	A, B	F
к-7779	D	C	D, H	A, B	A
к-7899	C	B	A, D	A, B	G
к-7992	B	B	D, H	B	H
к-8289	D	A	D, H	A, B	H
к-8500	D	B	F, J	B	F
к-8750	D	B	A, E	A, B	A
к-8814	D	B	D, H	B	H

Примечание: Буквенные обозначения аллелей присвоены случайным образом в алфавитном порядке. Часть аллелей, отсутствующих в данной выборке (например, аллель «В» маркера AA355), были ранее нами обнаружены у других сортов, не вошедших в представленное исследование

Note: Letter symbols for the alleles were assigned at random in alphabetical order. Some of the alleles that are missing in this sample (for example, the 'B' allele of marker AA355) were previously detected in other cultivars which were not included in the presented study

Установлено, что для идентификации изученных сортов и линий достаточно использовать набор из пяти высокополиморфных микросателлитных локусов. Построенная в результате кластерного анализа дендрограмма объединила в себе разнообразный исходный материал для селекции гороха, представленный как образцами иностранной отечественной и зарубежной селекции из коллекции мировых генетических ресурсов ВИР, так и местными линиями и сортами. При этом исследованные сорта и линии сгруппировались в значительной степени в соответствии с их происхождением (родословной), географией распространения (регионом, к агроклиматическим условиям которого сорт адаптирован), особенностями морфобиологических и селекционно важных признаков. Анализируемая дендрограмма позволяет визуализировать степень генетического сходства или различия изученных образцов, а также предоставляет дополнительную информацию для эффективного подбора пар при гибридизации, основанной на генетической отдаленности.

Работа выполнена в рамках государственного задания № АААА-А19-119021190011-0 по теме «Поиск и идентификация молекулярных маркеров стрессоустойчивости растений и разработка подходов генетической паспортизации сельскохозяйственных культур».

The work has been done within the framework of State Task No. АААА-А19-119021190011-0 entitled: "Search for and identification of molecular markers for plant stress resistance and development of approaches to crop genetic passportization".

References/Литература

- Abdel-Mawgood A.L., Ahmed M.M.M., Ali B.A. Application of molecular markers for hybrid maize (*Zea mays* L.) identification. *Journal of Food, Agriculture and Environment*. 2006;4(2):176-178.
- Awadalla P., Ritland K. Microsatellite variation and evolution in the *Mimulus guttatus* species complex with contrasting mating systems. *Molecular Biology and Evolution*. 1997;14(10):1023-1034. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a025708
- Boronnikova S.V. Molecular marking and genetic certification resource and rare species of plants for the purpose of optimization of preservation of their gene-funds. *Agrarian Bulletin of the Urals*. 2009;2(56):57-59. [in Russian] (Боронникова С.В. Молекулярное маркирование и генетическая паспортизация ресурсных и редких видов растений с целью оптимизации сохранения их генофондов. *Аграрный вестник Урала*. 2009;2(56):57-59).
- Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*. 1980;32(3):314-331.
- Davletov F.A. Breeding of non-shattering pea cultivars under the conditions of the Southern Urals (Seleksiya neosypayushchikhsya sortov gorokha v usloviyakh Yuzhnogo Urala). Ufa: Gilem; 2008. [in Russian] (Давлетов Ф.А. Селекция неосыпающихся сортов гороха в условиях Южного Урала. Уфа: Гилем; 2008).
- Davletov F.A., Gainullina K.P. The influence of meteorological conditions on the hybridization results. *Agrarian Bulletin of the Urals*. 2011;4(83):5-6. [in Russian] (Давлетов Ф.А., Гайнуллина К.П. Влияние метеорологических условий на результаты гибридизации. *Аграрный вестник Урала*. 2011;4(83):5-6).
- Davletov F.A., Gainullina K.P., Ashiev A.R. Peculiarities of growth and development of pea's varieties and lines of different morphotypes in the conditions of South Urals. *Grain Economy of Russia*. 2011;5:22-31. [in Russian] (Давлетов Ф.А., Гайнуллина К.П., Ашиев А.Р. Особенности роста и развития сортов и линий гороха различных морфотипов в условиях Южного Урала. *Зерновое хозяйство России*. 2011;5:22-31).
- Davletov F.A., Gainullina K.P., Ashiev A.R. Variability of the duration of vegetative period of field pea (*Pisum sativum* L.) in the Cis-Ural steppe of the Republic of Bashkortostan. *Herald of the Academy of Sciences of the Republic of Bashkortostan*. 2014;19(3):49-59. [in Russian] (Давлетов Ф.А., Гайнуллина К.П., Ашиев А.Р. Изменчивость продолжительности вегетационного периода гороха посевного (*Pisum sativum* L.) в условиях Предуральской степи Республики Башкортостан. *Вестник Академии наук Республики Башкортостан*. 2014;19(3):49-59).
- De Haan H. The breeding of peas in the Netherlands. *Euphytica*. 1954;3:188-194. DOI: 10.1007/BF00055592
- Dribnokhodova O.P., Gostimsky S.A. Allele polymorphism of microsatellite loci in pea (*Pisum sativum* L.) lines, varieties, and mutants. *Russian Journal of Genetics*. 2009;45(7):900-906. [in Russian] (Дрибноходова О.П., Гостимский С.А. Исследование аллельного полиморфизма микросателлитных локусов у разных линий, сортов и мутантов гороха посевного (*Pisum sativum* L.). *Генетика*. 2009;45(7):900-906).
- Dyachenko E.A., Ryzhova N.N., Kochieva E.Z., Vishnyakova M.A. Molecular genetic diversity of the pea (*Pisum sativum* L.) from the Vavilov Research Institute collection detected by the AFLP analysis. *Russian Journal of Genetics*. 2014;50(9):1040-1049. [in Russian] (Дьяченко Е.А., Рыжова Н.Н., Вишнякова М.А., Кочиева Е.З. Молекулярно-генетическое разнообразие гороха (*Pisum sativum* L.) из коллекции ВИР на основе данных AFLP-анализа. *Генетика*. 2014;50(9):1040-1049). DOI: 10.7868/S0016675814090045
- Gainullina K.P., Davletov F.A. Creation and introduction in agricultural industry of high-producing technological pea cultivar Pamyati Hangil'dina. In: *Current state, traditions and innovative technologies in the development of the agro-industrial complex. Part 1 (Sovremennoye sostoyaniye, traditsii i innovatsionnyye tekhnologii v razvitiy APK. Chast 1). Proceedings of the International Scientific and Practical Conference in the Framework of the XXVIII International Specialized Exhibition "Agrocomplex-2018"; March 14-26, 2018; Ufa*. Ufa: Bashkir SAU; 2018. p.29-33. [in Russian] (Гайнуллина К.П., Давлетов Ф.А. Создание и внедрение в производство высокопродуктивного технологического сорта гороха Памяти Хангильдина. В кн.: *Современное состояние, традиции и инновационные технологии в развитии APK. Часть 1. Материалы международной научно-практической конференции в рамках XXVIII Международной специализированной выставки «Агрокомплекс-2018»; 14-16 марта 2018 г.; Уфа*. Уфа: Башкирский ГАУ; 2018. Ч.1. С.29-33). URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_34987801_24170663.pdf [дата обращения: 10.04.2020]
- Govorov L.I. Pea (Gorokh). In: *Cultivated Flora of the USSR (Kulturnaya flora SSSR)*. Moscow; Leningrad:

- Selkhozgiz; 1937. [in Russian] (Говоров Л.И. Горох. В кн.: *Культурная флора СССР*. Москва; Ленинград: Сельхозгиз; 1937).
- Guchetl S.Z., Chelyustnikova T.A., Antonova T.S., Ramasanova S.A. Microsatellite loci as markers for identification and certification of sunflower lines and hybrids of VNIIMK breeding. *Oil Crops. Scientific and Technical Bulletin of VNIIMK*. 2007;137(2):27-32. [in Russian] (Гучетль С.З., Челюстникова Т.А., Антонова Т.С., Рамазанова С.А. Микросателлитные локусы как маркеры для идентификации и сертификации линий и гибридов подсолнечника селекции ВНИИМК. *Масличные культуры. Научно-технический бюллетень ВНИИМК*. 2007;2(137):27-32).
- Guyomarc'h H., Sourdille P., Charmet G., Edwards K., Bernard M. Characterisation of polymorphic microsatellite markers from *Aegilops tauschii* and transferability to the D-genome of bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. 2002;104:1164-1172. DOI: 10.1007/s00122-001-0827-7
- Jain S., Kumar A., Mamidi S., McPhee K. Genetic diversity and population structure among pea (*Pisum sativum* L.) cultivars as revealed by simple sequence repeat and novel genic markers. *Molecular Biotechnology*. 2014;56(10):925-938. DOI: 10.1007/s12033-014-9772-y
- Khlestkina E.K. Molecular markers in genetic studies and breeding. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2013;17(4/2):1044-1054. [in Russian] (Хлесткина Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013;17(4/2):1044-1054).
- Lihacheva L.I., Gimaletdinova V.S. Selection evaluation of promising varieties of peas in the conditions of Middle Ural. *Legumes and Groat Crops*. 2014;11(3):20-24. [in Russian] (Лихачева Л.И., Гималетдинова В.С. Селекционная оценка перспективных сортов гороха в условиях Среднего Урала. *Зернобобовые и крупяные культуры*. 2014;3(11):20-24).
- Loridon K., McPhee K., Morin J., Dubreuil P., Pilet-Nayel M.L., Aubert G. et al. Microsatellite marker polymorphism and mapping in pea (*Pisum sativum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 2005;111:1022-1031. DOI: 10.1007/s00122-005-0014-3
- Ma Y., Coyne C.J., Grusak M.A., Mazourek M., Cheng P., Main D. et al. Genome-wide SNP identification, linkage map construction and QTL mapping for seed mineral concentrations and contents in pea (*Pisum sativum* L.). *BMC Plant Biology*. 2017;17:43. DOI: 10.1186/s12870-016-0956-4
- Makasheva R.Kh. Pea (Gorokh). In: *Cultivated Flora of the USSR (Kulturnaya flora SSSR)*. Leningrad: Kolos; 1979. [in Russian] (Макашева Р.Х. Горох. В кн.: *Культурная флора СССР*. Ленинград: Колос; 1979).
- Popoluzkhin P.V., Gaidar A.A., Vasilevskii V.D. The role of the sowing schedule in the growing of cultivated pea seeds of various morphotypes in the southern forest-steppe of Western Siberia (Rol sroka poseva v vyrashchivanii semyan sortov gorokha posevnogo razlichnogo morfotipa v yuzhnoi lesostepi Zapadnoy Sibiri). In: *Leguminous crops – a developing trend in Russia (Zernobobovye kultury – razvivayushcheyesya napravleniye v Rossii)*. Omsk: Omsk SAU; 2016. p.100-104. [in Russian] (Поползухин П.В., Гайдар А.А., Василевский В.Д. Роль срока посева в выращивании семян сортов гороха посевного различного морфотипа в южной лесостепи Западной Сибири. В кн.: *Зернобобовые культуры – развивающееся направление в России*. Омск: Омский ГАУ; 2016. С.100-104). URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_26340635_29221627.pdf [дата обращения: 10.04.2020].
- Qu J., Liu J. A genome-wide analysis of simple sequence repeats in maize and the development of polymorphism markers from next-generation sequence data. *BMC Research Notes*. 2013;6:403. DOI: 10.1186/1756-0500-6-403
- Shelepina N.V., Shchurov A.Y. National economic significance and features of the chemical composition of pea grain (Narodnokhozyaystvennoye znacheniye i osobennosti khimicheskogo sostava zerna gorokha). *Nauchnye zapiski OrelGIET = Scientific Notes of Orel State University of Economic and Trade*. 2010;1:537-539. [in Russian] (Шелепина Н.В., Щуров А.Ю. Народнохозяйственное значение и особенности химического состава зерна гороха. *Научные записки ОрелГИЭТ*. 2010;1:537-539).
- Singh A.K., Rai R., Singh B.D., Chand R., Srivastava C.P. Validation of SSR markers associated with rust (*Uromyces fabae*) resistance in pea (*Pisum sativum* L.). *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2015;21(2):243-247. DOI: 10.1007/s12298-015-0280-8
- Sulimova G.E. DNA-markers in genetic studies: types of markers, their characteristics and application. *Advances in Current Biology*. 2004;124(3):260-271. [in Russian] (Сулимова Г.Е. ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и области применения. *Успехи современной биологии*. 2004;124(3):260-271).
- Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*. 1989;17(16):6463-6471. DOI: 10.1093/nar/17.16.6463
- Yang T., Fang L., Zhang X., Hu J., Bao S., Hao J. et al. High-throughput development of SSR markers from pea (*Pisum sativum* L.) based on next generation sequencing of a purified Chinese commercial variety. *PLoS One*. 2015;10(10):e0139775. DOI: 10.1371/journal.pone.0139775
- Zhang Z., Deng Y., Tan J., Hu S., Yu J., Xue Q. A genome-wide microsatellite polymorphism database for the indica and japonica rice. *DNA Research*. 2007;14(1):37-45. DOI: 10.1093/dnares/dsm005

Прозрачность финансовой деятельности / The transparency of financial activities

Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

The authors declare the absence of any financial interest in the materials or methods presented.

Для цитирования / How to cite this article

Гайнуллина К.П., Кулуев Б.Р., Давлетов Ф.А. Оценка генетического разнообразия сортов и линий гороха с помощью SSR-анализа. Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2020;181(3):70-80. DOI: 10.30901/2227-8834-2020-3-70-80

Gainullina K.P., Kuluev B.R., Daletov F.A. Genetic diversity assessment in pea cultivars and lines using the SSR analysis. Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding. 2020;181(3):70-80. DOI: 10.30901/2227-8834-2020-3-70-80

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы / The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work

Дополнительная информация / Additional information

Полные данные этой статьи доступны / Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2020-3-70-80>

Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы / The journal's opinion is neutral to the presented materials, the authors, and their employer

Авторы одобрили рукопись / The authors approved the manuscript

Конфликт интересов отсутствует / No conflict of interest

ORCID

Gainullina K.P. <https://orcid.org/0000-0001-6246-1214>

Kuluev B.R. <https://orcid.org/0000-0002-1564-164X>

Davletov F.A. <https://orcid.org/0000-0002-7421-869X>