

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ И ИХ ДИКИХ РОДИЧЕЙ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ И ПРИКЛАДНЫХ ПРОБЛЕМ

Научная статья
УДК 633.36/.37:575.22
DOI: 10.30901/2227-8834-2022-1-147-156



Идентификация дублетных образцов гороха (*Pisum sativum* L.) в коллекции ВИР

Е. В. Семенова, В. В. Васипов, И. Н. Анисимова

Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия

Автор, ответственный за переписку: Елена Викторовна Семенова, e.semenova@vir.nw.ru

Актуальность. Идентификация дублетных образцов в генетических банках семян весьма актуальна, поскольку увеличение объема коллекций за счет дублетов ведет к повышению затрат на поддержание, не расширяя уровень генетического разнообразия коллекций.

Материалы и методы. Изучали 17 пар образцов гороха *Pisum sativum* L. из коллекции ВИР, предположительно ошибочно внесенных в постоянный каталог дважды, но имеющих один и тот же интродукционный номер, поступившие в коллекцию в 1922–1996 гг. и репродуцированные к настоящему времени от двух до 16 раз. По результатам полевой оценки для молекулярного анализа было отобрано 15 пар дублетных образцов различного направления использования. RAPD-анализ выполнен с использованием пяти праймеров серии Oregon. Суммарные запасные белки семян разделяли методом электрофореза в 12,5-процентном полиакриламидном геле в присутствии β-меркаптоэтанола и додецилсульфата натрия.

Результаты. Для установления идентичности или отличий образцов использовали следующие критерии: 1) сходство по морфологическим признакам (общему габитусу, окраске цветков, антоциановой пигментации цветков и вегетативных органов), срокам начала цветения; 2) идентичность или различие профилей RAPD-фрагментов; 3) идентичность или различие электрофоретических спектров запасных белков семян. На основании сравнительного анализа выявлены семь пар дублетных образцов; среди них пары к-81/к-1199, к-8331/к-8465, к-8719/к-8760, к-8757/к-8825 были полностью идентичными, а к-8464/к-8472, к-8740/к-8873, к-8689/к-8723 – гетерогенными, но преимущественно со сходными профилями RAPD-фрагментов и типами электрофоретических спектров белков семян.

Заключение. Для установления идентичности коллекционных образцов гороха, выявления дублетных, гетерогенных и засоренных образцов эффективна комплексная оценка, включающая фенотипирование растений в полевых условиях, а также анализ полиморфизма амплифицированных фрагментов ДНК и компонентов электрофоретических спектров запасных белков семян.

Ключевые слова: фенотипирование, морфологические признаки, ДНК-маркеры, RAPD-анализ, запасные белки семян, электрофорез, полиморфизм

Благодарности: работа выполнена в рамках государственного задания согласно тематическому плану ВИР по проекту № 0481-2022-0002 «Выявление возможностей генофонда бобовых культур для оптимизации их селекции и диверсификации использования в различных отраслях народного хозяйства».

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы.

Авторы выражают глубокую благодарность О. О. Дзюба и А. А. Макаревич (ВИР) за помощь в выполнении анализов, Н. В. Алпатьевой, Э. Э. Егги (ВИР) и А. А. Синюшину (МГУ, Москва) за советы и ценные замечания.

Для цитирования: Семенова Е.В., Васипов В.В., Анисимова И.Н. Идентификация дублетных образцов гороха (*Pisum sativum* L.) в коллекции ВИР. Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2022;183(1):147-156. DOI: 10.30901/2227-8834-2022-1-147-156

IDENTIFICATION OF THE DIVERSITY OF CULTIVATED PLANTS AND THEIR WILD RELATIVES FOR SOLVING FUNDAMENTAL AND APPLIED PROBLEMS

Original article

DOI: 10.30901/2227-8834-2022-1-147-156

Identification of duplicate accessions in the pea (*Pisum sativum* L.) collection at VIR

Elena V. Semenova, Vladimir V. Vasipov, Irina N. Anisimova

N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, St. Petersburg, Russia

Corresponding author: Elena V. Semenova, e.semenova@vir.nw.ru

Background. Identification of duplicates in the collections of genetic resources is the most important problem of seed gene bank management. Duplicate accessions expand the collection size, thus raising the costs of germplasm maintenance without broadening the genetic diversity.

Materials and methods. The studied material included 17 pairs of *Pisum sativum* L. accessions from the VIR collection which presumably had been erroneously registered twice in the VIR catalogue; however, they had identical introductory numbers. The accessions entered the collection in 1922–1996 and to date they have been reproduced 2 to 16 times. After a field assessment, 15 pairs of putative duplicate accessions of various uses were selected for molecular analysis. A RAPD analysis was performed using five primers from the Operon Series. Total seed proteins were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Results. The following criteria were used to ascertain identity of the accessions or their difference: 1) similarity of morphological characters (habitus, and anthocyanin pigmentation of flowers and vegetative organs) and flowering dates; 2) identity or polymorphism of RAPD profiles; and 3) identity or difference in electrophoretic banding patterns of seed storage proteins. Seven pairs of duplicates were identified according to the results of a comparative analysis. Among them, the accessions in the pairs k-81/k-1199, k-8331/k-8645, k-8719/k-8760, and k-8757/k-8825 turned out to be completely identical, while k-8464/k-8472, k-8740/k-8873, and k-8689/k-8723 were heterogenic, but had similar RAPD profiles and seed proteins patterns.

Conclusions. An integrated assessment involving in-field plant phenotyping and analyzing polymorphism of amplified DNA fragments and components in electrophoretic banding patterns of seed proteins is promising for detecting identical or heterogenic accessions in genebank collections.

Keywords: phenotyping, morphological characters, DNA markers, RAPD analysis, seed storage proteins, electrophoresis, polymorphism

Acknowledgements: the research was performed within the framework of the State Task according to the theme plan of VIR, Project No 0481-2022-0002 “Identification of the possibilities of legume crop genetic diversity to optimize their breeding and diversify uses in various sectors of the national economy”.

The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work.

The authors are grateful to O. O. Dzyuba and A. A. Makarevich (VIR) for their help in performing the studies. We are also grateful to N. V. Alpatieva, E. E. Eggi (VIR), and A. A. Sinyushin (Moscow State University) for their valuable advice and comments.

For citation: Semenova E.V., Vasipov V.V., Anisimova I.N. Identification of duplicate accessions in the pea (*Pisum sativum* L.) collection at VIR. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2022;183(1):147-156. DOI: 10.30901/2227-8834-2022-1-147-156

Введение

Коллекция генетических ресурсов гороха (*Pisum sativum* L.), сохраняемая в Федеральном исследовательском центре Всероссийском институте генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), насчитывает более 8 тыс. образцов из 92 стран мира. Первые образцы, поступившие в коллекцию, датируются 1902 годом. В настоящее время пополнение коллекции гороха осуществляется путем обмена с другими генбанками, посредством экспедиционных сборов на территории России и за рубежом, выписки материала отечественных и зарубежных институтов, фирм и компаний. Новые сорта и селекционный материал поступают и непосредственно от селекционеров. При пополнении коллекции возникает проблема включения в постоянный каталог дублетов. Нередко в коллекцию поступают новые образцы, названия которых идентичны названиям образцов, уже имеющихся в коллекции, но нет информации о том, являются ли они дублетными.

Проблема идентификации дублетных коллекционных образцов в генетических банках семян весьма актуальна. При постоянном увеличении коллекции требуется все больше финансовых затрат на изучение, поддержание и хранение образцов, в том числе и дублетов, не способствующих расширению сохраняемого генетического разнообразия. Решению этой проблемы посвящены многочисленные исследования. Безусловно, первоочередное значение имеет тщательный анализ паспортных данных образцов (van Hintum, Knüpffer, 1995; Poduma, 2003), а также фенотипирование растений в полевых условиях. Так, например, недавно был разработан низкозатратный способ для выявления дублетных образцов ячменя (*Hordeum vulgare* L.) скандинавского происхождения, хранящихся в коллекциях ВИР и Нордического генного банка (NordGen, Швеция). Первый этап включал выявление образцов с одинаковыми названиями на основе паспортных баз данных в разных генных банках, второй – полевое изучение образцов, представляющих вероятные дублеты, третий – углубленное изучение с использованием более сложных методов (Yndgaard et al., 2016).

В ряде работ продемонстрирована эффективность методов, основанных на использовании молекулярных маркеров. Так, анализ морфологических признаков в сочетании с SSR-маркерами успешно использован у салата *Lactuca sativa* L. (Sochor et al., 2019) и кукурузы *Zea mays* L. (Andjelkovic et al., 2018). Показаны перспективы использования SSR-маркеров для идентификации дублетов в коллекциях сливы (*Prunus domestica* L.) (Sisko, 2016), ячменя (Lund et al., 2003). AFLP-маркеры оказались использованы для идентификации дублетов в коллекции салата (van Treuren et al., 2010), RAPD-маркеры – для выявления дублетов в коллекциях риса (Virk et al., 1995) и шелковицы (Naik, Dandin, 2006). SNP-маркеры использованы для идентификации дублетных образцов *Brassica oleracea* L. в российском и Нордическом генных банках (Palmé et al., 2020). В последние годы обсуждаются возможности использования методов высокопроизводительного секвенирования геномов для анализа коллекционных образцов (McCouch et al., 2012; Singh et al., 2019). Кроме того, не утратили своей актуальности простые и экономичные экспресс-методы, основанные на анализе полиморфных признаков, например спектров запасных белков семян. В ходе многочисленных исследований доказана эффективность электрофореза запасных белков се-

мян для выявления дублетных образцов в коллекциях злаковых и зернобобовых культур (Konarev A.V. et al., 1995; Konarev V.G., 2000; Pomortsev, Lyalina, 2009; Eggy, 2015). И. Н. Перчук с соавторами (Perchuk et al., 2016) использовали анализ полиморфизма запасных белков семян для выявления дублетных образцов овса в коллекциях ВИР и Нордического генного банка. В. В. Сидорова с соавторами (Sidorova et al., 2020) применили электрофорез запасного белка зеина для выявления дублицированных образцов сахарной кукурузы в коллекции ВИР.

Работы по выявлению дублетных образцов гороха в коллекции ВИР не проводились. В настоящей статье показаны возможности использования комплексного подхода, основанного на анализе морфологических признаков в полевых условиях, полиморфных ДНК-маркеров и запасных белков семян для выявления дублетных образцов в коллекции гороха.

Материал и методы

Материалом исследования служили 17 пар образцов гороха (*Pisum sativum* L.) коллекции ВИР, ошибочно внесенных в постоянный каталог дважды, то есть имеющих один и тот же интродукционный номер и одинаковые названия, но различные номера каталога. Образцы поступили в коллекцию в период с 1922 по 1996 г. и в течение периода хранения пересевались от двух до 16 раз (табл. 1).

Предполагаемые дублетные образцы выселили на соседних делянках на опытном поле научно-производственной базы (НПБ) «Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР» в 2011 г. Их оценку (фенологические наблюдения, анализ морфологических признаков) проводили в соответствии с методиками, принятыми в отделе генетических ресурсов зернобобовых культур (Vishnyakova et al., 2010). По результатам полевой оценки для молекулярного анализа отобрали 15 пар образцов различного направления использования. Образцы пар № 4 и № 7 были исключены из исследования, так как они значительно различались как по окраске семян, так и по морфологическим признакам растений, выращенных в поле. Скорее всего, семена исходных образцов каждой из пар при включении в постоянный каталог были разделены на фракции и далее репродуцировались отдельно. Из тех же самых пакетов отбирали семена для проращивания и последующего выделения ДНК, а также для выделения запасных белков.

Тотальную ДНК выделяли из 3–5 этиолированных проростков модифицированным СТАВ-методом (Anisimova et al., 2018). Для отдельных образцов дополнительно анализировали фракции ДНК, которые выделяли из полевых растений, различавшихся по морфологическим признакам и срокам начала цветения. При проведении RAPD-анализа использовали 5 десятичных праймеров серии Operon OPA14, OPA11, OPC14, OPA16, OPQ02 («Евроген», Россия), которые были отобраны среди 10 праймеров на основе предварительного скрининга (с учетом числа выявляемых полиморфных фрагментов). Реакционная смесь для ПЦР объемом 25 мкл содержала 100 нг геномной ДНК, 2,5 мМ dNTP, 2,5 мкл 10-кратного буфера, 2,5 мМ MgCl₂, 1 е. а. Taq ДНК-полимеразы (ДИАЛАТ ЛТД, Россия), 0,25 мМ праймера. Амплификацию проводили в термическом процессоре модели Techne TC-312 (Великобритания) в следующем режиме: денатурация матрицы ДНК при 94°C, 6 мин, затем 39 циклов амплификации: (30 с при 94°C; 45 с при 37°C; 50 с при

Таблица 1. Список предполагаемых дублетных образцов *Pisum sativum* L. из коллекции ВИРTable 1. Putative duplicates among *Pisum sativum* L. accessions from the VIR collection

№ пары / Pair No.	№ интродукции / Introduction No.	№ по каталогу ВИР / VIR catalogue No.	Название / Name	Происхождение / Origin	Год поступления в коллекцию / Year of entry into collection	Число пересевов / Number of reproductions	Направление использования / Purpose
1	A6003	53	Норд ранний полевой	Германия	1922	>16	зерновой
	A6003	110	Норд ранний полевой	Германия	1922	>11	зерновой
2	A6016	81	без названия	Канада	1922	>9	овощной
	A6016	1199	без названия	Канада	1922	>9	овощной
3	A6017	70	Местный	РФ, Омская обл.	1922	>8	зерновой
	A6017	1198	Местный	РФ, Омская обл.	1922	>11	зерновой
4	B6037	111	без названия	Белоруссия	1922	>12	зерновой
	B6037	1463	без названия	Белоруссия	1922	>6	кормовой
5	D6019	203	без названия	РФ, Омская обл.	1922	>11	кормовой
	D6019	221	без названия	РФ, Омская обл.	1922	>10	кормовой
6	F6019	209	без названия	РФ, Омская обл.	1922	>11	кормовой
	F6019	233	без названия	РФ, Омская обл.	1922	>9	кормовой
7	17231	1119	Местный	Белоруссия	1922	>11	кормовой
	17231	1128	Местный	Белоруссия	1922	>9	зерновой
8	73110	3126	Pois gris d'hiver	Франция	1927	>11	кормовой
	73110	3473	Pois gris d'hiver	Франция	1928	>8	кормовой
9	73111	3125	Pois Perdrit	Франция	1927	>9	кормовой
	73111	3899	Pois Perdrit	Франция	1934	>14	кормовой
10	82547	3443	Thorsdag	Швеция	1928	>12	зерновой
	82547	3798	Thorsdag	Швеция	1932	>11	зерновой
11	489981	8464	L 1771	Швеция	1985	4	кормовой
	489981	8472	L 1771	Швеция	1985	3	кормовой
12	492883	8331	Местный	Греция	1985	3	кормовой
	492883	8465	Местный	Греция	1985	7	кормовой
13	511710	8362	Raihna	Индия	1988	4	зерновой
	511710	8557	Raihna	Индия	1988	4	зерновой
14	556224	8740	№ 45114	Германия	1996	3	кормовой
	556224	8873	№ 45114	Германия	1996	4	кормовой
15	564478	8719	Atlas	Чехия	1994	3	овощной
	564478	8760	Atlas	Чехия	1996	3	овощной
16	579545	8757	Topper	Канада	1996	2	зерновой
	579545	8825	Topper	Канада	1996	3	зерновой
17	o135644	8689	Б-1591	РФ, Башкирия	1991	3	зерновой
	o135644	8723	Б-1591	РФ, Башкирия	1993	2	зерновой

72°C); пост-циклический синтез при 72°C, 7 мин. Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 1,5-процентном агарозном геле в 1 × TAE буфере с добавлением бромистого этидия и фотографировали с помощью геледокументирующей системы UVP Bio Doc-It™ Imaging System (США). Размеры амплифицированных фрагментов определяли относительно маркера молекулярного веса ДНК 1kb Easy Load DNA Ladder (Sigma Aldrich).

Для выделения суммарных белков единичные семена гороха освобождали от оболочки и размалывали в фарфоровой ступке. Навеску муки массой 5,0 мг переносили в микроцентрифужную пробирку (Eppendorf, Германия), прибавляли 140 мкл буфера для экстракции белков (0,1% додецилсульфат натрия, 0,025 М Трис, 0,192 М глицин рН 8,3), пробы перемешивали и инкубировали при температуре 20°C в течение 45 мин, по окончании инкубирования пробы центрифугировали 5 мин при скорости 14000 оборотов в мин при 20°C. Образцы белковых препаратов смешивали с буфером нанесения (62,5 мМ Трис-НСl рН 6,8, 5% β-меркаптоэтанол, 0,05% бромфеноловый синий, 10% глицерин) в соотношении 1 : 1.

Состав белковых субъединиц анализировали с помощью электрофореза в 12,5-процентном полиакриламидном геле в диссоциирующей системе в присутствии β-меркаптоэтанол по методу Laemmli (1970) в соответствии с методическими рекомендациями, принятыми в отделе биохимии и молекулярной биологии ВИР (Koparev V.G., 2000). В качестве стандарта использован электрофоретический спектр белков семян сои сорта 'Светлая' (к-9960). При описании компонентов электрофоретических спектров белков принимали во внимание данные С. В. Бобкова и Т. Н. Лазаревой, полученные при исследовании межвидовых гибридов гороха (Bobkov, Lazareva, 2012).

Результаты и обсуждение

Для установления идентичности или отличий предположительно дублетных образцов использовали следующие критерии: 1) сходство по морфологическим признакам (общему габитусу, высоте растений, наличию антоциановой пигментации цветков и вегетативных орга-

нов) и срокам начала цветения; 2) идентичность или различие профилей RAPD-фрагментов при попарном сравнении, 3) идентичность или полиморфизм компонентов электрофоретических спектров запасных белков семян при попарном сравнении. Поскольку горох относится к числу самоопыляющихся культур, ожидали, что большинство образцов будут однородными как по морфологическим, так и по молекулярным признакам. Тем не менее не исключали также, что выровненные в полевых условиях образцы могут быть гетерогенными по молекулярным признакам в результате скрытой гетерогенности (например, если образец имел гибридное происхождение), а также генетического или механического засорения.

Для поддержания всхожести все образцы постоянно пересеваются на опытных станциях ВИР. При посевах в южных районах возможно частичное переопыление насекомыми-опылителями. Весьма вероятно, что ранее поступившие образцы после многократных пересевов могут иметь примеси других генотипов, а также механические засорения. В таком случае особое внимание уделяли характеру выявленного полиморфизма. Так, если при сравнительном анализе двух предположительно дублированных образцов большинство семян выборки характеризовалось одинаковым типом спектра (обозначен как главный тип), а минорные типы также были общими для обоих образцов, то предполагали, что эта гетерогенность существовала в образце изначально. Наличие неоднородности образцов гороха в коллекции вполне возможно. Наиболее выровненными по всем признакам могут быть селекционные сорта, менее однородными – селекционные линии. Местные же стародавние сорта чаще всего представляют собой смесь генотипов.

Результаты сравнительного анализа предполагаемых дублетных образцов по данным фенотипирования, спектрам RAPD-фрагментов и электрофоретическим спектрам белков представлены в таблице 2. В полевых условиях в пределах пяти пар сравниваемых образцов (пары № 2, № 12, № 14, № 16, № 17) не наблюдали различий по общему габитусу растений, высоте, окраске цветков, наличию антоциановой пигментации вегетативных органов, а также срокам начала цветения.

Таблица 2. Результаты сравнительного фенотипического и молекулярного анализов образцов *Pisum sativum* L. из коллекции ВИР

Table 2. Results of comparative phenotypic and molecular analyses of *Pisum sativum* L. accessions from the VIR collection

№ пары / Pair No.	Образец / Accession	Сходство по морфологическим признакам / Similarity in morphological characters	Сроки начала цветения / Dates of flowering	Сходство по спектрам RAPD-фрагментов / Similarity in RAPD profiles	Сходство электрофоретических спектров белков семян / Similarity in electrophoretic banding patterns
Дублетные образцы / Duplicate accessions					
2	к-81 к-1199	Идентичны	Совпали	Идентичны	Идентичны и однородны
11	к-8464 к-8472	Единичная примесь у к-8472 (многоцветковость)	Совпали	Идентичны, примесь у к-8472	Выявлено по два типа спектра. Главные типы спектра идентичны, минорные отличаются
12	к-8331 к-8465	Идентичны	Совпали	Идентичны	Идентичны и однородны

Таблица 2. Окончание

Table 2. The end

№ пары / Pair No.	Образец / Accession	Сходство по морфологическим признакам / Similarity in morphological characters	Сроки начала цветения / Dates of flowering	Сходство по спектрам RAPD-фрагментов / Similarity in RAPD profiles	Сходство электрофоретических спектров белков семян / Similarity in electrophoretic banding patterns
14	к-8740 к-8873	Идентичны	Совпали	Гетерогенны	Выявлено по четыре типа спектра; есть общие и уникальные типы спектра
15	к-8719 к-8760	Единичная примесь у к-8760 (отличие по окраске листа)	Совпали	Идентичны, у к-8760 примесь	Идентичны, у к-8719 единичная примесь
16	к-8757 к-8825	Идентичны	Совпали	Идентичны	Идентичны и однородны
17	к-8689 к-8723	Идентичны	Совпали	Идентичны	Выявлено по два идентичных типа спектра
Не дублетные, генетически отличающиеся образцы / Non-duplicate, genetically differing accessions					
1	к-53 к-110	Различаются по высоте растений	Различаются на 11 дней	Не идентичны	к-53 однородный, к-110 гетерогенный. Общие типы спектра отсутствуют
3	к-70 к-1198	Различаются по высоте растений, по крупности семян	Различаются на 4 дня	Не анализировали	У к-70 выявлено 4 типа спектра, у к-1198 – 2. Преобладающий тип спектра общий
5	к-203 к-221	Визуально отличаются по общему габитусу	Различаются на 5 дней	Не идентичны	Однородны, но не идентичны
6	к-209 к-233	У к-209 есть примесь с более ярким двойным антоциановым полукольцом в узле	Различаются на 2 дня	Отличаются по двум праймерам, но отличия незначительны (единичные компоненты)	Гетерогенны, преобладающий тип спектра общий. Возможно, при одном из пересевов произошло перепыление
8	к-3126 к-3473	У к-3473 есть единичная примесь с розовыми цветками	Различаются на 2 дня	Гетерогенны и не идентичны	Гетерогенны. У образца к-3473 есть уникальные генотипы
9	к-3125 к-3899	У к-3125 более крупный боб; к-3899 содержит смесь растений, отличающихся по окраске цветков	Различаются на 6 дней	Образец к-3125 однороден, к-3899 гетерогенен	Образец к-3899 гетерогенен; к-3125 однороден, за исключением единичной примеси. Образец к-3899 представляет смесь генотипов и не похож на к-3125
10	к-3443 к-3798	Различаются по высоте растений (на 40 см)	Различаются на 6 дней	Имеют общие генотипы; к-3443 однороден, к-3798 гетерогенен	Гетерогенны; у к-3443 выявлено четыре типа спектра, у к-3798 – два. Количественно преобладающий и один из минорных типов спектра одинаковы
13	к-8362 к-8557	Различаются по выраженности окраски	Различаются на 3 дня	Образец к-8362 гетерогенен по двум из шести праймеров, к-8557 однороден	Не идентичны

Образцы двух пар (№ 11, № 15) в основном не имели различий по морфологическим признакам и срокам цветения, но содержали единичные растения, отличавшиеся по высоте и окраске цветков. Образцы восьми пар (№№ 1, № 3, № 5, № 6, № 8 – №10, № 13) незначительно отличались друг от друга как по морфологическим признакам, так и по срокам начала цветения. Четыре образца (пары № 4 и № 7), значительно различавшиеся в полевых условиях, в дальнейшем были исключены из анализа.

Все изученные пары образцов четко отличались друг от друга профилями RAPD-фрагментов, амплифицированных с помощью пяти использованных праймеров. Кроме того, у ряда образцов (пары № 6, № 8, № 14 или один из парных образцов № 9, № 10, № 13) отмечен полиморфизм при сравнении RAPD-спектров отдельных растений. В качестве дополнительного признака использовали электрофоретические спектры суммарных запасных белков, выделенных из 10 семян каждого образца.

Полностью однородными и идентичными по данным полевого и молекулярного анализов, а также электрофоретического анализа белков оказались образцы из пар № 2 и № 12. Они классифицированы как дублетные. Образцы к-81 и к-1199 (пара № 2) – очень старые формы кормового гороха из Канады. Интересно, что каждый образец этой пары был репродуцирован более 9 раз в разных условиях и остался однородным. К дублетам отнесены и кормовые местные образцы к-8331 и к-8465 из Греции (пара № 12), репродуцированные соответственно 3 и 7 раз, но при этом оставшиеся однородными и сохранившие свою идентичность по данным полевого анализа и электрофореза белков.

Сравниваемые образцы пар № 14, № 16 и № 17 также были абсолютно идентичны в полевых условиях, но по данным RAPD-анализа полностью однородными оказались только образцы пары № 17, а по данным электрофо-

ретического анализа белков – образцы пары № 16. Пара № 16 представлена образцами крупнозерного сорта 'Торре' из Канады, поступившего в коллекцию в результате экспедиционного сбора. Эти образцы пересевались всего 2-3 раза. Различия, выявленные с помощью двух праймеров из пяти использованных, указывают на то, что образцам свойственна скрытая молекулярная гетерогенность, и их можно считать дублетными.

Образцы пары № 17 (к-8689/к-8723), представляющие линию Б-1591 селекции Башкирского государственного педагогического института, претерпели соответственно 3 и 2 посева. Они обладают ценными качествами – неосыпаемостью семян и многоплодностью. Оба образца характеризовались идентичными профилями RAPD-фрагментов, но по результатам электрофоретического анализа белков семян оказались неоднородными. В выборке из 10 семян каждого образца присутствовали по два типа спектра, причем главный (обнаружен у 8 генотипов) и минорный типы спектра обоих образцов оказались идентичными. Можно предположить, что образцы являются дублетами, а их гетерогенность по составу электрофоретических компонентов белков связана с гибридным происхождением линии.

Образцы пары № 14 (к-8740/к-8873 из Германии) были абсолютно идентичны по морфологическим признакам, но согласно результатам анализа полиморфизма ДНК и белков представляли смесь нескольких генотипов. Так, в каждом из образцов идентифицированы спектры четырех типов, которые были общими, но встречались с разной частотой. Разные типы спектров имели отличия по компонентам вицилина, а также α - и β -полипептидов легумина (рис. 1). Очевидно, образцы к-8740 и к-8873 являются дублетными, но обладают скрытой гетерогенностью, которую необходимо учитывать при их репродукции во избежание утраты генетической целостности.

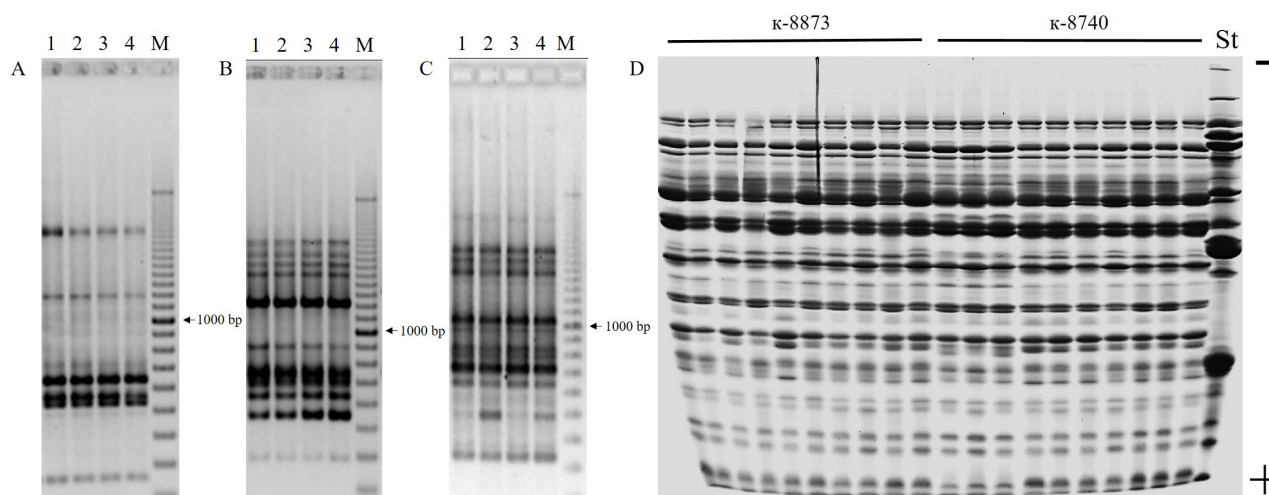


Рис. 1. Результаты попарного сравнения предполагаемых дублетных образцов *Pisum sativum* L. методами RAPD-анализа и электрофоретического анализа белков семян:

A, B, C – электрофореграммы RAPD-фрагментов, полученных при амплификации ДНК образцов к-8740 (номера дорожек 1, 2) и к-8873 (номера дорожек 3, 4) с праймерами OPA14 (**A**), OPA11 (**B**) и OPA16 (**C**); **D** – электрофореграмма запасных белков семян тех же образцов; **M** – маркер молекулярного веса ДНК 1kb Easy Load DNA Ladder (Sigma Aldrich); **St** – электрофореграмма запасных белков семян сои (сорт 'Светлая', к-9960)

Fig. 1. The results of pairwise comparison of putative duplicates among *Pisum sativum* L. accessions using RAPD analysis and electrophoretic analysis of seed proteins:

A, B, C – electrophoregrams of RAPD fragments obtained after amplifying DNA of *P. sativum* accessions k-8740 (lines 1 and 2) and k-8873 (lines 3 and 4) with primers OPA14 (**A**), OPA11 (**B**) and OPA16 (**C**); **D** – electrophoregram of seed storage proteins of the same accessions; **M** – 1kb Easy Load DNA Ladder (Sigma Aldrich); **St** – electrophoregram of seed storage proteins from soybean (cv. 'Svetlaya', k-9960)

К дублетным отнесены и образцы пары № 15 (к-8719/к-8760). Это крупноплодный, низкорослый овощной сорт 'Atlas' из Чехии. Образцы были идентичными по морфологическим признакам, за исключением единичной примеси в образце к-8760 (низкорослое растений с изумрудной окраской листа). Два праймера из пяти использованных выявили примесь в образце к-8760, а при электрофоретическом анализе белков единичная примесь обнаружена у образца к-8719. По результатам анализа белков примесь идентифицирована и в образце к-8760. Образец пересевали всего 3 раза. Можно предположить, что при одном из пересевов у к-8760 произошло незначительное засорение.

Образцы пары № 11 (к-8464/к-8472, кормовой высокорослый образец L 1771 из Швеции) оказались идентичными в полевых условиях (за исключением единичной примеси многоцветкового растения у к-8472). У этого образца также выявлена гетерогенность по спектрам RAPD-фрагментов и белков. Главные типы спектра были идентичными у обоих образцов, тогда как минорные четко отличались. У к-8464 отмечен полиморфизм в зоне низкомолекулярных компонентов легумина (вицилина), у к-8472 – в зоне высокомолекулярных компонентов. Можно предположить, что образцы были гетерогенными изначально.

Пара № 3 включала образцы к-70 и к-1198. Это местная зерновая форма, полученная с Омской сельскохозяйственной выставки. Образцы четко различались по высоте растений и срокам начала цветения (на четыре дня), по крупности семян. По данным электрофоретического анализа белков, образцы гетерогенные. Всего у к-70 выявлено четыре типа спектра, а у к-1198 – два, и только главный, количественно преобладающий тип спектра был общим. После поступления в коллекцию образцы пересевались неоднократно. Поскольку это форма местная, можно предположить, что образец изначально представ-

лял популяцию, после многократных пересевов какие-то биотипы были утрачены.

Результаты полевого и молекулярного анализов показали, что образцы, относящиеся к парам № 1 и № 5, были однородными, но сходство между ними отсутствовало. Кроме того, образцы пары № 1 (к-53/к-110) четко отличались по морфологии и срокам цветения.

Образцы пар № 10 и № 13 не только отличались по комплексу признаков, но и были гетерогенными. Так, образцы пары № 10 (к-3443/к-3798, сорт 'Thorsdag') сильно отличались по высоте (на 40 см) и срокам начала цветения, а также имели различающиеся профили RAPD-фрагментов и были гетерогенными по результатам электрофоретического анализа белков. Тем не менее отдельные генотипы у образцов 'Thorsdag' оказались одинаковыми как по данным RAPD-анализа, так и по данным анализа белков. Эти образцы пересевались более 10 раз в разных условиях и, вероятно, оказались сильно засоренными.

Гетерогенными и неидентичными оказались образцы пар № 6, № 8 и № 9. На рисунке 2 показаны продукты амплификации ДНК отдельных растений образцов из пары № 9: к-3125 (1–5) и к-3899 (6–10). Растения 1–5 имели розовые цветки, растения 6–10 различались по окраске цветков (6, 7, 8 имели светло-розовые цветки, 9, 10 – темно-малиновые). Как видно из рисунка 2, фрагменты, амплифицированные с праймерами OPA16 (рис. 2А) и OPC14 (рис. 2В), четко различались. Кроме того, в каждом из образцов выявлено по несколько типов электрофоретических спектров белков семян (см. рис. 2).

В результате проведенного анализа выявлены семь пар дублетных образцов (к-81/к-1199, к-8464/к-8472, к-8331/8465, к-8740/к-8873, к-8689/к-8723, к-8719/к-8760, к-8757/к-8825). Остальные образцы рассматриваются как неидентичные либо сильно засоренные в процессе репродукций.

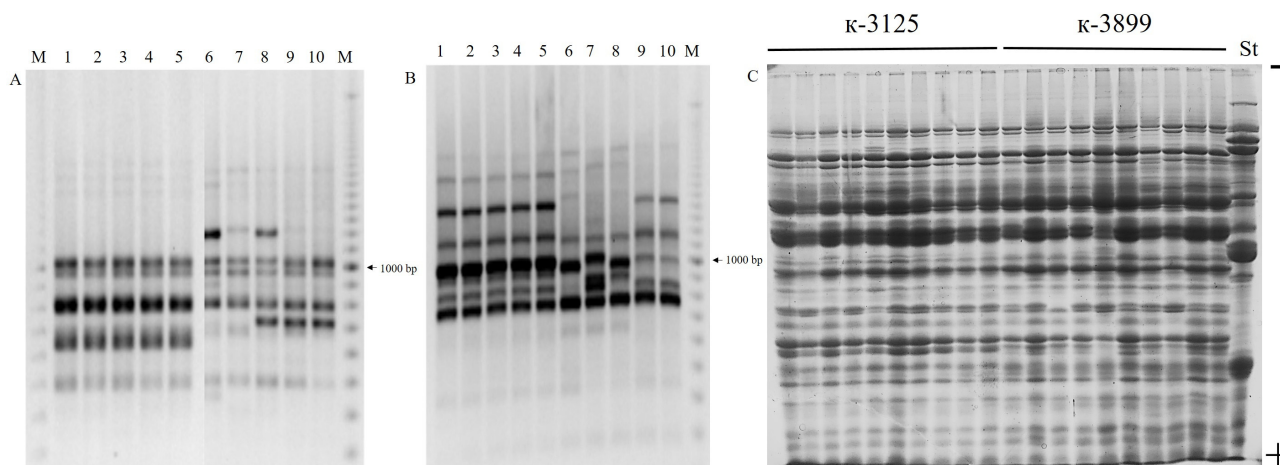


Рис. 2. Электрофореграммы RAPD-фрагментов, полученных при амплификации ДНК отдельных растений образцов *Pisum sativum* L. к-3125 (дорожки 1–5) и к-3899 (дорожки 6–10) с праймерами OPA16 (А) и OPC14 (В); растения 1–5 имели розовые цветки, растения 6–10 различались по окраске цветков (6, 7, 8 с розовыми цветками, 9, 10 – с малиновыми); С – электрофореграмма запасных белков семян тех же образцов; М – маркер молекулярного веса ДНК 1kb Easy Load DNA Ladder (Sigma Aldrich); St – электрофореграмма запасных белков семян сои (сорт 'Светлая', к-9960)

Fig. 2. Electrophoregrams of RAPD fragments obtained after amplifying DNA of individual plants of *Pisum sativum* L. accessions k-3125 (lines 1–5) and k-3899 (lines 6–10) with primers OPA16 (A) and OPC14 (B); plants 1–5 possessed pink flowers, plants 6–10 differed in flower color (6, 7, 8 with pink color, 9, 10 with dark red color); C – electrophoregram of seed storage proteins of the same accessions; M – 1kb Easy Load DNA Ladder (Sigma Aldrich); St – electrophoregram of seed storage proteins from soybean (cv. 'Svetlaya', k-9960)

Заключение

Для установления идентичности образцов гороха коллекции ВИР, определения дублицированных, гетерогенных и засоренных образцов эффективна комплексная оценка, включая характеристику растений в полевых условиях по морфологическим и фенологическим признакам, а также анализ амплифицированных фрагментов ДНК и электрофоретических спектров запасных белков семян.

References / Литература

- Andjelkovic V., Nikolic A., Kovacevic D., Mladenovic-Drinic S., Kravic N., Babic V. et al. Conserving maize in gene banks: Changes in genetic diversity revealed by morphological and SSR markers. *Chilean Journal of Agricultural Research*. 2018;78(1):30-38. DOI: 10.4067/S0718-58392018000100030
- Anisimova I.N., Alpatyeva N.V., Abdullaev R.A., Karabitsina Yu.I., Kuznetsova E.B. Screening of plant genetic resources with the use of DNA markers: basic principles, DNA isolation, PCR setup, agarose gel electrophoresis: (Guidelines). St. Petersburg: VIR; 2018. [in Russian] (Анисимова И.Н., Алпатьева Н.В., Абдуллаев Р.А., Карабицина Ю.И., Кузнецова Е.Б. Скрининг генетических ресурсов растений с использованием днк-маркеров: основные принципы, выделение ДНК, постановка ПЦР, электрофорез в агарозном геле (методические указания). Санкт-Петербург: ВИР; 2018).
- Bobkov S.V., Lazareva T.N. Band composition of electrophoretic spectra of storage proteins in interspecific pea hybrids. *Russian Journal of Genetics*. 2012;48(1):47-52. DOI: 10.1134/S1022795411110068
- Eggy E.E. Electrophoresis of seed proteins for the cultivar identification of high polymorphing crops on the example of Eastern galega (*Galega orientalis* Lam.). *Agrarian Russia*. 2015;(11):14-20. [in Russian] (Егги Э.Э. Электрофорез белков семян для сортовой идентификации высокополиморфных культур на примере козлятника восточного (*Galega orientalis* Lam.). *Аграрная Россия*. 2015;(11):14-20).
- Konarev A.V., Vvedenskaya I.O., Nasonova E.A., Perchuk I.N. Use of prolamine polymorphism in studying genetic resources of forage grasses. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 1995;42(13):197-209. DOI: 10.1007/bf02431253
- Konarev V.G. (ed.). Identification of varieties and registration of crop genetic diversity according to seed proteins (Identifikatsiya sortov i registratsiya genofonda kulturnykh rasteniy po belkam semyan). St. Petersburg: VIR; 2000. [in Russian] (Идентификация сортов и регистрация генофонда культурных растений по белкам семян / под ред. В.Г. Конарева. Санкт-Петербург: ВИР; 2000).
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-685. DOI: 10.1038/227680a0
- Lund B., Ortiz R., Skovgaard I.M., Waugh R., Andersen S.B. Analysis of potential duplicates in barley gene bank collections using re-sampling of microsatellite data. *Theoretical and Applied Genetics*. 2003;106(6):1129-1138. DOI: 10.1007/s00122-002-1130-y
- McCouch S.R., McNally K.L., Wang W., Hamilton R.S. Genomics of gene banks: A case study in rice. *American Journal of Botany*. 2012;99(2):407-423. DOI: 10.3732/ajb.1100385
- Naik V.G., Dandin S.B. Identification of duplicate collections in the mulberry (*Morus* spp.) germplasm using RAPD analysis. *The Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*. 2006;66(4):287-292. Palmé A.E., Hagenblad J., Solberg S.Ø., Aloisi K., Artemyeva A. SNP markers and evaluation of duplicate holdings of *Brassica oleracea* in two European genebanks. *Plants*. 2020;9(8):925. DOI: 10.3390/plants9080925
- Perchuk I.N., Konarev A.V., Loskutov I.G., Blinova E.V., Novikova L.Y., Horeva V.I., Kolodinska-Brantestam A. Protein markers, morphological and breeding-oriented characters in duplicate accession identification in the VIR (Russia) and Nordgen (Sweden) cultivated oat collections. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2016;177(3):82-93. [in Russian] (Перчук И.Н., Конарев А.В., Лоскутов И.Г., Блинова Е.В., Новикова Л.Ю., Хорева В.И., Колодинска-Брантестам А. Белковые маркеры, морфологические и селекционные признаки в идентификации дублетных образцов культурного овса в коллекциях ВИР (Россия) и Нордического генетического банка (Nordgen, Швеция). *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2016;177(3):82-93). DOI: 10.30901/2227-8834-2016-3-82-93
- Podyma W. Rye genetic resources in Europe. *Plant Breeding and Seed Science*. 2003;48(2/2):37-44.
- Pomortsev A.A., Lyalina E.V. Laboratory control of variety and variety purity of seeds and brewing barley commodity grain. *Grain Economy of Russia*. 2009;(6):29-39. [in Russian]. (Поморцев А.А., Лялина Е.В. Лабораторный контроль сортовой принадлежности и сортовой чистоты партий семян и товарного зерна пивоваренного ячменя. *Зерновое хозяйство России*. 2009;(6):29-39).
- Sidorova V.V., Kerv Yu.A., Konarev A.V. Identification of duplicate accessions in the sweet maize collection by means of zein electrophoresis. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(6):589-597. DOI: 10.18699/VJ20.652
- Singh N., Wu S., Raupp W.J., Sehgal S., Arora S., Tiwari V. et al. Efficient curation of genebanks using next generation sequencing reveals substantial duplication of germplasm accessions. *Scientific Reports*. 2019;9(1):650. DOI: 10.1038/s41598-018-37269-0
- Sisko M. Identification of hypothetical duplicate accessions of plums (*Prunus domestica* L.) within the Slovene plant gene bank collection using molecular markers. *Agricultura*. 2016;13(1-2):57-64. DOI: 10.1515/agricultura-2017-0007
- Sochor M., Jemelková M., Doležalová I. Phenotyping and SSR markers as a tool for identification of duplicates in lettuce germplasm. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*. 2019;55(3):110-119. DOI: 10.17221/68/2018-CJGPB
- Van Hintum T.J.L., Knüpffer H. Duplication within and between germplasm collections: I. Identifying duplication on the basis of passport data. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 1995;42(2):127-133. DOI: 10.1007/BF02539516
- Van Treuren R., de Groot E.C., Boukema I.W., van de Wiel, van Hintum Th.J.L. Marker-assisted reduction of redundancy in a genebank collection of cultivated lettuce. *Plant Genetic Resources*. 2010;8(2):95-105. DOI: 10.1017/S1479262109990220
- Virk P.S., Newbury H.J., Jackson M.T., Ford-Lloyd B.V. The identification of duplicate accessions within a rice germplasm collection using RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics*. 1995;90(7-8):1049-1055. DOI: 10.1007/BF00222920
- Vishnyakova M.A., Buravtseva T.V., Bulyntsev S.V., Burlyakova M.O., Semenova E.V., Seferova I.V., Aleksandrova T.G., Yankov I.I., Egorova G.P., Gerasimova T.V., Drugova E.V. Methodological guidelines. The VIR global collection of grain legume crop genetic resources: replenishment, conservation and studying (Metodicheskiye ukazaniya. Kolleksiya mirovykh geneticheskikh resursov zernovykh

bobovykh VIR: popолneniye, sokhraneniye i izucheniye). St. Petersburg: VIR; 2010. [in Russian] (Вишнякова М.А., Буравцева Т.В., Булынцев С.В., Бурляева М.О., Семенова Е.В., Сеферова И.В., Александрова Т.Г., Яньков И.И., Егорова Г.П., Герасимова Т.В., Другова Е.В. Методические указания. Коллекция мировых генетических ресурсов зерновых бобовых ВИР: пополнение, сохранение и изучение. Санкт-Петербург: ВИР; 2010).

Yndgaard F, Loskutov I.G., Solberg S.O., Kovaleva O.N., Kolodinska-Brantestam A., Svensson J.T. A low-cost method

for the detection of duplicate holdings among genebank accessions. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2016;177(4):18-27. [in Russian] (Индгаард Ф., Лоскутов И.Г., Солберг С.О., Ковалева О.Н., Колодинска-Брантестам А., Свенссон Я.Т. Низкозатратный метод для определения дублетов коллекции в генных банках. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2016;177(4):18-27). DOI: 10.30901/2227-8834-2016-4-18-27

Информация об авторах

Елена Викторовна Семенова, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44, e.semenova@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2637-1091>

Владимир Вячеславович Васипов, специалист, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44, vl.vasipov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-3829-7714>

Ирина Николаевна Анисимова, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44, irina_anisimova@inbox.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0474-8860>

Information about the authors

Elena V. Semenova, Cand. Sci. (Biology), Leading researcher, Department of Genetic Resources of Legume Crops, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, e.semenova@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2637-1091>

Valdimir V. Vasipov, Research Assistant, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, vl.vasipov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-3829-7714>

Irina N. Anisimova, Dr. Sci. (Biology), Leading Researcher, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, irina_anisimova@inbox.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0474-8860>

Вклад авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Contribution of the authors: the authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests: the authors declare no conflicts of interests.

Статья поступила в редакцию 30.04.2021; одобрена после рецензирования 14.12.2021; принята к публикации 28.02.2022.

The article was submitted on 30.04.2021; approved after reviewing on 14.12.2021; accepted for publication on 28.02.2022.