

К ПРОБЛЕМЕ ДИНАМИКИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА У СОРТОВ ГОРОХА (*Pisum sativum* L.) ОТЕЧЕСТВЕННОЙ СЕЛЕКЦИИ

Синюшин А.А.^{1*}, Анисимова Д.А.²

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра генетики, 119234 Россия, г. Москва, Ленинские горы, д.1, стр.12; ✉ *asinjushin@mail.ru

² ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, 11123 Россия, г. Москва, ул. Новогиреевская, д.3а.

Актуальность. В ходе селекции различных сельскохозяйственных культур существует риск утраты (эрозии) генетического разнообразия, связанный в первую очередь с использованием ограниченной части генофонда для выведения новых сортов. Отечественные сорта гороха посевного (*Pisum sativum* L.) имеют высокий уровень фенотипического разнообразия, однако динамика полиморфизма на уровне ДНК не изучена. Подобное исследование актуально с точки зрения перспектив дальнейшей селекции культуры и планирования мер по сохранению разнообразия в коллекциях генетических ресурсов. **Материалы и методы.** В анализ включены: 18 отечественных сортов гороха, созданных до 1991 г.; 22 сорта, созданных в более поздние годы; 40 зарубежных сортов; 7 образцов, представляющих маркерные линии и некультурные формы гороха. Этот материал был описан по ряду морфологических признаков, а также генотипирован с использованием различных ДНК-маркеров (14 CAPS на основе генов ядерной ДНК, 8 ядерных микросателлитных маркеров, а также два неядерных маркера). Уровень разнообразия оценивали как среднее значение коэффициента Жаккара от попарного сравнения сортов внутри группы. Дополнительно провели сравнение опубликованных характеристик сортов, включенных в Госреестр в 1994–2019 г. **Результаты.** На фенотипическом уровне отмечено повышение уровня разнообразия у зерновых сортов и снижение – у овощных. При оценке полиморфизма ДНК выявлена сходная, но гораздо менее выраженная тенденция. Отмечен низкий уровень внутрисортного рестрикционного полиморфизма CAPS-маркеров и разнообразия аллелей SSR-маркеров. Уровень разнообразия среди зарубежных сортов в основном не превышал значений, установленных для отечественных сортов. Исключение составил уровень фенотипического полиморфизма овощных сортов, который у зарубежных сортов оказался выше, чем у отечественных. Характеристики продуктивности у включенных в Госреестр сортов раннего (1995–2000) и позднего (2016–2019) периодов селекции не различаются значимо. **Выводы.** Среди российских сортов гороха нет выраженного сокращения генетического разнообразия. Достоверной динамики увеличения значений основных хозяйственно-ценных признаков не выявлено.

Ключевые слова: коллекция генетических ресурсов, молекулярные маркеры, разнообразие, эрозия.

Прозрачность финансовой деятельности/Financial transparency

Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах./The authors have no financial interest in the presented materials or methods.

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/10.30901/2658-6266-2020-1-03>

Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы./The journal's opinion is neutral to the presented materials, the author, and his or her employer

Все авторы одобрили рукопись/All authors approved the manuscript

Конфликт интересов отсутствует/No conflict of interest

ON THE PROBLEM OF GENETIC POLYMORPHISM DYNAMICS IN RUSSIAN CULTIVARS OF GARDEN PEA (*Pisum sativum* L.)

Sinjushin A.A.^{1*}, Anisimova D.A.²

¹ Department of Genetics, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, Moscow 119234, Russia; ✉ *asinjushin@mail.ru

² Central Research Institute of Epidemiology of the Federal Service on Customers Rights Protection and Human Well-being Surveillance, 3a, Novogireevskaya St., Moscow 11123, Russia.

Background. Breeding new crops is associated with a risk of decrease (erosion) in genetic polymorphism. It is associated mainly with the fact that only a limited range of pre-existing cultivars and forms are used for breeding new cultivars. The Russian cultivars of garden pea (*Pisum sativum* L.) are characterized by a high level of phenotypic variability, while dynamics of polymorphism at DNA level is poorly investigated. Such an investigation is relevant from the point of view of the prospects for further breeding of the crop, and for planning strategies of polymorphism conservation in germplasm collections. **Materials and methods.** The material used in the study included 18 Russian cultivars bred before 1991, 22 Russian cultivars created later, 40 foreign cultivars, as well as 7 marker lines and wild-growing accessions. These lines were phenotyped and genotyped using DNA markers (14 CAPS, 8 SSR, one mitochondrial and one chloroplast). Variability level was measured as an average Jaccard coefficient resulting from pairwise comparison within each group. Additionally, we analyzed the published characteristics of cultivars included in the State Register in 1994–2019. **Results.** At the phenotypic level, the variability of grain cultivars increased, while a decrease was recorded for vegetable cultivars. A comparison with foreign cultivars has shown that their polymorphism was similar to those of Russian cultivars, except for the vegetable cultivars which are phenotypically less polymorphic than foreign ones. The DNA polymorphism demonstrated a similar tendency, although to a lesser extent. A low level of within-cultivar polymorphism was found. Productivity characteristics of cultivars included into the State Register in the early period (1995–2000) and those included later (2016–2019) do not differ significantly. **Conclusions.** There is no clear indication of genetic erosion in Russian cultivars of pea. We also found no reliable increase in the basic agriculturally important characters within the two decades.

Key words: germplasm collection, molecular markers, variability, erosion.

Для цитирования: Синюшин А.А., Анисимова Д.А. К проблеме динамики генетического полиморфизма у сортов гороха (*Pisum sativum* L.) отечественной селекции. *Биотехнология и селекция растений*. 2020;3(1):13–23. DOI: 10.30901/2658-6266-2020-1-03

For citation: Sinjushin A.A., Anisimova D.A. On the problem of genetic polymorphism dynamics in Russian cultivars of garden pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Biotechnology and Breeding*. 2020;3(1):13–23. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2020-1-03

ORCID:

Sinjushin A.A. <https://orcid.org/0000-0003-4008-9460>

УДК 575.174:575.22:631.527.1

Поступила в редакцию: 15.03.2020

Принята к публикации: 24.04.2020

Введение

Горох посевной (*Pisum sativum* L.) – важная сельскохозяйственная культура, одна из древнейших и до настоящего времени наиболее значимая в умеренных широтах. Целенаправленная селекция гороха ведется не менее двух веков по всему миру. Помимо хозяйственной ценности, горох представляет собой интересную модель с точки зрения эволюционного процесса, когда искусственный отбор привел к формированию огромного числа различных внутривидовых форм.

Одним из возможных последствий селекции является сокращение (эрозия) генетического разнообразия, уже продемонстрированное для ряда культур (Altukhov, 2004). В качестве факторов, определяющих уровень полиморфизма в генофондах сельскохозяйственных растений, можно назвать следующие:

1. Сокращение уровня генетического разнообразия исходного материала при создании новых сортов. Большинство новых сортов создается на основе уже существующих. Мутации генов хозяйственно ценных признаков возникают *de novo* в генотипе ранее созданных сортов (Altukhov, 2004).

2. Повышение уровня разнообразия за счет скрещивания генетически несходных форм.

3. Генетический дрейф, связанный с репродукцией в коллекции небольшого числа индивидов (Leino et al., 2013; Sinjushin, 2015).

4. Возникновение спонтанных мутаций при хранении и размножении семян (Cieslarová et al., 2011a).

Исследования динамики генетического разнообразия гороха были выполнены в нескольких странах. В Чехии за 20-40 лет репродукции у одних образцов внутрисортное аллельное разнообразие микросателлитных маркеров уменьшилось вплоть до фиксации единственного аллеля, у других, напротив, увеличилось (Cieslarová et al., 2011b). На протяжении длительного времени селекции существенной генетической эрозии не было выявлено (Cieslarová et al., 2012). На примере 40 шведских сортов полевого гороха (*P. sativum* subsp. *sativum* var. *arvense* Poir.) показано, что более чем за 100 лет возделывания различия по микросателлитным маркерам у современных сортов стали более существенными, чем в XIX в., но разнообразие аллелей уменьшилось (Leino et al., 2013). На снижение уровня полиморфизма в ходе селекции указывают и Varanger et al. (2004), изучившие генотипы 148 сортов гороха по ДНК-маркерам и изоферментным локусам.

В России процесс создания новых сортов гороха идет очень активно; в Государственный реестр селекционных достижений на 2019 г. внесено более 170 сортов, преимущественно созданных после 1990 г. (State Register, 2019). В их родословных зачастую встречаются одни и те же

исходные формы, что, безусловно, сопряжено с риском снижения генетического полиморфизма. В то же время фенотипически новые сорта довольно разнообразны. В частности, при их выведении активно используются новые листовые морфотипы (Zelenov et al., 2018).

Целью настоящей работы стал анализ динамики генетического разнообразия у сортов гороха, созданных в России.

Материалы и методы

Материалом исследования послужили 80 сортов гороха отечественной и зарубежной селекции, а также 3 маркерные линии и 4 образца, представляющие неокультурные формы гороха (таблица 1). Образцы были в разное время получены из коллекции кафедры генетики МГУ, ФИЦ ВИГРР (ВИР), ФГБНУ ФНЦО, ФГБНУ ФНЦ ЗБК, ГНУ ВНИИСХМ, ФГБНУ ФИЦ «Немчиновка», Института ботаники НАН Республики Армения, РУП НПЦ НАН Беларуси по земледелию, Institut za Ratarstvo i Povrtarstvo (Сербия), Institute of Forage Crops (Болгария), John Innes Centre (Великобритания).

Для датировки сорта использовали год создания или внесения в Государственный реестр селекционных достижений. «Старыми» условно назвали сорта отечественной селекции, созданные до 1991 г., «новыми» – после 1991 г. Сорта зарубежной селекции, включенные в сравнение, представляли достаточно протяженный период времени (с конца XIX в. по настоящее время).

Фенотипические описания выполняли в однорядном посеве на опытном участке (Звенигородская биостанция МГУ, Московская область) в соответствии с дескриптором (The International COMECON..., 1981), адаптированным для данной работы (приложение 1/Supplement 1)¹. Основное внимание было уделено морфологическим признакам, физиологические характеристики и устойчивость к патогенам не учитывали. Также были добавлены некоторые характеристики, не вошедшие в упомянутый дескриптор. Массу семян определяли с помощью электронных весов ER-60A (A&D Company Ltd.).

Для выделения ДНК материал собирали в полевых условиях или проращивали семена в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге. ДНК выделяли модифицированным СТАВ-методом (Torres et al., 1993) с незначительными модификациями. Концентрацию ДНК определяли на спектрофотометре NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific). Концентрацию ДНК в растворе довели до 20 нг/мкл. Препараты ДНК хранили при –20°C.

Для выявления полиморфизма использовали CAPS- и SSR-маркеры на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР). Были выбраны локусы III и V групп сцепления, наиболее богатых удобными для генотипирования маркерами. Хотя выбранные ядерные CAPS-маркеры связаны с последовательностями генов, кодирующих бел-

¹ Supplementary materials 1 and 2 are available in the online version of the paper: <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2020-1-03>

ки (Kononov et al., 2005), эти гены не ассоциированы с известными хозяйственно ценными признаками и, следовательно, нейтральны с точки зрения искусственного отбора.

Таблица 1. Растительный материал, использованный в работе
Table 1. Plant material used in the study

Направление использования End-use		
Овощные Vegetable	Зерновые Grain	Прочие Others
Старые (до 1991 г.) Before 1991		
Адагумский, Акация, Альфа, Борец, Виола, Жегалова 112, Изумруд, Первенец (ФГБНУ ФНЦО), Позднеспелый мозговой улучшенный, Ранний грибовский 11, Совершенство 65-3	Аист, Немчиновский 766, Рамонский 77, Татьяна, Фитотрон 1, Флагман	Малиновка
Новые (с 1991 г.) After 1991		
Амброзия, Великан, Викинг, Исток, Каира, Крейсер, Первенец (Ленинградская обл.), Сенатор, Совинтер 1, Фрагмент, Чика	Батрак, Демон, Мультик, Немчиновский 50, Немчиновский 100, Норд, Орел, Орлан, Софья, Спартак	Флора 2
Зарубежные Foreign		
Hurst Green Shaft, Kelvedon Wonder, Puget (Великобритания); Premium (Чехия); Янтар (Украина); Cao Yan, Lu Zhun, Pin Wan (Китай); Sparkle, Ранний зеленый (США); Juwel (Германия); Rondo (Голландия); Anwend	Крепыш, Топаз, Труженик (Украина); Белорусский неосыпающийся, Белус, Миллениум, Зилга (Беларусь); Konto, Madonna, Rosakrone (Германия); Alaska, Filby, Iceberg (Великобритания); Eiffel, Frisson, Roi des Gourmands (Франция); Finale (Голландия); Smaragd (Чехия); Kaliski (Польша); Torsdag (Швеция); Капитал	Зазерский усатый, Игуменский кормовой, Кореличский кормовой, Червенский 235 (Беларусь); Wasata fioletowa (Польша); Mummy pea (Великобритания)
Маркерные линии и дикорастущие формы Marker lines and wild-growing forms		
WL1238, SGE, Slow, <i>P. sativum</i> subsp. <i>elatius</i> (M.Bieb.) Asch. & Graebn. (J164), <i>P. sativum</i> subsp. <i>elatius</i> (Сербия: Ćupina et al., 2011), <i>P. sativum</i> subsp. <i>sativum</i> var. <i>arvensis</i> (Армения), <i>P. sativum</i> subsp. <i>sativum</i> var. <i>arvensis</i> (J12423), <i>P. fulvum</i> Sibth. & Sm. (J12)		

Были использованы следующие CAPS-маркеры (приведены название маркера/эндонуклеаза рестрикции и источник последовательностей праймеров): *Adh1/HaeIII*, *Adh1/TaqI*, *CipPor/Ksp22I*, *CipPor/RsaI*, *Pepc/RsaI*, *Rnp33/HpaII*, *Rnp33/RsaI*, *Sodmt/Ksp22I*, *TubA1/TaqI*, *TubA1/HinfI* (подробные характеристики генов, их продуктов и аллелей

CAPS-маркеров см. в работах: Kononov et al., 2005, Kononov, 2006), *Fbpp/HpaII*, *PsFAS1/TaqI* (Sinjushin et al., 2008). Две комбинации праймеров были подобраны в ходе настоящей работы: *Uni* (5'-tctctactgcaccatctc, 5'-ctacattcctcccgccat), *PsCLV3* (5'-ctgttctttctgttcttcttag, 5'-caatattctacasaasaacaassa). Полиморфизм рестрикционных

фрагментов *Uni* и *PsCLV3* выявляли с помощью эндонуклеаз *Bst4CI* и *AluI* соответственно. Для поиска полиморфизма митохондриальной и пластидной ДНК использовали соответственно CAPS-маркеры *cox1/PsiI* и *rbcL/AspLEI* (Kosterin, Bogdanova, 2008). У нескольких сортов для ядерных маркеров в 2-3 повторностях (в том числе и с разными образцами ДНК) не удалось добиться устойчивой амплификации фрагмента ожидаемой длины; генотипы данных линий по этим локусам не были учтены в дальнейшем анализе.

Помимо CAPS, использовали микросателлитные (SSR) маркеры III и V групп сцепления AA355, AA374, AA399, AA491, AB92, AB146, AB83 и AD79 (Loridon et al., 2005).

Амплификацию проводили в приборе MC2+ (ДНК-Технология). Конечный объем реакционной смеси составлял 25 мкл и содержал 5 мкл раствора ДНК (20 нг/мкл), 5 мкл готовой смеси для амплификации ScreenMix (Evrogen), прямой и обратный праймеры в концентрации 0,2-0,5 мкмоль/л и воду высокой очистки (Milli-Q) до 25 мкл. Программа амплификации имела следующий вид: начальная денатурация (94°C, 2,5'), 5 циклов начальной элонгации (24°C, 0,5'; T_m +2°C, 0,5'; 70°C, 1,5'), 35 циклов элонгации (93°C, 20"; T_m, 0,5'; 71,5°C, 1'), конечная элонгация (72°C, 3'). Температуру отжига (T_m) подбирали и оптимизировали для каждой пары праймеров.

Для выявления полиморфизма CAPS-маркеров амплификат обрабатывали эндонуклеазами рестрикции (СибЭнзим) в соответствии с протоколом производителя.

Фракционирование продуктов рестрикции проводили путем горизонтального электрофореза в 1,5–3% агарозном геле (Amresco) с окрашиванием бромистым этидием. Результат амплификации SSR-маркеров определяли с помощью системы капиллярного гель-электрофореза QIAxcel (QIAGEN).

Для оценки динамики хозяйственно-ценных признаков у сортов гороха использовали данные из ежегодного издания «Характеристики сортов растений, впервые включенных в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию» (1994-2019).

Полученные данные обрабатывали с помощью MS Office Excel (Microsoft) и Statistica 12 (Statsoft).

Результаты и обсуждение

Результаты работы характеризуют выбранную для исследования коллекцию сортов, которая, как мы считаем, является репрезентативной. Есть основания полагать, что полученные данные отражают тенденции, характерные для отечественных сортов гороха в целом.

Динамика фенотипического разнообразия

В качестве меры попарного сходства между образцами использовали коэффициент Жаккара (K_j), равный отноше-

нию числа различающихся проявлений признака (кодов дескриптора или аллелей) к числу общих у двух образцов проявлений. Отмечено более низкое значение K_j у новых сортов по сравнению со старыми (см. табл. 2), т.е. фенотипически новые сорта более разнообразны. У овощных сортов ситуация противоположная (см. табл. 2).

Различные типы детерминантного роста побега – «самарский» (*deh*; здесь и далее приведено обозначение мутации) и «московский» (*det*) – встречаются только у отечественных сортов (приложение 2/Supplement 2). Ни у одного зарубежного сорта не отмечено срастания семяножки с семенной кожурой (*def*). Для 5 признаков из 16 изученных у российских сортов отмечены морфологические мутации, не встречающиеся ни у советских, ни у зарубежных образцов. Для ряда российских сортообразцов характерны необычные листовые морфотипы – «хамелеон» (*af uni^{mac}*), «акациевидный» (*tl*).

По сравнению со старыми зарубежными (Mummy pea, Rosakrone) и старыми отечественными (не вошедший в выборку Штамбовый 2) сортами, у современных сортов не встречается фасциация побега (*fa*). Сочетание этой аномалии с «московским» типом детерминантного роста (*det*) – морфотип «люпиноид» – рассматривают как перспективное для селекции (Zelenov, 2015), хотя районированных сортов этого морфотипа по нашим данным еще нет.

Можно констатировать увеличение разнообразия фенотипов современных российских сортов гороха по сравнению с советскими. Некоторые сорта несут значительное количество рецессивных морфологических мутаций, что нехарактерно для зарубежных сортов. Например, зерновой сорт Баграк (ФГБНУ ФНИЦ ЗБК) гомозиготен по пяти мутациям, затрагивающим гены морфологических признаков, и характеризуется белыми цветками (*a*), безлисточковостью (*af*), неосыпающимися семенами (*def*), «самарским» типом детерминантного роста побега (*deh*) и укороченными междоузлиями (*le*).

Фенотипическое разнообразие новых отечественных зерновых сортов, выраженное через K_j, сопоставимо с уровнем, установленным для зарубежных сортов (см. табл. 2). Как старые, так и, еще в большей степени, новые овощные сорта фенотипически менее разнообразны, чем зарубежные (см. табл. 2).

Динамика генетического разнообразия, выявляемая с помощью CAPS-маркеров ядерной ДНК

Все 14 ядерных CAPS-маркеров обнаружили полиморфизм: в пределах изученной коллекции было найдено в среднем 2,4 аллеля на локус (рис. 1, приложение 2/Supplement 2). Такой уровень полиморфизма ниже обнаруженного ранее для тех же маркеров (Konovalov et al., 2005). Это, вероятно, объясняется тем, что в процитированной статье была описана коллекция меньшего размера, но включающая 5 маркерных линий.

Значения K_j приведены в таблице 2. Результаты анализа сходны с тем, что было получено для морфологических признаков, т.е. разнообразие зерновых сортов увеличилось, а овощных – уменьшилось. Однако тенденция

выражена гораздо более умеренно, а средние значения K_j внутри групп «все старые сорта» и «все новые сорта» близки (соответственно 0,41 и 0,42).

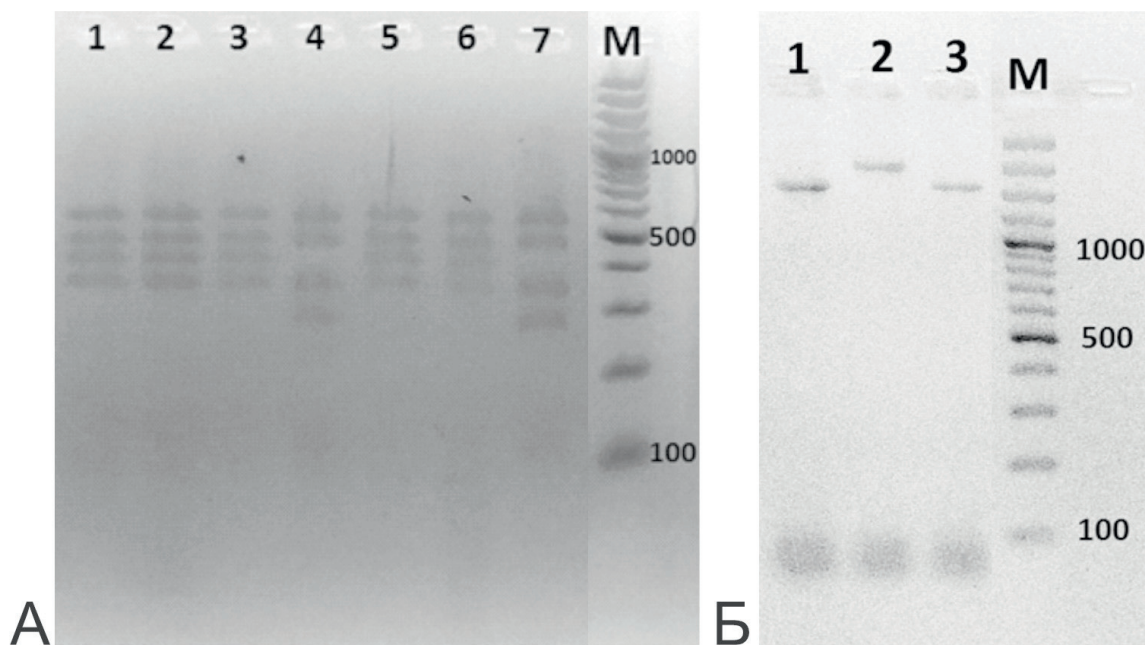


Рис. 1. Примеры полиморфизма CAPS-маркеров (результаты электрофореза в 2%-ном агарозном геле). А – *Pepc/RsaI*: 1-3, 5, 6 – аллель «1»; 4, 7 – аллель «2» (сорта Мультик, Аист, Софья, Батрак, Premium, Демон, Орлан соответственно). Б – *Sodmt/Ksp22I*: 1, 3 – аллель «1»; 2 – аллель «2» (сорта Флагман, Filby и Викинг). М – маркер молекулярной массы (указаны длины фрагментов, пн).

Fig. 1. Examples of CAPS polymorphism (electrophoresis in 2% agarose gel). А – *Pepc/RsaI*: 1-3, 5, 6 – allele «1»; 4, 7 – allele «2» (cvs. Multik, Aist, Sofya, Batrak, Premium, Demon, Orlan, respectively). Б – *Sodmt/Ksp22I*: 1, 3 – allele «1»; 2 – allele «2» (cvs. Flagman, Filby, Viking). М – molecular weight marker (fragment lengths are denoted in bp).

Корреляция между значениями K_j при сравнении одних и тех же сортов по морфологическим и молекулярным маркерам оказалась положительной, но слабой. Для 100 попарных сравнений в группе старых сортов коэффициент корреляции Спирмена R между морфологическими и молекулярными маркерами составил 0,151 ($p > 0,05$), для 100 сравнений в группе новых сортов $R = 0,218$ ($p < 0,05$).

Можно заключить, что среди новых сортов отечественной селекции (с 1991г.) показатель генетического сходства остался практически на том же уровне,

что и у старых сортов. Зерновые сорта оказались более гетерогенными, чем овощные, что согласуется с их большим фенотипическим разнообразием и ранее полученными данными для SSR-маркеров (Dribnokhodova, Gostimsky, 2009). Уровень CAPS-полиморфизма зарубежных сортов, выраженный через K_j , ненамного отличается от значений, установленных для отечественных сортов (см. табл. 2). Интересно, что и среди зарубежных сортов полиморфизм среди овощных оказался менее выраженным, чем в группе зерновых (см. табл. 2).

Таблица 2. Значения коэффициента Жаккара при попарном сравнении сортов.

Table 2. Jaccard coefficients for pairwise comparison of cultivars.

Для морфологических признаков Based on morphological traits		
	Зерновые Grain	Овощные Vegetable
Зерновые	0,33 – 0,64 – 0,87	0,27 – 0,47 – 0,75
	0,27 – 0,48 – 0,75	0,17 – 0,33 – 0,56
	0,23 – 0,49 – 0,88	0,28 – 0,47 – 0,68
Овощные		0,47 – 0,64 – 0,87
		0,47 – 0,67 – 0,87
		0,23 – 0,56 – 1,00
Для CAPS-маркеров Based on CAPS-markers		
	Зерновые	Овощные
Зерновые	0,17 – 0,40 – 0,63	0,17 – 0,41 – 0,75
	0,22 – 0,39 – 0,73	0,17 – 0,40 – 0,75
	0,12 – 0,42 – 0,75	0,12 – 0,41 – 0,87
Овощные		0,17 – 0,44 – 0,86
		0,24 – 0,48 – 0,86
		0,22 – 0,47 – 0,87

Примечание: Данные представлены в виде минимальное – среднее – максимальное. Верхняя строка ячейки относятся к старым отечественным сортам, средняя к новым, нижняя к зарубежным.

Note: Data are given as minimum – average – maximum K_j . In each cell, the upper set of values corresponds to the old national cultivars, the middle to the new ones, and the lower to foreign cultivars.

Уровень внутрилинейного полиморфизма

Для использования образцов из коллекции генетических ресурсов необходимо знать степень генетической однородности материала. В ходе работы мы провели оценку внутрилинейного полиморфизма у двух сортов – Виола (14 растений) и Викинг (12) – и трех неокультуренных образцов: *P. sativum* var. *arvense* из Армении (12), *P. sativum* subsp. *elatus* из Сербии (8) и *P. sativum* subsp. *elatus* Л64 (9). Были использованы два CAPS-маркера (*Pepc/RsaI* и *Sodmt/Ksp22I*). Результаты представлены в таблице 3.

Ранее в нашей лаборатории также была проведена

оценка внутрилинейного полиморфизма в наборе образцов гороха с использованием SSR-маркеров (Dribnokhodova, 2009; Sinjushin, 2015). Полученные результаты также продемонстрировали низкий уровень внутрилинейного полиморфизма у всех образцов (в среднем доля полиморфных маркеров равна 4,84%) (Dribnokhodova, 2009). В целом SSR-маркеры являются значительно более вариабельными, чем CAPS. Наблюдаемая в случае микросателлитных локусов внутрилинейная гетерогенность может быть связана не только с сохранением изначальной неоднородности сорта, но и с мутациями *de novo* (Cieslarová et al., 2011a). Возможность сокращения изначальной генетической гетерогенности образца за время его поддержания в коллекции уже была показана для гороха (Cieslarová et al., 2011b; Sinjushin, 2015).

Таблица 3. Частоты аллелей двух CAPS-маркеров у различных образцов гороха. Нумерация аллелей присвоена условно.

Table 3. Allele frequencies of two CAPS markers in different pea accessions. Alleles are numbered arbitrarily.

Маркер/ Рестриктаза Marker/ Endonuclease	Аллель Allele	Образец Accession				
		Виола	Викинг	<i>P. sativum</i> var. <i>arvense</i> Poir. (Армения)	<i>P. sativum</i> subsp. <i>elatius</i> (M.Bieb.) Asch. & Graebn. (Л164)	<i>P. sativum</i> subsp. <i>elatius</i> (M.Bieb.) Asch. & Graebn. (Сербия)
<i>Pepc/RsaI</i>	1	92,86%	100%	100%	100%	0%
	2	7,14%	0%	0%	0%	100%
<i>Sodmt/Ksp22I</i>	1	100%	100%	91,67%	88,89%	0%
	2	0%	0%	0%	0%	100%
	3	0%	0%	8,33%	11,11%	0%

Проблема интерпретации результатов фрагментного анализа и динамика разнообразия SSR-маркеров

Для анализа микросателлитных маркеров был применен фрагментный анализ, дающий оценку длины фрагментов в парах нуклеотидов. Однако при проведении нескольких ПЦР с одной и той же комбинацией праймеров и одним и тем же образцом ДНК неоднократно имела место неполная воспроизводимость результатов. Установленная с помощью системы QIAxcel длина фрагментов различалась на несколько нуклеотидов между повторностями.

Подобное явление уже было отмечено в литературе. Так, капиллярный электрофорез был признан неудовлетворительным для точного генотипирования малярийных комаров по микросателлитным маркерам (Manrique et al., 2015). Различия в 3-4 пн могут быть связаны как с погрешностями метода, так и с внутрисортным аллельным полиморфизмом. Чтобы исключить второе, мы провели несколько повторных тестов с одними и теми же образцами ДНК, и в ряде случаев различия сохранялись. Это делает невозможным подсчет K_r , как это было сделано

для CAPS-маркеров.

Так как основная цель работы заключалась в сравнении встречаемости аллелей SSR-маркеров в двух группах сортов, а не точном различении аллелей, мы построили вариационные ряды по длине фрагмента, установленной с помощью системы QIAxcel (рис. 2). В тех случаях, когда для одного и того же образца было получено несколько различных значений, использовали среднюю оценку. Для двух маркеров (AA374 и AA399) полученный ряд оказался непрерывным и, вероятно, соответствующим единственному аллелю (рис. 2, Б). Для прочих локусов распределение длин амплифицированных фрагментов указывает на несколько аллелей (рис. 2, А). Некоторые редкие аллели встречаются только у некультурных форм или маркерных линий – например, «легкий» (около 318 пн) аллель маркера АВ83 или «тяжелый» (423 пн) аллель маркера АВ146 (рис. 2). В остальных случаях можно констатировать, что все возможные значения длин фрагментов отмечены и у советских (до 1991 г.), и у российских (с 1991 г.), и у зарубежных сортов. Таким образом, аллельное разнообразие проанализированных микросателлитных локусов на протяжении времени сохраняется неизменным у отечественных сортов и сопоставимо с разнообразием зарубежных сортов.

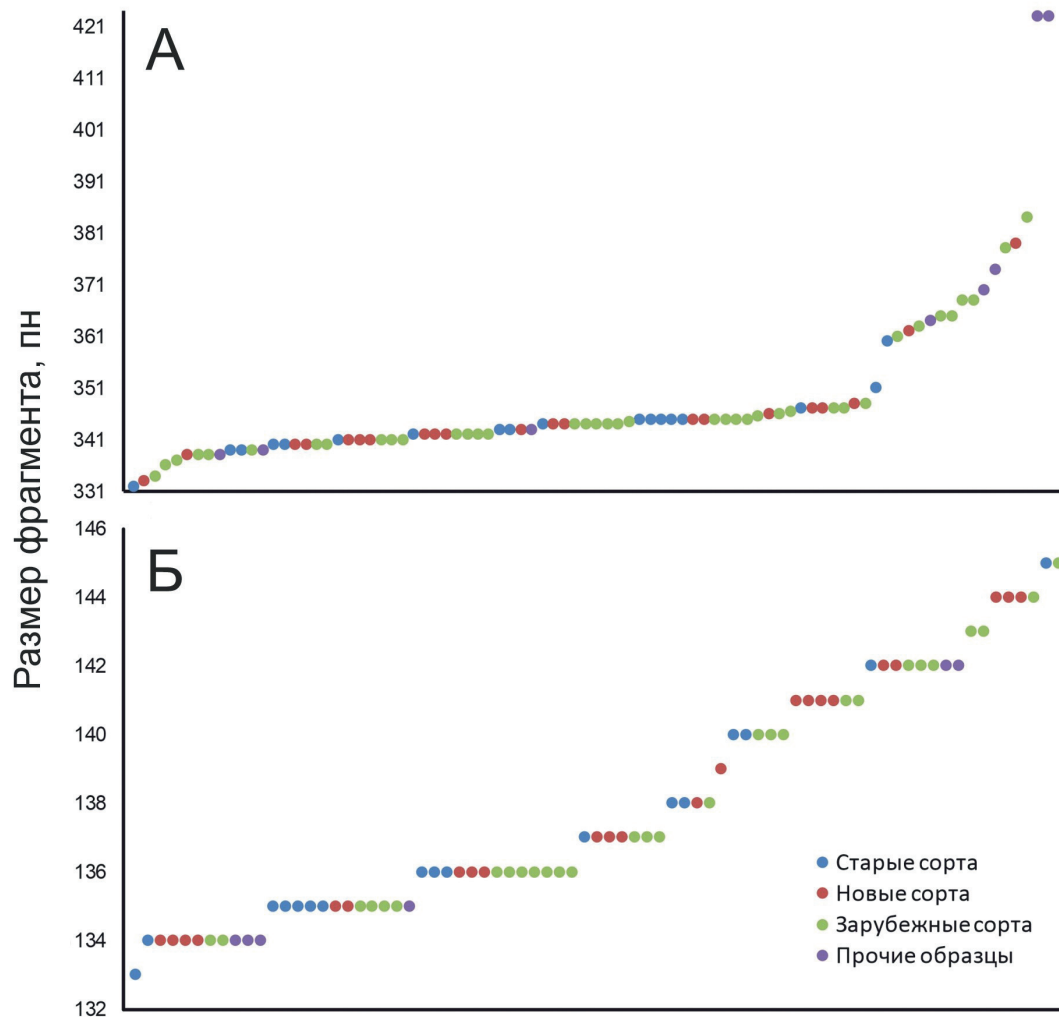


Рис. 2. Вариационные ряды для длин фрагментов (пн), установленных для SSR-маркеров AB146 (А) и AA374 (Б) с помощью системы QIAxcel. Образцы гороха расположены по оси абсцисс в порядке возрастания размера амплифицируемого фрагмента.

Fig. 2. The order statistics for fragment length (bp) estimated for AB146 (A) and AA374 (B) SSR markers using the QIAxcel system. Pea accessions are distributed along the x-axis in order of the increasing amplified fragment size.

Единообразие исследованных образцов по хлоропластному и митохондриальному маркерам

У большинства образцов, включая *P. sativum* subsp. *elatius* из Сербии, сайты рестрикции в неядерных маркерах отсутствовали. Два образца, имевшие отличающиеся от прочих аллели митохондриального (*cox1/PsiI*) и пластидного (*rbcL/AspLEI*) маркеров, Л64 и Л12, относятся соответственно к другому подвиду (*P. sativum*

subsp. *elatius*) и другому виду (*P. fulvum*). Эти результаты хорошо согласуются с выводом работы (Kosterin, Bogdanova, 2008) о том, что для окультуренных форм гороха характерно отсутствие сайтов рестрикции в неядерных маркерах *cox1/PsiI* и *rbcL/AspLEI*. То обстоятельство, что образец *P. sativum* subsp. *elatius* из Сербии обладает тем же генотипом, что и окультуренные формы, также не противоречит современным представлениям о парафилетическом характере этого подвида (Kosterin, Bogdanova, 2008).

Динамика хозяйственно-ценных признаков у отечественных сортов

Наибольший практический интерес связан с изменением продуктивности и иных хозяйственно значимых признаков в ходе селекции. Сведения, приведенные в ежегодном издании «Характеристики сортов растений, впервые включенных в Государственный реестр...», неоднородны в разные годы и для сортов различных направлений использования. Так, для зерновых сортов обычно приведены средняя и максимальная продуктивность, в то время как у овощных сортов во многих случаях продуктивность приведена как интервал от наименьшего до наибольшего значения. В таких случаях был проанализирован максимальный показатель. Кроме того, нецелесообразно обобщать результаты испытания для сортов разных регионов допуска. Наибольшее число сортов рекомендованы для Северо-Кавказского округа,

поэтому они были включены в сравнение. Распределение сортов по годам создания также неоднородно, поэтому для сравнения групп сопоставимого размера были охвачены периоды неравной длительности (рис. 3).

С учетом вышеизложенной специфики данных можно заключить, что для средней урожайности зерновых сортов, содержания белка в зерне и максимальной урожайности зеленого горошка овощных сортов нет достоверных различий между сортами раннего (преимущественно 1995-2000 гг.) и позднего (2016-2019) периодов. Аналогичные результаты получены для Центрально-Черноземного региона (не представлено). Таким образом, более чем за 20 лет отечественной селекции новейшего времени нет выраженного тренда на повышение урожайности или содержания белка в зерне. Вероятно, традиционная, не привлекающая методов направленной модификации генома селекция привела к тому, что значения основных показателей продуктивности гороха вышли на плато.

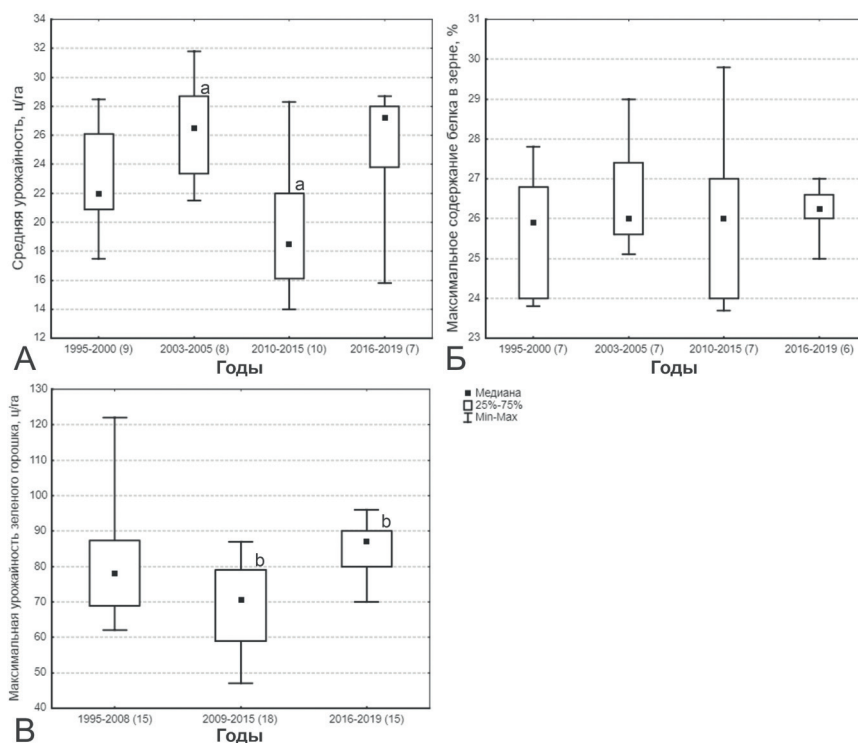


Рис. 3. Динамика средней урожайности (А), максимального содержания белка в зерне (Б) у зерновых сортов и максимальной урожайности зеленого горошка у овощных сортов (В). По оси абсцисс – годы включения в Госреестр, в скобках число сортов каждой группы; все сорта рекомендованы для возделывания в Северо-Кавказском регионе. Одинаковыми латинскими буквами обозначены достоверно различающиеся группы сортов (критерий Краскела-Уоллиса: а, $p < 0,05$; б, $p < 0,01$).

Fig. 3. Dynamics of the average yield (A), maximum protein content in grain (Б) of grain cultivars, and maximum green pea yield in vegetable cultivars (B). X-axis: year of inclusion into the State Register, the number of cultivars in each group is given in parentheses. All cultivars were recommended for cultivation in the North Caucasus region. The same Latin letters are used to mark significant differences (Kruskal-Wallis test: a, $p < 0,05$; b, $p < 0,01$).

В более ранний период селекции, с 1920-х по 1980-е гг., было показано значительное повышение урожайности отечественных сортов зернового гороха (Novikova et al., 1989). Интересен механизм этой динамики: общая биологическая продуктивность растений осталась практически неизменной, но урожайность увеличилась за счет повышения уборочного индекса и уменьшения биомассы вегетативных органов. Проведенная нами оценка сведений из «Характеристики сортов растений...» за 1994-2019 гг. указывает на отсутствие динамики урожайности. Возможно, дальнейшее перераспределение ассимилятов между вегетативной частью и семенами находится за пределами биологических возможностей вида.

Заключение

Подводя итог данной работе, можно сделать следующие выводы.

1. Среди отечественных зерновых сортов гороха с течением времени происходит повышение уровня фенотипического разнообразия, среди овощных – снижение.

2. Для большинства CAPS- и SSR-маркеров III и V групп сцепления число аллелей на locus остается неизменным с течением времени и практически совпадает с уровнем разнообразия, отмеченным у зарубежных сортов. Случаи, когда число аллелей со временем уменьшилось или увеличилось, редки. Выраженной эрозии генетического разнообразия у зерновых сортов не происходит; среди овощных сортов разнообразие снижается.

3. Проанализированные маркеры хлоропластной и митохондриальной ДНК не позволяют судить об изменении уровня генетического разнообразия сортов гороха, но дифференцируют различные подвиды гороха.

4. Редкие аллели ДНК-маркеров в основном присущи некультурным формам, которые логично рассматривать в качестве перспективных доноров изменчивости в селекции гороха.

5. За период селекции гороха 1994-2019 гг. не обнаружено достоверного увеличения средней урожайности и максимального содержания белка в семенах у зерновых сортов, а также увеличения максимальной урожайности зеленого горошка у овощных сортов, включенных в Государственный реестр РФ.

Благодарности/Acknowledgements

Авторы выражают глубокую благодарность всем коллегам, в разное время предоставившим материал для исследований: д.б.н. Ж.А. Акопян, д.б.н. М.А. Вишняковой, д.с.-х.н. Г.А. Дебелому, д.с.-х.н. А.Н. Зеленову, к.б.н. В.А. Жукову, к.б.н. И.П. Котляр, к.б.н. П.А. Пашкевичу, Dr. Aleksandar Mikić, Dr. Mike Ambrose, Dr. Valentin Kosev. Авторы благодарят к.б.н. Е.В. Семенову за ценные консультации, к.б.н. И.В. Артюшина за предоставленную возмож-

ность фрагментного анализа, М.М. Маркову за помощь со статистической обработкой и представлением данных.

The authors express deep gratitude to all colleagues who at different times provided material for research: Dr. Biol. Sci. J.A. Akopian, Dr. Biol. Sci. M.A. Vishnyakova, Dr. Agri. Sci. G.A. Debely, Dr. Agri. Sci. A.N. Zelenov, Ph.D. V.A. Zhukov, Ph.D. I.P. Kotlyar, Ph.D. P.A. Pashkevich, Dr. Aleksandar Mikić, Dr. Mike Ambrose, and Dr. Valentin Kosev. The authors are grateful to Ph.D. E.V. Semenova for valuable advice, Ph.D. I.V. Artyushin for the provided opportunity of fragment analysis, and to M.M. Markova for her help with the statistical processing and data presentation.

References/Литература

- Altukhov Yu.P. (ed.). Dynamics of population gene pools under anthropogenic pressures (Dinamika populyatsionnykh genofondov pri antropogennykh vozdeistviyakh). Moscow: Nauka; 2004. [In Russian] (Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / под ред. Ю.П. Алтухова. Москва: Наука; 2004).
- Baranger A., Aubert G., Arnau G., Lainé A.L., Deniot G., Potier J., Weinachter C., Lejeune-Hénaut I., Lallemand J., Burstin J. Genetic diversity within *Pisum sativum* using protein and PCR-based markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 2004;108:1309-1321. DOI: 10.1007/s00122-003-1540-5
- Cieslarová J., Hanáček P., Fialová E., Hýbl M., Smýkal P. Estimation of pea (*Pisum sativum* L.) microsatellite mutation rate based on pedigree and single-seed descent analyses. *Journal of Applied Genetics*. 2011a;52:391-401. DOI: 10.1007/s13353-011-0058-9
- Cieslarová J., Smýkal P., Dočkalova Z., Hanáček P., Procházka S., Hýbl M., Griga M. Molecular evidence of genetic diversity changes in pea (*Pisum sativum* L.) germplasm after long-term maintenance. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2011b;58:439-451. DOI: 10.1007/s10722-010-9591-3
- Cieslarová J., Hýbl M., Griga M., Smýkal P. Molecular analysis of temporal genetic structuring in pea (*Pisum sativum* L.) cultivars bred in the Czech Republic and in former Czechoslovakia since the mid-20th century. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*. 2012;48:61-73. DOI: 10.17221/127/2011-CJGPB
- Čupina B., Zlatković B., Smýkal P., Mikić A., Jajić I., Zeremski-Skorić T., Medović A. *In situ* evaluation of a *Pisum sativum* subsp. *elatius* population from the valley of the river Pćinija in southeastern Serbia. *Pisum Genetics*. 2011;43:20-24.
- Dribnokhodova O.P. Analysis of DNA polymorphism of a garden pea (*Pisum sativum* L.) (Анализ ДНК-полиморфизма горошка полевного [*Pisum sativum* L.]) (Ph.D. dissertation). Moscow: MSU; 2009. [in Russian] (Дрибноходова О.П. Анализ ДНК-полиморфизма горошка полевного (*Pisum sativum* L.): (дис. канд. биол. наук). Москва: МГУ; 2009).
- 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):788-793 [in Russian] (Дрибноходова О.П., Гостимский С.А. Исследование аллельного полиморфизма микросателлитных локусов у разных линий, сортов и мутантов гороха полевного (*Pisum sativum* L.) *Генетика*. 2009; 45(7):900-906). DOI: 10.1134/S1022795409070047
- The International COMECON List of Descriptors for the genus *Pisum* L. (Международный классификатор SEV рода *Pisum* L.). Leningrad; 1981. [In Russian] (Международный классификатор СЭВ рода *Pisum* L. Ленинград; 1981).
- Kononov F.A. Mapping and molecular genetic analysis of genes in pea (*Pisum sativum* L.) (Картирование и молекулярно-генетический анализ генов горошка (*Pisum sativum* L.)) (Ph.D. dissertation). Moscow: IOGen; 2006. [in Russian] (Коновалов Ф.А. Картирование и молекулярно-генетический анализ генов гороха (*Pisum sativum* L.): (дис. канд. биол. наук). Москва: ИОГен; 2006).

- Kononov F., Toshchakova E., Gostimsky S. A CAPS marker set for mapping in linkage group III of pea (*Pisum sativum* L.). *Cellular and Molecular Biology Letters*. 2005;10:163-171.
- Kosterin O.E., Bogdanova V.S. Relationship of wild and cultivated forms of *Pisum* L. as inferred from an analysis of three markers, of the plastid, mitochondrial and nuclear genomes. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2008;55:735-755. DOI: 10.1007/s10722-007-9281-y
- Leino M.W., Boström E., Hagenblad J. Twentieth-century changes in the genetic composition of Swedish field pea metapopulations. *Heredity*. 2013;110:338-346. DOI: 10.1038/hdy.2012.93
- Loridon K., McPhee K., Morin J., Dubreuil P., Pilet-Nayel M.L., Aubert G., Rameau C., Baranger A., Coyne C., Lejeune-Hénaut I., Burstin J. 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
- Manrique P., Hoshi M., Fasabi M., Nolasco O., Yori P., Calderón M., Gilman R.H., Kosek M.N., Vinet J.M., Gamboa D. Assessment of an automated capillary system for *Plasmodium vivax* microsatellite genotyping. *Malaria Journal*. 2015;14:326. DOI: 10.1186/s12936-015-0842-9
- Novikova N.E., Lakhanov A.P., Amelin A.V. Physiological changes in pea plants during long-term breeding for higher seed productivity (Fiziologicheskiye izmeneniya v rasteniyakh gorokha v processe dlitel'noi selektsii na semennuyu produktivnost'). *Doklady VASKhNIL* 1989;(9):16-19 [In Russian] (Новикова Н.Е., Лаханов А.П., Амелин А.В. Физиологические изменения в растениях гороха в процессе длительной селекции на семенную продуктивность. *Доклады ВАСХНИЛ*. 1989;(9):16-19).
- Sinjushin A.A. Plant breeding in scope of the factorial concept of heredity (Selektsiya rastenii v epokhu faktorialnoi kontseptsii nasledstvennosti). *Zernobobovye i krupyanye kultury = Legumes and Groat Crops*. 2015;(4):27-36 [In Russian] (Синюшин А.А. Селекция растений в эпоху факториальной концепции наследственности. *Зернобобовые и крупяные культуры*. 2015;(4):27-36).
- Sinjushin A.A., Kononov F.A., Gostimskii S.A. *Sym28*, a gene controlling stem architecture and nodule number, is localized on linkage group V. *Pisum Genetics*. 2008;40:15-18.
- State register for selection achievements admitted for usage (national list). V. 1. "Plant varieties" (official publication). Moscow: FGBNU "Rosinformagrotekh"; 2019. [In Russian] (Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. Т. 1. «Сорта растений» (официальное издание) М.: ФГБНУ «Росинформагротех»; 2019).
- Torres A.M., Weeden N.F., Martin A. Linkage among isozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba*. *Theoretical and Applied Genetics*. 1993;85:937-945. DOI: 10.1007/BF00215032
- Zelenov A.N. Comment to the article of A. A. Sinjushin "Plant breeding in scope of the factorial concept of heredity" (Kommentarii k statye A.A. Sinyushina "Selektsiya rastenii v epokhu faktorialnoi kontseptsii nasledstvennosti"). *Zernobobovye i krupyanye kultury = Legumes and Groat Crops*. 2015;(4):37-41 [In Russian] (Зеленов А.Н. Комментарий к статье А.А. Синюшина «Селекция растений в эпоху факториальной концепции наследственности». *Зернобобовые и крупяные культуры*. 2015;(4):37-41).
- Zelenov A.N., Zadorin A.M., Zelenov A.A. The first results of breeding pea varieties of the chameleon morphotype (Pervye rezultaty sozdaniya sortov gorokha morfotipa hameleon). *Zernobobovye i krupyanye kultury = Legumes and Groat Crops*. 2018;(2):10-17 [In Russian] (Зеленов А.Н., Задорин А.М., Зеленов А.А. Первые результаты создания сортов гороха морфотипа хамелеон. *Зернобобовые и крупяные культуры*. 2018;(2):10-17).