

DOI: 10.30901/2227-8834-2016-3-82-93

УДК 633.13: 575.22

**БЕЛКОВЫЕ МАРКЕРЫ, МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ  
И СЕЛЕКЦИОННЫЕ ПРИЗНАКИ  
В ИДЕНТИФИКАЦИИ ДУБЛЕТНЫХ ОБРАЗЦОВ  
КУЛЬТУРНОГО ОВСА В КОЛЛЕКЦИЯХ ВИР  
(РОССИЯ) И НОРДИЧЕСКОГО ГЕННОГО БАНКА  
(NORDGEN, ШВЕЦИЯ)**

И. Н. Перчук<sup>1</sup>,  
А. В. Конарев<sup>1</sup>,  
И. Г. Лоскутов<sup>1,3</sup>,  
Е. В. Блинова<sup>1</sup>,  
Л. Ю. Новикова<sup>1</sup>,  
В. И. Хорева<sup>1</sup>,  
А. Колдинска-Брантестам<sup>2</sup>

Федеральный  
исследовательский центр  
Всероссийский институт  
генетических ресурсов  
растений имени  
Н. И. Вавилова,  
190000  
Санкт-Петербург,  
ул. Б. Морская д. 42, 44,  
Россия,  
e-mail: i.perchuk@vir.nw.ru

<sup>2</sup>Нордический генный банк  
(NordGen), Box 41, SE-230 53,  
Alnarp, Sweden

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский  
государственный университет  
(СПбГУ),  
г. Санкт-Петербург,  
Университетская набережная,  
д. 7, 9,  
Россия, 199034

**Ключевые слова:**

сорта овса посевного, дублетные образцы, белковые маркеры, электрофорез аvenina

**Актуальность.** С течением времени в коллекции(ях) появляются дублирующие образцы, что требует лишних расходов на ее содержание, а также приводит к искажению реального уровня сохраняемого генетического разнообразия. В связи с активным сотрудничеством ВИР и Нордического генного банка представляется актуальным поиск возможных сортовых дублетных образцов в их коллекциях овса посевного *Avena sativa* L. **Материалы и методы.** Проводили полевое и лабораторное сравнительное изучение 112 пар потенциальных дублетов (ПД) одноименных скандинавских селекционных сортов овса посевного из коллекций ВИР и NordGen. В ходе полевого изучения образцы каждой пары сравнивали друг с другом по 26 морфологическим и селекционно ценным признакам. В качестве лабораторного метода использовали посеменной электрофоретический анализ аvenina. Состав образцов характеризовали по показателям частот встречаемости отдельных аvenиновых биотипов (типов спектра аvenina). **Результаты и обсуждение.** По результатам полевого изучения для оценки различия-сходства образцов одной ПД-пары авторы предложили использовать показатель *D общ.*, который объединяет выявленные различия по качественным и количественным признакам. На основании предлагаемого показателя все ПД-пары условно разделили на три группы, в которых с разной долей вероятности могли быть идентифицированы дублетные образцы. Лабораторное изучение установило, что 46% из 112 пар можно рассматривать как дублеты, поскольку образцы такой пары имели идентичный состав по аvenиновым биотипам. Сопоставление данных полевого и лабораторного испытания показало, что чем меньшим показателем полевых различий *D общ.* характеризуется выделенная авторами группа ПД-пар, тем меньше различий между их образцами согласно данным электрофореза и, как следствие, больше в группе дублетных пар, идентифицированных с использованием белковых маркеров. В группе с наименьшим показателем *D общ.* (0,1–1,5) около 70% составляли дублетные пары. Группу с максимальными полевыми различиями (*D общ.* = 3,9–8,3) составили только недублетные образцы. В целом, по данным электрофоретического анализа выборки дублетных и недублетных пар достоверно отличались по показателю *D общ.*. Для образцов недублетных пар была продемонстрирована возможность использования электрофореза аvenina для решения проблемы сортовой подлинности анализируемых образцов путем сравнения их с оригинальными сортовыми образцами (оригиналами), хранящимися в коллекции ВИРа. **Заключение.** Установленное соответствие результатов полевого и лабораторного изучения подтверждает возможность использования электрофоретических спектров аvenina для идентификации дублетных образцов в коллекциях овса посевного еще до полевых испытаний. При потере всхожести семян образца метод электрофореза аvenina позволяет установить его сортовую подлинность.

DOI: 10.30901/2227-8834-2016-3-82-93

## PROTEIN MARKERS, MORPHOLOGICAL AND BREEDING-ORIENTED CHARACTERS IN DUPLICATE ACCESSION IDENTIFICATION IN THE VIR (RUSSIA) AND NORDGEN (SWEDEN) CULTIVATED OAT COLLECTIONS

I. N. Perchuk<sup>1</sup>,  
A. V. Konarev<sup>1</sup>,  
I. G. Loskutov<sup>1,3</sup>,  
E. V. Blinova<sup>1</sup>,  
L. Y. Novikova<sup>1</sup>,  
V. I. Horeva<sup>1</sup> and  
A. Kolodinska-Brantestam<sup>2</sup>

<sup>1</sup>The N. I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42, 44, Bolshaya Morskaya str., St. Petersburg, 190000 Russia, e-mail: i.perchuk@vir.nw.ru

<sup>2</sup>Nordic Genetic Resource Center (NordGen), P. O. Box 41, SE 230 53 Alnarp, Sweden

<sup>3</sup>St. Petersburg State University, 7-9, Universitetskaya Emb., St. Petersburg, 199034, Russia

**Background.** Over time the collection(s) accumulated duplicate samples that require extra spending on their conservation and also lead to misinterpretation of the real level of the stored genetic diversity. In view of the active cooperation between VIR and the Nordic Gene Bank, it seems relevant to search for possible duplicate cultivar accessions in their *Avena sativa* L collections. **Materials and methods.** Comparative field and laboratory studies of the 112 pairs of potential duplicates (PD) of homonymous oat cultivar accessions from the collections of VIR and NordGen were performed. Each pair of accessions was compared with each other according to 26 morphological and breeding-oriented traits during the field study. Electrophoresis of single seed avenins was used as a laboratory method. The composition of the accessions was characterized in terms of the frequency of occurrence of avenin biotypes with corresponding avenin banding patterns. **Results.** To evaluate the field differences of the PD pairs of accessions the authors proposed to use *D aggr.* index which accumulated the revealed differences both in qualitative and quantitative plant characters. On the basis of this index, all PD pairs were conventionally divided into three groups wherein duplicates could be identified with variable degrees of probability. Electrophoretic analysis proved that 46% of the 112 pairs may be regarded as duplicates, because the paired accessions had identical composition according to avenin biotypes. Comparison between the field and laboratory trials of the accession groups selected showed that the lower was the *D aggr.* index, the smaller were the laboratory differences, and as a result the more duplicate pairs were identified in the group with the help of protein markers. In the group with the lowest *D aggr.* (0.1–1.5), the amount of duplicate pairs was about 70%. The group with the maximum *D aggr.* (3.9–8.3) consisted of non-duplicates only. Generally, the sets of duplicate and non-duplicate pairs identified by electrophoresis were credibly different according to the *D aggr.* index. **Conclusion.** The revealed conformity between the results of the field and laboratory tests shows that it is possible to use avenin banding patterns for identification of duplicate accessions in oat collections even before field trials.

### Key words:

cultivated oat varieties, duplicate accessions, protein markers, avenin electrophoresis

## Введение

Основные направления деятельности генных банков и центров генетических ресурсов – сохранение и изучение растительного разнообразия для его эффективного использования в улучшении возделываемых культур. Наличие достоверной информации об образцах коллекции – непременное условие такого использования. Состав коллекций – величина переменная для любого генного банка. Коллекции пополняются за счет экспедиционных сборов, путем обмена между генными банками, при необходимости образцы репродуцируются и т. п., что приводит к появлению дублирующих (или идентичных) образцов («дубликатов», «дублетов») (Lyman, 1984; The state..., 1998). Наличие дублетов в коллекции требует лишних расходов на их поддержание и хранение, а также приводит к искажению реального уровня генетического разнообразия, сохраняемого в коллекциях. Однако в случае частичной утраты или полной потери сохраняемого материала его восстановление может быть обеспечено за счет продублированного материала, в том числе из коллекций других генных банков. Можно говорить о дублетах «паспортных», «ботанических», «генетических» и др. (Hintum, 1994; Hintum, Knupffer, 1995; Hintum, Visser, 1995; Virk et al., 1995; Hintum, 2000). Строгого определения этого термина пока нет.

Для поиска и идентификации дублетных образцов в коллекции одного или сразу нескольких банков используют различные подходы. На первом этапе дублеты можно выявить, анализируя паспортные базы данных. Однако, как было показано при работе с коллекциями ячменя, овса, риса, пшеницы и ряда других культур, сходство паспортных данных – не гарантия, что образцы являются дублетами (Sahu, 1989; Verma et al., 1999; Lund et al., 2003). При поступлении образца в коллекцию не всегда указываются точные координаты места его сбора (происхождения). Нередки трудности с определением таксономической (особенно внутривидовой) принадлежности образцов (Loskutov et al., 2007). При сравнении хранящихся в коллекциях разных стран селекционных сортов, и, особенно, местных сортов и форм, существует проблема перевода названий (Hintum,

1994; Hintum, Knupffer, 1995; Piukken et. al., 2005).

Более надежную информацию о возможной дублетной природе образцов дает использование морфологических, агрономических или селекционно ценных признаков, а в последнее время – молекулярных маркеров (Ruiz, Aguirriano, 2004; Diederichsen, 2009; Yndgaard et al., in print). Успешное многолетнее использование белковых маркеров, особенно запасных белков семян, в идентификации сортов, биотипов и линий различных культур, включая оценку степени генетического родства, позволяет применять данный подход и для мониторинга «дублетности» (Konarev V., 1983; Hintum, Visser, 1995; Konarev et al., 1995; Molecular..., 1996; Portyanko et al., 1998; Identification..., 2000; Romanova et al., 2001; Konarev et al., 2002; Pomorcev, Lyalina, 2003; Zelenskaya et al., 2004; Ruiz, Aguirriano, 2004; Konarev et al., 2005). ДНК-маркеры (RAPD-, RFLP-, ALFP-, SSR-анализ) также активно адаптируются для решения рассматриваемой проблемы (Virk et al., 1995; Willner et al., 1998; Verma et al., 1999; Bradley et al., 2002; Lund et al., 2003; Dobrovolskaya et al., 2005; Fu, 2006).

Овес посевной (*Avena sativa* L.) – одна из ведущих пищевых и кормовых сельскохозяйственных культур России и стран центральной и северо-западной зоны Европы. Селекционная работа с овсом в России во многом основывается на исходном материале постоянно пополняемой коллекции Федерального исследовательского центра Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н. И. Вавилова (ВИР), начиная с основания института в 1894 г. Богатая коллекция овса сосредоточена в Нордическом генном банке (NordGen, Швеция). В последние десятилетия осуществлялось сотрудничество наших генных банков в работе с коллекциями овса: от обмена генетическим материалом и совместных экспедиций до фундаментальных исследований, связанных с современными проблемами селекции на качество (Leonova et al., 2008). В этой связи актуальным представляется сравнительное изучение одноименных селекционных сортов овса посевного из коллекций ВИР и Нордического генбанка с целью выяснения их возможной «дублетности».

Сравнительный анализ сортов проводили по результатам, как полевого изучения морфологических и селекционно ценных признаков, так и с использованием белковых маркеров (спектров запасных белков семян – авенинов).

## Материал и методы

Потенциальные дублеты (ПД-образцы) – одноименные сортовые образцы из двух разных коллекций были отобраны на основании паспортной базы данных. Анализируемая выборка включала 48 сортов из Швеции, 31 – из Финляндии, 16 – из Норвегии, 16 – из Дании и 1 канадский сорт. Данные сорта поступали в коллекцию ВИР в 1920-90-е гг., в коллекцию NordGen – в 1960-80-е гг.

Полевое изучение 112 пар сортов овса (всего 224 образца) проводили на научно-производственной базе «Павловские и Пушкинские лаборатории ВИР». По его результатам образцы каждой пары сравнивали друг с другом по 26 морфологическим и селекционно-ценным признакам (Loskutov et al., 2012), (табл. 1).

Для оценки различий по количественным признакам для каждого признака вычисляли стандартизованный модуль разности  $d_{ст.} = d$  пары /  $d$  макс – манхэттенское расстояние (Halafyan, 2010), где  $d$  пары – величина модуля разницы между значениями анализируемого признака у ПД-образцов одной пары,  $d$  макс. – максимальное значение модуля разницы для этого признака, зарегистрированное при сравнении ПД-образцов всех пар. Показатель уровня различий ПД-образцов одной пары по всем количественным признакам был равен  $D_{кол.} = \sum d_{ст.}$

Качественные признаки оценивали по наличию – отсутствию признака или степени его выраженности (по балльной системе). Показатель различий принимали  $p = 0$ , если наличие признака или степень его выраженности были одинаковы у обоих ПД-образцов, и  $p = 1$ , если они были разными. Показатель уровня различий ПД-образцов одной пары по всем качественным признакам был равен  $D_{ кач.} = \sum p$

Общий показатель различий между ПД-образцами определяли, как  $D_{общ.} = D_{кол.} + D_{ кач.}$

Посеменной электрофоретический анализ авенина (30 и более зерновок на образец) проводили по методике, принятой в ВИР, с небольшими модификациями (Identification..., 2000). Электрофоретический спектр авенина отдельной зерновки использовали для маркирования и регистрации соответствующего ей биотипа (генотипа). Образцы характеризовали по показателям частот встречаемости отдельных авениновых биотипов (типов спектра авенина) (табл.2). Сравнительный анализ состава ПД-образцов проводили, используя критерий  $\chi^2$  (формула для выборок с неодинаковыми объемами, уровень значимости  $\alpha = 0,05$ ) (Plokhinskiy, 1980). В случае недостоверности различий считали, что образцы имеют идентичный состав.

## Результаты и обсуждение

Основная цель полевых испытаний состояла в оценке сходства и различий образцов потенциальной дублетной пары. Сравнительный анализ результатов полевого испытания, продемонстрировал существование различий между ПД-образцами по любому из изучаемых признаков, за исключением положения колоска, пленчатости и опушения влагалища листа. По качественным признакам не было выявлено различий в 64 парах ПД-образцов, остальные пары различались по 1–5-ти признакам. Среди количественных признаков наибольшие отличия наблюдались по таким, как высота растений, число колосков в метелке и число зерен в метелке.

Значение показателя различий  $D_{кол.}$  изменялось в диапазоне  $0,1 \div 4,3$ . Структурный анализ вариабельности значений  $D_{кол.}$ , показал, что его распределение характеризуется ярко выраженной правосторонней асимметрией (коэффициент асимметрии равен 1,40). 50% пар ПД-образцов имели показатель  $D_{кол.} < 1,1$  (медиана распределения), а 90% (девятая дециль) –  $D_{кол.} < 2,2$ . Распределение суммарного показателя различий  $D_{общ.}$  было еще более асимметричным (коэффициент асимметрии 1,83). При диапазоне изменчивости  $0,1 \div 8,3$  для 50% пар ПД-образцов значение  $D_{общ.} < 1,6$ , а для 90% –  $D_{общ.} < 3,8$  (рис. 1).

**Таблица 1. Характеристика признаков, использованных при полевом изучении****ПД-образцов овса посевного *Avena sativa* L.****Table 1. Description of the traits used for the field study of *Avena sativa* L.  
potential duplicate accessions**

Тип признаков	Количественные		Качественные	
	Способ оценки признака			
	Единица измерения, соответствующая признаку	Ранг или балл	Наличие-отсутствие	
Морфологические	Высота растения Длина метелки Число колосков в метелке Число зерен в метелке Число зерен в колоске	Толщина стебля Опушение стебля Опушение базальной части зерна Опушение цветковой чешуи Опушение влаг. листа Угол наклона ф. листа Форма метелки Положение метелки Положение колоска* Окраска цветковой чешуи	Пленчатость* Восковой налет метелки Остистость	
Селекционно ценные	Период всходы-выметывание Период выметывание-созревание Масса зерен с метелки Масса 1000 зерен	Устойчивости: - к полеганию в незрелой стадии - к полеганию перед уборкой - к корончатой ржавчине - к стеблевой ржавчине		

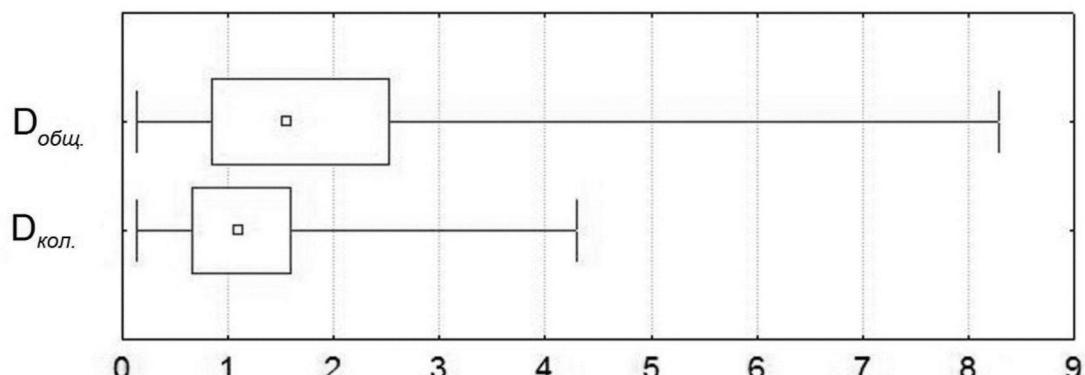
\*- признаки, по которым не было зарегистрировано различий между ПД-образцами

Асимметричный характер распределения и диапазон изменчивости вышеупомянутых показателей различий указывает на то, что исследуемая выборка ПД-образцов овса является неоднородной. Это позволяет предположить, что наряду с дублетными образцами среди выбранных пар сортов имеются и недублетные образцы. Как отмечалось выше, не существует единого критерия оценки «дублетности» образцов. Используя в качестве критерия показатель  $D_{общ.}$ , мы условно разделили проанализированную

выборку на три группы (табл. 4). ПД-образцы с относительно низким уровнем различий ( $D_{общ.} < 1,6$ ) рассматривали как наиболее вероятные дублетные образцы (*группа 1*). Образцы с высоким уровнем различий ( $D_{общ.} > 3,8$ ) составили группу, в которой с наименьшей вероятностью можно ожидать наличие дублетов (*группа 3*). Между ними находится *группа 2*, которая может включать как дублетные, так и недублетные образцы ( $D_{общ.} = 1,6-3,8$ ). В настоящей работе изучали селекционные сорта,

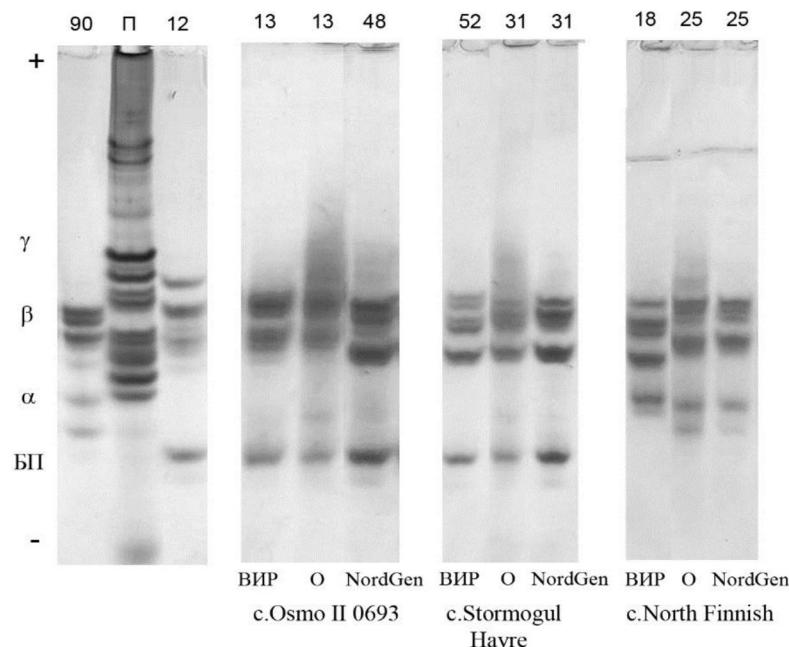
их генотипный состав целенаправленно формировался селекционерами. Понятие «сорт» среди прочих характеристик предполагает и оригинальность генотипного состава. Сравнение сортовых образцов по агроморфологическим признакам позволяет лишь косвенно судить об их возможной генетической близости. Это связано с тем, что для большинства этих признаков характерна значительная фенотипическая изменчивость при репродуцировании одних и тех же образцов в разных условиях. Более объективная оценка степени генетической идентичности может быть получена при сравнительном анализе состава запасных белков семян, являющихся генетическими маркерами (Konarev, 1983; Molecular..., 1996; Konarev, 2006). Электрофорез запасных белков семян лежит в основе международных и российских стандартных методов идентификации сортов важнейших сельскохозяйственных культур (Internati-onal..., 1996; Identification..., 2000; Pomercev, Lyalina, 2003). Запасные белки семян овса – авенины – характеризуются высоким уровнем полиморфизма

и широко применяются в изучении генетических ресурсов овса (Zelenskaya et al., 2004; Loskutov et al., 2005; Perchuk, Loskutov, 2014). При электрофоретическом анализе в спектрах авенина данной выборки образцов (около 10 000 зерновок) было идентифицировано более 20 компонентов, соответствующих по своей подвижности  $\alpha$ - $\beta$  и быстрым проламинам (БП) злаков. Различные комбинации компонентов составили около 100 типов спектра авенина (рис. 2). Сорта большинства самоопыляющихся культур характеризуются отсутствием полиморфизма по типам спектра запасных белков или очень низким его уровнем. Последнее было характерно и для проанализированных 224 образцов овса посевного. В составе 85% образцов зарегистрировано не более 3-х авениновых биотипов (типа спектра авенина). При этом, у большей части образцов 90–100% состава было представлено одним биотипом. Было зарегистрировано 32 таких биотипа. В составе 15% образцов регистрировали до 12 авениновых биотипов. Единичными для всей выборки оказались 19 биотипов.



**Рис. 1. Результаты структурного анализа. Варьирование показателя уровня различий у 112 пар ПД-образцов только по количественным признакам ( $D_{\text{кол.}}$ ) и по всей совокупности признаков ( $D_{\text{общ.}}$ )**

- – медиана распределения, – 25–75% выборки, – границы варьирования показателя.
- Fig. 1. The results of structural analysis. The variation of the index difference level of 112 pairs of potentially duplicate accessions according to quantitative traits ( $D_{\text{кол.}}$ ) only and according to all valuable traits ( $D_{\text{общ.}}$ )**
- the median of distribution, – 25–75% of the sample, – the boundaries of variation of the indicator.



**Рис. 2. Электрофореграммы некоторых авениновых биотипов (12, 13, 25...) и глиадинового биотипа пшеницы (П). Биотипы оригинальных (О) сортовых образцов Osmo II 0693, Stormogul Havre и North Finnish из коллекции ВИР. Биотипы ПД-образцов вышеупомянутых сортов из коллекций ВИР (ВИР) и Нордического генбанка (NordGen). БП,  $\alpha$ - $\gamma$  – типы проламинов злаков и их распределение на электрофореграмме**

**Fig. 2. Electrophoretic banding patterns of some avenin biotypes (12, 13, 25...) and wheat gliadin biotype (П). The original biotypes (О) of cultivars Osmo II 0693, Stormogul Havre and North Finnish from the VIR collection. Potentially duplicate accession biotypes of the above-mentioned cultivars from the VIR (ВИР) and NordGen collections. БП,  $\alpha$ - $\gamma$  – types of cereal prolamins and their distribution on the electrophoregram**

Сравнительный электрофоретический анализ авенинов ПД-образцов показал, что образцы в паре могут различаться по биотипному составу или быть идентичными. Идентичные по биотипному составу ПД-образцы мы рассматривали как дублетные. В целом образцы 46% проанализированных ПД-пар (51 пара из 112) оказались, согласно данным электрофореза, дублетными. Почти у всех дублетных образцов на долю одного биотипа приходилось 88–100% состава. Различия проявились по 1–3-м биотипам с частотой встречаемости менее 10% (см. табл. 2). В ходе данного исследования выделилась группа сортов, идентичных по составу, но различающихся по названиям. Такие образцы рассматривались нами как генетически сходные. Сходство этих сортов может быть связано с их происхождением из

одних и тех же источников, а также сходством задач селекции. Так, в составе некоторых шведских сортов селекции 1960–80-х гг. доминировал биотип № 7, у сортов, полученных в другие годы – биотипы № 48 или № 52. Биотип № 19 доминировал у некоторых финских сортов и т. д.

В связи с существованием в коллекциях разных генбанков образцов одноименных сортов, различающихся по каким-либо признакам, решить проблему установления сортовой принадлежности можно путем сравнения анализируемых образцов с оригинальным сортовым образцом (оригиналом). Наиболее надежным в этом случае представляется применение стандартных лабораторных методов. Поскольку при длительном хранении оригинального образца его семена могут частично или полностью потерять

всхожесть, для такого анализа предпочтителен электрофорез белков. Этот подход был продемонстрирован на примере сравнения некоторых выявленных недублетных образцов. Для наглядности выбрали такие пары образцов, состав которых различался кардинально, т. е. был представлен различными авениновыми биотипами (табл. 3). Был проведен сравнительный анализ состава выбранных образцов и сохранившихся в коллекции ВИР их сортовых оригиналов. Полу-

ченные результаты (см. рис. 2 и табл. 3) позволяют судить о том, какие из проанализированных образцов соответствуют оригиналу (являются действительными представителями сорта), а какие – нет. Так, представителями оригинального сорта можно считать образцы сортов ‘Gothland’, ‘Trifolium’, ‘Osmo II0693’, ‘Regent’ из коллекции ВИР и образцы сортов ‘North Finnish’, ‘Stormogul Havre’, ‘Nopsa Anos’, ‘Gota’ из коллекции Нордического генбанка.

**Таблица 2. Распределение авениновых биотипов в составе некоторых дублетных и недублетных образцов овса посевного *Avena sativa* L (частота встречаемости, %)**  
**Table 2. Avenin biotype (avenin banding pattern) distribution in the composition of some duplicate and non-duplicate accessions of *Avena sativa* L (frequency of occurrence, %)**

Название сорта	№ каталога	Год*	Номер авенинового биотипа													
			3	7	12	13	18	25	26	28	42	52	79	83	86	96
<b>Дублеты</b>																
Hvitling ВИР	к-2247	1922				100										
Hvitling NordGen	6982					96		2				2				
Argushavre ВИР	к-4705	1925										94		6		
Argushavre NordGen	6208											100				
Ribe ВИР	к-1150	1968								100						
Ribe NordGen	8703									100						
JO 0980 ВИР	к-1380	1985				67		4	2				23		2	2
JO 0980 NordGen	4454					72			2				26			
<b>Недублеты</b>																
North Finnish ВИР	к-1835	1921					100									
North Finnish NordGen	1386 7								100							
Veli ВИР	к-1378	1985	6			34		50								10
Veli NordGen	374			24					76							
Stil ВИР	к-1398	1988		35	16							49				
Stil NordGen	9297											100				

\* - год поступления оригинального сортового образца в коллекцию ВИР

**Таблица 3. Доминирующие авениновые биотипы (типы спектра авенина) в составе оригинальных и ПД-сортовых образцов овса посевного из коллекций ВИР и Нордического генбанка**

**Table 3. Dominant avenin biotypes (avenin banding patterns) in oat cultivar composition of both original and potentially duplicate accessions from the VIR and NordGen collections**

Название сорта	Год*	№ по каталогу ВИР	№ по каталогу NordGen	Авениновый биотип в образце, №		
				оригинал ВИР	образец ВИР	образец NordGen
North Finnish	1921	к-1835	13867	25	18	25
Gothland	1921	к-1854	4874	67	67	13
Stormogul Havre	1921	к-2123	5112	31	52	31
Trifolium	1921	к-2886	6997	3	3	60
Osmo II 0693	1926	к-5014	8430	13	13	48
Nopsa Anos	1926	к-5023	8705	57	13	57
Regent	1959	к-10982	9773	7	7	15
Gota	1968	к-11497	9762	6	25	6

\*год поступления оригинального сортового образца в коллекцию ВИР

**Таблица 4. Сопоставление результатов сравнения ПД-образцов по данным полевого испытания и электрофоретического анализа компонентного состава авенина**

**Table 4. Comparison of the results of comparative field tests and avenin electrophoretic analysis of potentially duplicate oat accessions from the VIR and NordGen collections**

Результаты полевого испытания			Результаты электрофоретического анализа					
Характеристика условных групп			Количество дублетных (Д) и недублетных (НД) пар образцов		число пар		количество, %	
	Пределы показателя <i>D общ.</i>	Количество ПД- пар в группе	Д	НД	Д	НД		
Группа 1: наибольшая вероятность нахождения в составе дублетных образцов	0,1 – 1,5	56	37	19	66	34		
Группа 2: состоит из дублетных и недублетных образцов	1,6 – 3,8	46	14	32	30	70		
Группа 3: наибольшая вероятность нахождения в составе недублетных образцов	3,9 – 8,3	10	-	10	-	100		
Всего		112	51	61	46	54		

При сопоставлении полученных нами результатов полевых испытаний и электрофоретического анализа было отмечено соответствие между уровнем различий по агроморфологическим признакам и генетическим маркерам – авениновым спектрам.

Определенные по данным электрофореза выборки дублетных и недублетных пар достоверно отличались по показателям различий *D общ.* согласно MannWhitneyUTest. ( $p = 0,0001$ ). ПД-образцы, характеризующиеся

еся качественно различным биотипным составом, входили только в группы 2 и 3. По сравнению с группами 1 и 2, в группе 3 различия по составу между одноименными образцами были более выражены, что соответствовало и результатам полевого испытания. В целом при анализе состава условно-выделенных нами групп, было установлено, что чем меньше показатель полевых различий  $D_{общ.}$ , тем больше в группе дублетных пар, выявленных с использованием белковых маркеров (см. табл. 4). Таким образом, результаты анализа белковых спектров подтвердили и уточнили данные проведенного ранее полевого испытания образцов овса.

### Заключение

Одним из преимуществ любой коллекции является ее «оригинальность». По причинам, названным выше, актуальной становится тема «дублеты в коллекциях генных банков». В настоящее время нет однозначного определения понятия «дублет», тем более применительно к коллекциям разного статуса. Что касается самого термина, то дублетные образцы – это генетически идентичные образцы. Проблема – в отсутствии объективных «бесспорных» методов или подходов к оценке степени генетической идентичности. Потому не существует единой методики по определению дублетов и невозможно делать окончательные выводы на основании какого-либо одного метода.

О недостатках использования только паспортных данных упоминалось выше. Полученные нами результаты также подтверждают, что одинаковое сортовое название образцов не является достаточным признаком «дублетности». К ранее указанным

ограничениям полевого анализа следует добавить его длительность – для злаков требуется как минимум два года (Bradley et al., 2002; Diederichsen, 2009). Иногда полевая оценка невозможна из-за потери всхожести сохраняемого материала. Развитие маркерных технологий обеспечило переход от визуальных (во многом субъективных) критерии оценки родства к объективным – не зависящим от окружающих условий. Настоящий период можно назвать периодом накопления информации по использованию молекулярных маркеров в вопросе поиска дублетов, выбора методов и критериев оценки полученных данных. Подтверждение молекулярными методами данных, полученных другими способами, позволяет использовать молекулярные маркеры на начальном этапе поиска дублетов. В пользу этого говорят и результаты настоящей работы. Установленное соответствие результатов полевого и электрофоретического анализов указывает на возможность использования, в частности, электрофореза авенина для поиска потенциальных дублетных образцов овса посевного еще до стадии полевых испытаний или в случае невозможности их проведения. Хотя применение молекулярных маркеров не всегда дает возможность сделать окончательное заключение о дублетности изучаемых образцов, использование этих методов существенно сокращает затраты при мониторинге коллекций. Преимущества молекулярных методов идентификации генетического разнообразия и контроля за состоянием коллекций и в том, что они достаточно легко воспроизводятся в разных лабораториях и стандартизируются, что особенно важно для координации работы с коллекциями разных стран.

*Работа была выполнена при поддержке совместного проекта ВИР (Россия) – Нордический генный банк (NordGen, Швеция), данная публикация подготовлена при поддержке проекта РНФ-14-16-00072.*

### References/Литература

1. Zelenskaya E. G., Konarev A. V., Loskutov I. G., Gubareva N. K., Strelchenko P. P. Characteristics of ancient local forms of cultivated oat from the collection of the Vavilov Institute of Plant Industry according to avenin polymorphism // Agrarnaya Rossiya, 2004, no. 6, pp. 50–58 [in Russian] (Зеленская Е. Г., Конарев А. В., Лоскутов И. Г., Губарева Н. К., Стрельченко П. П. Характеристика старо-местных форм овса посевного (*Avena sativa*L.) из коллекции ВИР по полиморфизму авенина // Аграрная Россия. 2004. № 6. С. 50–58).

2. Identification of varieties and registration of the genofond of cultivated plants by seed proteins / Ed. V. G. Konarev. St. Petersburg: VIR, 2000, 186 p. [in Russian] (Идентификация сортов и регистрация генофонда культурных растений по белкам семян /ред. Конарев В. Г. СПб.: ВИР, 2000. 186 с.).
3. Konarev A. V. The use of molecular markers for solving problems of plant genetic resources and plant breeding // Agrarnaya Rossiya, 2006, no. 6, pp. 4–22 [in Russian] (Конарев А. В. Использование молекулярных маркеров в решении проблем генетических ресурсов растений и селекции // Аграрная Россия. 2006. № 6. С. 4–22).
4. Konarev A. V., Perchuk I. N., Nakayama S. The use of prolamine polymorphism in the research of the parent material and seed production of forage gramineous crops // Agrarnaya Rossiya, 2002, no. 3, pp. 63–65 [in Russian] (Конарев А. В., Перчук И. Н., Накаяма С. Использование полиморфизма проламинов в изучении исходного материала и семеноводстве злаковых трав // Аграрная Россия. 2002. № 3. С. 63–65).
5. Konarev V. G. Plant proteins as genetic markers. Moscow: Kolos, 1983, 320 p. [in Russian] (Конарев В. Г. Белки растений как генетические маркеры. М.: Колос, 1983. 320 с.)
6. Loskutov I. G., Gubareva N. K., Alpatieva N. V. Avenin polymorphism in the study of wild oat species // Agrarnaya Rossiya, 2005, no. 2, pp. 43–48 [in Russian] (Лоскутов И. Г., Губарева Н. К., Алпатьевна Н. В. Полиморфизм авенина в изучении дикорастущих видов овса // Аграрная Россия. 2005. № 2. С. 43–48).
7. Loskutov I. G., Kovaleva O. N., Blinova E. V. Methodological guidelines for research and conservation of the global collection of barley and oats. St.Petersburg: VIR, 2012, 63 p. [in Russian] (Лоскутов И. Г., Ковалева О. Н., Блинова Е. В. Методические указания по изучению и сохранению мировой коллекции ячменя и овса. СПб.: ГНУ ВИР, 2012. 63 с.).
8. Plokhinskiy N. A. Algorithms of biometrics. Moscow: MGU, 1980, 107 p. [in Russian] (Плохинский Н. А. Алгоритмы биометрии. М.: МГУ, 1980. 107 с.).
9. Perchuk I. N., Loskutov I. G. Electrophoretic analysis of avenin as an effective method for monitoring the status of the cultivated oat collection // Proc of Int. Sci. Conf. Plant genetic resources as the basis of food security and QOL improvement. St. Petersburg, 2014, p. 78 [in Russian] (Перчук И. Н., Лоскутов И. Г. Электрофоретический анализ авенина – эффективный метод мониторинга состояния коллекции овса посевного // Генетические ресурсы растений – основа продовольственной безопасности и повышения качества жизни: Тез докл. Междунар. научн. конф. С.-Петербург, 2014. С. 78).
10. Pomorcev A. A., Lyalina E. V. Identification and barley variety seed testing by electrophoresis of seed storage proteins. Moscow: MSHA, 2003, 84 p. [in Russian] (Поморцев А. А., Лялина Е. В. Идентификация и оценка сортовой чистоты семян ячменя методом электрофоретического анализа запасных белков зерна. М.: МСХА, 2003. 84 с.)
11. Piukkenen V. P., Gubareva N. K., Mitrofanova O. P. Searching for possible duplicates among the collection accessions of bread wheat from China // Agrarnaya Rossiya, 2005, no. 2, pp. 31–34 [in Russian] (Пюккенен В. П., Губарева Н. К., Митрофанова О. П. Поиск возможных дублетов среди коллекционных образцов мягкой пшеницы из Китая // Аграрная Россия. 2005. № 2. С. 31–34).
12. Romanova Yu. A., Gubareva N. K., Konarev A. V., Mitrofanova O. P., Lyapunova O. A., Anfilova N. A., Strelchenko P. P. The study of the *Triticum spelta* L. wheat species collection by using gliadin polymorphism // Genetics, 2001, vol. 37, no. 9, pp. 1258–1265 [in Russian] (Романова Ю. А., Губарева Н. К., Конарев А. В., Митрофанова О. П., Ляпунова О. А., Анфилова Н. А., Стрельченко А. П. Исследование коллекции вида пшеницы *Triticum spelta* L. по полиморфизму глиадинов // Генетика. 2001. Т. 37. № 9. С. 1258–1265).
13. Halafyan A. A. Statistics 6. Statistical data analysis. Moscow: Binom, 2010, 528 p. [in Russian] (Халафян А. А. Статистика 6. Статистический анализ данных. М.: Бином, 2010. 528 с.).
14. Bradley V., Kisha T., Jonson R. The identification of duplicate accessions within a grass germplasm collection using RAPD analysis [abstract] // Crop Sci. Soc. Am., 2002, p.131923.
15. Diederichsen A. Duplication assessments in Nordic *Avena sativa* accessions at the Canadian national genebank // Gen. Res. Crop Evol., 2009, vol. 56, no. 4, pp. 587–597.
16. Dobrovolskaya O., Saleh U., Malysheva-Otto L., Roder M. S., Borner A. Rationalising germplasm collections: a case study for wheat. // Theor. Appl. Genet, 2005, vol. 111, pp. 1322–1329. DOI 10.1007/s00122-005-0061-9
17. Fu Y. B. Genetic variability in multiple accessions of two Canadian heritage crop cultivars as revealed by AFLP markers // Comm. Biom. Crop Sci., 2006, vol. 1, pp. 1–10.
18. Hintum van Th. J. L. Drowning in the gene-pool. Managing genetic diversity in genebank collections: Academic thesis for the degree of Doctor of agronomy. Swed. Univer. Agr. Sci. 1994, 360 p.
19. Hintum van T. J. L. Duplication within and between germplasm collections. III. A quantitative

- model // Gen. Res. Crop Evol., 2000, vol. 47, pp. 507–513.
20. Hintum van T. J. L., Knupffer H. Duplication within and between germplasm collections. I. Identifying duplication on the basis of passport data // Gen. Res. Crop Evol., 1995, vol. 42, no. 2, pp. 127–133.
21. Hintum van T. J. L., Visser D. L. Duplication within and between germplasm collections. II. Duplication in four European barleys collections // Gen. Res. Crop Evol., 1995, vol. 42, no. 2, pp. 135–145.
22. International Rules for Seed Testing. Rules 1996. Verification of species and cultivar. Seed Sci. & Technol. 1996, vol. 24 (Supplement) pp. 253–270.
23. Konarev A. V., Gubareva N. K., Kornuchin D. L., Berner A. Gliadin elecrophoretic analysis of the genetic integrity of wheat (*Triticum aestivum*) accessions after frequent seed reproduction // Gen. Res. Crop Evol., 2005, vol. 52, pp. 519–523.
24. Konarev A. V., Vvedenskaya I. O., Nasanova E. A., Perchuk I. N. Use of prolamine polymorphism in studing genetic resources of forage grasses // Gen. Res. Crop Evol., 1995, vol. 42, pp. 197–209.
25. Leonova S., Shelenga T., Hamberg M., Konarev A., Loskutov I., Carlsson A. Analysis of oil composition in cultivars and wild species of Oat (*Avena* sp.) // J. Agr. Food Chem., 2008, vol. 56, no. 17, pp. 7983–7991.
26. Loskutov I. G., Omelchenko A. Y., Harrer S. Identification of duplicates by comparing of passport database of *Avena* germplasm collections. Available at [http://www.ecpgr.cgiar.org/AGIS/Docs/MAANov07\\_Paper\\_1L.pdf](http://www.ecpgr.cgiar.org/AGIS/Docs/MAANov07_Paper_1L.pdf), 2007
27. Lund B., Ortiz R., Skovgaard I. Analysis of potential duplicates in barley gene bank collections using re-sampling of microsatellite data // Theor. Appl. Genet., 2003, vol. 106, pp. 1129–1138. DOI 10.1007/s00122-002-1130-y
28. Lyman J. M. Progress and planning for germplasm conservation of major food crops. Plant Gen. Res. Newsletter, 1984, vol. 60, pp. 3–21.
29. Molecular biological aspects of applied botany, genetics and plant breeding. Series: «Theoretical Basis of Plant Breeding», vol. I / Ed. V. G. Konarev, A. V. Konarev. St. Peters-burg: VIR, 1996. 228 p.
30. Portyanko V. A., Sharopova N. R., Sozinov A. A. Characterisation of European oat germplasm allelic variation at complex avenin loci detected by acid polyacrylamide gel electrophoresis // Euphytica, 1998, vol. 102, pp. 15–27.
31. Ruiz M., Aguirriano E. Analysis of duplication in the Spanish durum wheat collection maintained in the CRF-INIA on the basis of agro-morphological traits and gliadin proteins // Gen. Res. Crop. Evol., 2004, vol. 51, pp. 231–235.
32. Sahu R. K. Screening for duplicates in the germplasm collections // Int. Rice Res. Newslett., 1989, vol. 14, p. 4.
33. The state of the world's plant genetic resources for food and agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, 1998, 510 p.
34. Verma S. K., Khanna V. K., Singh N. K. Random amplified polymorphic DNA analysis of Indian scented basmati rice (*Oryza sativa* L.) germplasm for identification of variability and duplicate accessions, if any // Electrophoresis, 1999, vol. 20, pp. 1786–1789.
35. Virk P. S., Newbury H. J., Jacson M. T., Ford-Lloyd B. V. The identification of duplicate accessions within a rice germplasm collection using RAPD analysis // Theor. Appl. Genet., 1995, vol. 90, pp. 1049–1055.
36. Willner E., Sackville Hamilton N.R., Knupffer H. Duplication in forages collections // Report of a Working Group on Forages. 6 th Meeting. 6–8 March. 1997. Beitostolen. Norway. / Ed. Maggioni L., Marum P., Sackville Hamilton N. R., Thomas I., Gass T., Lipman E. Rome. Italy: Int. Plant Gen. Res. Ins., 1998, pp. 92–95.
37. Yndgaard F., Loskutov I., Solberg S., Kovaleva O., Agnese K. Brantestam and T. Svensson J T A low-cost method for the evaluation of potential duplicate holdings of genebank accessions [In press].