

К ИЗУЧЕНИЮ НАСЛЕДОВАНИЯ МОРФОТИПА ХАМЕЛЕОН У ГОРОХА

М.А. АНТОНОВА, А.А. ДУТОВА, А.А. ЛУНЬКОВА,
П.В. МЕЩЕРЯКОВА, П.А. МИЛЯЕВА, А.А. СИНЮШИН,

кандидат биологических наук,

Е.А. ТОЩАКОВА*

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ БИОЛОГИЧЕСКОГО ФАКУЛЬТЕТА

МГУ ИМ. М.В. ЛОМОНОСОВА, МОСКВА

* ООО «МЕРЦ ФАРМА», МОСКВА

Изучены особенности наследования морфотипа хамелеон у гороха. Показано, что этот фенотип присущ гомозиготам по двум рецессивным мутациям – af и uni^{tac} . Полученные результаты указывают на независимый характер наследования мутаций. С использованием генетического картирования было показано, что ген UNI у линий с морфотипом хамелеон локализован в III группе сцепления.

Ключевые слова: горох посевной, развитие сложного листа, гибридологический анализ, генетическое картирование, гетерофиллия.

Успешность селекции растений, направленной на создание новых высокопродуктивных и технологичных сортов, во многом связана с внедрением в генотип культур генетических факторов, определяющих новые проявления не только количественных, но и качественных признаков. К таким признакам относятся, например, форма и окраска семян, наличие пигментации, наличие механизма вскрывания плодов. В селекции гороха посевного (*Pisum sativum* L.) в последние десятилетия большое значение имеет строение листа. Именно его особенности могут позволить сочетать высокую фотосинтетическую активность и устойчивость к полеганию.

Большой интерес для селекции гороха вызывает особый тип строения листа, названный хамелеон [1, 2]. У форм с подобным фенотипом описан целый ряд преимуществ. Такое строение листьев имеет зерновой сорт Спартак, внесенный в Госреестр селекционных достижений в 2009 г. Особенностью этого фенотипа является то, что первые настоящие листья состоят только из усиков, у листьев срединной формации кончики усиков уплощены, иногда развиваются листочки. Последние листья могут выглядеть практически нормально, хотя от листьев дикого типа их отличают длинные черешочки. Выраженность признака варьирует в зависимости от условий выращивания.

До настоящего времени генетическая природа возникновения морфотипа хамелеон остается предметом обсуждения. Первоначально подобная форма была получена от скрещивания сорта Filby с усатым листом (мутация *afila*, *af*) с мутантом, имеющим фенотип «усиковая акация» [1]. В настоящее время установлено, что фенотип «усиковая акация» присущ гомозиготам по мутации в гене *UNIFOLIATA* (*UNI*), которую называют uni^{tac} (синоним tac^B , см. [2]). Ген *UNI* и его мутантный аллель uni^{tac} уже картированы на генетической карте, идентифицированы и хорошо изучены на молекулярном уровне [3].

При скрещивании растений морфотипа хамелеон с усатыми формами (*af*) в F_2 наблюдается расщепление на усатые и хамелеоны в соотношении 3:1 [1, 2]. Тем не менее, А.М. Задорин [2:16] указывает, что «природа расщепления при скрещиваниях гетерофильных растений с листочковыми формами окончательно еще не изучена». Таким образом, существует необходимость уточнить особенности наследования и генетического контроля развития морфотипа хамелеон у гороха. Настоящая работа посвящена изучению генетической регуляции морфотипа хамелеон гибридологическим методом и с использованием молекулярного картирования мутации uni^{tac} на генетической карте.

Материал и методика

Линии и условия их выращивания

Линия Аз-23, имеющая морфотип хамелеон, была любезно передана в коллекцию кафедры генетики биологического факультета МГУ А.Н. Зеленовым. Линию воспроизводили на экспери-

ментальном участке на территории Звенигородской биостанции им. С.Н. Скадовского МГУ. Там же выполняли скрещивания с жизнеспособными хлорофилл-дефицитными мутантами из коллекции кафедры генетики, имеющими иной листовый фенотип. Родительские формы, гибриды F₁ и F₂ входили в набор учебных задач для студентов кафедры генетики, проходивших летнюю практику по генетическому анализу у растений в период с 2004 по 2014 г. (табл. 1). Анализ расщепления проводили методом «хи-квадрат».

Генетическое картирование

Положение мутации *uni*^{tac} устанавливали в гибридной популяции F₂ (Аз-23 × «Хлорофилл-15») путем поиска сцепления мутации с морфологическими и молекулярными маркерами группы сцепления (ГС) III. Были использованы ДНК-маркеры на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР). Методика выделения ДНК, последовательности праймеров, условия проведения ПЦР, использованные эндонуклеазы рестрикции и прочие параметры приведены в работе [4]. В дополнение к CAPS-маркерам был также использован один SCAR-маркер K10#950, также локализованный в ГС III [5]. Взаимное положение сцепленных маркеров и расстояния между ними оценивали с помощью программы MapMaker, параметры расчета приведены в работе [4].

Результаты и обсуждение

Гибридологический анализ наследования морфотипа хамелеон

В таблице 1 приведены результаты гибридологического анализа наследования морфотипа хамелеон при гибридизации с формами, имеющими иной фенотип листа. Во всех случаях предварительно оценивали, насколько достоверно расщепление по признакам, определяемым генами *AF* и *UNI*, соответствует 3:1. Затем определяли соответствие расщепления по обоим генам соотношению 9:3:3:1. Видно, что в большинстве случаев наблюдаемое расщепление достоверно соответствует ожидаемому. В нескольких популяциях F₂ отмечено отклонение от ожидаемого расщепления, однако мы полагаем, что оно носит статистический характер. Например, в популяции F₂ (Аз-23 × «Хлорофилл-6» (2008)) наблюдается дефицит только одного предположительно некроссоверного класса (*AF_ UNI_*) из двух. В случае истинного сцепления генов *AF* и *UNI* расщепление было бы иным.

Таблица 1

Наблюдаемые расщепления по признаку формы листа в F₂ от скрещивания линии Аз-23 (хамелеон) с линиями, имеющими листья другого строения. Значения χ^2 , превышающие критические (для гипотезы H₀ о расщеплении 9:3:3:1, $p < 0,05$), выделены

Популяция F ₂ (год)	Нормальный лист	Усатый лист	Усиковая акация	Хамелеон	χ^2
Аз-23 × «Хлорофилл-6» (2008)	93	34	22	9	2,878
Аз-23 × «Хлорофилл-6» (2012)	130	24	28	13	10,137
Аз-23 × «Хлорофилл-12» (2014)	143	59	39	12	5,242
Аз-23 × «Хлорофилл-15» (2004)	98	41	32	8	2,801

Самое простое объяснение возникновения четырех фенотипических классов среди гибридов F₂ – независимое наследование генов *AF* и *UNI*. Двойной мутант *af af uni*^{tac} *uni*^{tac} выщепляется с частотой 0,0625 (1/16) и имеет морфотип хамелеон. Это вполне согласуется с тем, что формы с морфотипом хамелеон были впервые обнаружены именно среди гибридов F₂ от скрещивания линий с генотипами *af af UNI UNI* (усатый лист, сорт Filby) и *AF AF uni*^{tac} *uni*^{tac} («усиковая акация», мутант Б. Шармы) [1].

А.Н. Зеленовым [1] была высказана гипотеза о том, что возникновение морфотипа хамелеон связано с транслокацией небольшого участка ГС III, содержащего аллель *uni*^{tac}, на ГС I. В результате мутации *af* и *uni*^{tac} оказываются в сцепленных локусах ГС I.

Рассмотрим последствия транслокации мутации uni^{tac} на ГС I. При подобной перестройке локус ГС III, ранее занятый геном UNI , отсутствует: ген UNI представлен в ГС III своим нуль-аллелем (для удобства обозначим его uni^0). Тогда формы с морфотипом хамелеон имеют генотип $af\ uni^{tac} // af\ uni^{tac}\ uni^0 // uni^0$ (гены одной группы сцепления подчеркнуты). Напротив, формы с нормальным (листочковым) листом имеют генотип $AF // AF\ UNI // UNI$. При скрещивании этих форм образуются гетерозиготные гибриды F_1 с генотипом $AF // af\ uni^{tac}\ UNI // uni^0$.

В таблице 2 приведены генотипы гамет, которые образуются у гибридов F_1 . Функционально гаметы, несущие любой рецессивный аллель гена UNI (uni^{tac} или нуль-аллель uni^0), идентичны. Так как при отсутствии кроссинговера четыре типа гамет образуются с равной вероятностью (0,25), в F_2 при самоопылении должны возникать четыре фенотипических класса: 0,5625 AF_UNI ; 0,1875 $AF_uni\ uni$ (любой рецессивный аллель); 0,1875 $af\ af\ UNI$; 0,0625 $af\ af\ uni\ uni$.

Таблица 2

Типы гамет, образующиеся у гибридов F_1 от скрещивания между формами с нормальным листом и морфотипом хамелеон - в соответствии с гипотезой о транслокации

При отсутствии кроссинговера в I группе сцепления								
Гаметы	$AF\ UNI$		$AF\ uni^0$		$af\ uni^{tac}\ UNI$		$af\ uni^{tac}\ uni^0$	
Частоты	0,25		0,25		0,25		0,25	
При наличии кроссинговера в I группе сцепления с частотой p								
Некроссоверные					Кроссоверные			
Гаметы	AF UNI	AF uni^0	$af\ uni^{tac}$ UNI	$af\ uni^{tac}$ uni^0	$AF\ uni^{tac}$ UNI	$AF\ uni^{tac}$ uni^0	af UNI	af uni^0
Частоты	0,25× (1-p)	0,25× (1-p)	0,25× (1-p)	0,25× (1-p)	0,25p	0,25p	0,25p	0,25p

Если предположить, что в ГС I может происходить кроссинговер с частотой p , у гибридов F_1 возникает 8 типов гамет (таблица 2). Если аллели uni^{tac} и uni^0 функционально идентичны, а присутствие в гамете хотя бы одного доминантного аллеля UNI нивелирует действие любого числа рецессивных аллелей этого гена, то при суммировании функциональных классов гамет получим те же самые частоты: 0,25 $AF\ UNI$; 0,25 $af\ UNI$; 0,25 $AF\ uni$ (любой рецессивный аллель); 0,25 $af\ uni$. Результат самоопыления будет таким же, как и в предыдущих случаях, и в потомстве F_2 будет наблюдаться расщепление по фенотипу 9:3:3:1. Можно заключить, что гибридологический анализ *не дает оснований* для предпочтения гипотезы о наличии транслокации или ее отвержения.

Аллель uni^{tac} обладает достаточно «мягким» действием. Известно, что у гомозигот по более «жесткому» аллелю с полной утратой функции UNI нарушения в развитии существенны (однолисточковые листья, аномальные цветки и соцветия, стерильность) [3]. Развивая гипотезу о переносе мутации uni^{tac} в ГС I (и, следовательно, возникновении нуль-аллеля uni^0 в ГС III), мы приходим к заключению, что в F_2 должны возникать рекомбинанты $AF_uni^0\ uni^0$ (если кроссинговер не происходит) и $af\ af\ uni^0\ uni^0$ (если кроссинговер происходит). Логично предположить, что нуль-аллель в гомозиготе должен обладать действием, сопоставимым с действием «жесткого» аллеля. Однако в потомстве F_2 от скрещивания листочковых форм с линиями морфотипа хамелеон никогда не наблюдается появления рекомбинантов с сильными нарушениями развития.

Наконец, гипотеза о сцепленном наследовании генов AF и UNI не находит подтверждения на фактическом материале, приведенном в работе [1]. Расщепления в F_2 от скрещиваний между хамелеонами и листочковыми формами [1: 25] достоверно отклоняются от ожидаемого соотношения 9:3:3:1. Если допустить сцепленное наследование, можно рассчитать частоту образования гамет $af\ uni^{tac}$ из численности хамелеонов среди гибридов: во всех трёх случаях эта частота составляет около 0,27. Так как такие гаметы - нерекомбинантные по сравнению с родительскими формами, то кроссоверные гаметы должны образовываться с частотой $1 - 2 \times 0,27 = 0,46$. В этом случае расщепление в F_2 должно составить 0,5729 AF_UNI ; 0,1771 $AF_uni^{tac}\ uni^{tac}$; 0,1771 $af\ af\ UNI$; 0,0729 $af\ af\ uni^{tac}\ uni^{tac}$. Проверка по методу «хи-квадрат» показывает резкое отклонение наблюдаемых рас-

щеплений от ожидаемого в случае сцепления генов *AF* и *UNI* (χ^2 для трех приведенных в [1] расщеплений варьирует от 26,224 до 31,338, $p < 0,05$).

Результаты генетического картирования мутации *uni^{tac}*

Для окончательного разрешения вопроса о регуляции формы листа у формы хамелеон было осуществлено картирование мутации *uni^{tac}* в гибридной популяции F_2 от скрещивания хлорофилл-дефицитного мутанта «Хлорофилл-15» с линией Аз-23. Было обнаружено статистически достоверное сцепление мутации *uni^{tac}* с молекулярными и морфологическими маркерами ГС III (рис. 1), подтверждающее литературные данные о локализации гена *UNI*. Таким образом, у форм с морфотипом хамелеон ген *UNI* (представленный мутантным аллелем *uni^{tac}*) локализован в ГС III, а не перенесен в ГС I в результате транслокации.



Рис. 1. Участок генетической карты ГС III гороха, включающий ген *UNI*, по результатам картирования в популяции F_2 (Аз-23 × «Хлорофилл-15»). Верхний ряд чисел – генетические расстояния (сМ), нижний – значения lod-балла.

Расстояния, для которых значение lod-балла превышает 3,0, считали достоверными

В гибридных популяциях F_2 , в которых есть различия между родительскими формами по окраске семян (ген *I*, ГС I), дополнительно было проанализировано совместное наследование мутаций *uni^{tac}* и *i* (данные не представлены). Если предположить, что гены *AF* и *UNI* сцеплены в результате транслокации, можно ожидать также сцепление *UNI* и *I* (гены *I* и *AF* сцеплены). Ни в одной популяции не удалось обнаружить сцепленное наследование *I* и *UNI*, что также может свидетельствовать в пользу отсутствия транслокации между ГС I и ГС III у хамелеонов.

Гетерофиллия как нормальное явление у гороха

Одной из интересных особенностей формы хамелеон можно считать выраженную гетерофиллию: морфология листьев на разных узлах различна (см. выше). Однако анализ различных листовых фенотипов показывает, что это явление обычно для гороха. У нормальных (листочковых) форм первые два листа всегда имеют вид чешуек, третий имеет одну пару листочков и обычно лишен усиков и т.д. На примере линий гороха с различными листовыми фенотипами видно, что по мере развития индивидуального растения всегда обнаруживается как количественная, так и качественная изменчивость строения листа (рис. 2), т.е. собственно гетерофиллия. Так, в последующих узлах изменяется число структур листа; в ряде случаев первые листья лишены усиков и т.д.

Наиболее простое объяснение этого явления связано с тем, что строение листа сильно зависит не только от генотипа, но и от гормонального статуса растения. Если первый неизменен в ходе онтогенеза, то второй меняется достаточно существенно. Роль фитогормонов (в первую очередь ауксина) и генов *AF* и *UNI* была экспериментально изучена в недавней работе [6]. Вероятнее всего, именно в возрастной динамике ауксина следует искать причину гетерофиллии у бобовых – в том числе и у гороха с фенотипом хамелеон. В онтогенезе изучаемому морфотипу присуща выраженная гетерофиллия, проявляющаяся на качественном и количественном уровнях, но она не уникальна только для растений-хамелеонов.

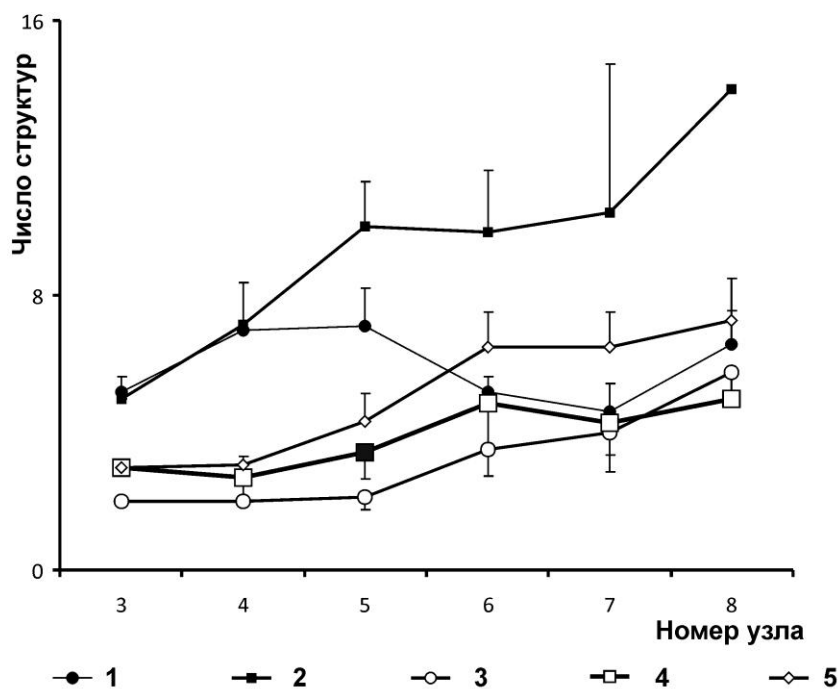


Рис. 2. Динамика изменения числа структур листа (усики + листочки, у tac^A учитывали также число долей листочков) у различных линий гороха. Приведены средние значения \pm стандартное отклонение. 1 – Filby (*af*), 2 – L131 (*af*), 3 – WL102 (*tl*), 4 – рекомбинант tac^A , 5 – Узкобобовый (дикий тип). У tac^A выделен узел, на котором впервые появляются усики

Выводы

Результаты проведенных исследований по гибридологическому анализу наследования листового морфотипа хамелеон и молекулярно-генетическому картированию мутации uni^{tac} убеждают нас в том, что необычный фенотип является результатом взаимодействия двух независимо наследующихся рецессивных мутаций – *af* и uni^{tac} .

Полученные данные могут быть использованы при планировании селекционной работы с использованием линий с морфотипом хамелеон. При скрещивании растений-хамелеонов с нормальными (листочковыми) линиями среди гибридов F_2 ожидаемая доля хамелеонов составляет 0,0625 (1/16). По 2/3 всех растений F_2 с усатым листом (*af af UNI*) и фенотипом «усиковая акация» (*AF uni^{tac} uni^{tac}*) при самоопылении дадут потомство F_3 , часть которого будет иметь фенотип хамелеон. Отклонения наблюдаемых расщеплений от ожидаемых связаны со случайными причинами и, возможно, наличием генов-модификаторов, которые влияют на проявление листовых мутаций в фенотипе гибридов.

Авторы благодарят доктора с.-х. наук А.Н. Зеленова за предоставленный для работы материал и ценные консультации, а также за рецензирование рукописи и ценные замечания; канд. биол. наук Ф.А. Коновалова, О.А. Аш и Г.А. Хартину за помощь в проведении отдельных этапов исследования; А.С. Белякову за обсуждение ряда положений данной работы, а также всех студентов, работавших с линией Аз-23 во время летних кафедральных практик 2004-2014 гг.

Литература

1. Зеленев А.Н. Селекция гороха на высокую урожайность семян: дисс. в виде научного доклада ... докт. с.-х. наук. Брянск. 2001. – 60 с.
2. Задорин А.М. Гетерофильная форма гороха и ее селекционные свойства // Зернобобовые и крупяные культуры. – 2013. – №3. – С. 16-18.
3. Gourlay C.W., Hofer J.M.I., Ellis T.H.N. Pea compound leaf architecture is regulated by interactions among the genes *UNIFOLIATA*, *COCHLEATA*, *AFILA*, and *TENDRIL-LESS* // Plant Cell. – 2000. – V. 12. – P. 1279-1294.

4. Konovalov F.A., Toshchakova E., Gostimsky S.A. A CAPS marker set for mapping in linkage group III of pea (*Pisum sativum* L.) // Cell. Mol. Biol. Lett. – 2005. – V. 10. – P. 163-171.
5. Чегамирза К., Ковеза О.В., Коновалов Ф.А., Гостимский С.А. Идентификация и локализация гена *chi115* и сцепленных с ним ДНК-маркеров у гороха посевного (*Pisum sativum* L.) // Генетика. – 2004. – Т. 40. – С. 909-915.
6. DeMason D.A., Chetty V., Barkawi L.S., Liu X., Cohen J.D. *Unifoliata-Afila* interactions in pea leaf morphogenesis // American Journal of Botany. – 2013. – V. 100. – P. 478-495.

TO STUDYING OF INHERITANCE OF MORPHOTYPE CHAMELEON OF PEAS

M.A. Antonova, A.A. Dutova, A.A. Lun'kova, P.V. Mescheryakova, P.A. Milyaeva, A.A. Sinyushin
M.V. LOMONOSOV MOSCOW STATE UNIVERSITY

E.A. Toshchakova

LLC «MERZ PHARMA», RUSSIA

Abstract: Features of inheritance of morphotype chameleon of peas are studied. It is shown that this phenotype is inherent in homozygotes on two recessive mutations – *af* and *uni*^{lac}. The obtained results specify an independent character of inheritance of mutations. With use of genetic mapping it has been shown that gene *UNI* at lines with phenotype chameleon is localized in the III^d group of coupling.

Keywords: Common peas, compound leaf development, hybrid analysis, genetic mapping, heterofilia.

УДК 635.65: 631.526.32(471.311)

НОВОЕ ПОКОЛЕНИЕ СОРТОВ ЗЕРНОБОБОВЫХ КУЛЬТУР МОСКОВСКОГО НИИСХ

Г.А. ДЕБЕЛЫЙ, доктор сельскохозяйственных наук

Л.В. КАЛИНИНА, кандидат биологических наук

А.В. МЕДНОВ, кандидат сельскохозяйственных наук

А.В. ГОНЧАРОВ, кандидат сельскохозяйственных наук

ФГБНУ «МОСКОВСКИЙ НИИСХ» «НЕМЧИНОВКА»

В статье представлены основные результаты селекционной работы за последнее пятилетие. Выведены и районированы более технологичные и скороспелые высокоурожайные сорта: горох посевной – Немчиновский 100 и полевой – Флора 2; узколистный люпин – Фазан, яровая вика – Уголек.

Ключевые слова: сорта, селекция, горох, вика яровая, люпин узколистный, урожайность, конкурсное испытание.

В обеспечении продовольственной безопасности России важное значение имеет производство высококачественных продуктов для населения и кормов для животноводства. Основными источниками растительного белка являются бобовые (клевер, люцерна) и зернобобовые культуры – горох, соя, люпин, вика. В соотношении 8:1 или 7:1 из растительного синтезируется животный белок – один из основных продуктов полноценного питания [1]. Бобовые культуры при благоприятных почвенно-климатических условиях с помощью клубеньковых бактерий используют свободный азот из воздуха для синтеза белковых веществ.

Не благоприятные погодные условия во второй период вегетации 2013-2014 гг. показали, что позднеспелая соя, при избыточном увлажнении во многих регионах затягивает созревание семян, и даже как в Сибири и на Урале, убирается по снегу. В центральных областях Нечерноземья и в республиках верхнего Поволжья основной зернобобовой культурой является горох, в меньшей мере вика и люпин [2].

Начало 2000-х годов связано с преобладанием на полях устойчивых к полеганию низкорослых и среднерослых сортов гороха с усатыми листьями. Опытные и производственные данные показывают, что наибольшее распространение в Нечерноземной зоне имеет возделывание сортов в занятых парах. Для подготовки почвы под озимые важное значение имеет срок уборки урожая. С этой точки зрения заслуживает внимание сорт гороха Немчиновский 100, районированный с 2010