

Abstract: *In the article results of obtaining passaging callus tissues of four genotypes of peas are presented (varieties Orlus, Batrak and selection lines Az 26, Az 93-1964), keeping a high morphogenetic potential and ability to regeneration of shoots for a long time. It is established that for an effective set of morphogenic structures with the subsequent formation of plants the combination of 5,0 mg/l BAP and 0,2 mg/l of NAA in a nutrient medium is optimum. Conditions providing obtaining of equilibrium system at which growth of not differentiated tissue and formation of regenerant shoots in long-term passaging calluses occurs simultaneously are developed. In this case it is more preferable to use alternating of cycles of cultivation on nutrient mediums with the low content of auxins (NAA-0,2 mg/l) and higher (NA-2,0 mg/l) at constant concentration of cytokinins (BAP-5,0 mg/l). Conditions of obtaining of scion-rooted regenerant plants of peas on rhizogenous mediums in the presence of auxins are developed. Regenerated plants R₀ of all the studied peas genotypes are obtained. The maximum ability to the induction of morphogenesis and formation of regenerant shoots in culture of long-term passaging calluses was shown by a white-flowered, leafless variety Orlus.*

Keywords: Common peas, callus, morphogenesis, rhizogenesis, regeneration of plants.

УДК 633.358:581.16

ИДЕНТИФИКАЦИЯ УНИКАЛЬНЫХ БЕЛКОВЫХ КОМПОНЕНТОВ В ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИХ СПЕКТРАХ ОБРАЗЦОВ ДИКИХ ПОДВИДОВ ГОРОХА

С.В. БОБКОВ, кандидат сельскохозяйственных наук

И.А. БЫЧКОВ, младший научный сотрудник

ФГБНУ «ВНИИ ЗЕРНОБОБОВЫХ И КРУПЯНЫХ КУЛЬТУР»

E-mail: svbobkov@gmail.com

Проведено сравнительное изучение электрофоретических спектров белков семян у 9 сортов и линий культурного и 15 образцов диких подвидов гороха. Проведен дискриминантный анализ статистически значимой принадлежности белков полиморфных компонентов к диким или культурным образцам гороха. В результате анализа дискриминировано 9 полиморфных компонентов. Пять компонентов преимущественно содержали белки культурных сортов и линий гороха. Четыре белковых компонента представляли белки образцов диких родичей гороха. Различия в белковом комплексе дикого и культурного гороха затрагивали компоненты запасных белков конвицилина, вицилина, легумина, а также липоксигеназы, которая выполняет функцию запасного белка в прорастающих семенах. Полученные результаты можно интерпретировать как присутствием специфических «культурных» или «диких» изоформ запасных белков, так и различной степенью их накопления, что является предметом дополнительного исследования.

Ключевые слова: горох, электрофорез, дискриминантный анализ, компонент, запасной белок, конвицилин, вицилин, легумин.

Горох является важной сельскохозяйственной культурой умеренного климата. По данным FAOSTAT в 2014 году в России горох выращивали на площади 893 тыс. га и получили 1,5 млн. тонн зерна. Средняя урожайность зерна составила 1,7 т/га.

Содержание питательных веществ в семенах гороха подвержено исключительно сильному варьированию. Семена гороха в зависимости от генотипа содержат 18,6-54,1 % крахмала, 5,9-12,7 % клетчатки, 1,3-2,1 % сахарозы, 0,6-5,5 % жира и 15,5-34,4 % белка [1, 2]. Семена гороха содержат минералы, полифенольные соединения, сапонины, α-галактозиды и фитиновую кислоту. Белки семян диких подвидов гороха характеризуются высоким

содержанием незаменимых аминокислот лизина и треонина [3]. Горох в качестве источника ценного белка широко используется в пищевой промышленности и кормопроизводстве.

Идентификация нового генетического материала начинается с исследования полиморфизма. Для оценки генетического разнообразия гороха широко используют полиморфизм ДНК-маркеров. ДНК-маркеры находят широкое применение в селекции сельскохозяйственных растений. Однако для поиска ДНК-маркеров генов интрогрессируемых хозяйственно-ценных признаков требуется проведение дорогостоящих процедур с использованием большого числа ПЦР-реакций. Молекулярные маркеры дисперсно распределены в геноме и большинство из них являются нейтральными для эволюции. Нейтральные маркеры не связаны с фенотипами, что затрудняет идентификацию новых уникальных генов и аллелей. Поэтому идентификация и использование белковых маркеров, продуктов экспрессии генов, может служить важным направлением в селекции гороха на высокое качество зерна.

Молекулярно-генетические исследования показали, что современные сорта гороха характеризуются узким генетическим базисом и ограниченным набором ценных аллелей. Сорта гороха страдают от засухи, фузариоза, мучнистой росы, поражения насекомыми-вредителями, что приводит к снижению урожайности и качества зерна. Вовлечение в селекционный процесс новых аллелей хозяйственно ценных признаков дикорастущего гороха позволит повысить генетическое разнообразие исходного материала для селекции новых сортов с устойчивостью к неблагоприятным факторам внешней среды и высоким качеством зерна.

Перспективными направлениями использования диких форм в селекции гороха являются устойчивость к вредителям и патогенам, а также к абиотическому стрессу, питательная и кормовая ценность, агротехнические преимущества и симбиотическая азотфиксация [4].

Обогащение новых мутантных форм гороха с измененной архитектоникой листового аппарата и биоэнергетическим потенциалом аллелями важных биохимических признаков диких родичей, не вовлеченных в селекционный процесс в ходе культурной эволюции гороха, способно создать перспективный исходный материал для ароморфозного направления селекции [5, 6].

Существуют два пути переноса полезных генов (аллелей) в элитные селекционные линии гороха – генетическая инженерия и интрогрессия из геномов диких родичей. Генетическая инженерия является дорогим и недостаточно разработанным на горохе методом. Поэтому интрогрессивная гибридизация с применением селективных фильтров для вредных генов является актуальным методом улучшения гороха.

Согласно классификации Р.Х. Макашевой [7] род гороха *Pisum* L. состоит из 2 видов: *P. sativum* L. – горох посевной и *P. fulvum* Sibth. et Smith – горох красно-желтый. Вид *P. sativum* L. представлен 6 подвидами: *elatius* (Bieb.) Schmalh., *syriacum* (Boiss. et Noe) Berger, *abyssinicum* (A. Br.) Berger, *transcaucasicum* Makash., *asiaticum* Govorov и *sativum*. В настоящее время вид *P. fulvum* вызывает повышенный интерес у исследователей. В качестве источника генов хозяйственно ценных признаков *P. fulvum* интенсивно скрещивают с элитными сортами и линиями культурного гороха [8]. Разрабатываются методы интрогрессивной селекции гороха с использованием широкого набора образцов *P. fulvum* [9]. Интерес к диким подвидам *P. sativum* как источнику хозяйственно ценных признаков менее выражен. В основном исследования затрагивают изучение коллекций и филогенетических отношений между таксонами дикорастущих подвидов гороха с использованием различных типов маркеров. Проводятся исследования электрофоретических спектров белков семян у образцов диких подвидов гороха [10].

Цель настоящих исследований состояла в идентификации белковых компонентов с уникальными белками диких образцов гороха для использования в селекционном процессе.

Методика исследований

Изучали спектры белков семян 6 сортов - Аист, Батрак, Девиз, Стабил, Темп, Фараон, 3 линий культурного гороха - ПАП 485/4, ВИ 9402, Рас-тип [11], 15 образцов диких подвидов гороха посевного - *elatus* (1851, 2173, 2524, 3115, 3370, 4014), *asiaticum* (1915, 1923, 2645, 5322), *syriacum* (2521), *transcaucasicum* (296, 2365, 3249, 8460).

Для выделения и электрофоретического разделения белков семян культурных генотипов и дикорастущих подвидов гороха использовали стандартный арбитражный метод ISTA (Конарев В.Г., 2000). Анализировали белки из 10 индивидуальных семян каждого представителя вида и подвида гороха. Белки семян экстрагировали из муки электродным буфером (трис, глицин, додецилсульфат натрия, pH=8,3) в течение 20 часов при температуре 3-4°C. Пипеткой брали 10 мкл экстракта и переносили в ячейки планшеток для смешивания с равным объемом буфера нанесения (додецилсульфат натрия, трис-HCl, глицерин, β-меркаптоэтанол, бромфеноловый синий). Концентрация разделяющего геля – 12,5 %, концентрирующего – 5 %. Для проведения исследований использовали камеру для вертикального электрофореза белков VE-4 фирмы «Хеликон» и реактивы для SDS-PAGE электрофореза.

Анализ относительной подвижности белковых компонентов образцов гороха проводили с использованием спектра сои сорта Ланцетная. Определяли насыщенность окрашивания компонентов спектра, которую оценивали как: 1 – слабую, 2 – интенсивную и 3 – очень интенсивную.

Идентификацию полиморфных компонентов между культурными и дикими образцами проводили в результате оценки присутствия/отсутствия и последующего сравнения средних величин интенсивности окраски (0-3) по критерию Стьюдента ($p < 0,95$). Интенсивность окрашивания позиции отсутствующего компонента принимали за ноль. Полиморфные компоненты для выявления статистически значимой принадлежности компонентов к диким или культурным образцам гороха подвергали дискриминантному анализу. Идентификацию запасных белков гороха - легумина, вицилина и конвицилина, а также липоксигеназы проводили по молекулярной массе компонентов. Использовали маркеры молекулярной массы 6,5-200 кДа (SIGMA, США).

Результаты исследований

В ходе исследования были изучены белковые спектры семян 9 сортов (*Pisum sativum* L.) и 15 образцов семян диких подвидов гороха (рисунок). В культурных и диких образцах гороха число белковых компонентов варьировало в интервале 50-70. Как культурные, так и дикие образцы гороха характеризовались наличием от 1 до 7 типов спектров. Всего в опыте было выявлено 54 типа спектров.

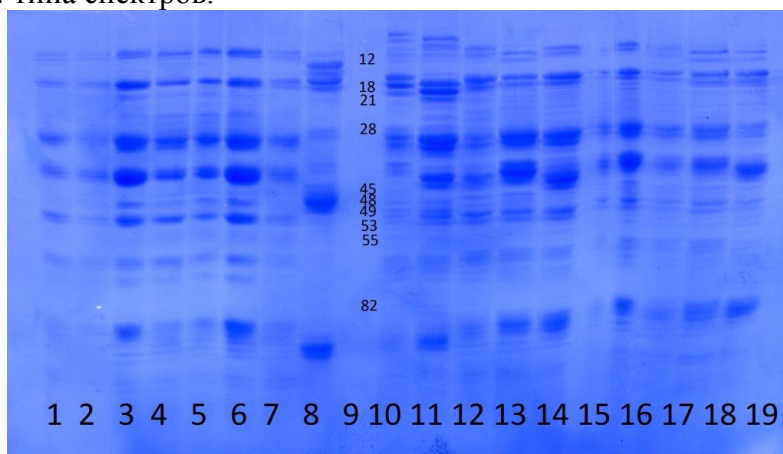


Рис. Размещение образцов на электрофоретических спектрах: 1 -Стабил, 2- ПАП 485/4, 3 - Аист, 4 - Фараон, 5 - Батрак, 6 - Рас-тип, 7 - ВИ 9402, 8 - соя Ланцетная, 9 - размещение номеров компонентов, 10 - И6098881 (*P. fulvum*), 11 - 2529 (*abyssinicum*), 12 - 565496 (*abyssinicum*), 13 - 3370 (*elatus*), 14 -1915 (*asiaticum*), 15 - 2524 (*elatus*), 16 - 1851 (*elatus*), 17 - 1923 (*asiaticum*), 18 - 8460 (*transcaucasicum*), 19 - 1974 (*asiaticum*)

Оценка электрофоретических спектров по присутствию/отсутствию компонентов и наличию существенных различий ($t > 0,95$) по средней интенсивности их окрашивания у диких и культурных образцов позволило выявить 54 полиморфных компонента (в табл. 1 приведены только 9 полиморфных компонентов).

Таблица 1

Полиморфные компоненты с существенной зависимостью интенсивности компонента от принадлежности к «дикому» или «культурному» типу

Сорт, линия, образец	Тип спектра	12	18	21	28	45	48	53	55	82
Культурные сорта и линии гороха										
Аист	I	1	3	0	1	3	0	3	3	0
Батрак	I	2	3	3	1	2	0	0	1	0
Девиз	I	3	3	0	2	0	0	0	0	2
	II	3	3	1	2	0	0	0	0	2
	III	3	3	1	2	0	0	0	0	2
Стабил	I	1	0	1	2	2	1	3	2	0
	II	1	0	1	2	3	0	3	3	0
Темп	I	2	3	1	2	0	0	0	1	2
	II	2	3	1	2	0	0	0	1	2
	III	2	3	1	2	0	0	0	1	2
	IV	2	3	1	2	0	0	0	1	2
Фараон	I	0	0	3	1	2	1	1	1	0
ПАП 485/4	I	0	3	1	1	3	0	3	3	0
Рас-тип	I	2	3	3	1	3	2	3	0	0
ВИ 9402	I	2	0	3	1	1	1	0	1	0
Дикие образцы гороха										
1851 <i>elatius</i>	I	1	0	3	1	3	0	3	1	0
2173 <i>elatius</i>	I	1	0	2	1	3	2	3	0	0
	II	1	0	2	1	3	2	3	0	0
2524 <i>elatius</i>	I	0	1	3	1	2	2	3	0	1
3115 <i>elatius</i>	I	0	1	3	2	3	2	3	0	0
	II	0	1	3	2	3	2	3	0	0
	III	0	1	3	2	3	2	3	0	0
3370 <i>elatius</i>	I	1	0	2	1	3	3	3	1	0
4014 <i>elatius</i>	I	1	1	3	0	1	0	3	0	0
	II	1	2	3	1	3	0	3	0	0
	III	1	1	3	1	3	1	3	0	0
1915 <i>asiaticum</i>	I	1	1	2	1	2	0	3	1	0
	II	1	1	2	1	2	0	3	1	0
	III	1	1	2	1	2	0	3	1	0
1923 <i>asiaticum</i>	I	0	1	3	1	3	2	3	0	1
2645 <i>asiaticum</i>	I	1	1	0	0	2	0	1	3	0
5322 <i>asiaticum</i>	I	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	II	1	0	3	1	1	0	0	0	0
	III	1	0	0	0	1	1	0	0	0
	IV	1	2	3	0	1	0	0	0	0
	V	1	2	3	0	1	0	0	0	0
2521 <i>syriacum</i>	I	2	0	3	1	3	2	3	0	0
	II	2	0	3	1	3	2	3	0	0

	III	2	0	3	1	3	2	3	0	0
<i>transcaucasicum</i>	I	0	0	3	1	2	0	0	0	0
	II	0	0	3	1	2	0	0	0	0
	III	0	0	3	1	2	0	0	0	0
	IV	0	0	3	1	2	0	0	0	0
	V	0	0	3	1	2	0	0	0	0
	VI	0	0	3	1	2	0	0	0	0
	VII	0	0	3	1	2	0	0	0	0
2365 <i>transcaucasicum</i>	I	0	0	2	1	3	3	3	0	0
	II	0	0	2	1	3	3	3	0	0
	III	0	0	2	1	3	3	3	1	0
3249 <i>transcaucasicum</i>	I	0	1	3	1	3	0	3	0	0
	II	0	1	3	1	3	2	3	0	0
	III	0	1	3	1	3	0	3	0	0
	IV	0	1	3	1	3	2	3	0	0
8460 <i>transcaucasicum</i>	I	0	1	3	1	1	0	0	1	0
Средняя интенсивность компонентов (культурные образцы)		1,7	2,2	1,4	1,6	1,3	0,3	1,1	1,2	0,9
Средняя интенсивность компонентов (дикие образцы)		0,6	0,6	2,5	0,9	2,3	1	1,9	0,3	0,05
Существенность различий (p)		0,999			0,99	0,95	0,99			

Примечание: жирным шрифтом выделены компоненты с максимальным выражением интенсивности.

Дискриминантный анализ выявил статистически значимую зависимость между «диким» или «культурным» статусом образцов и наличием или интенсивностью окрашивания у 9 (12, 18, 21, 28, 45, 48, 53, 55, 82) полиморфных компонентов (табл. 2). При этом компоненты 12, 18, 28, 55, 82 в максимальных выражениях интенсивности (2 и 3) принадлежали культурным сортам и линиям гороха (табл. 1). Белковые компоненты 21, 45, 48, 53 представляли белки образцов диких родичей гороха.

Таблица 2

Дискриминация компонентов белковых спектров со статистически существенной принадлежностью к дикому или культурному гороху

Компонент	Коэффициент детерминации, D	Значимость связи, p
12	0,909861	0,034141
18	0,640529	0,004070
21	0,998419	0,030417
28	0,806813	0,010589
45	0,808353	0,016874
48	0,807292	0,076038
53	0,850463	0,079998
55	0,781067	0,009122
82	0,991112	0,003459

Белковый компонент 12 представляет липоксигеназу. Этот компонент с интенсивностью 3 присутствует в семенах культурных растений. Компоненты конвицилина 18 и 21 ассоциированы соответственно с культурными и дикими растениями гороха. Компонент 28 относится к непроцессированному леумину и встречается у культурного гороха. Выявленные дискриминантным анализом белковые компоненты 45 и 48 являются кислыми субъединицами леуминов. Эти компоненты характерны для диких образцов

гороха. Белковые компоненты 53, 55 и 82 относятся к вицилинам. При этом белок компонента 53 преимущественно накапливается в семенах диких образцов гороха. Напротив, белковые компоненты вицилинов 55 и 82 характерны для культурного гороха.

Максимальная интенсивность (3) компонента липоксигеназы 12 характерно для всех 3 типов спектров сорта Девиз (табл. 1). Компонент «культурного» конвицилина 18 максимально (3) выражен у сортов Аист, Батрак, Девиз и Темп, а также линий ПАП 485/4 и Рас-тип. Компонент «дикого» конвицилина 21 с высокой интенсивностью (3) окрашивания был характерен для образцов 296, 1851, 1923, 2521, 2524, 3115, 3249, 8460. Интенсивно окрашенный компонент 21 также присутствовал в спектрах отдельных представителей культурного гороха (сорта Батрак, Фараон и линии Рас-тип, ВИ 9204).

Компонент непротерсированного легумина 28 с наибольшей интенсивностью (2) окрашивания характерен для культурных сортов гороха Девиз, Стабил, Темп. Компонент 45, представляющий кислую субъединицу протерсированного легумина, в интенсивном (3) выражении присутствовал в семенах диких образцов 1851, 1923, 2173, 2365, 2521, 2524, 3115, 3249, 3370, 4014. Компонент кислой субъединицы легумина 48 характерен для дикорастущих образцов 3370 и 2365. Компонент вицилина 53 достигает максимальных значений интенсивности (3) у практически идентичного с компонентом 45 набора диких образцов 1851, 1915, 1923, 2173, 2365, 2521, 2524, 3115, 3249, 3370, 4014.

Таким образом, различия в белковом комплексе дикого и культурного гороха затрагивают компоненты запасных белков конвицилина, вицилина, легумина, а также липоксигеназы, которая выполняет функцию запасного белка в прорастающих семенах. Полученные результаты можно интерпретировать как наличием специфических «культурных» или «диких» изоформ запасных белков, так и различной степенью их накопления, что является предметом дополнительного исследования. Присутствие «диких» белковых компонентов у культурных растений и, напротив, «культурных» у диких образцов можно объяснить спонтанными взаимными интрогрессиями.

Авторы выражают благодарность А.Н. Зеленову за любезно предоставленные оригинальные линии гороха.

Литература

1. Burstin J., Gallard, K., Mir R.R., Varshney R.K., Duc G. Improving protein content and nutrition quality. In: Biology and Breeding of Food Legumes, A. Pratap and J. Kumar (eds), Wallingford, CT: CAB International, 2011, – С.314–328.
2. Бобков С.В., Уварова О.В. Растительный белок зернобобовых культур и перспектива получения белковых изолятов // Вестник РАСХН. - 2010. - № 6. - С. 83-88.
- Бобков С.В., Сучкова Т.Н. Аминокислотный состав запасных белков у диких подвидов гороха // Вестник ОрелГАУ. - 2012. - № 3 (36). - С.30-33.
3. Костерин О.Э. Перспективы использования диких сородичей в селекции гороха (*Pisum sativum* L.) // Вавиловский журнал генетики и селекции. - 2015. - Т. 19 (2). - С. 154-164.
4. Зеленев А.Н., Зотиков В.И., Наумкина Т.С., Новикова Н.Е., Щетинин В.Ю., Борзенкова Г.А., Бобков С.В., Зеленев А.А., Азарова Е.Ф., Уварова О.В. Биологический потенциал и перспективы селекции рассеченнолисточкового морфотипа гороха // Зернобобовые и крупяные культуры. - 2013. - № 4 (8). - С. 3-11.
5. Зеленев А.Н. Основные положения концепции ароморфозного направления в селекции гороха // Зернобобовые и крупяные культуры. - 2015. - № 2 (14). - С. 12-20.
6. Макашева Р.Х. Зерновые бобовые культуры // Культурная флора СССР. Л.: 1979. - С.44-50.
7. Бобков С.В., Лазарева Т.Н. Компонентный состав электрофоретических спектров запасных белков межвидовых гибридов гороха // Генетика.- 2012. - Т.48. - №1. - С.56-61.
8. Бобков С.В., Селихова Т.Н. Получение межвидовых гибридов для интрогрессивной селекции гороха // Экологическая генетика. – 2015. – Т. XIII. - № 3. – 2015. – С. 40-49.
9. Селихова Т.Н., Бобков С.В. Сравнительный анализ спектров запасных белков у образцов дикорастущего подвида гороха *Pisum sativum* L. ssp. *elatius* // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. - 2014. - № 2. - С. 142-147.
10. Зеленев А.Н., Щетинин В.Ю., Кондыков И.В., Уваров В.Н., Задорин А.М., Борзенкова Г.А., Азарова Е.Ф., Наумкина Т.С., Бобков С.В., Уварова О.В. Паспорта доноров и источники селекционно-ценных признаков сельскохозяйственных культур. Горох (*Pisum sativum* L.). Формы с измененной архитектурой листа. Выпуск 9. - Орел. - 2011. - 25 с.

UNIQUE PROTEIN BANDS IN ELECTROPHORETIC SPECTRA OF WILD PEA SUBSPECIES

S.V. Bobkov, I.A. Bychkov

FGBNU «THE ALL-RUSSIA RESEARCH INSTITUTE OF LEGUMES AND GROAT CROPS»

Abstract: *Electrophoretic analysis of seed protein in 9 cultural and 15 wild pea accessions was conducted. Discriminant analysis of polymorphic bands was performed for assignment of their protein to cultural or wild types. As a result nine polymorphic bands were discriminated. Five bands preferably contained proteins of wild pea accessions. Four discriminated bands were composed by proteins of wild pea relatives. Differences in band composition preferably affected storage proteins convicilin, vicilin and legumin. Question of specific “cultural” or “wild” protein isoforms are present in discriminated bands or it is a various abundance of proteins common for both wild and cultural accessions remains to be investigated.*

Keywords: pea, electrophoresis, discriminant analysis, band, storage protein, convicilin, vicilin, legumin.

УДК 635.656:631.52

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ПЛАСТИЧНОСТЬ И СТАБИЛЬНОСТЬ СОРТОВ И СОРТООБРАЗЦОВ ГОРОХА В УСЛОВИЯХ КАМЕННОЙ СТЕПИ

И.А. ФИЛАТОВА, И.С. БРАЙЛОВА, научные сотрудники

ФГБНУ «НИИСХ ЦЕНТРАЛЬНО-ЧЕРНОЗЕМНОЙ ПОЛОСЫ ИМ. В.В. ДОКУЧАЕВА»

Дана оценка экологической пластичности и стабильности старых местных сортов и новых перспективных сортообразцов гороха по урожайности. Проведен сравнительный анализ по показателям адаптивности между усатыми и листочковыми морфотипами.

Ключевые слова: горох, сорт, урожайность, экологическая пластичность и стабильность.

На современном этапе селекция новых сортов достигла такого уровня, что дальнейшее значительное увеличение урожайности у гороха может привести к снижению его технологичности. Созданные сорта уже обладают достаточно высокой потенциальной урожайностью, порядка 50-60 ц/га и более. Но в производственных условиях продуктивность гороха значительно снижается [1]. Это обусловлено высокой отзывчивостью культуры на изменяющиеся агроклиматические условия выращивания. Поэтому одним из приоритетных направлений в селекции стало выведение сортов сочетающих высокую потенциальную продуктивность и качество урожая с устойчивостью к действию абиотических и биотических стрессов на уровне сорта, агроценоза, агроэкосистемы и агроландшафта (Жученко А.А. цит. по Ефремова В.В.) [2].

Критерием для выделения таких генотипов могут служить показатели экологической пластичности и стабильности. Под экологической пластичностью принято считать среднюю реакцию сорта на изменение условий среды, а под стабильностью – отклонение эмпирических данных в каждом условии среды от этой средней [3]. Добившись их гармоничного сочетания, можно обеспечить максимальную продуктивность сорта, выращивая его в различных почвенно-климатических зонах [4].

Основной целью селекционной работы в нашей лаборатории является создание высокоурожайных сортов, отзывчивых на благоприятные условия выращивания, и стабильных в меняющихся и стрессовых обстоятельствах.

Условия и методы исследований

Материалом для исследования служили 3 сорта местной селекции прошлых лет – Таловец 70 (1997 год допуска), Дударь (2002 год допуска), Фокор (2005 год допуска), и