

**INHERITANCE OF RED COTYLEDON COLOUR IN LENTIL WHEN CROSSED WITH
LENS TOMENTOSUS LADIZINSKY**

G. N. Suvorova, A. V. Ikonnikov

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

Abstract: Varieties of *L. culinaris* Rausa, Svetlaya, Obraztsov Chiflik 7, Vekhovskaya 1, which had yellow cotyledons, were crossed with accession of *L. tomentosus* ILWL120 from ICARDA with red cotyledons. 84 flowers were pollinated in combination *L. culinaris* × *L. tomentosus*, 14 pods and 16 F_1 seeds were harvested in a total. 11 F_1 plants were obtained from 16 seeds on which 890 F_2 seeds were formed. F_2 segregation provided the two phenotypic classes: red cotyledons and yellow cotyledons. In summary the 648 seeds with red cotyledons and 241 seeds with yellow cotyledons were obtained. The actual segregation in every variety variant gave the classic scheme 3 : 1 with high degree of confidence. When F_2 plants were analyzed the genotypic segregation corresponded to the monohybrid scheme 1 : 2 : 1. If plant formed seeds with red or yellow cotyledons only they believed to be a dominant or recessive homozygote. If plant formed seeds as well with red as with yellow cotyledon it considered to be a heterozygote. We were the first who used the *L. tomentosus* species in the genetic study and demonstrated that red cotyledon colour characterized the wild species is dominant over yellow colour and inherited as monogenic at the interspecific crosses.

Keywords: lentil, *Lens tomentosus*, red cotyledons, heterozygote, homozygote, domination

УДК 633.35:631.52

**ХОЗЯЙСТВЕННО ЦЕННЫЕ ПРИЗНАКИ ОБРАЗЦОВ ДИКОГО ВИДА ГОРОХА
PISUM FULVUM**

С. В. БОБКОВ, кандидат сельскохозяйственных наук

Т. Н. СЕЛИХОВА, кандидат биологических наук

И. А. БЫЧКОВ

**ФГБНУ «ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЗЕРНОБОБОВЫХ И КРУПЯНЫХ КУЛЬТУР»**

E-mail: svbobkov@gmail.com

Проведено изучение электрофоретических спектров индивидуальных семян у образцов дикого вида гороха *P. fulvum*. Выявлены образцы K6070 и K2523 с легкими (короткими) изоформами конвицилина, перспективные для физиолого-биохимического исследования и последующего использования в селекции на высокое качество белка. Исследование формообразовательного процесса в беккроссируемых популяциях межвидовых гибридов Стабил × И609881 позволило выделить линии поколения гибридов BC_2F_3 , BC_2F_4 , BC_1F_4 , BC_1F_5 , устойчивые к возбудителю мучнистой росы. Гибридологический анализ показал доминантный характер наследования признака. Подтверждение устойчивости линий гороха, полученных в результате межвидового скрещивания, на инфекционном фоне в полевых условиях позволит открыть дорогу для их использования в селекционном процессе.

Ключевые слова: горох, электрофорез, компонент, запасной белок, конвицилин, ген, мучнистая роса.

Горох (*Pisum sativum* L.) является важной зернобобовой сельскохозяйственной культурой. Высокое содержание белка, а также лизина и треонина, является основным условием конкурентоспособности культуры. Горох в качестве источника ценного белка используют в пищевой промышленности и кормопроизводстве.

В 2014 году в России горох выращивали на площади 897 тыс. га и произвели 1,5 млн. тонн зерна (FAOSTAT, 2016). Средняя урожайность зерна составила 1,7 тонн/га. Низкая

урожайность обусловлена тем, что современные сорта гороха не обладают генетической устойчивостью к засухе, фузариозу, мучнистой росе, поражению насекомыми-вредителями. По содержанию белка горох существенно уступает своему ближайшему конкуренту сое, при этом в процессе селекционной работы с горохом содержание белка продолжает снижаться. Изолированные белки гороха характеризуются недостаточно высокими физико-химическими свойствами, что является одним из препятствий для использования в пищевой промышленности.

Культурный горох ведёт своё происхождение от дикого предка *Pisum sativum* ssp. *elatius* [1]. В процессе одомашнивания гороха существенную роль сыграли мутации генов, контролирующие растрескивание бобов, покой семян, размер семян и их качество, длину стебля, массу корней и уборочный индекс. В результате большая часть генетического разнообразия гороха *Pisum* L. осталась за бортом культурной эволюции.

Молекулярно-генетические исследования выявили узкий генетический базис у современных сортов гороха, а ресурс генетического разнообразия в настоящее время остается мало изученным и не востребуемым в селекции (Костерин, 2015). Вовлечение в селекционный процесс новых генов хозяйственно ценных признаков из генофонда дикорастущего гороха позволит повысить генетическое разнообразие исходного материала для селекции новых сортов с высоким качеством зерна, устойчивых к абиотическим стрессам, болезням и вредителям.

Цель исследований – идентификация новых хозяйственно ценных признаков у образцов дикого вида гороха *P. fulvum* для использования в селекционном процессе.

Материалы и методы

В эксперименте изучали 6 культурных сортов и селекционных линий гороха и 34 образца дикорастущего вида *P. fulvum* мировой коллекции ВИР. Межвидовую гибридизацию проводили в условиях тепличного бокса в комбинациях Стабил × И609881 (рис. 1) и Стабил × И592882. Успешность межвидовой гибридизации оценивали с использованием морфологических и белковых маркеров.



Рис. 1. Семена гороха: а) сорта Стабил, б) образца *P. fulvum* И609881

Для выделения и разделения белков семян гороха использовали стандартный метод SDS-PAGE электрофореза. Белки экстрагировали из муки в течении 20-и часов при температуре 3-4°C с помощью электродного буфера (ТРИС, глицин, додецил сульфат натрия), pH=8,3. После центрифугирования 10 мкл экстракта переносили в ячейку планшетки, где смешивали с равным объемом буфера нанесения (додецил сульфат натрия, ТРИС-HCl, глицерин, β-меркаптоэтанол, бромфеноловый синий). Электрофорез проводили в полиакриламидном геле с использованием камеры для вертикального электрофореза VE-4 (Хеликон, Россия). Концентрация разделяющего геля – 12,5 %, концентрирующего – 5 %.

Позиции белковых компонентов гороха определяли по реперным компонентам белкового спектра сои сорта Ланцетная. Интенсивность окрашивания компонентов спектров оценивали как: 1 – слабую, 2 – интенсивную и 3 – очень интенсивную. Идентификацию

конвицилина проводили по молекулярной массе компонентов. Использовали маркеры молекулярной массы 6,5-200 кДа (SIGMA, США).

Результаты и обсуждение

Нестандартные изоформы конвицилина для селекции на высокое качество зерна.

Основными запасными белками гороха являются легумин, вицилин и конвицилин. Молекулярная масса легумина и вицилина равняется 60-80 кДа и 47-50 кДа, соответственно. Конвицилин имеет массу 70 кДа и характеризуется обширной гомологией с вицилином, начиная с 122-166 (в зависимости от изоформы) аминокислоты до С-конца полипептида. Конвицилин, вицилин и легумин кодируются различными генами. Моногенное кодоминантное наследование [3] конвицилина, а также отсутствие посттрансляционных модификаций за исключением удаления сигнального пептида облегчает использование различных модификаций белка в селекционной практике.

Легумин и вицилин в различных соотношениях в изолированном виде обладают высокими физико-химическими свойствами и формируют гели хорошего качества. Сильный положительный заряд NH₂-конца молекулы конвицилина является причиной ухудшения физико-химических свойств изолированных белков гороха, что является препятствием для их использования в пищевой промышленности. Поэтому вовлечение в селекцию гороха исходного материала, не содержащего конвицилина или полиморфного по его изоформам, особенно с делециями генов, кодирующих первые 122-166 аминокислот, создает предпосылки для улучшения качества изолированных белков у новых сортов гороха. Поэтому, по нашему мнению, источниками ценных физико-химических свойств белка гороха могут служить легкие (короткие) изоформы конвицилина.

Источниками изоформ конвицилина может служить мутационный процесс, а также естественный полиморфизм внутри культивируемого вида гороха и диких таксонов гороха. Сравнительное исследование электрофоретических спектров сортов и диких подвидов гороха, проведенное в лаборатории физиологии и биохимии растений ВНИИЗБК, показало, что в семенах образцов культурного и дикорастущего гороха присутствуют как легкие (короткие), так и более тяжелые (длинные) изоформы конвицилина [4]. Ранее наши сотрудники установили, что изоформы конвицилина локализованы преимущественно в 4 позициях электрофоретических спектров [5]. При этом в культурном горохе были представлены крайние варианты изоформ конвицилина, а у образцов дикого вида *P. fulvum* доминировали средние по массе изоформы [6]. Тем не менее, проведенное сотрудниками нашей лаборатории исследование широкого набора образцов *P. fulvum* позволило выделить образцы K6070 и K2523 с легкими изоформами конвицилина [7] (рис. 2). Эти, ранее не использованные в селекционном процессе изоформы могут быть результатом делеций в NH₂-терминальной области гена, что может быть выявлено секвенированием кодирующих генов.

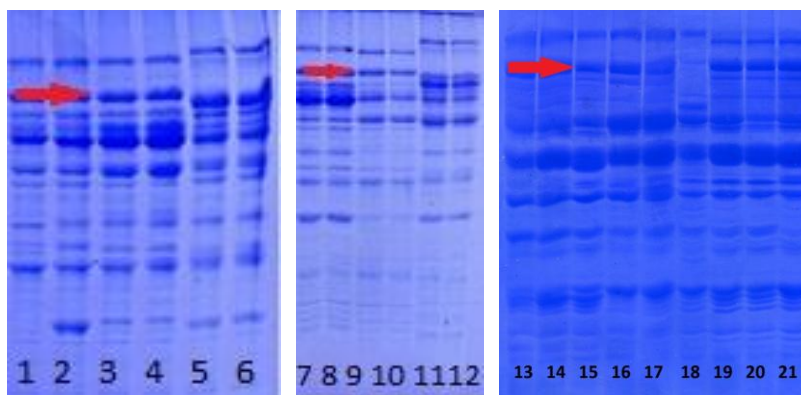


Рис. 2. Электрофоретический спектры белков семян гороха: 1, 2 - *elatius* (K2173); 3, 4 - *transcaucasicum* (K2365); 5, 6 - *Pisum fulvum* (K6070), 7, 8 - *asiaticum* (K5322); 9, 10 - *transcaucasicum* (K2376); 11, 12 - *Pisum fulvum* (K2523), 13-21 – сорт Ауст (на 18 дорожке представлен спектр с отсутствием компонента конвицилина). Положение изоформ конвицилина обозначено красными стрелками

Изоформы конвицилина образцов *P. fulvum* K6070 и K2523 из-за хорошей различимости их компонентов на спектрах удобно использовать в маркерной селекции гороха для создания изогенных линий, получения изолированных белков и оценкой их физико-химических свойств.

Электрофоретический анализ индивидуальных семян сорта гороха Аист позволил выявить спектр, в котором практически отсутствует компонент конвицилина. В дальнейшем семена гороха следует расщепить и провести электрофоретический анализ белков одной семядоли. Вторую семядолю семени, у которого маркировано отсутствие конвицилина, следует прорастить и вырастить целое растение. Электрофоретический анализ второй генерации семян поможет выяснить, служит ли это следствием нарушения экспрессии и является результатом мутации гена, кодирующего конвицилин.

Устойчивость к возбудителю мучнистой росы (*Erysiphe pisi*) из генома дикого сородича гороха *P. fulvum*

Мучнистая роса (*Erysiphe pisi*) является опасной болезнью гороха, которая приводит к снижению качества зерна и урожайности на 25-50 % [8]. Распространенная во всем мире, мучнистая роса особенно активно проявляется в климатических условиях, характеризующихся высокой температурой днем и низкой ночью [12]. Использование в сельскохозяйственном производстве сортов гороха, устойчивых к мучнистой росе, является наиболее эффективной, экономически и экологически обоснованной стратегией.

Выращивание растений культурного гороха и образцов дикого вида *P. fulvum* в тепличном боксе показало, что часть диких образцов гороха не поражалась мучнистой росой. Вовлеченный в межвидовую гибридизацию образец дикого вида И609881 также отличался устойчивостью к возбудителю мучнистой росы. Формообразовательный процесс изучали в популяциях межвидовых гибридов гороха, полученных в комбинациях Стабил × И609881 и Стабил × И592882.

В комбинации Стабил × И609881 в результате самоопыления и возвратных скрещиваний получены популяции гибридов BC₂F₃, BC₂F₄, BC₁F₄, BC₁F₅. В комбинации Стабил × И592882 растения представлены одной популяцией BC₃F₃. Все пять беккроссируемых популяций культивировали в тепличном боксе на инфекционном фоне (мучнистая роса, *Erysiphe pisi*).

Отбор растений межвидовых гибридов гороха на инфекционном фоне в течение нескольких генераций позволил выделить линии, полностью устойчивые к этому патогену (рис. 3). Все растения принадлежали к гибридной популяции Стабил × И609881. Среди гибридов Стабил × И592882 устойчивых к мучнистой росе растений не получено.



Рис. 3. Растения межвидовых гибридов BC₂F₃ Стабил × И609881 в условиях тепличного бокса: а) восприимчивые (слева) и устойчивые к мучнистой росе (справа), б) пораженные мучнистой росой (слева) и устойчивые (справа)

Два рецессивных аллеля *er1* и *er2*, обеспечивающих устойчивость к *Erysiphe pisi*, локализованы в различных локусах [9, 10]. Только ген *er1* используется в селекции гороха. Использование гена *er2* проблематично вследствие того, что его протекторное действие проявляется только в определенных условиях произрастания растений. Третий доминантный ген *Er3*, обеспечивающий устойчивость к возбудителю мучнистой росы, был идентифицирован недавно в интрогрессивных скрещиваниях восприимчивого сорта Messire с образцом гороха Р660-4 (отбор из образца *P. fulvum* ICARDA IFPI3261) [11]. Показано независимое расщепление генов *er1*, *er2* и *Er3*, а также присутствие *Er3* в нескольких образцах *P. fulvum* [12].

В наших опытах в результате гибридизации по реципрокной схеме устойчивых растений ВС₂F₃ Стабил × И609881 с восприимчивым сортом гороха Темп все полученные растения F₁ отличались устойчивостью к мучнистой росе, что указывало на доминантный характер признака устойчивости. Исследование расщепления гибридов F₂ по устойчивости к мучнистой росе позволит ответить на вопрос о числе генов, контролирующих этот признак.

В отличие от испанских коллег в наших опытах использовались другие образцы *P. fulvum*. Следует отметить, что не все изученные в наших опытах образцы *P. fulvum* обладали устойчивостью к мучнистой росе. В скрещиваниях восприимчивого сорта Стабил с двумя образцами *P. fulvum* И609881 и И592882 устойчивые линии выделены только в гибридной комбинации Стабил × И609881. Для решения вопроса, определяется ли устойчивость геном *Er3*, или это новый ген (аллель), необходимо провести дополнительные скрещивания наших линий с линиями, отселектированными командой Сары Фондевиллы (2007). Образцы дикого вида гороха могут, по меньшей мере, иметь различные аллели гена *Er3*, обеспечивающие различную степень устойчивости к возбудителю мучнистой росы.

В перспективе пирамидирование известных генов устойчивости с помощью маркерной селекции может усилить устойчивость к патогену мучнистой росы и увеличить время эволюции патогена, необходимое для преодоления устойчивости растений.

Заключение

Запасные белки гороха легумин и вицилин в различных соотношениях в изолированном виде обладают высокими физико-химическими свойствами и формируют гели хорошего качества. Положительный заряд NH₂-конца молекулы конвицилина (122-166 R-групп аминокислот) является причиной ухудшения технологических качеств изолированных белков гороха, что является препятствием для использования в пищевой промышленности. Поэтому поиск коротких изоформ или нуль-мутаций конвицилина является актуальным направлением исследований. Исследование широкого набора образцов *P. fulvum* позволило выделить образцы К6070 и К2523 с легкими (короткими) изоформами конвицилина, которые после оценки ценных свойств имеют перспективу для использования в селекционном процессе. В результате изучения формообразовательного процесса в популяциях межвидовых гибридов Стабил × И609881 выделены линии, устойчивые к возбудителю мучнистой росы. Подтверждение устойчивости линий гороха, полученных в результате межвидовых скрещиваний, на инфекционном фоне в полевых условиях позволит открыть дорогу для их использования в селекционном процессе.

Литература

1. Weeden N.F. Genetic changes accompanying the domestication of *Pisum sativum*: is there a common genetic basis to the 'Domestication syndrome' for legumes? // Annals of botany. - 2007 - V. 100. - P. 1017–1025.
2. 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.
3. Бобков С.В., Лазарева Т.Н. Компонентный состав электрофоретических спектров запасных белков межвидовых гибридов гороха // Генетика. – 2012. – Т.48. – № 1. – С.56-61.
4. Бобков С.В., Бычков И.А. Идентификация уникальных белковых компонентов в электрофоретических спектрах образцов диких подвидов гороха // Зернобобовые и крупяные культуры. - 2016. - № 3 (19). - С. 35-41.
5. Селихова Т.Н., Бобков С.В. Повышение качества белка гороха с использованием полиморфизма конвицилина // Земледелие. – 2015. - № 2. – С. 47-48.
6. Selikhova T., Bobkov S. Polymorphism of pea storage protein convicilin // Vestnik OrelGAU. – 2014. – № 4 (49). – P. 7-11.

7. Селихова Т.Н., Бобков С.В. Полиморфизм запасных белков у образцов диких таксонов гороха // Доклады РАСХН. - 2013. - №5. – С. 20-22.
8. Warkentin, T.D., Rashid K.Y., Xue A.G. Fungicidal control of powdery mildew in field pea // Can. J. Plant Sci. - 1996. – V. 76. – P. 933-935.
9. Timmerman G.M., Frew T.J., Weeden N.F. Linkage analysis of *er1*, a recessive *Pisum sativum* gene for resistance to powdery mildew fungus (*Erysiphe pisi* D.C.) // Theor. Appl. Genet. - 1994. - V. 88. - P. 1050–1055.
10. Katoch V., Sharma S., Pathania S., Banayal D. K., Sharma S. K., Rathour R. Molecular mapping of pea powdery mildew resistance gene *er2* to pea linkage group III // Mol. Breeding. - 2010. - V. 25. - P. 229-237.
11. Fondevilla, S., Torres A.M., Moreno M.T., Rubiales D. Identification of a new gene for resistance to powdery mildew in *Pisum fulvum*, a wild relative of pea // Breeding Sci. - 2007. - V. 57. - P. 181-184.
12. Fondevilla S., Cubero J.I., Rubiales D. Confirmation that the *Er3* gene, conferring resistance to *Erysiphe pisi* in pea, is a different gene from *er1* and *er2* genes // Plant Breed. - 2011. - V. 130. - P. 281-282.

AGRONOMICALLY VALUABLE TRAITS FROM WILD PEA SPECIES *PISUM FULVUM*

S. V. Bobkov, T. N. Selikhova, I. A. Bychkov

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

E-mail: svbobkov@gmail.com

Abstract: Protein spectra of individual seeds derived from *P. fulvum* accessions were studied. Light (short) isoforms of convicilin, perspective for physiology and biochemical investigation and application in pea breeding, were revealed in protein spectra of *P. fulvum* accession K6070 u K2523. Lineages of plants resistant to powdery mildew were revealed in populations of pea interspecific hybrids *Stabil* × *I609881*. Currently, resistant plants were present in generations of *BC₂F₃*, *BC₂F₄*, *BC₁F₄*, *BC₁F₅*, and higher. Dominant inheritance of our resistance source was proved in additional crosses. This investigation paves the way for lineages of resistant plants to be implicated in pea breeding.

Keywords: pea, electrophoresis, SDS-PAGE, band, storage protein, convicilin, gene, powdery mildew.

УДК 633.34:631.53.048:632.51

ВЛИЯНИЕ АГРОТЕХНИЧЕСКИХ ПРИЁМОВ ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ СОИ ОБЫЧНЫМ РЯДОВЫМ СПОСОБОМ ПОСЕВА НА ЗАСОРЕННОСТЬ АГРОФИТОЦЕНОЗА И УРОЖАЙНОСТЬ ЗЕРНА

О. Г. МИЛЕНКО, ассистент кафедры растениеводства

ПОЛТАВСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ АГРАРНАЯ АКАДЕМИЯ, УКРАИНА

E-mail: olya.milenko@yandex.ru

Изучено влияние норм высева семян и способов ухода за посевами на засоренность агрофитоценоза и урожайность сои. Установлено, что механический способ ухода за посевами дает возможность снизить количество сорняков до 72 % по сравнению с контролем. На вариантах опыта с химическим способом ухода за посевами количество сорняков уменьшилось до 91 %, по сравнению с контролем. Норма высева влияла на всех вариантах опыта, независимо от ухода, – за счет увеличения нормы высева семян с 600 тыс./га до 900 тыс./га количество сорняков снижалось до 58 %. Установлена оптимальная норма высева семян для скороспелого сорта Устя – 900 тыс./га. Самые благоприятные условия для роста и развития растений в посевах обычного рядового способа были созданы с использованием механического способа ухода.

Ключевые слова: соя, норма высева, способ ухода, урожайность.

Опыт возделывания сои показывает, что вполне реально получать урожайность зерна 2,5-3,0 т/га. Однако имеют место существенные колебания урожайности по годам, обусловленные рядом биологических особенностей сои, определяющих приемы ее