

ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВ СЕМЯН ГОРОХА *PISUM L.*

Т.Н. СЕЛИХОВА, кандидат биологических наук

С.В. БОБКОВ, кандидат сельскохозяйственных наук

ГНУ ВНИИ зернобобовых и крупяных культур

Проведен анализ электрофоретических спектров белков семян у дикорастущих родичей гороха *Pisum sativum L.* Получены межвидовые гибриды гороха *P. sativum* × *P. fulvum*. Изучено наследование конвицилина в гибридной комбинации ПАП (*Pisum sativum*) × И609885 (*P. fulvum*).

Ключевые слова: горох, SDS-PAGE электрофорез, белок, спектр, компонент, конвицилин.

Согласно принятой в России классификации род гороха *Pisum L.* состоит из 2 видов: *P. sativum L.* – горох посевной и *P. fulvum Sibth. et Smith* – горох красно-желтый [1]. 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 повышенный интерес у исследователей вызывает вид *P. fulvum*. Образцы *P. fulvum* используют в гибридизации с культивируемым видом в качестве источника генов устойчивости к патогенам [2, 3, 4]. Интерес к диким подвидам *P. sativum* как источнику хозяйственно-ценных признаков менее выражен. В сравнительных исследованиях дикорастущих таксонов гороха по составу компонентов запасных белков используют ограниченное число образцов диких подвидов *P. sativum* [5]. Однако между образцами дикорастущего подвида *elatius* и культивируемого *sativum* существует значительная дивергенция, что выражается в репродуктивной изоляции и нарушениях мейоза у гибридов [6].

В настоящее время электрофорез запасных белков семян применяют, в основном, для идентификации генотипов и изучения исходного селекционного материала культивируемого подвида гороха [7, 8]. Генетическое разнообразие диких таксонов гороха практически не используется в селекционном процессе. Дикорастущие родичи гороха характеризуются значительной генетической вариабельностью и могут служить источниками хозяйственно-ценных аллелей. Исследования, направленные на идентификацию компонентов электрофоретических спектров в качестве биохимических маркеров, имеют хорошую перспективу для использования в современной селекции гороха. Например, замена морфологических маркеров на биохимические позволит ускорить оценку растений-регенерантов культуры пыльников гороха по происхождению (соматические клетки или микроспоры) [9].

Цель исследований состояла в изучении электрофоретических спектров белков семян у образцов дикого вида *P. fulvum* и 5 дикорастущих подвидов гороха *P. sativum*.

Методика

Объектом исследования служили образцы гороха коллекции ВИР вида *P. fulvum* (И609881, И609885, К2523, К6070) и подвидов *P. sativum L.* – *elatius* (К1851, К2173, К2524, К3115, К4014), *transcaucasicum* (К296, К2365, К2376, К3249, К3980), *asiaticum* (К1923, К1974, К1975, К2645, К5322, К1915), *abyssinicum* (К2759), *syriacum* (К2521). Изучали сорта и линии *P. sativum ssp. sativum*: Стабил (усатый тип листа, *af*), 109б (усатый тип листа, *af*), ПАП (многократно непарноперистый морфотип, *aftl*). Межвидовую гибридизацию гороха

проводили в условиях тепличного бокса. Результативность гибридизации оценивали с использованием морфологических и белковых маркеров.

Использован стандартный арбитражный метод ISTA для выделения и электрофоретического разделения белков семян двудольных [10]. Анализировали белки из 50 индивидуальных семян каждого представителя вида и подвида гороха. Запасные белки экстрагировали из муки электродным буфером (Трис, глицин, додецилсульфат натрия, рН=8,3) в течение 20 часов при температуре 3-4°C. После центрифугирования 10 мкл экстракта переносили в ячейки планшеток для смешивания с равным объемом буфера нанесения (додецилсульфат натрия, Трис-НСl, 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 компонентов образцов гороха проведен с использованием спектра сои сорта Ланцетная. Окраску компонентов спектра оценивали как: 1 – слабую, 2 – интенсивную и 3 – очень интенсивную. Кластерный анализ проводили с использованием программы TREECON по методу UPMGA [11]. В качестве внешней группы был использован сорт сои Ланцетная. Индексы бутстрепа (ИБ) рассчитывали для 1000 реплик.

Идентификацию конвицилина проводили по молекулярной массе компонентов [12]. Использовали маркеры молекулярной массы 6,5-200 кДа (SIGMA, США). Анализ расщепления по электрофоретическим компонентам глобулинов проводили с использованием 27 семян гибридов F₂.

Белки семян дикорастущих родичей гороха

Электрофоретические спектры белков семян гороха Pisum L.

Объектом исследования служили образцы гороха коллекции ВИР вида *P. fulvum* (И609881, И609885, К2523, К6070) и подвидов *P. sativum* L. - *elatius* (К1851, К2173, К2524, К3115, К4014), *transcaucasicum* (К296, К2365, К2376, К3249, К3980), *asiaticum* (К1923, К1974, К1975, К2645, К5322, К1915), *abyssinicum* (К2759), *syriacum* (К2521). Исследовали белки семян сортов и линий культивируемого подвида гороха *sativum*: Стабил (усатый тип листа, *af*), 102b (усатый тип листа, *af*), ПАП (многократно непарноперистый морфотип, *af1*), ВИ 9402 (акациевидный морфотип, *tl*). Проводили изучение электрофоретических спектров белков линии Рас-тип [13].

Электрофоретический анализ образцов коллекции ВИР показал большое число типов спектров, различных по составу и интенсивности окрашивания компонентов. Молекулярная масса компонентов варьировала от 17,5 до 97,4 кДа.

Во всех типах электрофоретических спектров компоненты распределялись по 76 позициям «соевой» шкалы (от 5 до 104). Образцы диких таксонов гороха И609881, И609885, К2523, К6070, К3115, К3980, К296, К1851, К1915, К1923, К1974, К1975, К2173, К2365, К2524, К2645, К2759, К3115, К3249, К4014, К5322, К2376, К2521 имели 26 одинаковых белковых компонентов. Они различались по наличию/отсутствию 26-ти и интенсивности окрашивания 16-ти компонентов (табл. 1).

Таблица 1. Полиморфные компоненты запасных белков у образцов диких таксонов гороха.

Тип полиморфизма	Полиморфные компоненты
наличие/отсутствие	9 10 12 18 19 20 24 26 29 30 31 35 38 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 68 69 71
интенсивность окрашивания	5 6 7 8 13 14 15 16 21 22 23 27 28 32 33 54

Образцы *P. fulvum* K2523 и K6070 коллекции ВИР имели 57 одинаковых белковых компонентов и различались по наличию/отсутствию 6-го компонента и интенсивности окрашивания компонента 23. Следует отметить, что образцы K6070 и K2523 характеризовались наличием маркерных компонентов 18, 19.

Образцы (K4014, K3115, K2524, K2173, K1851) имели 52 общих компонента и различались по наличию/отсутствию 14-ти и интенсивности окрашивания 8-го и 48-го компонентов. В спектрах образцов подвидов *asiaticum* (K1975) и *abyssinicum* (K2759) всего идентифицировано 58 компонентов разной интенсивности окрашивания. Образцы подвида *asiaticum* (K1923, K1974, K2645, K5322, K1915) имели 52 одинаковых компонента и различались по наличию/отсутствию 8-го компонента и интенсивности окрашивания компонентов 31, 32, 33. В спектрах образца K2521 подвида *syriacum* идентифицировано 63 белковых компонента. Образцы *transcausicum* (K296, K2365, K2376, K3249, K3980) имели 44 одинаковых компонента и различались по наличию/отсутствию 17-ти и интенсивности окрашивания 5-ти компонентов (6, 7, 8, 21, 46).

Запасные белки гороха - легумин и вицилин в различных сочетаниях формируют гель высокого качества [12]. Конвицилин значительно ухудшает его качество. Поэтому использование в селекции гороха исходного материала, полиморфного по изоформам конвицилина, позволит значительно улучшить качество запасных белков у новых сортов гороха. Конвицилин имеет молекулярную массу ~70 кДа [12]. Локализация конвицилина на электрофоретических спектрах показана на рисунке 1.

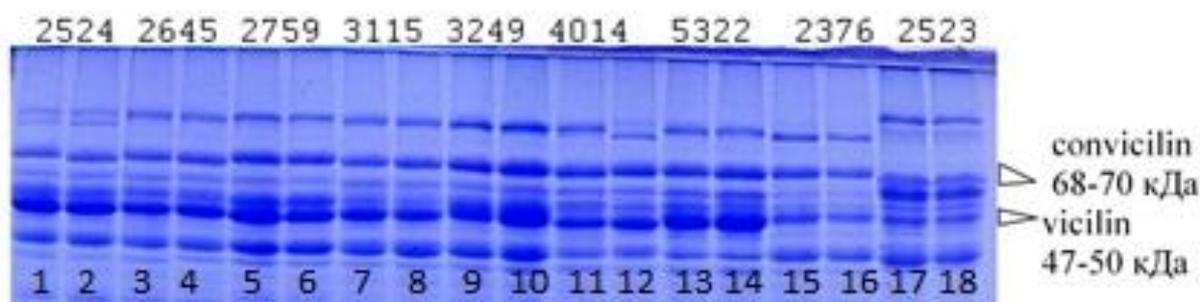


Рис. 1. Локализация конвицилина на электрофоретических спектрах. Электрофоретические спектры белков образцов *P. sativum* L. подвидов: 1, 2 - *elatius* (*Pisum sativum* L. ssp. *elatius* K2524); 3, 4 - *asiaticum* (K2645); 5, 6 - *abyssinicum* (K2759); 7, 8 - *elatius* (K3115); 9, 10 - *transcausicum* (K3249); 11, 12 - *elatius* (K4014); 13, 14 - *asiaticum* (K5322); 15, 16 - *transcausicum* (K2376); 17, 18 - *Pisum fulvum* (K2523).

Область локализации изоформ конвицилина у подвидов *P. sativum* - *elatius*, *asiaticum*, *abyssinicum* и *transcausicum* характеризовалась достаточно сильной консервативностью. Все компоненты находились на 15 позиции (рисунок 1). У образцов *P. fulvum* K2523 и K6070, И609881 были обнаружены облегченные (17-я позиция) изоформы конвицилина [14].

Спектры белков семян образцов *P. sativum* L. ssp. *elatius* и *sativum*

Проведено сравнительное изучение компонентного состава электрофоретических спектров белков семян у дикорастущего (*elatius*) и культивируемого (*sativum*) подвидов гороха *P. sativum* L. Объектом исследования служили образцы гороха подвида *Pisum sativum* ssp. *elatius* (K4014, K3115, K2524, K2173, K1851). Также анализировали образцы *Pisum sativum* ssp. *sativum*: сорт Стабил и линии 1096, ПАП, ВИ9402, Рас-тип.

Образцы *elatius* имели 52 общих компонента и различались по наличию/отсутствию 14-ти и интенсивности окрашивания 8-го и 48-го компонентов (табл. 2). Молекулярная масса компонентов варьировала от 17,5 до 97,4 кДа (рис. 2).

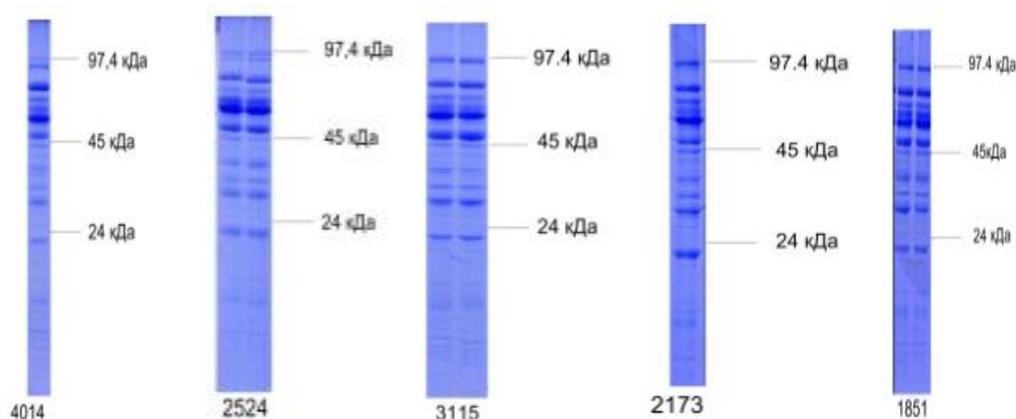


Рис. 2. Электрофоретические спектры белков образцов *P. sativum* ssp. *elatius*.

В диапазоне 45-65 кДа у образцов K2524 и K1851 присутствовали очень интенсивные компоненты (26 и 31), отсутствующие в спектрах K2173, K3115 и K4014. У образца K2524 обнаружено 35 компонентов, не встречающихся в других образцах *P. sativum* ssp. *elatius* (табл. 2). В диапазоне 24-45 кДа обнаружено 47 компонентов, характерных только для образца K2524 и 49 - для K1851.

Таблица 2. Полиморфные компоненты запасных белков у образцов *P. sativum* ssp. *elatius*.

Образец	Компоненты														
	8	20	26	30	31	35	40	41	42	45	46	47	48	49	69
K2524	1	1	3	2	3	3	0	3	3	3	3	1	1	0	3
K1851	3	1	3	2	3	0	3	3	0	3	3	0	3	3	3
K2173	3	1	0	2	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	3
K3115	3	0	0	2	0	0	3	3	0	0	0	0	0	0	0
K4014	3	1	0	0	0	0	3	3	3	3	0	0	0	0	3

В результате анализа филогенетических отношений между образцами *elatius* и *sativum* по методу UPMGA была построена дендрограмма (рис. 3).

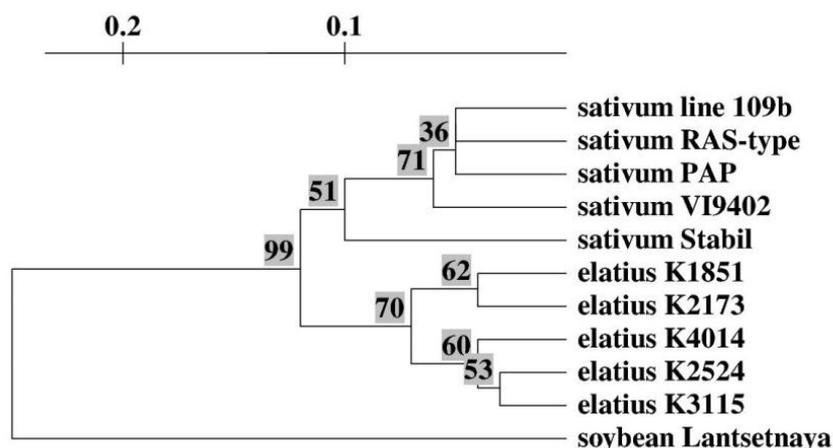


Рис. 3. Филогенетические отношения у образцов подвидов гороха *P. sativum* L. ssp. *elatius* и *sativum*.

На дендрограмме с 99% значением индекса бутстрепа выделились два кластера. В первый кластер вошли образцы культивируемого подвида гороха *sativum*. Образцы этого кластера формировали кладу. Во второй кластер вошли образцы подвида дикорастущего подвида *elatius*. Образцы *elatius* характеризовались более высоким уровнем дивергенции. Они распределялись по двум обособленным подкластерам (индекс бутстрепа 70%). Первый подкластер формировали образцы K1851 и K2173. Второй - образцы K4014, K2524 и K3115.

В настоящее время образцы дикорастущего подвида гороха *elatius* практически не используются в селекционном процессе в качестве источника хозяйственно-ценных признаков. Однако представители диких подвидов гороха *P. sativum* служат источником генетического разнообразия, не вовлеченного в селекционный процесс. Для оценки перспективности использования диких подвидов в селекции гороха проведен сравнительный анализ электрофоретических спектров белков семян у дикорастущего (*elatius*) и культивируемого (*sativum*) подвидов гороха *P. sativum* L. Установлено четкое распределение образцов по двум кластерам. Показано, что образцы культивируемого подвида *sativum* образуют монофилетическую группу. На основании этого можно сделать вывод о наличии узкого генетического базиса у современного селекционного материала гороха.

Межвидовая гибридизация гороха

Вид *P. fulvum* рассматривается в качестве ценного источника ценных хозяйственных признаков. Размер генома у этого вида составляет 108,9% от *P. sativum* [15]. В сравнении с горохом посевным он является более устойчивым к аскохитозу (*Micosphaerella pinodes*) [4], гороховой зерновке (*Bruchus pisorum*) [2] и мучнистой росе (*Erysiphe pisi*) [3]. В настоящее время определены специфичные для генома *P. fulvum* аллели, детерминирующие устойчивость к гороховой зерновке и мучнистой росе.

Вид *P. fulvum* активно используют в программах гибридизации с культивируемым видом гороха *P. sativum* для получения интрогрессивных линий с включениями части генома *P. fulvum* в качестве источника новых генов хозяйственно-ценных признаков. Гибридизация гороха посевного *P. sativum* с *P. fulvum* сталкивается с проблемой несовместимости. Небольшое число гибридных семян получено в скрещиваниях, где *P. fulvum* использовали в качестве отцовского компонента [16]. Истинность межвидовых гибридов гороха устанавливали по окраске

цветков [2], электрофоретическим спектрам изоэнзимов, ITS PCR-RFLP и геномной *in situ* гибридизации (GISH) [16].

Межвидовые гибриды гороха получены в комбинациях скрещивания: 109б × И609881, Стабил × И609881, ПАП × И609885 при использовании *P. fulvum* в качестве отцовского компонента. Линия 109б и сорт Стабил характеризовались усатым типом листа и белой окраской цветков. Растения линии ПАП представляли многократно непарноперистый морфотип с белыми цветками [13]. Растения образцов *P. fulvum* И609881 и И609885 характеризовались кремовыми цветками (рисунок 4). Гибриды F₁ во всех комбинациях имели обычную форму листа и розовую окраску лепестков цветков (рисунок 4). Спектр окраски цветков у гибридов F₂ сильно варьировал (рисунок 5).



Рис. 4. Образец *P. fulvum* И609881 с кремовыми цветками и гибрид F₁ *P. sativum* (Стабил) × *P. fulvum* (И609881).



Рис. 5. Вариации окраски цветков у гибридов F₂ *P. sativum* (Стабил) × *P. fulvum* (И609881).

В комбинации ПАП × И609885 проведено одно успешное скрещивание. В комбинации 1096 × И609881 гибриды получены в результате скрещивания 3 из 27 цветков (11,1%). Эффективность получения гибридов в комбинации Стабил × И609881 составила 46,7% (7 успешных скрещиваний из 15). Средняя эффективность межвидовой гибридизации для всех комбинаций скрещивания составила 25,6%.

*Наследование конвицилина у межвидового гибрида гороха *P. sativum* × *P. fulvum**

Белок семян гороха на 80% состоит из альбуминов и глобулинов [12]. При использовании ТРИС-глицинового буфера преимущественно экстрагируются глобулины [10]. Конвицилин является глобулином.

Изучение компонентного состава запасных белков родителей и гибридов F₂ проводили в комбинации скрещивания: ПАП × И609885 [17]. Анализ спектров конвицилина у гибридов F₂ выявил генетическое расщепление по электрофоретическим компонентам 15 и 16 (~70 кДа) - рисунок 6.

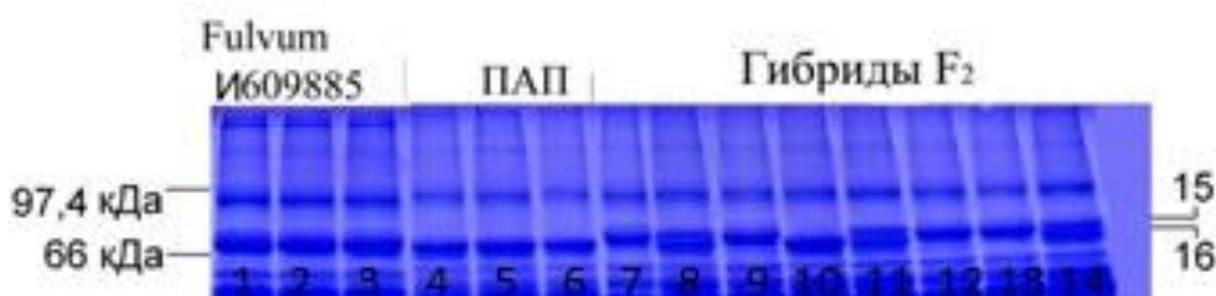


Рис. 6. Электрофореграмма запасных белков родителей и межвидовых гибридов F₂ ПАП × И609885: 1... 3 - спектры образца И609885, 4... 6 - спектры линии ПАП, 7... 14 - спектры гибридов F₂.

Таблица 3. Расщепление гибридов гороха F₂ ПАП × И609885 по изоформам конвицилина

Белок	Компонент	P ₁	P ₂	Гибриды F ₂		
Конвицилин	15	+	-	+	+	-
	16	-	+	-	+	+
	Распределение компонентов 1,25:1,1:1			10	9	8

У гибридов F₂ наблюдается расщепление по фенотипу в соотношении 1,25 +/- : 1,1+/- : 1 +/- (табл. 3). В соответствии с гипотезой моногенного кодоминантного наследования теоретическое расщепление должно соответствовать соотношению 1 +/- : 2 +/+ : 1 -/-. Сравнение результатов по критерию χ^2 выявило совпадение фактического расщепления с теоретическим ($\chi^2_{\text{факт}}=3,29$; $\chi^2_{05}=5,99$). Следовательно, изоформы конвицилина И609885 и ПАП кодируются двумя аллелями одного локуса по кодоминантному типу наследования.

Выводы

1. Исследованы электрофоретические спектры белков семян дикорастущих образцов гороха. Описан компонентный состав спектров в единицах относительной подвижности реперных компонентов спектра сои, необходимый для идентификации биохимических маркеров интрогрессивных аллелей хозяйственно-ценных признаков у гибридов гороха.

2. На электрофоретических спектрах определена локализация важного запасного белка гороха - конвицилина. Область локализации изоформ конвицилина у подвидов *P. sativum - elatius*, *asiaticum*, *abyssinicum* и *transcaucasicum* характеризовалась достаточно сильной консервативностью. Однако у образцов *P. fulvum* K2523 и K6070, И609881 были обнаружены облегченные изоформы конвицилина.

3. Проведен кластерный анализ электрофоретических спектров белков семян у дикорастущего (*elatius*) и культивируемого (*sativum*) подвидов гороха *P. sativum* L. и построена дендограмма.

Установлено четкое распределение образцов по двум кластерам. Образцы культивируемого подвида *sativum* формировали монофилетическую группу, что указывало на узость генетического базиса современного селекционного материала гороха. Анализ филогенетических отношений выявил обособленность подвидов *elatius* и *sativum* и, следовательно, перспективность использования дикорастущего подвида *elatius* в селекции гороха.

4. Получены межвидовые гибриды гороха *Pisum sativum* × *Pisum fulvum*. Изучено наследование конвицилина в гибридной комбинации ПАП (*Pisum sativum*) × И609885 (*P. fulvum*). Изоформы конвицилина И609885 и ПАП контролировались двумя аллелями одного локуса по кодоминантному типу наследования.

Литература

1. Макашева Р.Х. Зерновые бобовые культуры // Культурная флора СССР. – СПб.: Колос, 1979. – С. 45-49.
2. Byrne O.M., Hardie D.C., Khan T.N. [et al.] Genetic analysis of pod and seed resistance to pea weevil in a *Pisum sativum* × *P. fulvum* interspecific cross // Austral. J. Agricult. Res. – 2008. – V. 59. – P. 854-862.
3. 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 Breeding. – 2010.
4. Fondevilla S., Avila C.M., Cubero J.I., Rubiales D. Response of *Micosphaerella pinodes* in a germplasm collection of *Pisum* ssp. // Plant Breeding. – 2005. – V. 124. – P. 313-315.
5. Jha S.S., Ohri D. Comparative study of seed protein profiles in the genus *Pisum* // Biologia Plantarum. – 2002. – V. 45. – № 4. – P. 529-532.
6. Богданова В.С., Галиева Э.Р. Нарушения мейоза как проявление ядерно - цитоплазматической несовместимости при скрещивании подвидов посевного гороха // Генетика. – 2009. – Т. 45. – № 5. – С. 711-716.
7. Gupta A.J., Singh Y.V., Ram H.H. Seed protein profiles and cultivar identification in garden pea (*Pisum sativum* L.) // The Indian Journal of Genetics and Plant Breeding. – 2008. – V.8. – №3. – P.283-287.
8. Nisar M., Ghafoor A., Khan M.R. [et al.] First proteomic assay of Pakistani *Pisum sativum* L. germplasm relation to geographic pattern // Генетика. – 2009. – Т. 45. – № 7. – С. 920-925.
9. Бобков С.В. Культура изолированных пыльников гороха // Доклады РАСХН. – 2010. – №6. – С.19-21.
10. Идентификация сортов и регистрация генофонда культурных растений по белкам семян / В.Г. Конарев [и др.]; под ред. В.Г. Конарева. – СПб.: ВИР, 2000. – 186 с.
11. Van de Peer Y., De Wachter Y. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment // Comput. Applic. Biosci. – 1994. – V.10. – P.569-570.
12. Tzitzikas E.N., Vincken J.P., Groot J. Genetic variation in pea seed composition // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2006. – №54. – P.425-433.
13. Зеленев А.Н., Щетинин В.Ю., Кондыков И.В., Уваров В.Н., Задорин А.М., Борзенкова Г.А., Аза-

рова 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. – 25с.

14. Лазарева Т.Н., Бобков С.В. Полиморфизм запасных белков у образцов диких таксонов гороха // Доклады РАСХН. – 2013. – №5. – С. 20-22.

15. Baranyi M., Greilhuber J., Swiecicki W.K. Genome size in wild *Pisum* species // Theoretical and Applied Genetics. – 1996. – V. 93. – P.717-721.

16. Ochatt S.J., Benabdelmouna A., Marget P. [et al.] Overcoming hybridization barriers between pea and some of its wild relatives // Euphytica. – 2004. – V.137. – P.353-359.

17. Бобков С.В., Лазарева Т.Н. Компонентный состав электрофоретических спектров запасных белков межвидовых гибридов гороха // Генетика. – 2012. – Т.48. – №1. – С.56-61.

ELECTROFORETIC ANALYSIS OF PROTEINS OF PEAS PISUM L.

T.N. Selihova, S.V. Bobkov

The All-Russia Research Institute of Legumes and Groat Crops

Abstract: *Electroforetic spectra of storage proteins in wild-growing accessions of pea are investigated. Interspecific hybrids of pea *Pisum sativum* × *Pisum fulvum* are obtained. Convicilin inheritance in hybrid combination of PAP (*Pisum sativum*) × I609885 (*P. fulvum*) is studied.*

Keywords: pea, SDS-PAGE electrophoresis, protein, spectrum, band, convicilin.