

ПОЛУЧЕНИЕ МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДОВ ГОРОХА ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В МАРКЕРНОЙ СЕЛЕКЦИИ НА ВЫСОКОЕ КАЧЕСТВО БЕЛКА

С.В. БОБКОВ, кандидат сельскохозяйственных наук

Т.Н. СЕЛИХОВА, кандидат биологических наук

ФГБНУ «ФНЦ ЗЕРНОБОБОВЫХ И КРУПЯНЫХ КУЛЬТУР»

E-mail: svbobkov@gmail.com

У образцов *Pisum fulvum* Sibth. et Sm. (к-2523 и к-6070), полученных из мировой коллекции ВИР, идентифицированы уникальные компоненты конвицилина, которые предложено использовать в качестве биохимических маркеров для быстрого создания селекционных линий гороха с высоким качеством белка, подходящего для глубокой переработки и получения инновационных продуктов пищевой промышленности. В качестве культурного компонента скрещивания использовали сорт Стабил, интрогрессивные линии BC₂F₅ Стабил × и-609881 и л-83-1, селекционные линии ПАП 485/4 и ЛУ 153-06. В 2017 и 2018 годах проведено 49 межвидовых скрещиваний. Межвидовые гибриды гороха получены в комбинациях скрещиваниях ПАП 485/4 × к-6070, Стабил × к-2523, к-2523 × л-83-1. Растение гибрида F₁ ПАП 485/4 × к-6070 выращивали в тепличном боксе и получили 13 семян гибридов второго поколения. После удаления оболочек гибридные семена F₂ ПАП 485/4 × к-6070 разделяли на две семядоли для маркерной селекции по уникальным компонентам конвицилина. Одну семядолю оставляли для проведения SDS-PAGE электрофореза, а другую с почкой проращивали на смоченной дистиллированной водой фильтровальной бумаге в чашке Петри. Проростки помещали в полипропиленовые сосуды с почвой. Отбор полученных из второй семядоли гибридных растений с интрогрессивными изоформами конвицилина проводили на основании данных электрофоретического анализа белков первой семядоли.

Ключевые слова: горох посевной (*Pisum sativum*), горох красно-желтый (*P. fulvum*), межвидовая гибридизация, изоформа конвицилина, маркерная селекция.

Горох *Pisum sativum* L. является важной сельскохозяйственной культурой. В России в 2017 г. горох выращивали на площади 1,3 млн. га со средней урожайностью зерна 2,5 т/га и произвели 3,3 млн. тонн зерна (FAOSTAT, 2019) [1].

Семена гороха содержат крахмал, белок, клетчатку, сахара, жир, минералы, полифенольные соединения, сапонины, α-галактозиды и фитиновую кислоту, другие вещества. Белок гороха в сравнении с белком сои лучше усваивается в желудочно-кишечном тракте [2]. Продуктами гидролиза белков гороха являются короткие полипептиды, обладающие антигипертензивным действием [3]. Современные сорта гороха характеризуются относительно низким (23-25%) содержанием белка в семенах, хотя у отдельных диких образцов содержание белка в семенах превышает 30% [4].

Следует обратить внимание на особенность аминокислотного состава белка гороха, в нем очень много лизина, а триптофан и серосодержащие аминокислоты (метионин и цистеин) представлены в ограниченном количестве (менее 3% от содержания всех аминокислот) [5]. Легумин, в сравнении с другими запасными белками (вицилином и конвицилином) является в наибольшей степени серосодержащим белком. Подсчитано, что на 60 кДа массы молекулы легумина приходится по одним данным [6] два остатка метионина и три цистеина, а по другим [7] семь и четыре соответственно. Другой важной запасной белок вицилин содержит очень мало метионина и совсем не содержит цистеина [7].

Питательные качества семян зернобобовых культур определяются свойствами белковых фракций [8]. Из литературных источников известно, что соотношение легумина и вицилина в белковом комплексе гороха в зависимости от генотипа составляет 0,2-1,5 [9].

Увеличение соотношения легумина к вицилину можно использовать в селекции гороха на повышенное содержание серосодержащих аминокислот.

Физико-химические и технологические свойства запасных белков гороха определяются составом образующих их молекул. Легумин и вицилин в качестве отдельных компонентов или в смеси формируют хороший белковый гель, а конвицилин препятствует образованию гелей из белковых изолятов [9, 10]. Учитывая, что в настоящее время не известны мутанты гороха без содержания конвицилина [11], изучение влияния интрогрессивных изоформ этого белка на качество белковых изолятов является актуальным направлением исследований [12]. Вовлечение в селекционный процесс новых аллелей конвицилина, полученных от диких сородичей гороха, позволит повысить генетическое разнообразие исходного материала для селекции новых сортов гороха с высококачественным белком, пригодным для использования в пищевой промышленности [13].

Критическое значение для интрогрессивной селекции гороха имеет оценка особенностей передачи аллелей от дикого родителя к межвидовым гибридам. Длительная раздельная эволюция дикого и культурного гороха, низкая результативность скрещиваний при межвидовой гибридизации, перенос вместе с ценными аллелями нежелательного генетического материала, создают препятствия широкому вовлечению диких сородичей гороха в селекционный процесс [14].

Цель исследования состояла в изучении особенностей межвидовой гибридизации культурного гороха с образцами-донорами уникальных аллелей, кодирующих «дикие» изоформы конвицилина, для использования в селекции на высокое качество изолированного белка.

Материалы и методы

Межвидовая реципрокная гибридизация культурного гороха с образцами дикого вида *P. fulvum* к-2523 и к-6070 из коллекции ВИР проведена в условиях тепличного бокса. В качестве культурного гороха использовали сорт Стабил, интрогрессивные линии BC₂F₅ Стабил × и-609881 и л-83-1, селекционные линии ПАП 485/4 [15] и ЛУ 153-06.

Для выделения и разделения белков семян гороха использовали стандартный метод электрофореза SDS-PAGE. Электрофорез проводили с использованием камеры для вертикального электрофореза VE-4 (Хеликон, Россия). Содержание полиакриламида в разделяющем геле составляло 12,5%, а концентрирующем – 5%. Позиции компонентов белков гороха определяли по реперным компонентам спектра сои сорта Ланцетная. Интенсивность окрашивания компонентов выражали в баллах и характеризовали как: 1 – слабую, 2 – интенсивную и 3 – очень интенсивную и выставляли в тексте в круглых скобках. Локализацию конвицилина определяли по компонентам с молекулярной массой 70 кДа [10]. Компоненты идентифицировали с использованием набора маркеров с молекулярной массой 6,5-200 кДа (SIGMA-ALDRICH, США).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием дисперсионного анализа. Парные сравнения средних проводили с использованием критерия Тьюки ($\alpha=0,05$).

Результаты и обсуждение

Глобулины легумин, вицилин и конвицилин являются основными запасными белками у гороха. Известно, что конвицилин и вицилин характеризуются обширной гомологией, начиная от 122 или 166 аминокислотного остатка (в зависимости от изоформы) до С-конца белковой молекулы [10]. Конвицилин отличается от вицилина N-концом, который в отличие от вицилина и остальной части молекулы конвицилина имеет сильный положительный заряд. Физико-химические свойства глобулинов определяются химическим составом образующих их молекул. Легумин и вицилин в качестве отдельных компонентов или в смеси формируют хороший белковый гель, а конвицилин в силу сильно заряженного N-конца молекулы мешает образованию гелей из белковых изолятов [9]. Отсюда сделан вывод, что горох с различным соотношением легумина и вицилина, но не содержащий конвицилина является идеальным сырьём для пищевой промышленности [10]. Учитывая, что до настоящего времени не найдены мутанты гороха, не содержащие конвицилин [11],

существует вероятность того, что интрогрессивные изоформы конвицилина, особенно с меньшей молекулярной массой, будут отличаться от «культурных» изоформ составом аминокислотных остатков N-конца молекулы, оказывая положительное влияние на физико-химические свойства белковых изолятов.

Ранее проведенное электрофоретическое разделение белков семян позволило выявить уникальные «легкие» изоформы конвицилина у диких образцов *P. fulvum* к-2523 и к-6070 [13], полученных из коллекции ВИР. Использование уникальных компонентов конвицилина в качестве биохимических маркеров приведет к созданию интрогрессивных линий гороха, а изучение влияния «диких» изоформ конвицилина на физико-химические свойства белковых изолятов позволит оценить перспективу использования нетрадиционных аллелей конвицилина в селекционном процессе.

Межвидовая гибридизация культурного гороха с образцами *P. fulvum* к-2523 и к-6070

Межвидовую гибридизацию гороха проводили в условиях тепличного бокса в 2017 и 2018 годах. В 2017 году скрещивания растений проводили в июле и августе в комбинациях к-6070 × (BC₂F₅ Стабил × и-609881), к-6070 × ЛУ 153-06, к-6070 × ПАП 485/4, ЛУ 153-06 × к-2523, ПАП 485/4 × к-6070 (табл. 1). Всего провели 16 скрещиваний и получили 6 мелких бобов (5-10 мм). Крупный боб с одним семенем был получен в комбинации ПАП 485/4 × к-6070. В комбинациях, где растения дикого вида использовались в качестве материнского компонента скрещивания, гибридные семена не были получены, что соответствует ранее опубликованным данным [11]. В комбинации к-6070 × ПАП 485/4 наблюдали развитие бессемянного боба до нормального размера.

Таблица 1

Межвидовая гибридизация гороха, 26.07.1917-3.08.2017

Комбинация	Число скрещиваний, шт	Число мелких бобов, шт	Число крупных пустых бобов, шт	Число бобов с семенами, шт
к-6070 × (BC ₂ F ₅ Стабил × и-609881)	1	0	0	0
к-6070 × ЛУ 153-06	8	3	0	0
к-6070 × ПАП 485/4	5	2	1	0
ЛУ 153-06 × к-2523	1	0	0	0
ПАП 485/4 × к-6070	1	1	0	1
ВСЕГО	16	6	1	1

В 2018 году скрещивания растений проводили в августе и сентябре в комбинациях к-6070 × Стабил, к-2523 × Стабил, к-2523 × л-83-1, Стабил × к-6070, Стабил × к-2523 (табл. 2).

Таблица 2

Межвидовая гибридизация гороха, 6.08.1918-3.09.2018

Комбинация	Число скрещиваний, шт	Число мелких бобов, шт	Среднее число бобов на одно скрещивание, шт	Число зерен в бобе, шт	Крупные бобы без семян, шт
к-6070 × Стабил	14	0	0 ^{a*}	0	0
к-2523 × Стабил	12	0	0 ^a	0	0
к-2523 × л-83-1	2	1	0,5 ^{ab}	1	0
Стабил × к-6070	2	1	0,5 ^{ab}	0	1
Стабил × к-2523	3	2	0,67 ^b	2	1
ВСЕГО	33	4	0,368	3	2

* - средние значения с одинаковыми буквенными символами существенно не различаются при $\alpha=0,05$ (парные сравнения средних проводили с использованием критерия Тьюки)

Всего провели 33 скрещивания и получили 6 мелких бобов. В комбинациях скрещивания к-6070 × Стабил и к-2523 × Стабил развитие бобов прекращалось через несколько дней после опыления и затем они опадали. В комбинациях к-2523 × л-83-1, Стабил × к-6070 и Стабил × к-2523 получены мелкие бобы (5-10 мм), которые рано останавливались в развитии, но могли оставаться на растениях некоторое время после опыления. Из них только 4 боба продолжали развитие до нормального состояния. Среди них 2 боба в комбинациях к-2523 × л-83-1 и Стабил × к-2523 содержали 1 и 2 семени соответственно. Два других боба в комбинациях скрещивания Стабил × к-6070 и Стабил × к-2523 вырастали до нормального размера, но не содержали семян (рис. 1).



Рис. 1. Бобы межвидовых гибридов гороха, не содержащие семян: а) нормальный боб, б) боб с одним семенем (в центре) и боб без семян (справа внизу)

Гибридное растение F_1 ПАП 485/4 × к-6070 выращивали в тепличном боксе и получили 13 семян гибридов второго поколения. В результате скрещивания этого межвидового гибрида с сортом Стабил получили растение BC_1F_1 (ПАП 485/4 × к-6070) × Стабил. Растения гибридов F_1 к-2523 × л-83-1 и Стабил × к-2523 выращивали в тепличном боксе с целью получения семян гибридов второго поколения и проведения возвратных с культурным горохом.

Выделение семядолей в семенах гибридов F_2 ПАП 485/4 × к-6070 для маркерной селекции на высокое качество белка

После снятия оболочек гибридные семена F_2 ПАП 485/4 × к-6070 для маркерной селекции по уникальным компонентам конвицилина разделяли на две семядоли (рис. 2).

Одну семядолю оставляли для проведения SDS-PAGE электрофореза, а другую с почкой проращивали на фильтровальной бумаге в чашке Петри. Проросшие семядоли помещали в полипропиленовые сосуды с почвой. Растения выращивали в тепличном боксе. На основании полученных белковых спектров проводили отбор растений с наличием интрогрессивных компонентов «диких» изоформ конвицилина для использования в дальнейших скрещиваниях с культурным родителем в процессе селекции на высокое качество белка.



Рис. 2. Выделение изолированных семядолей для электрофоретического анализа и маркерной селекции растений с уникальными изоформами конвицилина: а) семя гороха с удаленной семенной оболочкой; б) изолированные семядоли, одна семядоля предназначена для электрофоретического анализа, вторая с почкой для получения целого растения; в) прорастание маркированных семядолей в чашках Петри с фильтровальной бумагой; г) посадка проросших семядолей в почву

Электрофоретический анализ компонентов конвицилина в белках изолированной семядоли гибридов F_2 для отбора растений с интрогрессивными изоформами конвицилина

Электрофоретический анализ белков семян проводили у образца *P. fulvum* к-2523, сорта Стабил, родителей и гибридов F_2 комбинации скрещивания ПАП 485/4 × к-6070. Анализ подтвердил наличие легких изоформ конвицилина у образцов к-2523 и к-6070 в сравнении с селекционной линией ПАП 485/4 и сортом Стабил (рис. 3).

У гибридов F_2 наблюдали расщепление по компонентам конвицилина. В результате анализа удалось маркировать растения гибридов F_2 ПАП 485/4 × к-6070, содержащие генетический фактор, кодирующий интрогрессивный компонент (изоформу) конвицилина. Отобранные с использованием маркерных компонентов гибридные растения, несущие интрогрессивные изоформы конвицилина планируется использовать в дальнейших скрещиваниях с культурными растениями гороха.

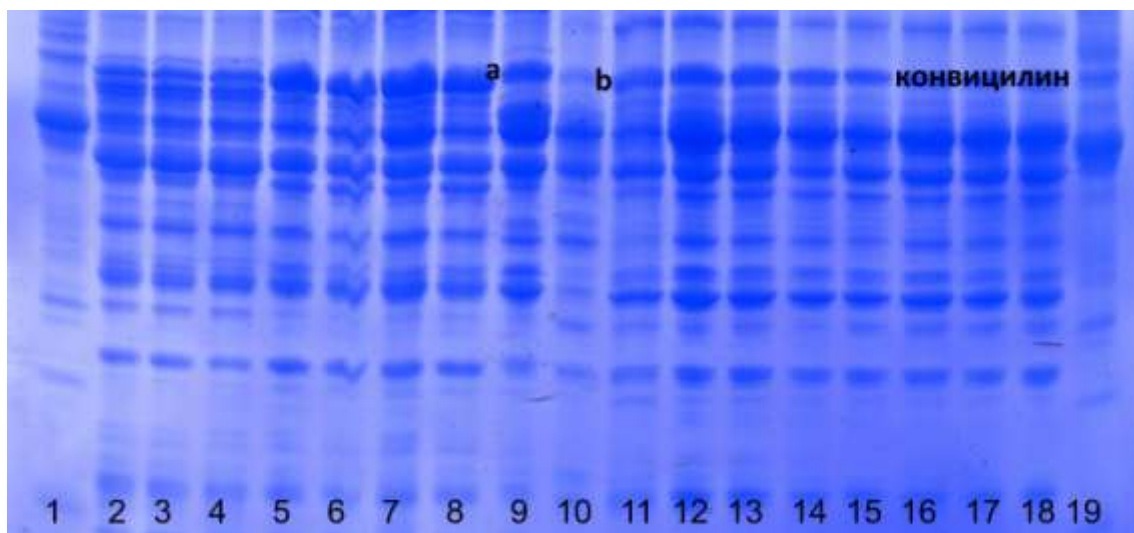


Рис. 3. Электрофоретические спектры белков семян образца *P. fulvum* к-2523, сорта Стабил, родителей и гибридов F₂ ПАП 485/4 × к-6070: 1, 19 – сорт сои Ланцетная, 2-4 - к-2523, 5-8 - к-6070, 9-11 - F₂ ПАП 485/4 × к-6070 (А9, В1, А11), 12-15 - ПАП 485/4, 16-18 – Стабил. Надпись «конвицилин» указывает на локализацию компонентов конвицилина, буквой «а» обозначен «культурный» компонент конвицилина, а буквой «b» - полученный в результате интрогрессии от дикого образца к-6070

Заключение

Использование диких сородичей для интрогрессии генов хозяйственно ценных признаков является перспективным направлением селекции сельскохозяйственных культур. Однако исследования в этом направлении проводятся преимущественно с генами устойчивости растений к различным стрессорам. Между тем, несомненный интерес представляет и интрогрессивная селекция на повышение качества сельскохозяйственной продукции для использования в пищевой промышленности. Выявленное нами наличие легких изоформ конвицилина у образцов дикого гороха *P. fulvum* в сравнении с селекционными линиями ПАП 485/4 и ЛУ 153-06 культурного гороха и сортом Стабил позволяют нам предложить пути маркерной селекции гороха на высокое качество белка. Полученные нами межвидовые гибриды гороха с интрогрессивными изоформами конвицилина дикого вида гороха могут оказаться интересными в селекционном отношении. Дальнейшие исследования предполагают изучение физико-химических свойств белковых изолятов гибридов.

Литература

1. Crops // FAOSTAT [Электронный ресурс]. URL: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (дата обращения: 12.06.2019).
2. Domoney C., Duc G., Ellis T.H.N., Ferrandiz C., Firnhaber C., Gallardo K., Hofer J., Kopka J., Kuster H., Madueno F., Munier-Jolain N.G, Mayer K., Thompson R., Udvardi M., Salon C. Genetic and genomic analysis of legume flowers and seeds // *Current Opinion in Plant Biology*. - 2006. - V. 9. - P. 133-141.
3. Roy F., Boye J., Simpson B. Bioactive proteins and peptides in pulse crops: pea, chickpea and lentil // *Food Research International*. - 2010. - V. 43 (2). - P. 432-442.
4. Бобков С.В., Уварова О.В. Перспектива использования гороха для производства изолятов запасных белков // *Земледелие*. - 2012. - № 8. - С. 47-48.
5. Signor C.L, Aime D., Bordat A., Belgazi M., Labas V., Couzy O., Young T.B., Prosperi J.-M., Leprince O., Tompson R.D., Buitink J., Burstin J., Gallardo K. Genome-wide association studies with proteomics data reveal genes important for synthesis, transport and packaging of globulins in legume seeds // *New Phytologist*. - 2017. - V. 214. - P. 1597-1613.
6. Casey R., Short M.N. Variation in the amino acid composition of legumin from *Pisum* // *Phytochemistry*. - 1981. - V. 20. - P. 21-23.
7. Croy R.R.D., Gatehouse J.A., Tyler M., Boulter D. The purification and characterisation of a third storage protein (convicilin) from the seeds of pea (*Pisum sativum* L.) // *Biochem. J.* - 1980. - V. 191. - P. 509-516.

8. Duranti M., Gius C. Legume seed protein content and nutritional value // Field Crop Research. – 1997. – V. 53. – P. 53. – P. 31-45.
9. O’Kane F.E., Happe R.P., Vereijken J. M., Gruppen H., Van Boekel M.A.J.S. Characterization of pea vicilin. 2. Consequences of compositional heterogeneity on heat-induced gelation behavior // J. Agric. Food Chem. – 2004. – V. 52. – P. 3149-3154.
10. Tzitzikas E.N., Vincken J.P., Groot J., Gruppen H., Visser R.G. Genetic variation in pea seed composition // Journal of Agricultural and Food Chemistry. - 2006. - № 54. - P. 425-433.
11. Бобков С.В., Селихова Т.Н. Получение межвидовых гибридов для интрогрессивной селекции гороха // Экологическая генетика. - 2015. - Т. XIII. - № 3. - 2015. - С. 40-49. (Bobkov S.V., Selikhova T.N. Obtaining interspecific hybrids for introgressive pea breeding // Russian Journal of Genetics: Applied Research. - 2017. - Vol. 7. - № 2. - P. 145-152.)
12. Бобков С.В., Селихова Т.Н., Бычков И.А. Хозяйственноценные признаки образцов дикого вида гороха *Pisum fulvum* // Зернобобовые и крупяные культуры. - 2016. - № 4 (20). - С. 41-46.
13. Селихова Т.Н., Бобков С.В. Полиморфизм запасных белков у образцов диких таксонов гороха // Доклады РАСХН. - 2013. - № 5. - С. 20-22.
14. Бобков С.В., Лазарева Т.Н. Компонентный состав электрофоретических спектров запасных белков межвидовых гибридов гороха // Генетика. - 2012. - Т. 48. - № 1. - С. 56-61. (Bobkov S.V., Lazareva T.N. Band composition of electrophoretic spectra of storage proteins in interspecific pea hybrids // Russian Journal of Genetics. - 2012. - V. 48. - № 1. - P. 47-52.)
15. Зеленов А.Н., Зеленов 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. Горох (*Pisum sativum* L.). Формы с измененной архитектурой листа // Паспорта доноров и источники селекционно ценных признаков сельскохозяйственных культур. Выпуск 9. - Орел. - 2011. – 25 с.

Работа выполнена по пункту программы ФНИ государственных академий № 0636-2019-0008 «Мобилизация генетических ресурсов зернобобовых и крупяных культур для использования в селекционном процессе».

Благодарность. Авторы выражают искреннюю благодарность за любезно предоставленные образцы семян для проведения эксперимента А.Н. Зеленову - селекционная линия ПАП 485/4, В.Н. Уварову - селекционная линия ЛУ 153-06 (ФНЦ ЗБК) и Е.В. Семёновой - образцы *P. fulvum* к-2523 и к-6070 (ВИГРР им. Н.И. Вавилова).

OBTAINING PEA INTERSPECIFIC HYBRIDS FOR USE IN MARKER ASSISTANT SELECTION ON HIGH PROTEIN QUALITY

S.V. Bobkov, T.N. Selikhova

FSBSI «FEDERAL SCIENTIFIC CENTER OF LEGUMES AND GROAT CROPS»

Abstract: Unique bands of convicilin identified in *P. fulvum* accessions k-2523 and k-6070 (N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources) would be used as biochemical markers for fast producing of breeding lines with high quality of isolated protein suitable for obtaining innovative food products. Pea variety Stabil, introgressive lines BC₂F₅ Stabil × i-609881 and l-83-1, breeding lines PAP 485/4 and LU 153-06 were used as cultural components in interspecific crosses. Interspecific hybridization was conducted in 2017 and 2018; the total number of crosses was 49. Pea interspecific hybrids F₁ were obtained in crosses PAP 485/4 × k-6070, Stabil × k-2523 and k-2523 × l-83-1. Hybrid plant F₁ PAP 485/4 × k-6070 was grown in greenhouse and 13 hybrid seeds F₂ were obtained. After dehulling hybrid seeds F₂ PAP 485/4 × k-6070 were splitted into two cotyledons for marker breeding with using unique electrophoretic bands of convicilin. One cotyledon was used for SDS-PAGE electrophoresis. The second cotyledon with intact bud after sprouting was placed in polypropylene vessel with soil for plant growth. Selection of hybrid plants with introgressive isoforms of convicilin was conducted according the data obtained from SDS-PAGE electrophoresis of the first cotyledon.

Keywords: pea, *Pisum sativum*, *Pisum fulvum*, interspecific hybridization, isoform of convicilin, marker assistant breeding.