

## Генетический анализ линии «Люпиноид» гороха посевного (*Pisum sativum* L.)

А.А. Синюшин, А.В. Алешин, Д.Г. Максименко

(Руководитель С.А. Гостимский)

## Genetic analysis of line "Lupinoid" of garden pea (*Pisum sativum* L.)

A.A. Sinjushin, A.V. Alyoshin, D.G. Maksimenko

(Supervisor: S.A. Gostimsky)

**Резюме:** В исследовании генетического контроля формирования особого типа соцветия линии гороха посевного «Люпиноид» применен гибридологический метод. Показано, что формирование такого соцветия обусловлено комплементарным взаимодействием рецессивных аллелей двух генов, один из которых связан с ограничением размеров побеговой апикальной меристемы, а второй контролирует пролиферацию главной оси. Обсуждается возможность использования данной линии в исследовании фундаментальных и прикладных аспектов генетики растений.

**Abstract:** The hybridological method was used to analyze the genetic control of inflorescence development in pea line "Lupinoid". It was demonstrated that recessive alleles of two genes take part in formation of the special inflorescence type. One of these genes limits size of stem apical meristem, the another one provides axis proliferation in wild type plants. Some conclusions connected with perspectives of usage of analyzed line in plant breeding were also discussed.

### Введение

Горох посевной (*Pisum sativum* L.: Fabaceae) является классическим генетическим объектом, на котором были установлены основные закономерности наследственности. Он остается важным объектом для проведения экспериментальной и учебной работы по генетике растений. На кафедре генетики биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова создана коллекция мутантов, сортов и маркерных линий гороха для осуществления научных и учебных работ. Коллекция используется для проведения генетического анализа и установления генетического контроля формирования различных признаков растений. Настоящая работа проведена в рамках производственной практики студентов кафедры генетики и посвящена изучению новой формы гороха, отличающейся необычной формой соцветия.

Целью настоящей работы стало изучение генетического контроля морфогенеза соцветия у линии «Люпиноид». Для достижения данной цели были поставлены задачи определения числа генов, участвующих в образовании соцветия в этой линии, выяснения генотипа данной линии по некоторым ло-

кусам, определяющим проявление важных морфологических признаков, и оценка перспектив использования этой формы в научной и селекционной работе.

Линия «Люпиноид» характеризуется необычной формой соцветия, обеспечивающей одновременное созревание большого числа плодов (Зеленов, 2001). Она была получена в ходе селекционной работы во Всероссийском научно-исследовательском институте зернобобовых и крупяных культур (ВНИИЗБК, г. Орел).

### Материалы и методы

Линия «Люпиноид» была любезно предоставлена докт. биол. наук А.Н. Зеленовым (ВНИИЗБК, г. Орел). Для установления характера наследования изучаемых признаков линию скрещивали с маркерной линией WL1132, характеризующейся нормальным строением соцветия (по типу двойной пролиферирующей кисти, рис. 1б). Скрещивания были выполнены по стандартной методике (Гостимский, Хартина, 2006).

Скрещиваемые формы различались по проявлениям следующих признаков: форма соцветия (нормальная – «люпинообразная»), окраска семян (желтая – зеленая), окраска венчика (розовая – белая), окраска незрелых плодов и чашечек (желтая – зеленая). В каждой паре первым указано проявление признака в линии WL 1132, вторым – «Люпиноид».

Родительские формы и растения F<sub>1</sub> и F<sub>2</sub> были высажены летом 2006 г. на опытном участке на территории Звенигородской биологической станции им. С.Н. Скадовского МГУ. Проводили описание форм по ряду качественных и количественных признаков. Статистическую оценку расщепления в F<sub>2</sub> проводили методом «хи-квадрат» ( $p > 0,05$ ) с разложением на компоненты (Семеновский, 1970).

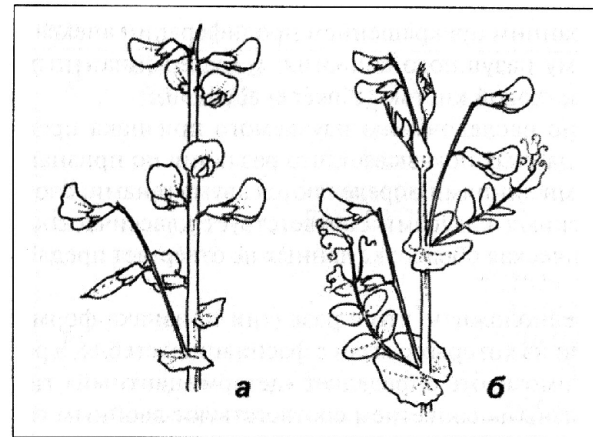


Рисунок 1. Форма соцветия у растений линий «Люпиноид» (а) и WL 1132 (б).  
Inflorescence structure of plants of lines "Lupinoid" (a) and WL 1132 (b).

## Результаты и обсуждение

**Строение соцветия в линии «Люпиноид» в сравнении с нормой.** У расте- ний изучаемой линии наблюдали развитие соцветия особого типа. В верхней части главной оси цветки собраны вместе, отчасти напоминая соцветие *Lupinus* (что и послужило причиной присвоения такого названия, рис. 1а). В измененном соцветии наблюдается до 12–15 цветков, которые раскрываются практически одновременно. На междоузлиях, предшествующих «люпинообразной» структуре, могут развиваться цветки в составе пазушных кистей, характерных для растений дикого типа. Более подробно строение соцветия в изучаемой линии было описано ранее (Синюшин, Гостимский, 2006).

**Генетический анализ признака формы соцветия.** В первом поколении, полученном от скрещивания линий «Люпиноид» и WL1132, все растения были единообразны и имели нормальные соцветия: в пазухах листьев развивались абрактёзные кисти, обычно двухцветковые. Таким образом, показано, что исходные линии являются гомозиготными по генам, определяющим форму соцветия.

Во втором поколении обнаружено расщепление по признаку формы соцветия на 4 фенотипических класса:

- формы с нормальным соцветием;
- растения с лентовидно фасцированным стеблем;
- формы с так называемым «детерминантным» типом роста;
- растения с «люпинообразным» соцветием.

Фасциация – это широко распространенная среди цветковых растений аномалия, связанная со срастанием нескольких точек роста или, напротив, неограниченным разрастанием (обычно в одной плоскости) единой точки роста (Шавров, 1959). У гороха фасциация приводит к формированию щитковидного соцветия (неверно называемого «ложным зонтиком»). «Детерминантный» тип роста связан с ранним прекращением пролиферации апекса и превращением его в меристему пазушного соцветия: у «детерминантных» форм ось оканчивается двухцветковой кистью (Singer et al., 1990).

Количественные данные по наследованию изучаемого признака представлены в таблице 1. Анализ данных показывает, что различия по признаку формы соцветия между данными линиями определяются двумя генами; соотношение между фенотипическими классами соответствует классическому расщеплению 9:3:3:1. Статистическая обработка данных не отвергает предложенную гипотезу (табл. 1).

Таким образом, можно предположить, что в развитии признака формы соцветия участвуют 2 гена, один из которых связан с фасциацией стебля, а рецессивный аллель второго в гомозиготе определяет «детерминантный» тип стебля. Формы с «люпинообразным» соцветием соответствуют двойным гомозиготам по рецессивным аллелям обоих генов. Подобное взаимодействие может быть классифицировано, как комплементарное. Нормальное соцветие связано с комплементарным взаимодействием доминантных аллелей двух раз-

личных генов, а аномальное обусловлено действием двух рецессивных аллелей в гомозиготном состоянии.

Таблица 1.

Генетический анализ расщепления в популяции F<sub>2</sub> от скрещивания линии «Люпиноид» с линией WL1132.  
Genetic analysis of population of F<sub>2</sub> hybrids from cross of “Lupinoid” line with line WL 1132.

Число растений в F <sub>2</sub>					Всего	H <sub>0</sub> -гипотеза	χ <sup>2</sup> <sub>A</sub>	χ <sup>2</sup> <sub>B</sub>	χ <sup>2</sup> <sub>A-B</sub>	Σχ <sup>2</sup>
Нормальное соцветие	Детерминированное соцветие	Щитковидное соцветие	«Люпинообразное» соцветие							
O	176	50	54	18	298	9:3:3:1	0,112	0,756	0,252	1,120
E	167,625	55,875	55,875	18,625						

O – наблюдаемое значение, E – ожидаемое. Число степеней свободы df = 3, p > 0,05.  
O – observed meaning, E – expected. Number of degrees of freedom df = 3, p > 0,05.

Некоторые предварительные данные (не представлены) дают возможность предполагать, что фасциация в линии «Люпиноид» связана с нарушениями активности гена *FA*, локализованного в III группе сцепления гороха посевного. «Детерминантный» рост, скорее всего, обусловлен мутацией в гене *DET* (*DETERMINATE*), локализованном в V группе (Swiecicki, 1987). Связь мутантных аллелей в данном скрещивании с генами *FA* и *DET* требует дополнительной проверки.

Таким образом, на основании полученных результатов генетического анализа схема изучаемого скрещивания может быть представлена следующим образом:

P	«Люпиноид» fafa detdet	X	WL1132 FAFA DETDET
		↓	
F <sub>1</sub>		Нефасц. недетерм. FAfa DETdet	(X)
			↓
F <sub>2</sub>			9/16 Нефасц. недетерм. FA- DET- 3/16 Фасц., недетерм. fafa DET- 3/16 Нефасц. детерм. FA- detdet 1/16 Фасц. детерм. («люпинообразные») fafa detdet

**Установление генотипов скрещиваемых линий.** Анализ наследования других морфологических признаков в расщепляющейся популяции F<sub>2</sub> показал, что расщепление происходит по моногенному типу (табл. 2).

Таблица 2.

Результаты генетического анализа популяции F<sub>2</sub> от скрещивания линии «Люпиноид» с линией WL1132.

Results of genetic analysis of F<sub>2</sub> population from cross between lines "Lupinoid" and WL 1132.

Число растений в F <sub>2</sub>				Всего	H <sub>0</sub> -гипотеза	χ <sup>2</sup> <sub>A</sub>	χ <sup>2</sup> <sub>B</sub>	χ <sup>2</sup> <sub>A-B</sub>	Σχ <sup>2</sup>	
Нормальное соцветие	Детерминированное соцветие	Щитковидное соцветие	«Люпинообразное» соцветие							
О	176	50	54	18	298	9:3:3:1	0,112	0,756	0,252	1,120
Е	167,625	55,875	55,875	18,625						

О – наблюдаемое значение, Е – ожидаемое. Число степеней свободы df = 1, p > 0,05.

O – observed meaning, E – expected. Number of degrees of freedom df = 1, p > 0,05.

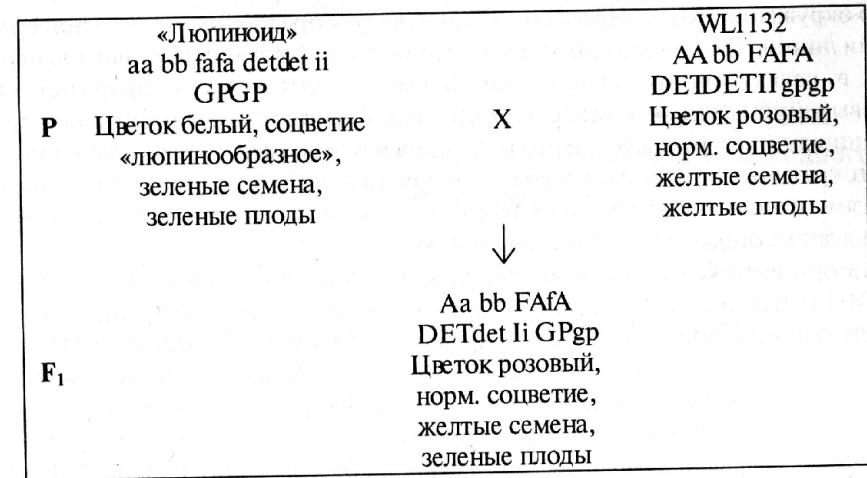
Анализ окраски семядолей семян, собранных с растений F<sub>1</sub>, показал, что 225 семян имели желтую окраску и 79 – зеленую, что соответствует теоретически ожидаемому соотношению 3:1. Статистический анализ не отвергает данную гипотезу, следовательно, родительские линии различаются по аллелям гена *I*, определяющего у гороха окраску семядолей: *I* – желтая, *i* – зеленая.

Анализ окраски незрелых бобов (зеленая – желтая) также обнаружил расщепление в F<sub>2</sub> с соотношением 224 растения с желтыми плодами, 74 – с зелеными, что достоверно соответствует расщеплению 3:1. Различия между родительскими формами связаны с аллельными состояниями одного гена: *GP* (*GREEN POD*) – зеленая, *gp* – желтая.

Наконец, третий признак – пигментация венчика цветка (розовая – белая) также наследуется по моногенной схеме (217 розовых, 87 белых). Это свидетельствует в пользу моногенных различий между скрещиваемыми линиями.

Генетический контроль антоциановой пигментации цветка связан с 2 основными генами – *A* и *B*. Эти гены взаимодействуют по типу доминантного эпистаза: у форм с генотипом *A-B-* цветок пурпурный, у растений с генотипом *aa* вне зависимости от аллельного состояния по гену *B* окраска не формируется. Поскольку в F<sub>1</sub> все растения имели розовые цветки, было выдвинуто предположение, что линия «Люпиноид» является двойной гомозиготой по рецессивным аллелям генов, связанных с контролем пигментации цветка – *aabb*.

Таким образом, различия между родительскими формами по каждому изучаемому признаку моногенны (значения Σχ<sup>2</sup> во всех случаях не превышают пороговой величины по Фишеру, метод «хи-квадрат» не дает оснований для отвержения гипотезы H<sub>0</sub>). Схема анализируемого скрещивания может быть представлена в следующем виде:



Перспективы использования линии «Люпиноид» в теоретических и прикладных целях. Проведенное исследование позволило определить генотипы исследованных линий и показало, что необычная форма соцветия в линии «Люпиноид» связана с взаимодействием рецессивных аллелей 2 генов. Подобный случай впервые описан в практике и представляет интерес для изучения генетического контроля развития соцветия у данного вида.

Изучение генетического контроля развития растений – одна из наиболее актуальных проблем современной биологии. Полученные в отношении модельного объекта *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (*Brassicaceae*) данные указывают на сложность молекулярных механизмов регуляции формообразования. Это подчеркивает необходимость изучения основных принципов морфогенеза на других растениях для формирования по возможности более полной картины генетической регуляции развития высших растений в целом.

Вопрос создания новых высокопродуктивных форм не утратил своей актуальности, и в настоящее время в селекции широко применяются формы с измененным за счет мутаций габитусом (карликовые, фасциированные, с модифицированной структурой листа и т.д.). Таким образом, помимо фундаментальных целей, изучение изменчивости и наследственности у гороха преследует практические цели.

Учитывая тот факт, что наиболее выгодная архитектура соцветия формируется в расщепляющих популяциях с частотой 1/16, выделение высокопродуктивных форм при гибридизации исходного образца с другими линиями затруднительно. Кроме того, при описании растений расщепляющейся популяции F<sub>2</sub> («Люпиноид» × WL1132) отмечено, что двойные гомозиготы *fafa detdet* воспроизводят фенотип растений линии «Люпиноид» лишь отчасти: так, у них число цветков, входящих в «люпинообразное» соцветие существенно меньше (4–6). В литературе неоднократно отмечалась высокая степень подверженности признака фасциации модифицирующему действию среды и ген-

ного окружения (Marx, Hagedorn, 1965). Следует предположить, что при создании линии «Люпиноид» помимо генотипа, способствующего развитию ценной в селекционном отношении формы соцветия, был сформирован чрезвычайно удачный комплекс генов-модификаторов. Этот комплекс при скрещивании разрушается, и его восстановление возможно, вероятно, путем многократной постановки возвратных скрещиваний (бэк-кроссинга). Таким образом, использование линии «Люпиноид» в селекции весьма перспективно, но связано с определенными сложностями.

Авторы выражают глубокую благодарность докт. биол. наук А.Н. Зеленову (ВНИИЗБК, г. Орел) за любезно предоставленный материал; сотрудникам кафедры генетики биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова канд. биол. наук, н.с. З.Г. Кокаевой, н.с. О.А. Аш, н.с. Г.А. Хартиной, за помощь в проведении полевых работ и обсуждение основных результатов работы. Кроме того, авторы благодарят студентов кафедры генетики, принимавших участие в летних кафедральных практикумах в период с 2003 по 2007 г, и лично Е.А. Тошакову и С.В. Тошакову. Работа поддержана грантом РФФИ № 07-04-00652 и программой «Ведущие научные школы» НШ-4202, 2006.

#### Список литературы

- Гостимский С.А., Хартин Г.А. 2001. Демонстрация опытов Г. Менделя. Учебно-методическое пособие по генетике растений. М.: МАКС Пресс, 2006. С. 10–11.
- Зеленов А.Н. Селекция гороха на высокую урожайность семян. Автореф. дисс. ... докт. биол. наук. Брянск, 60 с.
- Лутова Л.А., Проворов Н.А., Тиходеев О.Н. 2000. Генетика развития растений. СПб.: Наука, С. 170–181.
- Серебровский А.С. 1970. Генетический анализ. М.: Наука, 312 с.
- Синюшин А.А., Гостимский С.А. 2006. Фасциация у гороха посевного: основные закономерности морфогенеза // Онтогенез. Т. 37 (6). С. 449–456.
- Шавров Л.А. 1959. О природе фасциаций // Бот. журн. Т. 44. № 4. С. 500–505.
- Яковлев В.Л. 1992. Интродукция генов af, def и deh в генотип высокоурожайного сорта гороха Смарагд // Совершенствование селекции и технологии возделывания зерновых бобовых и крупяных культур (сборник научных трудов). Орел, С. 27–34.
- Marx G.A., Hagedorn D.J. 1962. Fasciation in *Pisum* // Heredity. V. 53. P. 31–43.
- Singer S.R., Hsiung L.P., Huber S.C. 1990. Determinate (det) mutant of *Pisum sativum* (Leguminosae: Papilionoideae) exhibits an indeterminate growth pattern // Amer. J. Bot. V. 77 (10). P. 1330–1335.
- Swiecicki W.K. 1987. Determinate growth (det) in *Pisum*: a new mutant gene on chromosome 7 // *Pisum Newslett.* V. 19. P. 72–73.

### Анализ наследования признаков фасциации стебля и хлорофилльной недостаточности у линий гороха посевного (*Pisum sativum* L.)

А.С.Малышева, Е.В.Маркова  
(Руководитель О.П.Дрибноходова)

### Genetic study of traits (chlorophyll insufficiency and fasciation) on pea (*Pisum sativum* L.)

A.S.Malysheva., E.V.Markova  
(Supervisor O.P.Dribnochodova)

**Резюме:** Проведён анализ наследования двух признаков гороха посевного (*Pisum sativum* L.): фасциации стебля и хлорофилльной недостаточности. Для анализа были использованы результаты скрещивания линий «Штамбовый» и Новая форма 42. Обнаружено, что родительские формы по каждому из исследованных признаков различаются моногенно. Ген, определяющий мутацию хлорофилльной недостаточности, chl42, находится в одной группе сцепления с маркерным геном af на расстоянии приблизительно 30% кроссинговера. Сцепление гена, определяющего фасциацию стебля, с маркерными генами не выявлено.

**Abstract:** Genetic study of two traits (chlorophyll insufficiency and fasciation) was conducted on pea (*Pisum sativum* L.). Offspring from crosses between varieties “Shtambovy” and New form 42 were analysed. It is revealed, parents for each of searching traits differ in single gene. Gene of chlorophyll insufficiency and marker gene af are linked and separated by 30 m.u. Linkage between fasciation gene and marker genes is not found.

#### Введение

Проблема картирования генов – определения порядка расположения генов в хромосомах – одна из старейших задач генетики, сохранившая свою актуальность до настоящего времени, так как для многих видов, в том числе и для гороха, полная генетическая карта еще не построена. Определение генетического расстояния между маркерами осуществляется на основе анализа расщепления во втором или третьем поколении от скрещивания двух гомозиготных инбредных линий, несущих маркерные морфологические мутации и исследуемый признак. Если расщепление достоверно отличается от стандартного, и другие причины, кроме сцепления генов, не оказывают на расщепление существенного влияния, то из соотношений неканонического расщепления непосредственно рассчитывается сила сцепления. (Серебровский, 1970)

Фасциация вегетативных и генеративных органов широко распространена