

А.Н. Зеленов и др., 2013; В.Д. Штырхунов и др., 2016). Другими словами, *формы гороха с изменённой архитектоникой листа предназначены для агроэкологической ниши с высоким уровнем плодородия.*

Таким образом, потребность в увеличении производства семян гороха, повышению содержания белка в них, усилению адаптивности растений, а также вызванные глобальным и локальным изменениями климата перемены в экологии диктуют необходимость вовлечения в селекцию генисточников с высокими физиологическими показателями продукционного процесса и разработки методов, обеспечивающих повышение биоэнергетического потенциала растения.

Авторы выражают благодарность доктору биологических наук М.А. Вишняковой за просмотр рукописи и сделанные замечания, которые способствовали лучшему обоснованию авторской позиции.

INCREASE OF BIOENERGY POTENTIAL OF PLANT – ACTUAL PROBLEM OF SELECTION OF PEAS

A. N. Zelenov, A. A. Zelenov

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

E-mail: zelenov-a-a@yandex.ru

***Abstract:** Successes in peas selection in the XX-th century are reached thanks to essential genetical and morpho-physiologic transformations of plant. Genes of short stem, determinacy, leaflessness, nonshattering of seeds are introduced into genome. Efficacy of sink-source relations increased and the harvest index increased coming nearer to biologically possible limit. At the same time protein content of seeds and deteriorated resistance to biotic and abiotic stressors decreased. There was a need to adapt to global and local climate changes. The solution of these problems and further progress in selection for seed yield is possible by increasing the energy potential of the plant. For this purpose it is offered to use genetical sources with the varied architectonics of leaf and floral zone of stalk. Feature of selection on biopotential increase consists in necessity of foundation of genetical sources bank with the increased parametres of productional process and carrying out of selection at high agrotechnical level in the conditions of reproductive isolation from world assortment of cultural samples of *Pisum sativum* L.*

Keywords: Peas, biopotential, morphotype, microevolution, selection, productivity.

УДК 575.162; 575.167; 633.31/.37

МУТАЦИЯ *determinate habit* У ГОРОХА ЯВЛЯЕТСЯ ПОЛУДОМИНАНТНОЙ

А. А. СИНЮШИН, кандидат биологических наук,

Е. А. ВОЛОВИКОВ, О. А. АШ, Г. А. ХАРТИНА

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ БИОЛОГИЧЕСКОГО ФАКУЛЬТЕТА

МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА, МОСКВА

*Проведен детальный фенотипический анализ различных форм гороха посевного, несущих мутацию *determinate habit* (deh), по сравнению с нормальными формами. Проанализирован характер наследования мутации. Показано, что мутация deh является полудоминантной: гибриды первого поколения от скрещиваний deh × ДЕН имеют промежуточный фенотип.*

Ключевые слова: горох посевной, детерминантный тип роста, *determinate habit*, гибридологический анализ.

Процесс доместикации диких видов растений шел путем закрепления в их геномной мутаций, менявших особенности развития и метаболизма в выгодную человеку сторону. В селекции гороха посевного (*Pisum sativum* L.) большое значение имеют мутации, которые повышают продуктивность и технологичность создаваемых сортов, их устойчивость к патогенам. Дикие формы гороха представляют собой растения с длинным, слабым и полегающим стеблем, а также растянутым во времени процессом цветения и плодоношения. Большое значение для селекции гороха и многих других культур имело создание сортов с так называемым детерминантным типом роста (ДТР), у которых цветение и созревание плодов происходит за короткое время [1].

У гороха описаны два гена, мутации которых приводят к ДТР. Один из них носит название *DETERMINATE (DET)*. Мутанты *det* имеют небольшое число (2-5 в зависимости от генотипа) пазушных кистей, и их апикальная меристема полностью превращается в верхушечное соцветие [2]. Этот тип ДТР («московский тип» по терминологии [1]) характерен, например, для овощных сортов Крейсер и Первенец селекции ВНИИССОК (Московская область).

Другой вариант ДТР («самарский тип») связан с мутацией *determinate habit (deh)* [1]. У мутантов *deh* происходит преждевременное отмирание апекса, сопровождающееся недоразвитием листьев и/или прилистников в верхней части побега. По мнению И.В. Кондыкова с соавторами [1: 34], редукция апекса «определяется недостатком пластических веществ, вызванным уменьшением площади фотоассимилирующей поверхности в этой зоне растения». В процитированной работе также отмечено, что в определенных условиях подавление развития прилистников не происходит или после закладки нескольких узлов с редуцированными листьями продолжается рост (израстание) без отклонений от нормы.

Противоречивые данные получены в отношении генетического контроля такого типа ДТР. Так, в работе [3] описаны отклонения от расщепления 3:1 (в сторону как дефицита форм *deh*, так и их избытка) в F₂ от скрещивания детерминантных форм с нормальными. Также отмечено появление фенотипического класса растений с ДТР (9,6-36,8 %) уже в F₁. Первое обстоятельство может быть связано с климатическими условиями региона, в котором проводили исследования, а последнее – с неоднородностью использованного материала [А.Н. Зеленов, личное сообщение]. Таким образом, особенности проявления и наследования мутации *deh* требуют дополнительного изучения.

Материал и методика

Сорта, линии и гибриды F₁ и F₂ из коллекции кафедры генетики Биологического факультета МГУ высевали на экспериментальном участке на территории Звенигородской биостанции им. С.Н. Скадовского, там же проводили скрещивания и описание фенотипов. Часть наблюдений выполнена в теплице-боксе Биологического факультета МГУ. Для измерения площади прилистников их отделяли от растений, гербаризировали, сканировали, а затем измеряли площадь на контрастированных изображениях с использованием программы ImageScope M (FEI Electron Optics B.V.). Коэффициент асимметрии прилистников определяли как модуль разности площадей правого и левого прилистника, деленный на сумму этих площадей. Для изучения строения клеток эпидермиса листа наносили на поверхность листа прозрачный лак для ногтей; образовавшуюся пленку аккуратно переносили на сухое предметное стекло и анализировали с использованием светового микроскопа Laboval 4 (Carl Zeiss). Статистическую обработку проводили с использованием программного пакета Statistica 8 (StatSoft).

Для подтверждения генотипа гибридов F₁ использовали ДНК-маркеры на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР). ДНК выделяли из растений F₁ по ранее описанной методике [4]. Определяли генотип каждого растения по двум ядерным маркерам – фрагментам генов эндо-1,4-β-глюканазы *Egl1* (полиморфизм выявляли с использованием эндонуклеазы *RsaI*) и супероксиддисмутазы *Sodmt* (эндонуклеаза *Ksp22I*). Последовательности праймеров и все параметры ПЦР и рестрикции приведены в работе [4].

Разделение продуктов рестрикции во всех случаях проводили путем электрофореза в 2 %-ном агарозном геле (агароза производства Amresco), окрашенном бромистым этидием.

Результаты и обсуждение

Особенности фенотипа мутантов *deh*

При анализе фенотипа мутантов *deh* (сорта Флагман, Батрак, Немчиновский 50, мутант «Рас-тип») по сравнению с нормальными растениями удалось установить, что для них действительно характерна сильная редукция прилистников (рис. 1). Примерно с середины побега площадь прилистников уменьшена; прилистники выглядят недоразвитыми, с полупрозрачной пластинкой, рано засыхающей по краям. Редукция носит прогрессирующий характер (рис. 2). В условиях теплицы возможно неполное проявление этого признака: часть прилистников (зачастую один из двух в узле) остаются нередуцированными. В ряде случаев после нескольких узлов с аномальными прилистниками рост продолжается с формированием узлов, несущих неизменные листья.

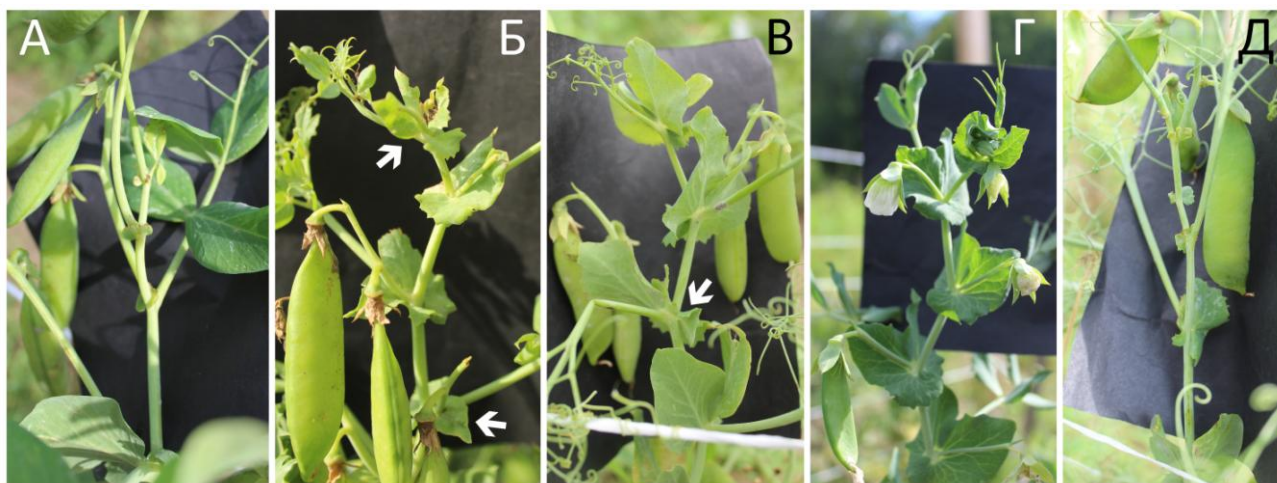


Рис. 1. Фенотипы линий с ДТР и с нормальным ростом. А – Флагман (*deh*); Б – «Рас-тип» (*deh*); В – гибрид F_1 от скрещивания «Рас-тип» × Аз-23, имеющий асимметричные прилистники (стрелка); Г – Аз-23 (DEH); Д – Немчиновский 50 (*deh*). Редуцированные прилистники указаны стрелками

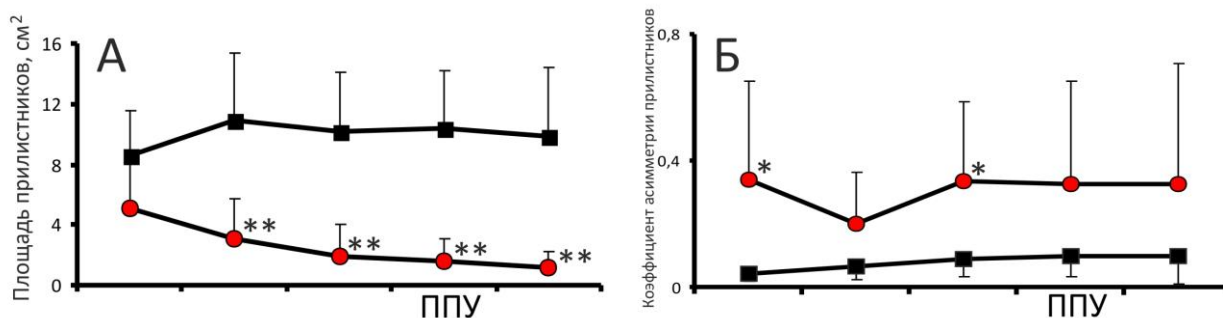


Рис. 2. Динамика площади (А) и коэффициента асимметрии (Б) прилистников у сорта Флагман («самарский тип» ДТР, показан красным) и линии ДТР («московский тип» ДТР, показан черным), $n = 9$. Приведены среднее значение, стандартное отклонение и оценки достоверности (критерий Манна-Уитни; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$). ППУ – первый продуктивный узел

Была изучена структура клеток эпидермиса прилистников мутанта *deh* (сорт Флагман, проанализированы прилистники нормального размера и с признаками редукции) и растений дикого типа (линия ДТР) (табл. 1). Эпидермальные клетки нормальных растений имеют изменчивую форму с волнообразными стенками (рис. 3А). У растений сорта Флагман на нередуцированных прилистниках клетки в целом нормальны, их размеры достоверно не отличаются от контроля (рис. 3Г). На прилистниках верхних узлов картина иная: клетки мелкие, стенки практически без искривлений (рис. 3Б). В целом эпидермис редуцированных прилистников выглядит недоразвитым. Для сравнения проанализировали особенности эпидермиса прилистников у носителей мутации *st* (сорт Filby), которые также характеризуются редуцированными прилистниками. Эпидермальные клетки на обеих сторонах прилистников крупные, с сильно извитыми стенками (рис. 3В). Очевидно, у мутантов *st* уменьшение размеров прилистников связано с уменьшением числа клеток, а не их размеров и степени дифференцированности.

Таблица 1

Размеры клеток эпидермиса прилистников у линий гороха с нормальными и редуцированными прилистниками (здесь и далее приведены среднее значение \pm стандартное отклонение) В – верхняя поверхность, Н – нижняя поверхность, * - достоверные отличия от контроля (критерий Манна-Уитни, $p < 0,01$)

Линия (генотип)	Площадь поверхности, мм ²	
	В	Н
ДТР (<i>det DEH ST</i>), контроль	0,001636 \pm 0,000415	0,002203 \pm 0,000534
Флагман (<i>DET deh ST</i>), нередуцированные прилистники	0,001597 \pm 0,000402	0,002152 \pm 0,000576
Флагман, редуцированные прилистники	0,000326 \pm 0,000093*	0,000179 \pm 0,000051
Filby (<i>DET DEH st</i>)	0,003265 \pm 0,000712*	0,003114 \pm 0,000504*

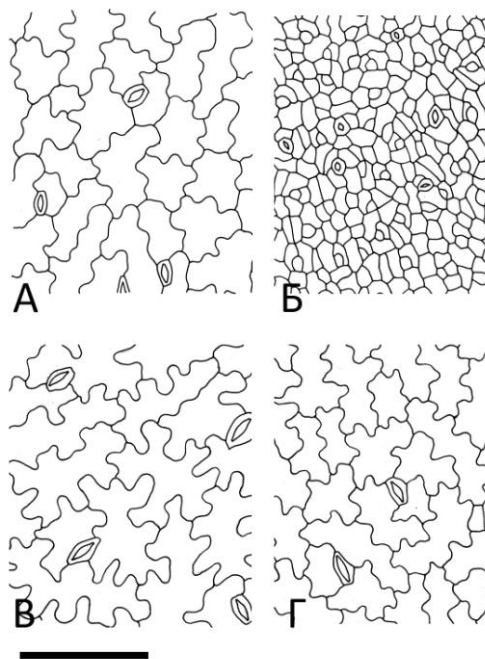


Рис. 3. Строение эпидермиса (прорисовка) на верхней поверхности прилистников у различных линий: А – ДТР (DEH ST); Б – Флагман (*deh ST*, редуцированный прилистник); В – Filby (DEH st); Г – Флагман (нередуцированный прилистник). Масштабный отрезок – 0,1 мм

Репродуктивная зона мутантов *deh* значительно сокращена (табл. 2). В разные сезоны сорт Флагман (*deh*) имел разное количество развитых пазушных цветоносов. Эти данные хорошо согласуются с уже имеющимися в литературе описаниями, согласно которым фенотип гомозигот по мутации *deh* изменчив и зависит от освещенности и влажности [1]. Основным признаком, на который мы в дальнейшем ориентировались при описании гибридов F₁ и F₂, – выраженное угнетение прилистников в верхней части побега.

Нам не удалось обнаружить достоверной связи между суммарной площадью прилистников в репродуктивной зоне и числом продуктивных узлов у сорта Флагман (коэффициент корреляции Спирмена $\rho = 0,154$; $p = 0,555$). По нашему мнению, изменение формы прилистников и уменьшение числа продуктивных узлов у мутантов *deh* представляют собой не причину и следствие, а элементы плейотропного проявления одной мутации. Мутанты *st*, также имеющие редуцированные прилистники (но во всех узлах), по числу узлов превосходят формы с генотипом *deh* (табл. 2). Листовые пластинки мутантов *deh* обычно развиты нормально, внося свой вклад в ассимиляцию.

Таблица 2

Число репродуктивных узлов у различных сортов и линий (среднее значение ± стандартное отклонение, в скобках приведен коэффициент вариации)

Линия (год)		Число репродуктивных узлов
<i>deh</i>	Флагман (2007)	3,66 ± 0,91 (24,86 %)
	Флагман (2009)	3,11 ± 0,78 (25,08 %)
	Флагман (2015)	2,71 ± 0,86 (31,73 %)
	Флагман (2016)	3,71 ± 1,45 (39,08 %)
	Батрак (2015)	4,10 ± 0,91 (22,20 %)
	Батрак (2016)	3,92 ± 0,76 (19,39 %)
	«Рас-тип» (2015)	5,00 ± 1,72 (34,40 %)
	«Рас-тип» (2016)	5,17 ± 1,09 (21,08 %)
	Немчиновский 50 (2016)	2,57 ± 1,09 (42,41 %)
<i>DEH</i>	Аз-23 (2015)	9,58 ± 1,64 (17,12 %)
	Аз-23 (2016)	7,84 ± 2,43 (30,99 %)
	Filby (2009)	8,00 ± 1,00 (12,50 %)
	Filby (2015)	6,19 ± 1,33 (21,49 %)
	Filby (2016)	3,84 ± 1,07 (27,86 %)

Гибридологический анализ наследования мутации *deh*

В большинстве выборок F₂, полученных от скрещиваний *deh* × *DEH*, наблюдали значимые отклонения от ожидаемого расщепления 3:1 (табл. 3). Во всех случаях отклонений отмечали избыток форм с ДТР, в одной из комбинаций (Filby × Флагман, 2009 г.) нормальные формы составили меньшую часть потомства. На расщепление, по-видимому, оказывают влияние условия выращивания (одни и те же комбинации в разные годы дают различные соотношения в F₂), генотип родителя без ДТР (разные комбинации в один и тот же сезон отличаются по соотношениям фенотипов), а также неполная пенетрантность и варьирующая экспрессивность признака, отмеченные предыдущими исследователями [1, 3] (также см. ниже).

Таблица 3

Наблюдаемые расщепления по признаку типа роста в F₂ от скрещиваний между формами с ДТР (Флагман и «Рас-тип») и без него

Значения χ^2 , превышающие критические ($p < 0,05$), выделены.

Кроме отмеченных*, гибриды F₂ получены самоопылением объединенной выборки гибридов F₁ от прямого и обратного скрещивания

Популяция F ₂ (год)	Без ДТР	ДТР	$\chi^2_{3:1}$
«Штамбовый» × Флагман (2005)	29	18	4,433
Rosakrone × Флагман (2005)	60	33	5,452
«Люпиноид» × Флагман (2006)	93	67	24,300
Filby × Флагман (2007)	92	23	1,533
Filby × Флагман (2009)	18	53	93,338
Флагман × ДТР (2009)*	65	67	46,707
ДТР × Флагман (2009)*	61	43	14,821
«Рас-тип» × Узкобобовый (2012)	119	42	0,101
Filby × Флагман (2013)	122	60	6,161
Filby × Флагман (2015)	36	35	22,352
«Рас-тип» × Аз-23 (2015)	117	30	1,653
«Рас-тип» × «Ваху-1» (2016)	115	38	0,002
Filby × Флагман (2016)	65	33	3,932

Характер проявления мутации *deh* у гетерозигот

Для определения того, является мутация *deh* доминантной или рецессивной, описывали популяции F₁ от прямых и обратных скрещиваний Флагман (*deh*) × Filby (*DEH*) и «Рас-тип» (*deh*) × Аз-23 (*DEH*). Чтобы исключить возможность примеси сорта Флагман к гибридам F₁ Флагман × Filby, были использованы ДНК-маркеры на основе ПЦР (рис. 4). Среди проанализированных растений действительно были найдены образцы, соответствующие сорту Флагман, которые были исключены из дальнейшего анализа. В отношении гибридов F₁ «Рас-тип» × Аз-23 подобную проверку не проводили, т.к. листовой фенотип гибридов (усатый лист *af UNI TAC-A*) однозначно позволяет их отличить и от линии «Рас-тип» с рассеченнолисточковым листом (*af UNI tac^A*), и от линии Аз-23 с листовым морфотипом хамелеон (*af uni^{tac} TAC-A*).

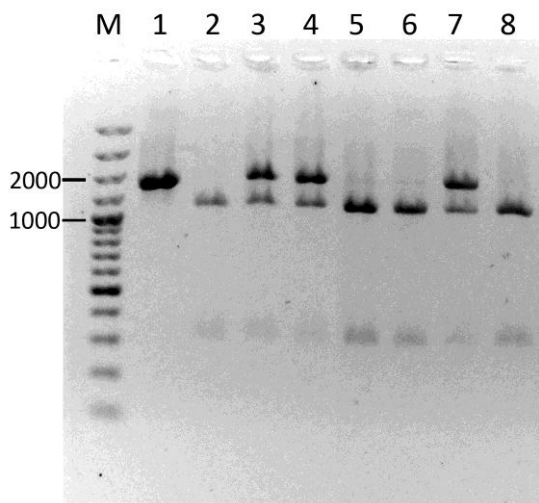


Рис. 4. Установление гибридной природы растений F₁ от скрещивания Флагман × Filby при помощи ДНК-маркера *Sodmt*, обработанного эндонуклеазой *Ksp22I*. Электрофорез в 2 % агарозном геле. М – маркер молекулярной массы (слева приведены размеры фрагментов), 1 – Filby, 2 – Флагман, 3-8 – гибридные растения. Образцы 3, 4 и 7 – гетерозиготы (в спектре присутствуют ДНК-фрагменты обоих родителей); образцы 5, 6 и 8 – результат самоопыления сорта Флагман

Гибриды F₁ от прямого и обратного скрещиваний достоверно не различались по числу продуктивных узлов (рис. 5В-Г). В трех случаях гетерозиготы имели фенотип, промежуточный между родителями; исключение составляет популяция F₁ Флагман × Filby (2015 г., рис. 5 Б). Эти данные свидетельствуют о полудоминантном характере наследования мутации *deh*. Также во всех комбинациях у части (6,3-30,8 %) гибридов F₁ наблюдали редуцированные или асимметричные прилистники (рис. 1В), что согласуется с результатами работы [3] и отчасти объясняет отклонения в расщеплениях, противоречащие гипотезе о рецессивном наследовании мутации *deh* (табл. 3).

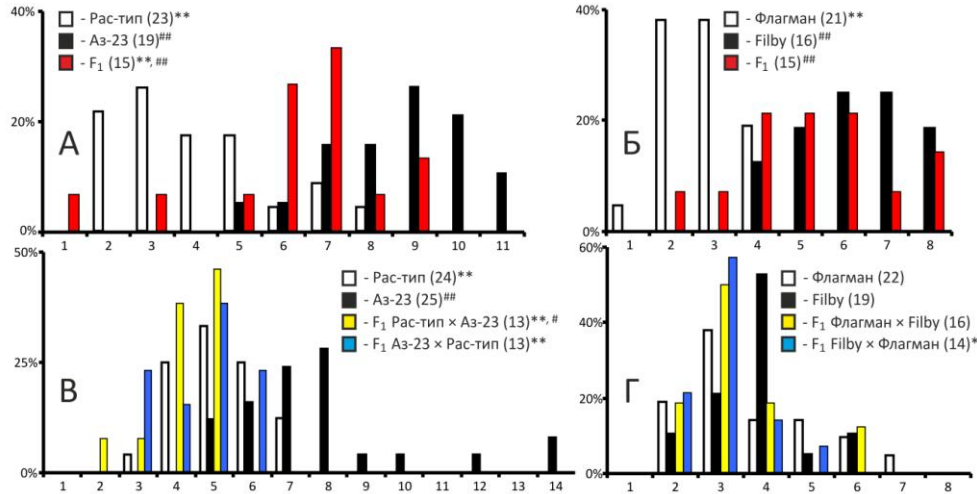


Рис. 5. Распределение гетерозигот DEH *deh* по числу продуктивных узлов (ось абсцисс) по сравнению с родительскими формами (ось ординат – частота фенотипического класса). В скобках указано число растений, приведены оценки достоверности (критерий Манна-Уитни) отличий от родителя без ДТР (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$) и от родителя с ДТР (#, $p < 0,05$; ##, $p < 0,01$). А, Б – данные 2015 г., В, Г – данные 2016 г.

Сходство мутантов *deh* с дикорастущими родичами гороха

Интересно отметить, что подобный мутантам *deh* фенотип – малое число продуктивных узлов и уменьшение площади прилистников – в норме встречается у некоторых представителей рода чина (*Lathyrus*). Таковы виды, ранее относимые к роду сочевичник (*Orobus*): *L. vernus* (L.) Bernh., *L. aureus* (Steven) Bornm., *L. niger* (L.) Bernh. и др. Наши наблюдения за чиной весенней (*L. vernus*) – обычным видом средней полосы России, произрастающим и на территории Звенигородской биостанции МГУ, – показали, что у этого многолетника обычно уже третий надземный узел является продуктивным. Общее число продуктивных узлов невелико (3-6), и налицо уменьшение площади прилистников (рис. 6). Структура гена *DEH* неизвестна, и о его непосредственной роли в эволюции жизненной формы Бобовых говорить преждевременно. Тем не менее, подобное строение соцветия, аномальное для гороха, у некоторых родственных ему видов может быть адаптивно ценным.



Рис. 6. Динамика площади прилистников у *Lathyrus vernus* (крайний лист слева соответствует первому продуктивному узлу). Масштабный отрезок – 2 см

Заключение

По итогам проделанной работы можно сделать следующие выводы:

1. Мутация *deh* имеет полудоминантный характер наследования, характеризуется неполной пенетрантностью и варьирующей экспрессивностью.
2. Сокращение числа продуктивных узлов у мутантов *deh* не связано с уменьшением площади прилистников: эти особенности составляют плейотропное проявление мутации.
3. Коэффициент вариации числа продуктивных узлов у мутантов *deh* в большинстве случаев превышает 20 %. Можно ожидать, что селекционная работа с признаком ДТР «самарского типа» будет затруднена, а преимущества использования такого типа роста доступны лишь в узком диапазоне условий.

Авторы благодарят за помощь всех студентов, работавших с мутантами deh во время летних практик. Работа частично поддержана РФФИ (грант № 15-04-06374).

Литература

1. Кондыков И.В., Зотиков В.И., Зеленов А.Н., Кондыкова Н.Н., Уваров В.Н. Биология и селекция детерминантных форм гороха. Орел: Картуш, 2006. – 120 с.
2. Makasheva R.K., Drozd A.M. Determinate growth habit (*det*) in peas: isolation, symbolization and linkage // Pisum Newslett. – 1987. – V. 19. – P. 31-32.
3. Бабайцева Т.А. Создание исходного материала для селекции технологичных сортов гороха в условиях Волго-Вятской зоны России: автореф. ... канд. с.-х. наук. Киров, 1996. – 20 с.
4. Konovalov F., Toshchakova E., Gostimsky S.A. CAPS marker ser for mapping in linkage group III of pea (*Pisum sativum* L.) // Cell. Mol. Biol. Lett. – 2005. – V. 10. – P. 163-171.

MUTATION *determinate habit* HAS A SEMIDOMINANT MODE OF INHERITANCE IN PEA

A. A. Sinjushin, E. A. Volovikov, O. A. Ash, G. A. Khartina

GENETICS DEPT., BIOLOGICAL FACULTY, M.V. LOMONOSOV MOSCOW STATE

Abstract: Detailed phenotypic analysis of pea accession marked with mutation *determinate habit* (*deh*) was carried out in comparison with *indeterminate forms*. Mode of inheritance of mutation *deh* was studied. Mutation appeared *semidominant*, as first filial progeny from crosses *deh* × *DEH* had an *intermediate phenotype*.

Keywords: garden pea, *determinate growth*, *determinate habit*, hybridological analysis.

УДК 633.358:582.739:581.8

НОВЫЙ СОРТ ГОРОХА КАБАН: МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА, ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ ПЕРИКАРПИЯ

Е. А. ФАДЕЕВ, кандидат сельскохозяйственных наук

А. Н. ФАДЕЕВА, кандидат биологических наук

Д. А. КАПРАН*, студентка

К. Д. ШУРХАЕВА, кандидат сельскохозяйственных наук

Т. Н. АБРОСИМОВА, научный сотрудник

ФГБНУ «ТАТАРСКИЙ НИИСХ»

* ФГБОУ ВПО «САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Новый сорт гороха Кабан, включенный в Госреестр селекционных достижений РФ, допущенных для возделывания, от других зерновых сортов отличается строением перикарпия. Анатомическими исследованиями установлено отсутствие пергаментного слоя