

## АНАЛИЗ ИНТРОГРЕССИВНЫХ ЛИНИЙ МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДОВ ГОРОХА ПО КОМПОНЕНТНОМУ СОСТАВУ БЕЛКОВ СЕМЯН

© С.В. Бобков<sup>1</sup>, И.А. Бычков<sup>1</sup>, Т.Н. Селихова<sup>1</sup>, Е.В. Семенова<sup>2</sup>, М.А. Вишнякова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Федеральный научный центр зернобобовых и крупяных культур», Орел;

<sup>2</sup>ФГБНУ «ФИЦ Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова», Санкт-Петербург

Для цитирования: Бобков С.В., Бычков И.А., Селихова Т.Н., и т. д. Анализ интрогрессивных линий межвидовых гибридов гороха по компонентному составу белков семян // Экологическая генетика. – 2020. – Т. 18. – № 1. – С. 79–88. <https://doi.org/10.17816/ecogen16099>.

Поступила: 17.09.2019

Одобрена: 21.02.2020

Принята: 19.03.2020

У гороха передача ценных аллелей дикого вида в гибриды и их использование в селекции затруднительны вследствие низкой скрещиваемости видов. В случаях получения гибридов остается открытым вопрос о степени интрогрессии чужеродного материала. В статье приводятся результаты оценки результативности осуществленных авторами скрещиваний культурного гороха (*Pisum sativum*) с диким видом *P. fulvum* на основе анализа компонентного состава белков семян родителей и гибридных линий BC<sub>2</sub>F<sub>5</sub>, полученных путем двух возвратных скрещиваний. Анализ эффективности интрогрессии генетического материала родителей по каждой полиморфной позиции электрофоретического спектра показал, что соотношение фактических частот компонентов культурного и дикого видов у гибридов соответствовало ожидаемому уровню в 73 % позиций спектра. Эффективность интрогрессии генов, отвечающих за отдельные белковые компоненты, характерные для дикого вида, у межвидовых гибридов гороха при отсутствии отбора существенно превышала ожидаемый уровень.

**Ключевые слова:** горох; *Pisum sativum*; *P. fulvum*; межвидовой гибрид; SDS-PAGE; интрогрессия; белок; белковый компонент; изоформа.

## ANALYSIS OF INTROGRESSIVE LINES OF INTER-SPECIES PEA HYBRIDS BY BAND COMPOSITION OF SEED PROTEINS

© S.V. Bobkov<sup>1</sup>, I.A. Bychkov<sup>1</sup>, T.N. Selikhova<sup>1</sup>, E.V. Semenova<sup>2</sup>, M.A. Vishnyakova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Federal Scientific Center of Legumes and Groats Crops, Orel, Russia;

<sup>2</sup>Federal Research Center “N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources”, St. Petersburg, Russia

Cite this article as: Bobkov SV, Bychkov IA, Selikhova TN, et al.

Analysis of introgressive lines of inter-species pea hybrids by band composition of seed proteins.

*Ecological genetics*. 2020;18(1):79-88. <https://doi.org/10.17816/ecogen16099>.

Received: 17.09.2019

Revised: 21.02.2020

Accepted: 19.03.2020

**Background.** The reproductive incompatibility of cultivated (*Pisum sativum*) and wild (*P. fulvum*) pea species determines the difficulties of obtaining hybrids as well as the transfer of valuable wild parent alleles into interspecific hybrids and their use in the breeding process. The aim of the research was a comparative study of protein spectra of pea interspecific hybrids BC<sub>2</sub>F<sub>5</sub> *P. sativum* × *P. fulvum* obtained by the authors and their parents.

**Materials and methods.** The band composition of seed proteins in the interspecific hybrids of peas BC<sub>2</sub>F<sub>5</sub>, variety Stabil (*P. sativum*) × accession from VIR collection I-609881 (*P. fulvum*) has been studied. Effectiveness of parent gene transfer determining each polymorphic position of electrophoretic spectrum were evaluated. **Results.** The ratio of the actual frequencies of the bands of the cultivated and wild parents in the introgression lines corresponded to the expected level in 73% positions of the electrophoretic spectrum. The introgression rate of individual seed protein bands from wild parent into interspecific pea hybrids in the absence of selection significantly exceeded the expected level, which may indicate the adaptive value of alleles encoding unique seed protein isoforms. **Conclusion.** The possibility of introgressive transfer of wild-type alleles to the cultivated genotypes of pea, as well as the presence of identified cultivated isoforms of storage proteins in all studied lines of BC<sub>2</sub>F<sub>5</sub> interspecific hybrids in 88.2% of the polymorphic positions of the electrophoretic spectrum, indicates the possibility of using the wild species *P. fulvum* in pea breeding.

**Keywords:** peas; *Pisum sativum*; *P. fulvum*; interspecific hybrid; SDS-PAGE; introgression; protein; protein band; isophorm.

## ВВЕДЕНИЕ

Появление новых концепций селекции «неодоместикации» и «обратной селекции», пытающихся использовать желательные признаки диких видов для интрогрессии в культивируемые — свидетельство не угасающего и, напротив, возрастающего интереса к диким родичам культурных растений [1, 2]. Приводятся и новые доказательства важности использования представителей диких таксонов гороха в качестве источников генетического разнообразия, не вовлеченного ранее в культурную эволюцию гороха (*Pisum sativum* L.) [3, 4]. Молекулярно-генетические исследования мировых коллекций гороха способствовали усилению интереса к дикому виду — красно-желтому гороху (*P. fulvum* Sibth. et Smith.) как источнику генов устойчивости к абиотическим стрессорам (засуха, экстремальные температуры), болезням и вредителям [5–7]. Установлено, что корни растений *P. fulvum* проникают в почву с высокой скоростью на большую глубину, что является важным признаком для селекции на устойчивость к засухе [8]. Отдельные образцы *P. fulvum* обладают генами устойчивости к аскохитозу [9, 10], мучнистой росе [11], ржавчине [12], заразихе [13] и гороховой зерновке [14]. В настоящее время идентифицированы специфичные для *P. fulvum* гены устойчивости к гороховой зерновке [6] и мучнистой росе [11, 15], а также QTL (Quantitative trait locus — локус количественных признаков), ассоциированный с устойчивостью красно-желтого гороха к ржавчине [12].

К настоящему времени межвидовая гибридизация культурного гороха с диким видом *P. fulvum* привела к созданию линий гороха с повышенной (но не полной, как у родительского образца *P. fulvum*) устойчивостью к гороховой зерновке [16] и мучнистой росе [11].

Однако различный размер геномов (у *P. fulvum* он составляет 108,9 % по отношению к *P. sativum*) [17], различия кариотипов видов, влекущие нарушения мейоза [18], ядерно-цитоплазматическая несовместимость [19] затрудняют передачу ценных аллелей дикого родителя в межвидовые гибриды и определяют низкую результативность скрещиваний [20, 21]. В успешных скрещиваниях интрогрессия ценных аллелей связана с проблемой сопутствующего переноса сцепленного

с ними нежелательного генетического материала. Для уменьшения количества вредных аллелей требуется проведение определенного числа возвратных скрещиваний [2]. При этом необходимо сохранить в гибридах пул аллелей, сформированный в ходе культурной эволюции гороха для поддержания высокого качества зерна и высокой урожайности [22].

*Цель наших исследований* — характеристика линий межвидовых гибридов гороха *P. sativum* × *P. fulvum*, полученных в ходе проведения возвратных скрещиваний ( $BC_2F_5$ ) и самоопыления, по компонентному составу белков семян, в том числе запасных белков: конвицилина, вицилина и легумина и сравнение их с белковыми спектрами родителей.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании были использованы 10 линий межвидовых гибридов гороха A1-R, A2-R, A3-R, A4-S, A5-S, A6-S, A7-R, A11-R, A12-R, A13-R поколения  $BC_2F_5$ , полученных в результате скрещивания растений сорта Стабил (*P. sativum*) с образцом и-608881 дикого вида *P. fulvum* из коллекции ВИР [23]. Сорт австрийской селекции Стабил — высокопродуктивный зерновой, среднеспелый, безлисточковый, пластичный, включенный в Государственный реестр селекционных достижений в 2006 г. и допущенный к использованию в трех регионах Российской Федерации [24]. Среди изученных линий семь ранее были оценены как устойчивые к мучнистой росе (обозначены индексом R) и три линии охарактеризованы как восприимчивые (индекс S) [25].

Растения выращивали в нерегулируемых условиях тепличного бокса (при высоких температурах летом и пониженных осенью). В процессе вегетации растений наблюдались значительные перепады температуры днем и ночью, что создавало благоприятные условия для поражения растений мучнистой росой.

Для выделения и разделения белков семян гороха использовали стандартный метод SDS-PAGE электрофореза [26]. Белки экстрагировали из одного семени, полученного с отдельного растения каждой линии межвидовых гибридов. С каждого семени для экстракции белка брали две навески муки по 4 мг. Электрофорез проводили с ис-

пользованием камеры для вертикального электрофореза VE-4 (Хеликон, Россия). Содержание полиакриламида в разделяющем геле составляло 12,5 %, а в концентрирующем — 5 %.

Позиции компонентов белков у гибридных линий гороха определяли по реперным компонентам 10, 50, 90 белков спектра семян сои [26]. Использовали семена сорта сои Ланцетная селекции ФГБНУ «Федеральный научный центр зерновых и крупяных культур» и ФГБОУ ВО «Белгородский государственный аграрный университет» [24]. Интенсивность окрашивания компонентов выражали в баллах и характеризовали как: 1 — слабую, 2 — интенсивную и 3 — очень интенсивную и составляли в тексте в круглых скобках.

Непроцессированный легумин на гелевых пластинах локализовался в компонентах с молекулярной массой 60–65 кДа,  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы легумина располагались в компонентах с массой 35–46 и 21–23 кДа соответственно [27]. Идентификацию непроцессированного вицилина ( $\alpha + \beta + \gamma$ ) проводили по компонентам с молекулярной массой 47–50 кДа,  $\alpha + \beta$  вицилина — 30–36 кДа,  $\beta + \gamma$  вицилина — 25–30 кДа, индивидуальных фракций  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  вицилина — 13–20 кДа. Липоксигеназу и конвицилин определяли по компонентам с молекулярной массой 100 и 70 кДа соответственно [23, 28, 29]. Компоненты идентифицировали с использованием набора маркеров с молекулярной массой 6,5–200 кДа (Sigma-Aldrich, США).

Индекс полиморфизма вычисляли путем деления числа полиморфных белковых компонентов на общее число сравниваемых пар. При оценке полиморфизма учитывали различия по наличию и интенсивности окрашивания компонентов. При сравнении спектров сорта Стабил и образца и-609881 полиморфными считали компоненты, различающиеся либо по наличию (0 или 1, 2, 3), либо по интенсивности (1, 2, 3) окрашивания [30].

Соответствие фактических и ожидаемых частот фенотипических классов оценивали по каждой полиморфной позиции компонентов у 10 интрогрессивных гибридов гороха по критерию  $\chi^2$  с использованием функции ХИ2.ТЕСТ компьютерной программы EXCEL 2010 (Microsoft Corporation). Ожидаемые частоты фенотипических классов рассчитывали исходя из частот аллелей родителей с коррекцией на два возвратных скрещивания.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В электрофоретических спектрах семян линий межвидовых гибридов гороха и их родителей содержалось 70 позиций белковых компонентов. Среди них 40 позиций являлись полиморфными. Индекс полиморфизма составил 0,47. Между сортом Стабил и образцом *P. fulvum* (и-6098881) наблюдались различия как по наличию компонентов белков, так и по их интенсивности (рис. 1). В 30 из 40 полиморфных позиций электрофоретических спектров полиморфизм выражался в наличии и отсутствии компонентов, а в 10 позициях — в различной интенсивности их окрашивания, что служило мерой количества белка в компоненте. По типу полиморфизма компоненты родители распределялись на четыре группы: А, Б, В, Г (см. таблицу). В группе А полиморфизм характеризовался наличием компонентов у дикого родителя и их отсутствием у сорта Стабил. В группе Б полиморфные компоненты родителей различались по интенсивности окрашивания, при этом более интенсивные компоненты принадлежали образцу дикого вида. В группах В и Г полиморфизм характеризовался наличием или более выраженной интенсивностью окрашивания компонентов у культурного родителя сорта Стабил.

Липоксигеназа у сорта Стабил была локализована в компонентах 6, 7 и 8, при этом полиморфным являлся интенсивно (3) окрашенный компонент 6 (см. таблицу, рис. 1). Следует отметить, что образец и-609881 характеризовался наличием интенсивно окрашенного компонента 3 (см. таблицу), предположительно содержащего специфичную изоформу липоксигеназы [30, 31], которая отсутствовала в белковом комплексе сорта Стабил. Исходя из того что интенсивные (3) компоненты 3 и 6 сопряжены между собой (отсутствуют у одного родителя и присутствуют у другого), их можно рассматривать в качестве главных изоформ липоксигеназы у дикого образца и-609881 и сорта Стабил соответственно (рис. 1). Линии межвидовых гибридов гороха, как устойчивые, так и восприимчивые к возбудителю мучнистой росы, характеризовались наличием только одного интенсивного компонента — 6.

Конвицилин у родителей сорта Стабил и образца и-609881 располагался в двух интенсивных (3) компонентах 17 и 20 и трех неинтенсивных (1) —

**Полиморфные компоненты белков семян в спектрах родителей гибридной комбинации Стабил × *P. fulvum* (и-609881) и интрогрессивных линий гороха BC<sub>2</sub>F<sub>5</sub>**

Компо- нент	Роди- тели		Интрогрессивные линии гороха										Число линий с ком- понентами <i>P. fulvum</i> в группах А и Б, и компонентами сорта Стабил в группах В и Г, (фактическое соотно- шение фенотипических классов)	Значимость отличий ( $\chi^2$ , <i>p</i> ) от ожидаемого соотношения 9,84 : 0,16 (62,5 : 1)	
	Стабил	и-609881	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A11	A12	A13			Белок
Устойчивость к мучнистой росе			R	R	R	S	S	S	R	R	R	R			
А. Наличие компонентов только у дикого родителя															
21	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	Cv	1 (9 : 1)	<b>0,034259481</b>
22	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	Lg	3 (7 : 3)	<b>8,21671E-13</b>
30	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Lg	0 (10 : 0)	0,686772471
38	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	0 (10 : 0)	0,686772471
41	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	0 (10 : 0)	0,686772471
54	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Vc $\alpha + \beta$	0 (10 : 0)	0,686772471
62	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	0 (10 : 0)	0,686772471
73	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	0 (10 : 0)	0,686772471
101	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	0 (10 : 0)	0,686772471
Б. Больше количество белка в компонентах дикого родителя															
3	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	LOX	0 (10 : 0)	0,686772471
12	1	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	—	2 (8 : 2)	<b>3,53079E-06</b>
20	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Cv	0 (10 : 0)	0,686772471
32	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Lg	0 (10 : 0)	0,686772471
В. Наличие компонентов только у культурного родителя															
4	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	—	10 (10 : 0)	0,686772471
13	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	—	10 (10 : 0)	0,686772471
15	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	—	5 (5 : 5)	<b>3,18641E-34</b>
16	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	—	7 (7 : 3)	<b>8,21671E-13</b>
19	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	Cv	5 (5 : 5)	<b>3,18641E-34</b>
24	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Lg	10 (10 : 0)	0,686772471
27	2	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	Lg	10 (10 : 0)	0,686772471
33	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Lg	0	—
43	2	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	Lg $\alpha$	10 (10 : 0)	0,686772471
45	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	—	8 (8 : 2)	<b>3,53079E-06</b>
51	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Vc $\alpha + \beta$	10 (10 : 0)	0,686772471
56	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	—	10 (10 : 0)	0,686772471
61	2	0	2	2	2	1	1	2	2	2	1	1	—	6 (6 : 4)	<b>3,74934E-22</b>
67	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	—	10 (10 : 0)	0,686772471
71	3	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	Vc $\beta + \gamma$	10 (10 : 0)	0,686772471
74	2	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	Vc $\beta + \gamma$	10 (10 : 0)	0,686772471
76	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	—	9 (9 : 1)	<b>0,034259481</b>
90	2	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	Lg $\beta$	10 (10 : 0)	0,686772471
104	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Vc $\beta$	10 (10 : 0)	0,686772471
105	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Vc $\gamma$	10 (10 : 0)	0,686772471
106	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Vc $\gamma$	10 (10 : 0)	0,686772471

Продолжение табл.

Компонент	Родители		Интрогрессивные линии гороха										Число линий с компонентами <i>P. fulvum</i> в группах А и Б, и компонентами сорта Стабил в группах В и Г, (фактическое соотношение фенотипических классов)	Значимость отличий ( $\chi^2, p$ ) от ожидаемого соотношения 9,84 : 0,16 (62,5 : 1)		
	Стабил	и-609881	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A11	A12	A13			Белок	
Устойчивость к мучнистой росе			R	R	R	S	S	S	R	R	R	R				
Г. Больше количество белка в компонентах культурного родителя																
6	3	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	LOX	10 (10 : 0)	0,686772471
42	3	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	Lg $\alpha$	10 (10 : 0)	0,686772471
50	3	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	Vc $\alpha + \beta$	9 (9 : 1)	<b>0,034259481</b>
55	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	Vc $\alpha + \beta$	10 (10 : 0)	0,686772471
86	3	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	Lg $\beta$	10 (10 : 0)	0,686772471
98	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	Vc $\alpha$	10 (10 : 0)	0,686772471

Примечание. Полужирным выделены компоненты с существенными отличиями от ожидаемой частоты, индексами R и S обозначены устойчивые и неустойчивые к мучнистой росе интрогрессивные линии гороха. Обозначения белков: Cv — конвицилин, Lg — легумин, Vc — вицилин, LOX — липоксигеназа.

18, 19, 21 (рис. 1). Компоненты 19, 20, 21 были полиморфными (см. таблицу). Интенсивный компонент 17 присутствовал у обоих родителей. Другой интенсивный компонент 20 был характерен только для спектра образца и-609881. Из интенсивных компонентов линии гороха содержали только 17-й, а компонент 20 образца и-609881 был потерян в результате возвратных скрещиваний и самоопыления. Число линий с неинтенсивными компонентами 19 и 21 сорта Стабил составляло 50–92 %.

Для определения локализации запасного белка легумина проводили дополнительное исследование — электрофорез белков семян сорта Стабил в присутствии и отсутствии  $\beta$ -меркаптоэтанола. При отсутствии  $\beta$ -меркаптоэтанола происходило накопление непроцессированного легумина в компонентах с молекулярной массой 60–65 кДа. Его присутствие в буфере для нанесения белка приводило к восстановлению дисульфидных связей, и молекула легумина расщеплялась на две

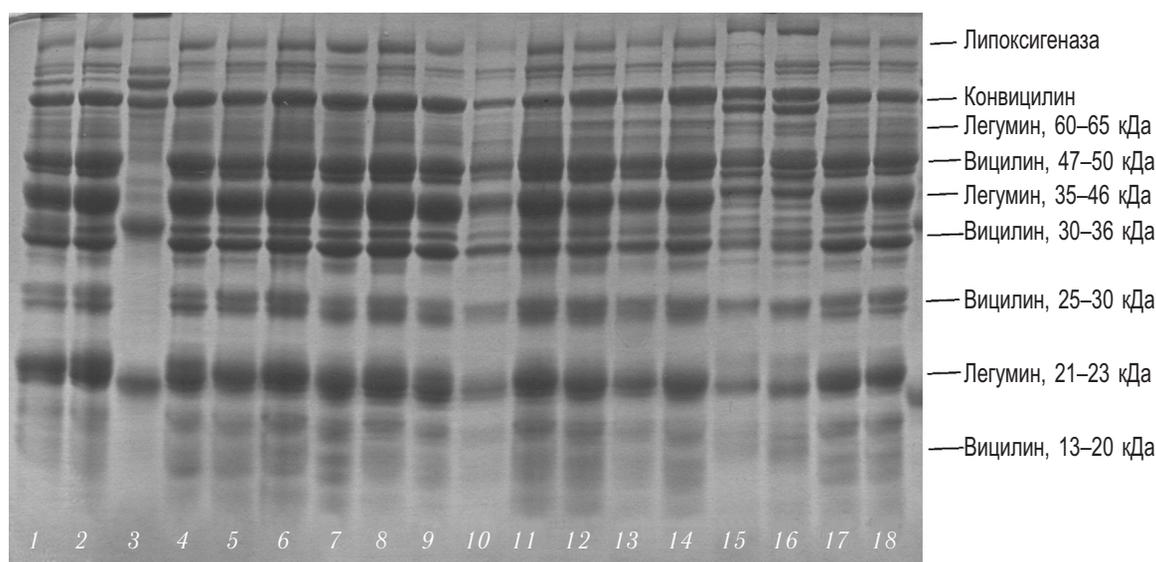
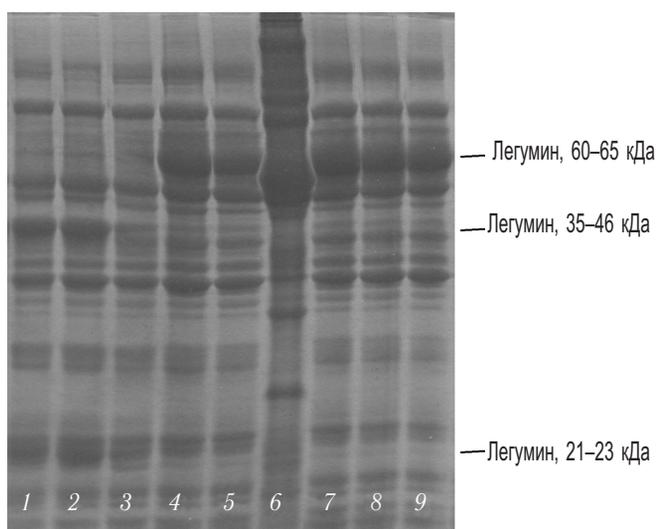


Рис. 1. Электрофоретические спектры белков семян родителей гибридной комбинации сорта Стабил × и-609881 (*P. fulvum*) и семян интрогрессивных линий гороха. Интрогрессивные линии: 1 — A1; 2 — A2; 4 — A3; 5 — A4; 6 — A5; 7 — A6; 8 — A7; 9 — A8; 10 — A9; 11 — A10; 12 — A11; 13 — A12; 14 — A13. Родители: 15, 16 — и-609881 (*P. fulvum*); 17, 18 — сорт Стабил. Белки семян сои сорта Ланцетная локализованы в 3-м спектре



**Рис. 2.** Электрофоретические спектры белков семян сорта Стабил: 1–3 — спектры, полученные в присутствии меркаптоэтанола, 4–9 — спектры без меркаптоэтанола, 6 — спектр сои. В отсутствие меркаптоэтанола легумин локализуется преимущественно в области 60–65 кДа. В присутствии меркаптоэтанола молекула легумина диссоциирует на 2 субъединицы с молекулярными массами 35–46 и 21–23 кДа

субъединицы  $\alpha$  и  $\beta$  с молекулярными массами 35–46 и 21–23 кДа соответственно (рис. 2).

В области непротерсированного легумина после применения  $\beta$ -меркаптоэтанола оставались 12 компонентов с низкой интенсивностью окрашивания (1), которые занимали обширную часть электрофоретического спектра. Не исключено, что содержащиеся в этих компонентах белки не являлись легумином (см. таблицу, рис. 1, 2). Из 12 компонентов области нередуцированного легумина только 7 были полиморфными. Кислая ( $\alpha$ ) субъединица легумина (35–46 кДа) была представлена тремя белковыми компонентами 42, 43 и 44 (рис. 1). Компоненты 42 и 43 с интенсивной окраской (2, 3) были полиморфными (см. таблицу). В целом компоненты образца дикого вида характеризовались меньшей интенсивностью окрашивания, что указывало на меньшее количество легумина в семенах дикого гороха. Линии межвидовых гибридов гороха унаследовали компонентный состав кислой ( $\alpha$ ) субъединицы легумина сорта гороха Стабил. Основная ( $\beta$ ) субъединица легумина также была локализована в 3 компонентах электрофоретического спектра 86, 88 и 90. Компоненты 86 и 90 являлись полиморфными. Более интенсивные компоненты присутствовали в спектре сорта Стабил. Все линии гороха, как

и в случае с кислой субъединицей легумина, содержали компоненты сорта Стабил, представляющих  $\beta$ -субъединицу легумина.

Непротерсированный вицилин (47–50 кДа) располагался в двух смежных компонентах 34 и 37 (рис. 1). При этом сорт Стабил и образец и-609881 не отличались между собой как по наличию, так и по интенсивности окрашивания компонентов непротерсированного вицилина. Интрогрессивные линии сохранили указанные компоненты. Протерсированный вицилин  $\alpha + \beta$  (30–36 кДа) локализовался в четырех компонентах — 50, 51, 54, 55. Основные изоформы вицилина  $\alpha + \beta$  были представлены в двух интенсивно (3) окрашенных компонентах — 50 и 55 (рис. 1). Изоформы протерсированного вицилина  $\beta + \gamma$  (25–30 кДа) были локализованы в четырех компонентах: 70, 71, 73, 74, при этом три компонента (70, 71, 73) у сорта Стабил были интенсивно окрашенными. Компоненты 71, 73, 74 были полиморфными. У интрогрессивных линий гороха все компоненты протерсированного вицилина  $\alpha + \beta$  и  $\beta + \gamma$ , а также  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  представляли изоформы сорта Стабил (см. таблицу).

Доля генома дикого вида у линий гороха  $BC_2F_5$  составляла 12,5 %. Проведение двух возвратных скрещиваний межвидовых гибридов с растениями сорта Стабил и самоопыления в течение пяти поколений теоретически обеспечивает 99,2 % уровень гомозиготности. Ожидаемые частоты аллелей образца дикого вида и сорта Стабил, кодирующих изоформы белков в полиморфных позициях электрофоретических спектров, равнялись 0,125 и 0,875, а ожидаемые частоты фенотипических классов — 0,016 и 0,984 соответственно.

У линий межвидовых гибридов оценку наличия компонентов с белками дикого вида гороха проводили только в группах А и Б. В группе В оценивали только наличие белков культурного гороха вследствие отсутствия компонентов дикого вида в полиморфных позициях родительских спектров. В группе Г не исключена скрытая интрогрессия генетического материала дикого вида, однако в целом здесь также оценивали наличие белков культурного родителя.

Оценка эффективности передачи генов родителей по каждой полиморфной позиции электрофоретического спектра показала, что соотноше-

ние фактических частот компонентов культурного и дикого родителей у интрогрессивных линий межвидовых гибридов гороха соответствовало ожидаемому уровню в 73 % позиций электрофоретического спектра (см. таблицу).

В группах А и Б только 3 из 13 (23 %) компонентов образца дикого вида присутствовали хотя бы в одной интрогрессивной линии гороха. В группе А только 2 компонента образца *P. fulvum* из 9 : 21 (конвицилин) и 22 (легумин) остались в интрогрессивных линиях гороха. Скорость интрогрессии указанных компонентов была существенно выше ожидаемой величины ( $p = 0,034259481$  и  $8,21671E-13$  соответственно). В группе Б у интрогрессивных линий гороха из четырех полиморфных компонентов присутствовал только один интенсивный компонент *P. fulvum* 12 с частотой 0,2. Темп интрогрессии гена, определяющего компонент 12, был существенно выше ожидаемой величины ( $p = 3,53079E-06$ ). Десять компонентов дикого родителя отсутствовали во всех изученных линиях гороха. Однако использование критерия  $\chi^2$  подтвердило идентичность ( $p = 0,686772471$ ) ожидаемого и фактического распределения этих компонентов в интрогрессивных линиях гороха.

В группе В компоненты сорта Стабил в 15 позициях из 21 (71,4 %) присутствовали во всех интрогрессивных линиях гороха. При этом фактическая частота компонентов культурного родителя соответствовала ожидаемому уровню ( $p = 0,686772471$ ). Среди компонентов этой группы 52,4 % были представлены запасными белками (см. таблицу). Шесть компонентов сорта Стабил в группе В присутствовали не у всех, а только у 50–90 % линий межвидовых гибридов. Компоненты сорта Стабил 15, 19 (конвицилин) и 61 в интрогрессивных линиях присутствовали с частотами 0,5–0,6, что существенно ниже ожидаемого уровня ( $p = 3,18641E-34$ ,  $3,18641E-34$ ,  $3,74934E-22$  соответственно). Частота компонентов сорта Стабил 16, 45, 76 в линиях составила 0,7–0,9, что также было существенно ниже ожидаемого уровня ( $p = 8,21671E-13$ ,  $3,53079E-06$  и  $0,034259481$  соответственно). В группе Г белковые компоненты сорта Стабил присутствовали во всех линиях гороха, за исключением компонента 50 (вицилин  $\alpha + \beta$ ), который наблюдался в ин-

трогрессивных линиях с частотой 0,8, существенно ниже ожидаемой ( $p = 0,034259481$ ).

Таким образом, по предварительным данным в гибридном материале  $BC_2F_5$  с использованием двух беккроссов, при отсутствии отбора по компонентному составу белков семян в группах А и Б наличие белковых компонентов 12, 21 и 22 существенно превышало ожидаемый уровень. В остальных 10 полиморфных позициях компоненты дикого гороха полностью отсутствовали во всех интрогрессивных линиях гороха, что для гибридов  $BC_2F_5$  соответствовало ожидаемому уровню. В группах В и Г присутствовало 27 полиморфных позиций электрофоретического спектра. В этих группах 17 компонентов с идентифицированными запасными белками вицилином, конвицилином, легумином и липоксигеназой 15 (88,2 %) присутствовали во всех интрогрессивных линиях гороха. Частота остальных компонентов с идентифицированными запасными белками: 19 (конвицилин) и 50 (вицилин  $\alpha + \beta$ ) была существенно ниже ожидаемого уровня. Следует отметить, что изоформа нередуцированного легумина компонента 33, содержащаяся в сорте Стабил, отсутствовала во всех линиях межвидовых гибридов. Четыре неидентифицированных компонента культурного родителя имелись у всех интрогрессивных линий гороха. Частоты неидентифицированных компонентов культурного родителя 15, 16, 45, 61, 76 у интрогрессивных линий оказались ниже ожидаемого уровня. По литературным данным, неидентифицированные компоненты белков семян могут быть ответственными за энергию, метаболизм или устойчивость к стрессам [31].

Высокая степень интрогрессии в отдельных локусах, может служить показателем генетического дрейфа или адаптивной ценности генов, имеющих селективное преимущество, или находящихся в тесной связи с другими генами, подвергающимися положительному отбору [32]. Низкая степень интрогрессии в отдельных локусах указывает на наличие в них аллелей, ответственных за репродуктивную изоляцию вида [33]. В перспективе, для исследования дифференцированной интрогрессии генов белков семян из генома дикого вида *P. fulvum* и поиска аллелей, обладающих адаптивными свойствами, необходимо на первом этапе исключить возвратные скрещивания и в различных генерациях межвидовых гибридов гороха

проводить исследования частот отдельных белков семян для выявления аллелей с высокими адаптивными свойствами. Полученные данные можно использовать для селективного переноса адаптивных аллелей диких родичей в геномы элитных сортов гороха.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При изучении линий межвидовых гибридов гороха ( $BC_2F_5$  *P. sativum* × *P. fulvum*) сделана попытка определения степени интрогрессии генетического материала дикого вида в геном культурного на основе анализа компонентного состава белков их семян в сравнении с родителями, что имеет важное значение для селекции гороха на высокое качество зерна. Оценка эффективности передачи генов родителей по каждой полиморфной позиции электрофоретического спектра показала, что соотношение фактических частот компонентов культурного и дикого родителей у интрогрессивных линий межвидовых гибридов гороха соответствовало ожидаемому уровню в 73 % позициях электрофоретического спектра. Судя по частоте отдельных белковых компонентов дикого родителя, темп интрогрессии у межвидовых гибридов гороха при отсутствии отбора существенно превышал ожидаемый уровень. Есть основания полагать, что быстрый темп интрогрессии присущ аллелям с адаптивной ценностью. Наличие компонентов запасных белков культурного вида у всех линий, полученных в результате двух возвратных скрещиваний, наблюдали в 88,2 % полиморфных позициях спектра. В целом наши опыты подтвердили возможность использования дикого вида *P. fulvum*, обладающего рядом свойств адаптивности, в селекционном процессе гороха с перспективой передать эти свойства культурному виду.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и образования по пункту программы фундаментальных научных исследований государственных академий 0636-2019-0008 «Мобилизация генетических ресурсов зернобобовых и крупяных культур для использования в селекционном процессе» и бюджетного проекта 0662-2019-0002 по научному обеспечению эффективного использования мирового генофонда зернобобовых культур и их диких родичей из коллекции ВИР.

## ЛИТЕРАТУРА

1. McCouch S, Baute GJ, Bradeen J, et al. Agriculture: feeding the future. *Nature*. 2013;499(7456):23-24. <https://doi.org/10.1038/499023a>.
2. Dempewolf H, Baute G, Anderson J, et al. Past and future use of wild relatives in crop breeding. *Crop Science*. 2017;57:1070-1082. <https://doi.org/10.2135/cropsci2016.10.0885>.
3. Smýkal P, Kenicer G, Flavell AJ, et al. Phylogeny, phylogeography and genetic diversity of the *Pisum* genus. *Plant Genetic Resources*. 2011;9(1):4-18. <https://doi.org/10.1017/s147926211000033x>.
4. Костерин О.Э. Перспективы использования диких сороричей в селекции гороха (*Pisum sativum* L.) // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2015. – Т. 19. – № 2. – С. 4–14. [Kosterin OE. Prospects of the use of wild relatives for pea (*Pisum sativum* L.) breeding. *Vavilov journal of genetics and breeding*. 2015;19(2):4-14. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.18699/VJ15.019>.
5. Ochatt SJ, Benabdelmouna A, Marget P, et al. Overcoming hybridization barriers between pea and some of its wild relatives. *Euphytica*. 2004;137(1):353-359. <https://doi.org/10.1023/b:euph.0000040476.57938.81>.
6. Byrne OM, Hardie DC, Khan TN, et al. Genetic analysis of pod and seed resistance to pea weevil in a *Pisum sativum* × *P. fulvum* interspecific cross. *Australian J Agricultural Res*. 2008;59(9):854-862. <https://doi.org/10.1071/ar07353>.
7. Clement SL, McPhee KE, Elberson LR, Evans MA. Pea weevil, *Bruchus pisorum* L. (Coleoptera: Bruchidae), resistance in *Pisum sativum* × *Pisum fulvum* interspecific crosses. *Plant Breeding*. 2009;128(5):478-485. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2008.01603.x>.
8. Ali SM, Sharma B, Ambrose MJ. Current status and future strategy in breeding pea to improve resistance to biotic and abiotic stresses. *Euphytica*. 1994;73(1-2):115-126. <https://doi.org/10.1007/bf00027188>.
9. Fondevilla S, Avila CM, Cubero JI, Rubiales D. Response of *Micosphaerella pinodes* in a germplasm collection of *Pisum* ssp. *Plant Breeding*. 2005;124(3):313-315. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2005.01104.x>.
10. Carrillo E, Rubiales D, Pérez-de-Luque A, Fondevilla S. Characterization of mechanisms of resistance against *Didymella pinodes* in *Pisum* spp.

- Eur J Plant Pathol.* 2013;135(4):761-769. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0116-0>.
11. Fondevilla S, Torres AM, Moreno MT, Rubiales D. Identification of a new gene for resistance to powdery mildew in *Pisum fulvum*, a wild relative of pea. *Breed Sci.* 2007;57(2):181-184. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.57.181>.
  12. Barilli E, Satovic Z, Rubiales D, Torres A. Mapping of quantitative trait loci controlling partial resistance against rust incited by *Uromyces pisi* (Pers.) Wint. in a *Pisum fulvum* L. intraspecific cross. *Euphytica.* 2010;175(2):151-159. <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0141-z>.
  13. Rubiales D, Moreno MT, Sillero JC. Search for resistance to crenata broomrape (*Orobanche crenata* Forsk.) in pea germplasm. *Genet Res Crop Evol.* 2005;52(7):853-861. <https://doi.org/10.1007/s10722-003-6116-3>.
  14. Clement SL, Hardie DC, Elberson R. Variation among accessions of *Pisum fulvum* for resistance to pea weevil. *Crop Science.* 2002;42(6):2167-73. <https://doi.org/10.2135/cropsci2002.2167>.
  15. Fondevilla S, Cubero JI, 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.* 2011;130(2):281-282. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2010.01769.x>.
  16. Aryamanesh N, Byrne O, Hardie DC, et al. Large-scale density-based screening for pea weevil resistance in advanced backcross lines derived from cultivated field pea (*Pisum sativum*) and *Pisum fulvum*. *Crop Pasture Science.* 2012;63(7):612-618. <https://doi.org/10.1071/cp12225>.
  17. Baranyi M, Greilhuber J, Swiecicki WK. Genome size in wild *Pisum* species. *Theor Appl Genet.* 1996;93(5-6):717-721. <https://doi.org/10.1007/bf00224067>.
  18. Errico A, Conicella C, Venora G. Karyotype studies on *Pisum fulvum* and *Pisum sativum* using a chromosome image analysis system. *Genome.* 1991;34(1):105-108. <https://doi.org/10.1139/g91-017>.
  19. Bogdanova VS, Kosterin OE. Hybridization barrier between *Pisum fulvum* Sibth. et Smith and *P. sativum* L. is partly due to nuclear-chloroplast incompatibility. *Pisum Genet.* 2007;39:8-9.
  20. De Martino T, Errico A, Lassandro A, Conicella C. Distorting segregation resulting from pea chromosome reconstruction with alien segments from *Pisum fulvum*. *J Heredity.* 2000;91(4):322-325. <https://doi.org/10.1093/jhered/91.4.322>.
  21. Kosterin OE, Bogdanova VS, Galieva ER. Reciprocal compatibility within the genus *Pisum* L. as studied in F1 hybrids. 2. Crosses involving *P. fulvum* Sibth. et Smith. *Gen Res Crop Evol.* 2019;66(2):383-399. <https://doi.org/10.1007/s10722-018-0714-6>.
  22. Weeden NF. Genetic changes accompanying the domestication of *Pisum sativum*: is there a common genetic basis to the 'Domestication syndrome' for legumes? *Ann Botan.* 2007;100(5):1017-1025. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm122>.
  23. Бобков С.В., Селихова Т.Н. Получение межвидовых гибридов для интрогрессивной селекции гороха // Экологическая генетика. — 2015. — Т. 13. — № 3. — С. 40–49. [Bobkov SV, Selikhova TN. Obtaining interspecific hybrids for introgressive pea breeding. *Russ J Genet Appl Res.* 2017;7:145-152. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.1134/s2079059717020046>.
  24. Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. Т. 1. Сорты растений (официальное издание). — М.: ФГБНУ «Росинформаротех», 2019. — 516 с. [State register for selection achievements admitted for usage (national list). Vol. 1. Plant varieties (official publication). Moscow: Rosinformagrotekh; 2019. 516 p. (In Russ.)]
  25. Бобков С.В., Селихова Т.Н. Интрогрессия доминантного гена устойчивости к мучнистой росе из генома дикого вида гороха *Pisum fulvum* // Зернобобовые и крупяные культуры. — 2018. — № 4. — С. 20–24. [Bobkov SV, Selikhova TN. Introgression of a dominant gene conferring resistance to powdery mildew from genome of pea wild species *Pisum fulvum*. *Zernobobovye i krupyanye kul'tury.* 2018;(4):20-24. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.24411/2309-348X-2018-11044>.
  26. Конарев В.Г. Идентификация сортов и регистрация генофонда культурных растений по белкам семян. — СПб.: ВИР, 2000. — 186 с. [Konarev VG. Identifikatsiya sortov i registratsiya genofonda kul'turnykh rasteniy po belkam semyan. Saint Petersburg: All-Russian Institute of plant genetic resources. N.I. Vavilova; 2000. 186 p. (In Russ.)]
  27. Tzitzikas EN, Vincken JP, Groot J, et al. Genetic variation in pea seed composition. *J Agric Food Chem.* 2006;54(2):425-433. <https://doi.org/10.1021/jf0519008>.
  28. Szimanowska U, Jakubczyk A, Baraniak B, Kur A. Characterization of lipoxigenase from pea seeds (*Pi-*

- sim sativum* var. *Telephone* L.). *Food Chemistry*. 2009;116(4):906-910. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.045>.
29. O'Kane FE, Happe PR, Vereijken JM, et al. Heat-induced gelation of pea legumin: comparison with soybean glycinin. *J Agric Food Chem*. 2004;52(16):5071-5078. <https://doi.org/10.1021/jf035215h>.
30. Бобков С.В., Лазарева Т.Н. Компонентный состав электрофоретических спектров запасных белков межвидовых гибридов гороха // Генетика. — 2012. — Т. 48. — № 1. — С. 56–61. [Bobkov SV, Lazareva TN. Band composition of electrophoretic spectra of storage proteins in interspecific pea hybrids. *J Genet*. 2012;48(1):47-52. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.1134/s1022795411110068>.
31. Bourgeois M, Jacquin F, Savoie V, et al. Dissecting the proteome of pea mature seeds reveals the phenotypic plasticity of seed protein composition. *Proteomics*. 2009;9(2):254-271. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700903>.
32. Rieseberg LH, Linder CR, Seiler GJ. Chromosomal and genic barriers to introgression in *Helianthus*. *Genetics*. 1995;141:1163-1171.
33. Turner TL, Hahn MW, Nuzhdin SV. Genomic islands of speciation in *Anopheles gambiae*. *PLoS Biol*. 2005;3:e285. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030285>.

#### ✿ Информация об авторе

**Сергей Васильевич Бобков** — канд. с.-х. наук, заведующий лабораторией физиологии и биохимии растений. ФГБНУ «Федеральный научный центр зернобобовых и крупяных культур», Орел. E-mail: svbobkov@gmail.com.

**Иван Александрович Бычков** — младший научный сотрудник, лаборатория физиологии и биохимии растений. ФГБНУ «Федеральный научный центр зернобобовых и крупяных культур», Орел, Россия. E-mail: ivan.a.b@mail.ru.

**Татьяна Николаевна Селихова** — канд. биол. наук, старший научный сотрудник, лаборатория физиологии и биохимии растений. ФГБНУ «Федеральный научный центр зернобобовых и крупяных культур», Орел. E-mail: tat.selihova@yandex.ru.

**Елена Викторовна Семенова** — канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник, отдел генетических ресурсов зернобобовых культур. ФГБНУ «ФИЦ Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова», Санкт-Петербург. E-mail: e.semenova@vir.nw.ru.

**Маргарита Афанасьевна Вишнякова** — д-р биол. наук, заведующая отделом, отдел генетических ресурсов зернобобовых культур. ФГБНУ «ФИЦ Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова», Санкт-Петербург. E-mail: m.vishnyakova@gmail.com.

#### ✿ Author and affiliations

**Sergey V. Bobkov** — Candidate of Agricultural Sciences, Head of Laboratory, Plant Physiology and Biochemistry Laboratory. Federal Scientific Center of Legumes and Groat Crops, Orel, Russia. E-mail: svbobkov@gmail.com.

**Ivan A. Bychkov** — Junior Scientist, Plant Physiology and Biochemistry Laboratory. Federal Scientific Center of Legumes and Groat Crops, Orel, Russia. E-mail: ivan.a.b@mail.ru.

**Tatyana N. Selikhova** — Candidate of Biological Sciences, Senior Scientist, Plant Physiology and Biochemistry Laboratory. Federal Scientific Center of Legumes and Groat Crops, Orel, Russia. E-mail: tat.selihova@yandex.ru.

**Elena V. Semenova** — Candidate of Biological Sciences, Lead Scientist, Department of Legumes Genetic Resources. Federal Research Center "N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources", St. Petersburg, Russia. E-mail: e.semenova@vir.nw.ru.

**Margarita A. Vishnyakova** — Doctor of Biological Sciences, Head of Department, Department of Legumes Genetic Resources. Federal Research Center "N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources", St. Petersburg, Russia. E-mail: m.vishnyakova@gmail.com.