

© С.В. Бобков, Т.Н. Селихова

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт зернобобовых и крупяных культур»

Проведены скрещивания сортов культурного вида гороха с широким набором образцов дикого вида *P. fulvum*. В комбинации *P. sativum* × *P. fulvum* все полученные семена были развитыми и гибридными. Скрещивания *P. fulvum* × *P. sativum* приводили к формированию семян с невыполненными зародышами. Получение гибридов *P. fulvum* × *P. sativum* подтверждено с использованием биохимических и морфологических маркеров. В культуре *in vitro* незрелых 8-дневных зародышей *P. fulvum* (И592589) × *P. sativum* (сорт Аист) получены растения-регенеранты. У отдельных образцов дикого вида *P. fulvum* обнаружен уникальный белковый компонент 7, который отсутствовал в электрофоретических спектрах культурного гороха. В результате гибридологического анализа определено наследование компонента 7 как моногенное и доминантное.

✿ **Ключевые слова:** горох; *Pisum fulvum*; межвидовая гибридизация; белки семян; интрогрессия.

ПОЛУЧЕНИЕ МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДОВ ДЛЯ ИНТРОГРЕССИВНОЙ СЕЛЕКЦИИ ГОРОХА

ВВЕДЕНИЕ

Горох (*Pisum sativum* L.) является важной зернобобовой сельскохозяйственной культурой умеренного климата. Селекция гороха на высокую и стабильную урожайность, устойчивость к биотическим и абиотическим стрессорам, высокое содержание и качество запасных белков является основным условием повышения конкурентоспособности культуры (Ali et al., 1994; Бобков, Уварова, 2010).

Молекулярно-генетические исследования выявили парадоксально узкий генетический базис современных сортов гороха (Baranger et al., 2004). Вовлечение в селекционный процесс новых аллелей хозяйственно-ценных признаков дикорастущего гороха позволит повысить генетическое разнообразие исходного материала для селекции новых сортов (Ellis, 2011; Smykal et al., 2011). Существуют два пути переноса полезных генов (аллелей) в элитные селекционные линии гороха — генетическая инженерия и интрогрессия из геномов диких родичей (Ellis, 2011). Генетическая инженерия является дорогим и недостаточно разработанным на горохе методом. Межвидовая гибридизация приводит к интрогрессии как полезных, так и нежелательных для коммерческих сортов генов. Поэтому при интрогрессии генов интереса следует принять меры по блокировке переноса нежелательного генетического материала. Использование беккроссов с сортами и элитными селекционными линиями способствует селективной интрогрессии ценных генов. Указанные стратегии переноса генетического материала не являются исключительными и имеют перспективу для комбинированного использования.

Вид *P. fulvum* среди дикорастущих родичей гороха является важным источником новых аллелей хозяйственно-ценных признаков. Размер генома у вида *P. fulvum* составляет 108,9% от *P. sativum* (Baranyi et al., 1996). Этот вид интересен для использования в селекции гороха на устойчивость к болезням, вредителям и абиотическим стрессорам (засуха, экстремальные температуры) (Ochatt et al., 2004; Byrne et al., 2008; Clement et al., 2009). Корни растений *P. fulvum* проникают в почву с высокой скоростью на большую глубину (Ali et al., 1994).

Из литературных источников известно, что межвидовая гибридизация гороха сталкивается с проблемой репродуктивной несовместимости (Ben-Ze'ev, Zohary, 1973; Bogdanova, Kosterin, 2007) и отличается низкой эффективностью скрещиваний (Ochatt et al., 2004).

Значительная филогенетическая дивергенция между видами *P. sativum* и *P. fulvum* проявляется в достаточно сильной репродуктивной изоляции (Ben-Ze'ev N., Zohary D., 1973; Ellis, 2011; Smykal et al., 2011; Zaytseva et al., 2012). Если в скрещиваниях *P. sativum* × *P. fulvum* возможно получение гибридов (Ochatt et al., 2004; Byrne et al., 2008; Fondevilla et al., 2010; Бобков, Лазарева, 2012), то в обратном направлении гибридизация сталкивается с выраженной несовместимостью. В научной литературе сообщается как о получении нежизнеспособных семян (Ben-Ze'ev N., Zohary D., 1973) так и об одном гибридном растении, полученном в результате проведения 100 скрещиваний (Bogdanova, Kosterin, 2007).

Несмотря на определенные успехи в интрогрессии генов устойчивости *P. fulvum* в геном культурного вида (Fondevilla et al., 2010), репродуктивная изоляция ограничивает использование межвидовых гибридов в селекции

Поступила в редакцию 13.03.2015
Принята к публикации 12.08.2015

гороха. Преодоление барьеров межвидовой несовместимости является первоочередной и важной задачей (Ochatt et al., 2004).

Исходя из того, что разные гены интереса могут находиться в различных образцах *P. fulvum* (Vugne et al., 2008; Fondevilla et al., 2010) исследование межвидовой несовместимости необходимо проводить с учетом генетического разнообразия дикорастущего вида. Эту работу можно совместить с поиском и идентификацией образцов, которые являются источниками хозяйственно-ценных признаков.

Цель работы состояла в исследовании особенностей межвидовой гибридизации гороха с использованием широкого набора образцов дикорастущего вида для создания интрогрессивных линий *P. sativum* с включениями части генома *P. fulvum* в качестве источника новых генов и аллелей хозяйственно-ценных признаков. Проведена идентификация гибридов и уникального генетического материала *P. fulvum* с использованием электрофоретических спектров белков семян.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В экспериментах использовали сорта *P. sativum* ssp. *sativum*: Стабил (*af*, безлисточковый морфотип),

Аист (листочковый морфотип) и линию ВИ 9402 (*tl*, акациевидный морфотип), а также образцы *P. fulvum* K2523, K6070, И592573, И582583, И592575, И592577, И592579, И592589, И582593, И592595, И592597, И592598, И592602, И592603, И592608, И592609, И592612, И592615, И592619, И592626, И592881, И609881, И609884 из мировой коллекции ВИР (табл. 1). Межвидовую гибридизацию гороха проводили в июне-июле 2012 и 2013 гг. в условиях тепличного бокса по реципрокной схеме. В направлениях *P. sativum* × *P. fulvum* и *P. fulvum* × *P. sativum* проведено 61 и 25 скрещиваний соответственно. Коэффициент корреляции между числом образцов *P. fulvum*, используемых в разных направлениях скрещиваний, равнялся 0,45 ($p < 0,05$).

Для культивирования изолированных семян и заготовки *in vitro* в направлении *P. fulvum* × *P. sativum* проводили дополнительные скрещивания. По одному скрещиванию проведено в комбинациях И592595 × Стабил, И592583 × Стабил, И592602 × Стабил, И592612 × Стабил, И592589 × Аист, K2523 × Стабил. По три скрещивания проведены в комбинациях K6070 × Стабил и K2523 × Стабил, а в комбинации K2523 × Аист — 6 скрещиваний. В обратных комбинациях Стабил × K6070 и Стабил × K2523 проведено по одному скрещиванию.

Таблица 1

Межвидовая гибридизация гороха (2012, 2013 гг.)

№п/п	Образцы <i>P. fulvum</i>	<i>P. sativum</i> × <i>P. fulvum</i>			<i>P. fulvum</i> × <i>P. sativum</i>		
		Стабил	Аист	Сумма	Стабил	Аист	Сумма
1	K2523	2*	—**	2	9	—	9
2	K6070	5	—	5	5	—	5
3	И582583	—	—	—	2	—	2
4	И592573	1	—	1	3	—	3
5	И592575	—	—	—	1	—	1
6	И592577	—	—	—	1	—	1
7	И592579	—	3	3	—	2	2
8	И592589	2	3	5	—	4	4
9	И582593	—	2	2	—	2	2
10	И592595	1	—	1	—	2	2
11	И592597	—	—	—	1	—	1
12	И582598	—	1	1	2	4	6
13	И592602	—	—	—	1	3	4
14	И592603	1	1	2	2	4	6
15	И592608	1	—	1	—	—	—
16	И592609	—	—	—	—	1	1
17	И592612	—	—	—	1	—	1
18	И592615	—	1	1	—	1	1
19	И592619	—	—	—	2	—	2
20	И592626	—	—	—	1	—	1
21	И592881	1	—	1	—	—	—
22	И609881	—	—	—	6	—	6
23	И609884	—	—	—	—	1	1
ВСЕГО		14	11	25	37	24	61

* — количество опыленных цветков; ** — скрещивания не проводили

Таблица 2

Результативность межвидовой гибридизации гороха

Направление скрещивания	Число цветков	Бобы		Семена		
		Число	Число на одно скрещивание	Число	Число на одно скрещивание	Число семян в 1 бобе
<i>P. sativum</i> × <i>P. fulvum</i>	25	9	0,36 ± 0,1	20	0,8 ± 0,08	2,22
<i>P. fulvum</i> × <i>P. sativum</i>	61	4	0,07 ± 0,03**	13	0,21 ± 0,05***	3,25

** — различия существенны с вероятностью ошибки $p=0,005$; *** — различия существенны с вероятностью ошибки $p=0,001$

Изолированные семяпочки и зародыши, полученные в результате межвидовых скрещиваний, высаживали на агаризованные питательные среды для инициации морфогенного каллусогенеза, длительного субкультивирования регенерирующих каллусных тканей и получения растений-регенерантов (Bobkov, 2014). Семяпочки выделяли и высаживали на питательные среды в возрасте 4–6 суток. В комбинациях скрещивания К2523 × Аист и И592589 × Аист изолировали незрелые зародыши в возрасте 8 суток.

При сравнении результативности скрещиваний в направлениях *P. fulvum* × *P. sativum* и *P. sativum* × *P. fulvum* учитывали число бобов и семян (в абсолютных значениях и пересчете на одно скрещивание), а также среднее число семян в 1 бобе (Kosterin, Bogdanova, 2014).

Межвидовые гибриды идентифицировали по электрофоретическим спектрам индивидуальных семян и морфологическим маркерам вегетирующих растений.

Для выделения и электрофоретического разделения белков семян в полиакриламидном геле применяли стандартный арбитражный метод ISTA (Конарев, 2000). Белки экстрагировали из муки в течение 20 часов при температуре 3–4 °С с помощью электродного буфера (ТРИС, глицин, додецил сульфат натрия), pH = 8,3. После центрифугирования 10 мкл экстракта переносили в ячейку планшетки, где смешивали с равным объемом буфера нанесения (додецил сульфат натрия, ТРИС-НСl, глицерин, β-меркаптоэтанол, бромфеноловый синий). Электрофорез проводили в полиакриламидном геле с использованием камеры для вертикального электрофореза VE-4 (Хеликон, Россия). Концентрация разделяющего геля — 12,5 %, концентрирующего — 5 %.

Для идентификации уникальных компонентов *P. fulvum* использовали маркеры молекулярной массы 6,5–200 кДа (SIGMA-ALDRICH, США) (Shand et al., 2007). Анализ наследования белкового компонента 7 в электрофоретических спектрах проводили с использованием 19 семян гибридов F₂.

Оценку существенности различий проводили с использованием критерия Стьюдента (Доспехов, 1985).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результативность скрещиваний

В наших опытах результативность гибридизации при использовании *P. fulvum* в качестве материнского компонента скрещивания была ниже, чем в обратной комбинации. В направлении *P. sativum* × *P. fulvum* из 25 опыленных цветков были сформированы 9 бобов, которые в сумме содержали 20 семян (табл. 2). Число сформированных бобов и семян в пересчете на одно скрещивание равнялись 0,36 и 0,80 соответственно. В направлении скрещивания *P. fulvum* × *P. sativum* в результате 61 скрещивания получили 4 боба и 13 семян. Число бобов и семян в пересчете на одно скрещивание равнялись 0,07 и 0,21 соответственно. Различия по числу сформированных бобов и семян между этими направлениями скрещиваний были статистически значимыми ($p=0,005–0,001$). В направлениях скрещиваний *P. fulvum* × *P. sativum* и *P. sativum* × *P. fulvum* среднее число семян в бобе составило 3,25 и 2,22 соответственно.

Выявлены результативные комбинации скрещивания. В направлении скрещиваний *P. sativum* × *P. fulvum* семена были получены в комбинациях: Стабил × К2523, Стабил × К6070, Стабил × И592589, Стабил × И592595, Стабил × И592603, Аист × И592579, Аист × И582598. В направлении *P. fulvum* × *P. sativum* семена получены в комбинациях: И592577 × Стабил, И692603 × Стабил, И582593 × Аист, И592602 × Аист (табл. 3). Результативные скрещивания в этом направлении приводили к формированию бобов с неразвитыми семенами. В комбинации И592577 × Стабил получили одно выполненное семя, которое оказалось жизнеспособным. Вегетирующее растение F₁ И592577 × Стабил отличалось хорошим развитием (рис. 1).

В культуре *in vitro* изолированных 8-дневных зародышей комбинации скрещивания И592589 × Аист получены морфогенные каллусы, регенерирующие каллусные ткани и растения-регенеранты.

Идентификация межвидовых гибридов F₁ гороха по компонентному составу белков электрофоретических спектров

Индивидуальные семена гороха, полученные в результате межвидовых скрещиваний в комбинациях Ста-

Таблица 3

Результативные комбинации скрещиваний и идентификация гибридов

№п/п	Комбинация	Число опылен-ных цветков	Число бобов	Число семян в бобе	Идентификация гибридов
<i>P. sativum</i> × <i>P. fulvum</i>					
1	Стабил × К2523	2	1	3	Анализ не проводили
2	Стабил × К6070	5	3	2 + 1 + 1 = 4	Анализ не проводили
3	Стабил × И592589	2	1	1	Анализ не проводили
4	Стабил × И592595	1	1	3	SDS-PAGE: все гибриды
5	Стабил × И592603	1	1	7	SDS-PAGE: все гибриды
6	Аист × И592579	3	1	1	Анализ не проводили
7	Аист × И582598	1	1	1	Анализ не проводили
<i>P. fulvum</i> × <i>P. sativum</i>					
1	И592577 × Стабил	1	1	1	Получено вегетирующее растение, идентифицировано как гибрид по красным цветкам и зубчатому краю прилистников
2	И692603 × Стабил	1	1	4	SDS-PAGE: отсутствие спектров
3	И582593 × Аист	2	1	2	SDS-PAGE: слабо выраженные компоненты спектров
4	И592602 × Аист	3	1	6	SDS-PAGE анализ белков 1 семени: гибрид



Рис. 1. Вегетирующее растение межвидового гибрида F₁ И592577 × Стабил с зубчатым краем прилистников

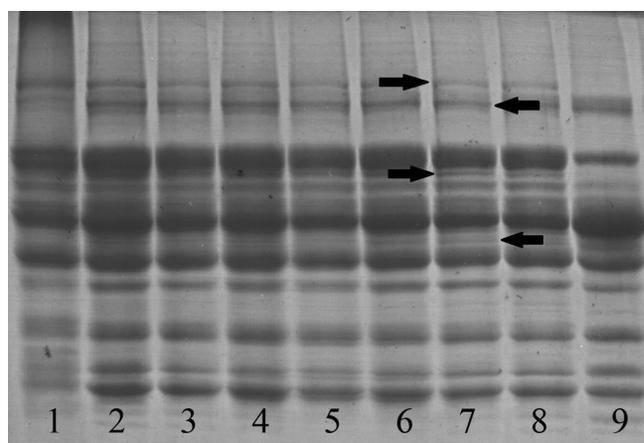


Рис. 2. Электрофоретический анализ белков индивидуальных семян родителей и гибридов F₁ в комбинации скрещивания Стабил × И592603. Электрофоретические спектры: 1 — образец *P. fulvum* И592603; 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 — гибриды F₁, 9 сорт Стабил. В спектрах гибридов F₁ правыми стрелками обозначены белковые компоненты образца И592603, а левыми — сорта Стабил

бил × И592603, Стабил × И592595, И592603 × Стабил, И582593 × Аист, И592602 × Аист подвергали электрофоретическому анализу (табл. 3). Полученные белковые спектры сравнивали со спектрами семян родителей.

В комбинации скрещивания Стабил × И592603 анализировали спектры белков 7 индивидуальных семян предполагаемых гибридов (рис. 2). Во всех спектрах присутствовали белковые компоненты сорта Стабил и отцовского компонента скрещивания — образца дико-

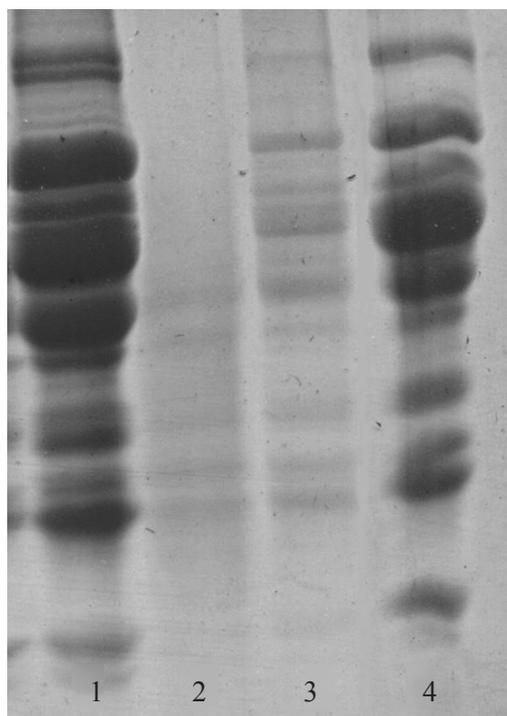


Рис. 3. Электрофоретический анализ белков индивидуальных семян родителей и потомства, полученного в результате скрещивания в комбинации I582593 × Аист. Электрофоретические спектры: 1 — образец *P. fulvum* I582593; 2, 3 — семена, полученные в результате гибридизации I582593 × Аист; 4 — сорт Аист. Невыполненные семена содержали зародыши с недостаточным для электрофоретического анализа количеством белков (спектры 2 и 3)

растущего вида *P. fulvum* I592603. Наличие в спектрах белковых компонентов обеих родителей служило индикатором гибридной природы полученных семян. В комбинации Стабил × I592595 анализировали спектры 3 индивидуальных семян предполагаемых гибридов. Во всех спектрах анализ выявил уникальные компоненты сорта Стабил и образца *P. fulvum* I592595 (рис. 4). Следовательно, все полученные семена были гибридными.

В направлении скрещиваний *P. fulvum* × *P. sativum* наблюдали формирование невыполненных семян. В комбинации I692603 × Стабил сформированы 4 семени, которые практически не содержали зародышей. Электрофоретический анализ показал отсутствие спектров. Два семени, полученные в комбинации скрещивания I582593 × Аист, также были невыполненными. Однако электрофоретический анализ выявил наличие спектров из наиболее многочисленных белков (рис. 3). Недостаточное количество белков не позволило провести сравнительный анализ полиморфных компонентов, необходимый для идентификации гибридов.

В комбинации I592602 × Аист получили 6 семян (табл. 3). Одно семя было практически выполненным, а остальные 5 не содержали полноценных зародышей.

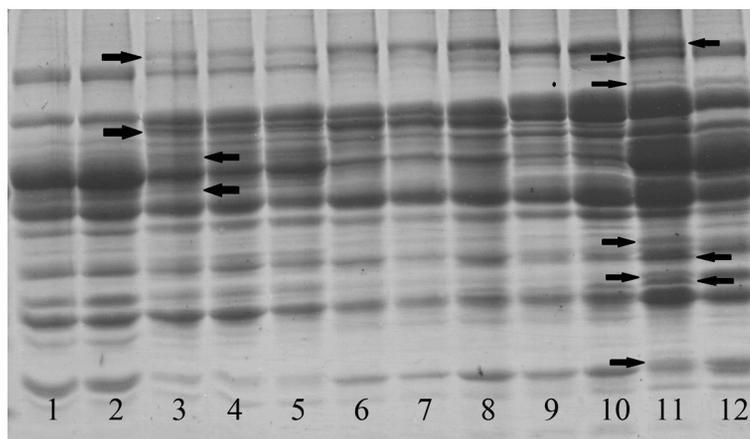


Рис. 4. Электрофоретический анализ белков индивидуальных семян родителей и гибридов F_1 в комбинациях скрещивания Стабил × I592595 и I592602 × Аист. Электрофоретические спектры: 1, 2 — сорт Стабил; 3, 4, 5 — гибриды F_1 Стабил × I592595; 6, 7, 8 — образец *P. fulvum* I592595; 9, 10 — образец *P. fulvum* I592602; 11 — гибрид F_1 I592602 × Аист; 12 — сорт Аист. В спектре 3 правыми стрелками обозначены белковые компоненты образца I592595, а левыми — сорта Стабил. В спектре 11 правыми стрелками обозначены компоненты сорта Аист, а левыми — образца *P. fulvum* I592602

Электрофоретический анализ белков сформированного семени выявил наличие в спектре 5 уникальных белковых компонентов сорта Аист (рис. 4). В спектре также присутствовали компоненты образца *P. fulvum* I592602, что позволило идентифицировать полученное семя как гибрид F_1 .

Вегетирующее растение, полученное в комбинации скрещивания I592577 × Стабил, характеризовалось красными цветками и зубчатым краем прилистников, что свидетельствовало о его гибридной природе (рис. 1). Примечательно, что венчики цветков в бутонах первоначально имели светло-желтую окраску, а к моменту раскрытия приобретали красную пигментацию.

Идентификация и интрогрессия генов уникальных белков *P. fulvum*

При проведении сравнительного анализа электрофоретических спектров белков семян большое значение имеет поиск и идентификация уникальных компонентов у образцов дикорастущего вида *P. fulvum*, которые отсутствуют в спектрах сортов и линий культивируемого гороха *P. sativum*. Уникальные белковые компоненты *P. fulvum* могут представлять белки, играющие важную роль в устойчивости растений к вредителям и болезням, а также служить маркерами генов хозяйственно-ценных признаков.

Ранее в наших исследованиях был обнаружен белковый компонент 7 (нумерация проведена по реперным компонентам спектра сои), который отсутствовал у сортов и линий гороха и являлся уникальным для образца *P. fulvum* I509881. Было показано, что этот

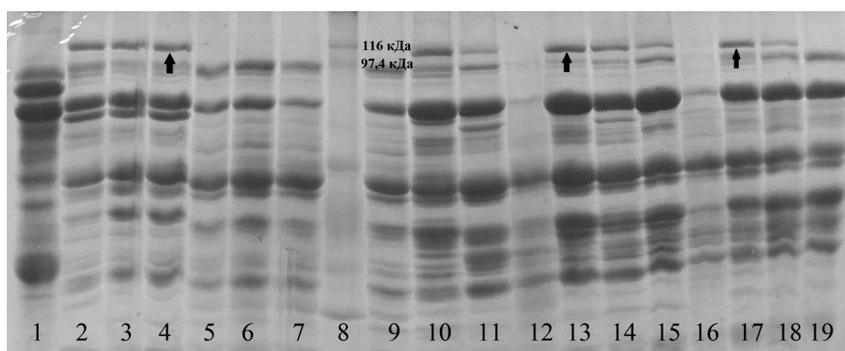


Рис. 5. Электрофореграмма запасных белков родителей и межвидовых гибридов F_2 ВИ 9402 (*P. sativum*) × И609881 (*P. fulvum*). Электрофоретические спектры: 1 — сорт сои Ланцетная; 2, 3, 4 — образец И609881; 5, 6, 7 — линия ВИ 9402; 8 — маркеры молекулярной массы (SIGMA-ALDRICH, USA); 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 — спектры гибридов F_2 . Стрелками в спектрах ВИ 9402 и гибридов F_2 обозначен компонент 7 (~110 кДа)

компонент наследовался в F_1 в гибридных комбинациях 109 б × И609881, Стабил × И609881 (Бобков, Лазарева, 2012). Позднее компонент 7 был обнаружен в электрофоретических спектрах образцов *P. fulvum* К2523 и К6070, а также образца *P. sativum* sp. *transcausicum* К296.

Для определения наследования компонента 7 проводили гибридизацию растений образца акациевидной формы гороха ВИ 9402 с образцом И509881. В результате скрещиваний были получены гибриды F_1 и F_2 . Электрофоретическому анализу подвергали запасные белки индивидуальных семян гибридов F_1 и F_2 . Компонент 7 присутствовал в спектрах всех гибридных семян F_1 . В спектрах 19 семян гибридов F_2 наблюдали генетическое расщепление по этому компоненту (рис. 5). Фенотипы с наличием и отсутствием компонента 7 распределялись в соотношении 13:6. В соответствии с гипотезой моногенного доминантного наследования теоретическое расщепление соответствует отношению 3:1. Фактически расщепление составило 2,2:1. Сравнение результатов по критерию χ^2 выявило совпадение фактического и теоретического расщеплений ($\chi^2_{\text{факт}} = 0,44$; $\chi^2_{05} = 3,84$). Следовательно, наследование компонента 7 является моногенным и доминантным.

ОБСУЖДЕНИЕ

Существуют различные методы переноса нового генетического материала в селекционные линии — генетическая инженерия и межвидовая гибридизация. Генетическая инженерия является дорогостоящим и недостаточно разработанным на горохе методом (Ellis, 2011). Межвидовая гибридизация приводит к созданию материала, мало пригодного для использования в селекции вследствие параллельного переноса хозяйственно-ценных и нежелательных генов (аллелей). Методы маркерной селекции с использованием линий культурного гороха в качестве рекуррентных родителей при возвратных скрещиваниях способны создать интрогрессивные линии гороха с отсутствием нежелательных для селекции аллелей.

При проведении межвидовой гибридизации необходимо подтвердить факт получения межвидовых гибридов. Межвидовые гибриды идентифицировали по маркерным генам морфологических признаков, окраске цветков вегетирующих растений F_1 (Вурне et al., 2008; Бобков, Лазарева, 2012), электрофоретическим спектрам изоэнзимов и генетическим маркерам (Ochatt et al., 2004). В наших опытах был использован метод, основанный на сравнении электрофоретических спектров индивидуальных семян родителей и гибридов. Он позволяет проводить идентификацию гибридов при отсутствии необходимости получения вегетирующих растений, а также при использовании нежизнеспособных семян. Дополнительно для идентификации гибридов использовали морфологические маркеры.

Известно, что для рода *Pisum* характерна репродуктивная изоляция таксонов. Например, описаны нарушения мейоза вследствие ядерно-цитоплазматической несовместимости у гибридов, полученных в результате скрещивания между образцами дикорастущего подвида *elatius* и культурного подвида *sativum* вида *P. sativum* L. (Богданова, Галиева, 2009). Гибридизация гороха посевного (*P. sativum*) с дикорастущим видом (*P. fulvum*) сталкивается с более выраженной репродуктивной несовместимостью (Ben-Ze'ev, Zohary, 1973). Из литературных источников известно, что межвидовые гибриды получали только в комбинациях скрещивания, в которых *P. fulvum* использовали в качестве отцовского компонента (Ochatt et al., 2004; Вурне et al., 2008; Бобков, Лазарева, 2012). При этом гибридизация не отличалась высокой результативностью (Ochatt et al., 2004). Использование *P. fulvum* в скрещиваниях в качестве отцовского компонента приводило к появлению нежизнеспособных проростков (Ben-Ze'ev, Zohary, 1973). Получение одного гибридного семени и вегетирующего растения стало возможным в результате проведения 100 скрещиваний в направлении *P. fulvum* × *P. sativum* (Bogdanova, Kosterin, 2007). Использование ДНК маркеров пока-

зало, что все четыре полученные гибридные растения F_2 содержали пластиды отцовского компонента скрещивания (*P. sativum*).

В настоящих опытах средняя эффективность формирования бобов в направлении *P. fulvum* × *P. sativum* составила 7 %, что существенно ($p = 0,005$) меньше, чем при использовании *P. fulvum* в качестве отцовского компонента скрещивания (36 %). Существенные ($p = 0,001$) различия наблюдались и по числу полученных семян в пересчете на одно скрещивание в направлениях *P. fulvum* × *P. sativum* (0,21) и *P. sativum* × *P. fulvum* (0,8). Число семян в одном бобе в направлении *P. fulvum* × *P. sativum* равнялось 3,25, что было больше чем в обратной комбинации (2,22).

Если в направлении скрещиваний *P. sativum* × *P. fulvum* все полученные семена были хорошо развитыми и гибридными, то в реципрокной комбинации наблюдали формирование невыполненных семян. В комбинации И592603 × Стабил полученные 4 семени практически не содержали зародышей (арест развития на ранних стадиях). Два семени, полученные в комбинации скрещивания И582593 × Аист, были невыполненными. Электрофоретический анализ выявил наличие спектров, но недостаточное количество белков (отсутствовали полиморфные компоненты) не позволило провести идентификацию продуктов гибридизации. Однако факт присутствия и разделения запасных белков в полиакриламидном геле (рис. 3) указывал на формирование и рост зародышей.

В комбинации скрещивания И592602 × Аист только одно из 6 сформированных семян характеризовалось наличием выполненного зародыша (табл. 3). Электрофоретический анализ белков этого семени подтвердил получение гибрида в направлении скрещивания *P. fulvum* × *P. sativum*, где *P. fulvum* использовали в качестве материнского компонента (рис. 4).

Из литературных источников известно, что у гороха межвидовая гибридизация возможна при использовании *P. fulvum* в качестве отцовского компонента скрещиваний. Основной причиной репродуктивной несовместимости в комбинации *P. fulvum* × *P. sativum* является отсутствие прорастания пыльцевых зерен *P. sativum* на рыльцах пестиков *P. fulvum* (Ochatt et al., 2004). Получение гибридного семени можно объяснить тем, что в отдельных случаях пыльца прорастает и происходит оплодотворение.

Межвидовая гибридизация у зернобобовых культур сталкивается с пост-зиготической несовместимостью, что приводит к отмиранию зародышей на ранних стадиях развития. Для их спасения используют метод эмбриокультуры *in vitro*. Культивирование изолированных зародышей межвидовых гибридов на питательных средах рассматривается в качестве важного метода для осуществления интрогрессии генетического материала диких видов нута (Clarke et al., 2006). Метод эмбрио-

культуры *in vitro* успешно применяется в межвидовой гибридизации чечевицы (Suvogova, 2014).

Преодоление пост-зиготической несовместимости гороха с использованием метода эмбриокультуры особенно актуально в низко результативном направлении межвидовых скрещиваний *P. fulvum* × *P. sativum*. В наших опытах к положительным результатам приводило культивирование *in vitro* изолированных 8-дневных зародышей гороха в комбинации скрещивания И592589 × Аист. В результате были получены морфогенные каллусные ткани и растения-регенеранты.

У межвидовых гибридов гороха *P. fulvum* × *P. sativum* должны присутствовать митохондрии *P. fulvum*, которые, как известно, наследуются по материнской линии (Богданова, Галиева, 2009). Создание интрогрессивных линий гороха с митохондриальным геномом *P. fulvum* открывает новые возможности для генетических и физиологических исследований.

Отдельные образцы дикого вида *P. fulvum* характеризуются повышенной устойчивостью к вредителям и болезням (Burne et al., 2008; Fondevilla et al., 2010). Поэтому весьма актуален вопрос, могут ли уникальные компоненты белков семян *P. fulvum* служить маркерами повышенной устойчивости к неблагоприятным факторам среды. Известно, что повышенная устойчивость к вредителям и болезням может поддерживаться уникальными изоформами липоксигеназ (Porta, Rocha-Sosa, 2002). Липоксигеназы обнаружены в зрелых и незрелых семенах, а также в вегетирующих органах гороха (Domoney et al., 1990).

Среди представителей вида *P. fulvum* обнаружены образцы, характеризующиеся наличием уникального компонента 7 с молекулярной массой белка ~110 кДа. Этот белок на электрофоретических спектрах находится в непосредственной близости к двум основным изоформам липоксигеназы гороха с молекулярными массами ~90 и ~97 кДа (Casey et al., 1985). С использованием аффинной хроматографии у гороха выявлена изоформа липоксигеназы с молекулярной массой ~100 кДа (Domoney et al., 1990). Марганцевые липоксигеназы патогенного гриба *Gaumannomyces graminis* локализируются на электрофоретических спектрах в интервале 100–140 кДа (Su, Oliw, 1998).

Присутствие компонента 7 в смежной области с компонентами липоксигеназ гороха не является достаточным основанием считать белок ранее неизвестной изоформой. Определение принадлежности белка компонента 7 к липоксигеназам или другим белкам, а также изучение его функциональных свойств, требуют проведения дополнительных исследований.

Интрогрессия уникальных генов *P. fulvum* в геном культурного гороха с использованием белковых маркеров не имеет существенных технических ограничений для использования в селекции гороха. Для проведения электрофоретического анализа требуется небольшое коли-

чество белка, экстрагированного из одной семядоли или её части. В результате проращивания второй семядоли с почкой вырастает нормальное растение.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бобков С. В., Лазарева Т. Н. (2012) Компонентный состав электрофоретических спектров запасных белков межвидовых гибридов гороха. Генетика. Т. 48(1): С. 56–61.
2. Бобков С. В., Уварова О. В. (2010) Растительный белок зернобобовых культур и перспектива получения белковых изолятов. Вестник РАСХН. № 6: С. 83–88.
3. Богданова В. С., Галиева Э. Р. (2009) Нарушения мейоза как проявление ядерно-цитоплазматической несовместимости при скрещивании подвидов посевного гороха. Генетика. Т. 45 (5): С. 711–716.
4. Доспехов Б. А. (1985) Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). М.: Агропромиздат.
5. Конарев В. Г. (2000) Идентификация сортов и регистрация генофонда культурных растений по белкам семян. СПб.: ВИР.
6. Ali S. M., Sharma B., Ambrose M. J. (1994) Current status and future strategy in breeding pea to improve resistance to biotic and abiotic stresses. Euphytica. V. 73: P. 115–126.
7. Baranger A. G., Aubert G., Arnau G. et al. (2004) Genetic diversity within *Pisum sativum* using protein - and PCR based markers. Theoretical and Applied Genetics. V. 108: P. 1309–1321.
8. Baranyi M., Greilhuber J., Swiecicki W. K. (1996) Genome size in wild *Pisum* species. Theoretical and Applied Genetics. V. 93: P. 717–721.
9. Ben-Ze'ev N., Zohary D. (1973) Species relationship in the genus *Pisum* L. Israel Journal of Botany. V. 22: P. 73–91.
10. Bobkov S. (2014) Obtaining calli and regenerated plants in anther cultures of pea. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding. V. 50 (2): P. 123–129.
11. Bogdanova V. S., Kosterin O. E. (2007) Hybridization barrier between *Pisum fulvum* Sibth. et Smith and *P. sativum* L. is partly due to nuclear-chloroplast incompatibility. Pisum Genetics. V. 39: P. 8–9.
12. Byrne O. M., Hardie D. C., Khan T. N. et al. (2008) Genetic analysis of pod and seed resistance to pea weevil in a *Pisum sativum* × *P. fulvum* interspecific cross. Australian Journal of Agricultural Research. V. 59: P. 854–862.
13. Casey R., Domoney C., Nielsen N. C. (1985) Isolation of a cDNA clone for pea (*Pisum sativum*) seed lipoxygenase. Biochem. J. V. 232: P. 79–85.
14. Clarke H. J., Wilson J. G., Kuo I., Lulsdorf M. M., Mallickarjuna N., Kuo J., Siddique K. H. M. (2006) Embryo rescue and plant regeneration in vitro of selfed chickpea (*Cicer arietinum* L.) and its wild annual relatives. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 85: 197–204.
15. Clement S. L., McPhee K. E., Elberson L. R., Evans M. A. (2009) Pea weevil, *Bruchus pisorum* L. (Coleoptera: Bruchidae), resistance in *Pisum sativum* × *Pisum fulvum* interspecific crosses. Plant Breeding. V. 128: 478–485.
16. Domoney C., Firmin J. L., Sidebottom C. et al. (1990) Lipoxygenase heterogeneity in *Pisum sativum*. Planta. V. 181: P. 35–43.
17. Ellis T. H. N. (2011) *Pisum*. In: C. Kole (ed.). Wild crop relatives: genomic and breeding resources, legume crops and forages. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; p. 237–248.
18. Fondevilla S., Cubero J. I., Rubiales D. (2010) Confirmation that the Er3 gene, conferring resistance to Erysiphe pisi in pea, is a different gene from er1 and er2 genes. Plant Breeding. V. 130 (2): P. 281–282.
19. Kosterin O. E., Bogdanova V. S. (2014) Efficiency of hand pollination in different pea (*Pisum*) species and subspecies. Indian J. Genet. V. 74 (1): P. 50–55.
20. Ochatt S. J., Benabdelmouna A., Marget P. et al. (2004) Overcoming hybridization barriers between pea and some of its wild relatives. Euphytica. V. 137: P. 353–359.
21. Porta H., Rocha-Sosa M. (2002) Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. Plant Physiology. V. 130: P. 15–21.
22. Shand P. J., Ya H., Pietrasik Z., Wanasundara P. K. J. P. D. (2007) Physicochemical and textural properties of heat-induced pea protein isolate gels. Food Chemistry. V. 102: P. 1119–1130.
23. Smykal P., Kenicer G., Flavell A. J. et al. (2011) Phylogeny, phylogeography and genetic diversity of the *Pisum* genus. Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization. V. 9 (1): P. 4–18.
24. Su C., Ollivier E. H. (1998) Manganese lipoxygenase: characterization and purification. J. Biol. Chem. V. 273: P. 13072–13079.
25. Suvorova G. (2014) Hybridization of cultivated lentil *Lens culinaris* Medik. and wild species *Lens tomentosus* Ladizinsky. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding. V. 50: 130–134.
26. Zaytseva O. O., Bogdanova V. S., Kosterin O. E. (2012) Phylogenetic reconstruction at the species and intraspecies levels in the genus *Pisum* (L.) (peas) using a histone H1 gene. Gene. V. 504: P. 192–202.

OBTAINING OF INTERSPECIFIC HYBRIDS FOR PEA INTROGRESSIVE BREEDING

Bobkov S. V., Selikhova T. N.

✳ **SUMMARY:** *Background.* Overcoming of reproductive isolation, identification and transfer of agronomic value genes from wild rela-

tives into cultivated pea genomes is an important task for pea introgressive breeding. *Materials and methods.* Reciprocal hybridization of cultivated pea with wide set of *P. fulvum* accessions was conducted. Identification of hybrids was carried out with use of biochemical and morphological markers. Identification of unique protein was conducted with use of electrophoretic spectra of mature seeds. *Results.* Pea interspecific hybrids were obtained in two reciprocal directions of crosses. Cross efficiency in *P. sativum* × *P. fulvum* and *P. fulvum* × *P. sativum* combinations was 36 % and 7 %, respectively. All tested seeds in crosses *P. sativum* × *P. fulvum* were hybrids. Crosses in direction *P. fulvum* × *P. sativum* led to formation of puny seeds restricted in embryo growth. Protein markers of one seed derived in cross *P. fulvum* × *P. sativum* proved its hybrid nature. Morphological markers demonstrated that plant derived from another cross was also a hybrid. Culture of immature embryos was developed for recovering plants in interspecific crosses. Morphogenic calli and regenerated plants were obtained in culture of immature embryos *P. fulvum* (И592589) × *P. sativum* (Aest). Identification of unique protein 7 of *P. fulvum* was conducted. Inheritance of that protein was proved as monogenic dominant. *Conclusion.* Efficiency of hybridization in combination *P. fulvum* × *P. sativum* was significantly less in compare to reciprocal one. All products of that cross combination were tested as hybrids. Unique protein 7 of *P. fulvum* was revealed as a result of mature seed electrophoretic spectra analysis. Inheritance of that protein was determined as monogenic dominant.

✿ **KEY WORDS:** pea; wild species; *Pisum fulvum*; interspecific hybridization; SDS-PAGE electrophoresis; embryo; storage protein; introgression; lipoxygenase.

✿ **REFERENCES (TRANSLITERATED)**

1. Ali S.M., Sharma B., Ambrose M.J. (1994) Current status and future strategy in breeding pea to improve resistance to biotic and abiotic stresses. *Euphytica*. V. 73: P. 115–126.
2. Baranger A.G., Aubert G., Arnau G. et al. (2004) Genetic diversity within *Pisum sativum* using protein- and PCR based markers. *Theoretical and Applied Genetics*. V. 108: P. 1309–1321.
3. Baranyi M., Greilhuber J., Swiecicki W.K. (1996) Genome size in wild *Pisum* species. *Theoretical and Applied Genetics*. V. 93: P. 717–721.
4. Ben-Ze'ev N., Zohary D. (1973) Species relationship in the genus *Pisum* L. *Israel Journal of Botany*. V. 22: P. 73–91.
5. Bobkov S. (2014) Obtaining calli and regenerated plants in anther cultures of pea. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*. V. 50 (2): P. 123–129.
6. Bobkov S.V., Lazareva T.N. (2012) Band composition of electrophoretic spectra of storage proteins in interspecific pea hybrids. *Russian Journal of Genetics*. V. 48 (1): P. 47–52.
7. Bobkov S.V., Uvarova O.V. (2010) Rastitel'nyy belok zernobobovykh kul'tur i perspektiva polucheniya belkovykh izolyatov [Vegetable protein of grain legumes an perspective of protein isolates producing]. *Vestnik RASKhN*. N 6: S. 83–88.
8. Bogdanova V.S., Galieva E.R. (2009) Meiotic abnormalities as expression of nuclear-cytoplasmic incompatibility in crosses of *Pisum sativum* subspecies. *Russian Journal of Genetics*. V. 45 (5): P. 623–627.
9. Bogdanova V.S., Kosterin O.E. (2007) Hybridization barrier between *Pisum fulvum* Sibth. et Smith and *P. sativum* L. is partly due to nuclear-chloroplast incompatibility. *Pisum Genetics*. V. 39: P. 8–9.
10. Byrne O.M., Hardie D.C., Khan T.N. et al. (2008) Genetic analysis of pod and seed resistance to pea weevil in a *Pisum sativum* × *P. fulvum* interspecific cross. *Australian Journal of Agricultural Research*. V. 59: P. 854–862.
11. Casey R., Domoney C., Nielsen N.C. (1985) Isolation of a cDNA clone for pea (*Pisum sativum*) seed lipoxygenase. *Biochem. J.* V. 232: P. 79–85.
12. Clarke H.J., Wilson J.G., Kuo I., Lulsdorf M.M., Mallickarjuna N., Kuo J., Siddique K.H.M. (2006) Embryo rescue and plant regeneration in vitro of selfed chickpea (*Cicer arietinum* L.) and its wild annual relatives *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 85: 197–204.
13. Clement S.L., McPhee K.E., Elbersen L.R., Evans M.A. (2009) Pea weevil, *Bruchus pisorum* L. (Coleoptera: Bruchidae), resistance in *Pisum sativum* × *Pisum fulvum* interspecific crosses. *Plant Breeding*. V. 128: 478–485.
14. Domoney C., Firmin J.L., Sidebottom C. et al. (1990) Lipoxygenase heterogeneity in *Pisum sativum*. *Planta*. V. 181: P. 35–43.
15. Dospikhov B.A. (1985) Metodika polevogo opyta (s osnovami statisticheskoy obrabotki rezul'tatov issledovaniy) [Method of field experiment]. M.: Agropromizdat.
16. Ellis T.H.N. (2011) *Pisum*. In: C. Kole (ed.). *Wild crop relatives: genomic and breeding resources, legume crops and forages*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; p. 237–248.
17. Fondevilla S., Cubero J.I., Rubiales D. (2010) Confirmation that the Er3 gene, conferring resistance to Erysiphe pisi in pea, is a different gene from er1 and er2 genes. *Plant Breeding*. V. 130 (2): P. 281–282.
18. Konarev V.G. (2000) Identifikatsiya sortov i registratsiya genofonda kul'turnykh rasteniy po belkam semyan [Identification of varieties and registration of the genofond of cultivated plants by seed proteins]. SPb.: VIR.
19. Kosterin O.E., Bogdanova V.S. (2014) Efficiency of hand pollination in different pea (*Pisum*) species and subspecies. *Indian J. Genet.* V. 74 (1): P. 50–55.
20. Ochatt S.J., Benabdelmouna A., Marget P. et al. (2004) Overcoming hybridization barriers between pea and some of its wild relatives. *Euphytica*. V. 137: P. 353–359.
21. Porta H., Rocha-Sosa M. (2002) Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. *Plant Physiology*. V. 130: P. 15–21.
22. Shand P.J., Ya H., Pietrasik Z., Wanasundara P.K.J.P.D. (2007) Physicochemical and textural

- properties of heat-induced pea protein isolate gels. Food Chemistry. V. 102: P. 1119–1130.
23. Smykal P., Kenicer G., Flavell A.J. et al. (2011) Phylogeny, phylogeography and genetic diversity of the *Pisum* genus. Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization. V. 9 (1): P. 4–18.
24. Su C., Oliv E.H. (1998) Manganese lipoxygenase: characterization and purification. J. Biol. Chem. V. 273: P. 13072–13079.
25. Suvorova G. (2014) Hybridization of cultivated lentil *Lens culinaris* Medik. and wild species *Lens tomentosus* Ladizinsky. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding. V. 50: 130–134.
26. Zaytseva O.O., Bogdanova V.S., Kosterin O.E. (2012) Phylogenetic reconstruction at the species and intraspecies levels in the genus *Pisum* (L.) (peas) using a histone H1 gene. Gene. V. 504: P. 192–202.

✿ Информация об авторах

Бобков Сергей Васильевич — к. сельскохоз. н., старший научный сотрудник, заведующий лабораторией физиологии и биохимии растений. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт зернобобовых и крупяных культур» ФАНО России. 302502, Орловская обл., Орловский район, пос. Стрелецкий, ул. Молодежная, д. 10, корп. 1. E-mail: svbobkov@gmail.com.

Селихова Татьяна Николаевна — к. б. н., старший научный сотрудник, лаборатория физиологии и биохимии растений. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт зернобобовых и крупяных культур» ФАНО России, 302502, Орловская обл., Орловский район, пос. Стрелецкий, ул. Молодежная, д. 10, корп. 1. E-mail: tat.selihova@yandex.ru.

Bobkov Sergey Vasilevich — head of plant physiology and biochemistry laboratory, All-Russia Research Institute of Legumes and Groat Crops, Doctor of agriculture, senior scientist. 302502, Orlovskaya oblast, Orlovsky rayon, pos. Streletsky, Molodezhnaya St., 10, building 1, Russia. E-mail: svbobkov@gmail.com.

Selikhova Tatyana Nikolaevna — Doctor of biology, senior scientist of plant physiology and biochemistry laboratory, All-Russia Research Institute of Legumes and Groat Crops, Doctor of agriculture. 302502, Orlovskaya oblast, Orlovsky rayon, pos. Streletsky, Molodezhnaya St., 10, building 1, Russia. E-mail: tat.selihova@yandex.ru.