

УДК 635.656:631.527:575

ОЦЕНКА КОЛЛЕКЦИОННЫХ ОБРАЗЦОВ ГОРОХА ПОСЕВНОГО (*PISUM SATIVUM* L.) НА НАЛИЧИЕ НОСИТЕЛЕЙ МУТАЦИЙ *r* И *rb*

А. А. ВАСИЛЕНКО¹, С. М. ТЫМЧУК², В. В. ПОЗДНЯКОВ¹, О. Ю. ДЕРЕБИЗОВА¹,
И. Н. БЕЗУГЛЫЙ¹

¹ Институт растениеводства им. В. Я. Юрьева НААН
61060, Украина, г. Харьков, проспект Московский, 142
E-mail: yuriev1908@gmail.com

² Инженерная академия Украины
61046, Украина, ул. Дм. Пожарского, 2/10
e-mail: eau.7788982@gmail.com

Цель. Провести оценку коллекционных образцов гороха посевного (*Pisum sativum* L.) для идентификации среди них носителей мутаций *r* и *rb*. **Методы.** Выращивание образцов гороха проводили в полевых условиях и получение семян осуществляли при контролируемом опылении. Определение формы крахмальных гранул проводили по их микрофотографиям, полученных с помощью компьютерной цифровой микроскопической камеры DMC-300 на микроскопе «Биолам-15» (объектив × 40). Содержание крахмала определяли поляриметрическим методом Эверса, а содержание амилозы — колориметрическим методом В. О. Juliano. Полученные результаты подвергали статистической обработке методом дисперсионного анализа. **Результаты.** Подтвержден достоверный эффект мутаций *r* и *rb* по содержанию и фракционному составу крахмала в семенах гороха. У гладкосемянных образцов среднее содержание крахмала составило 39,9 %, а содержание амилозы в крахмале — 45,9 %, у носителей мутации — соответственно 31,2 % и 67,6 %, а у носителей мутации *rb* — соответственно 26,9 % и 28,2 %. Идентифицирован образец с мозговыми семенами, округлыми крахмальными гранулами и низким содержанием амилозы в крахмале. Установлено, что этот образец является носителем рецессивной мутации, неаллельной к мутации *r* и совпадающей по типу эффекта с мутацией *rb*. **Выводы.** Выделен оригинальный генетический источник крахмал-модифицирующей моногенной мутации гороха *rb*, который включен в гибридизацию с источниками мутации *r* для расширения генетической основы селекции мозговых сортов гороха.

Ключевые слова: горох посевной (*Pisum sativum* L.), генетическое разнообразие, мутации *r* и *rb*, фенотип семян, форма крахмальных гранул, содержание крахмала, содержание амилозы в крахмале.

Введение. Внутривидовое разнообразие различных сельскохозяйственных растений, сосредоточенное в генетических банках мира, используется в селекции далеко неполно. В то же время идентифицированные в пределах генетического разнообразия растений источники их полезных признаков и свойств могут обеспечивать результативные решения актуальных селекции [1].

Одной из ее наиболее актуальных современных проблем является создание промышленных источников высококачественных крахмалов, основными источниками которых считаются картофель и зерновые культуры [2]. Однако в последнее время все большее внимание как источники крахмала привлекают зернобобовые культуры, особенно горох [3]. Их преимущества перед другими крахмалоносными культурами состоит в высоком содержании белка, который представлен, в основном солерастворимой и водорастворимой фракциями [4].

Поэтому при промышленном выделении крахмала возникает возможность получения значительных количеств ценного со-продукта переработки зерна — кормового и пищевого белка, который отличается высокой биологической ценностью [5].

Кроме того, высокая доля в белковом комплексе зерна глобулинов и альбуминов значительно упрощает процесс отделения крахмала от белка при промышленной переработке зерна.

Однако особого внимания заслуживают крахмалы с высокими долями каждого из структурных со-полимеров — амилозы и амилопектина, которые отличаются очень высокими технологическими свойствами и значительно отличаются по этим свойствам от крахмалоносных растений традиционного типа, что значительно расширяет сферы промышленного использования крахмалов [6]. Считается, что наиболее результативным и экологически безопасным способом создания промышленных источников крахмалов как высокоамилозного, так и амилопектинового типа является генетическое улучшение крахмалоносных культур путем использования их естественного разнообразия, которое среди культур, активно выращиваемых в Европе, наиболее широко представлено у кукурузы и гороха. У обеих этих культур идентифицирована серия моногенных мутаций, вызывающих полезный эффект по содержанию и фракционному составу крахмала который может быть с успехом использован в селекции кукурузы и гороха зернового назначения [7, 8]. Кроме этого, крахмала-модифицирующие мутанты кукурузы и гороха являются ценным исходным материалом для селекции этих культур, используемых как овощные [9–11].

Среди крахмала-модифицирующих мутаций гороха наиболее широко используются и лучше других изучены мутации *r* и *rb* [12]. Известно, что обе эти мутации рецессивны, их носители имеют сходный морщинистый фенотип семян, однако мутация *r* снижает активность крахмал — разветвляющего фермента [13], а мутация *rb* — активность АДФ-глюкозо-пирофосфориллазы [14]. Поэтому носителям мутации *r* свойственно снижение содержания крахмала и повышение в нем доли амилозы, а носителям мутации *rb* — снижение содержания крахмала без изменения его фракционного состава или даже некоторого снижения доли амилозы [15]. Кроме того, крахмальные гранулы носителей мутации *r* по морфотипу являются сложными, а носителей мутации *rb* —

простыми, которые по форме не отличаются от гладкосемянных горохов, но уступают им по размерам [16].

Поскольку основные признаки углеводного состава зерна мутантов гороха *r* и *rb* различаются, возникает необходимость оценки коллекционного материала с целью идентификации носителей каждой из этих мутаций. Она и составила задачу наших исследований.

Материалы и методы

В качестве материала для наших исследований были взяты 60 образцов гороха посевного из рабочей коллекции отдела селекции гороха Института растениеводства им. В. Я. Юрьева НААН, в том числе 57 образцов с морщинистыми семенами и три образца с округлыми. Последние использовались в качестве контролей.

Образцы экспериментальной выборки выращивали в 2010–2014 гг. в селекционном севообороте Института растениеводства им. В. Я. Юрьева согласно общепринятой методике полевого эксперимента [17]. В полученных семенах биологической спелости анализировали форму крахмальных гранул, а также содержание крахмала и фракционный состав крахмала.

Для определения формы крахмальных гранул семена гороха фиксировали в течение 48 часов в смеси этилового спирта, глицерина и воды в соотношении 1 : 1 : 1 с добавкой в качестве антисептика 0,01 М % азида натрия. Затем материал растирали в фарфоровой ступке и подвергали микрофотографированию с помощью компьютерной цифровой микроскопической камеры DMC-300 на микроскопе «Биолам-15» (объектив × 40).

Содержание крахмала определяли поляриметрическим методом Эверса [18], а содержание амилозы — колориметрическим методом В. О. Juliano [19].

Полученные результаты подвергались статистической обработке методом дисперсионного анализа [20].

Результаты исследований и их обсуждение

В результате проведенных исследований установлено, что подавляющее большинство коллекционных сортов со сморщенными семенами являются носителями рецессивной мутации *r* и только один сорт — Виолена был идентифицирован как носитель рецессивной мутации *rb*.

По фенотипу семян сорта-носители этих мутаций не различались между собой, но были качественно отличны от сортов гладкосемянного гороха (Рис. 1).

Анализ морфотипов крахмальных гранул у сортов экспериментальной выборки показал, что все сорта гладкосемянного гороха имели простые гранулы, а все сорта-носители мутации *r* — сложные. И среди сортов с мозговым фенотипом

семян только сорту Виолена были свойственны простые крахмальные гранулы, неотличимые по морфотипу от гладкосемянных сортов гороха, но более мелкие по размерам (Рис. 2).

И уже одна эта особенность позволяет предположить, что сорт Виолена может являться носителем мутации, которая вызывает образование морщинистых семян, но отлична от мутации *r*.



Сорт Оплот
(генотип *RRRbRb*)

Сорт Asgrow seed
(генотип *rrRbRb*)

Сорт Виолена
(генотип *RRrbrb*)

Рисунок 1. Внешний вид семян сортов гороха с различным аллельным состоянием генов *r* и *rb*



Сорт Оплот
(генотип *RRRbRb*)

Сорт Asgrow seed
(генотип *rrRbRb*)

Сорт Виолена
(генотип *RRrbrb*)

Рисунок 2. Морфотипы крахмальных гранул сортов гороха с различным аллельным состоянием генов *r* и *rb*

Результаты биохимического анализа свидетельствуют, что сорт Asgrow seed с мозговым фенотипом семян (крахмальная гранула сложная) отличался сниженным содержанием крахмала по сравнению с гладкосемянным сортам

Оплот (крахмальная гранула простая), причем содержание крахмала у сорта Виолена (семена мозговые, крахмальная гранула простая) было среди этих сортов самым низким (Табл. 1).

Таблица 1. Содержание крахмала и амилозы у гладкосемянных и мозговых коллекционных образцов гороха, 2013–2014 гг.

Сорт	Генотип	Содержание крахмала, %			Содержание амилозы, %		
		2013	2014	среднее	2013	2014	среднее
Виолена	<i>RRrbrb</i>	27,74	25,96	26,85	24,48	31,82	28,15
Asgrow seed	<i>rrRbRb</i>	32,26	30,70	31,48	64,91	69,77	67,34
Оплот	<i>RRRbRb</i>	38,72	41,16	39,94	47,39	44,40	45,90
НСР ₀₅		—	—	4,92	—	—	11,37

Сорт Asgrow seed со сморщенными семенами отличался и значительно повышенным содержанием амилозы в крахмале в сравнении с гладкосемянными сортами Оплот. Исключением был сорт Виолена, у которого содержание амилозы в крахмале существенно уступало и гладкосемянным и мозговым сортам.

Еще одним доказательством отличной от других проанализированных мозговых сортов генетической природы сорта Виолена служат результаты его скрещиваний с сортами-носителями мутации *r*. Первое поколение гибридов такого типа имело семена с фенотипом, подобным гладкосемянным формам гороха, хотя оба родительских компонента гибридов имели морщинистые семена.

Таким образом полученные результаты свидетельствуют, что по совокупности проанализированных признаков сорт Виолена является носителем неаллельной к мутации *r* рецессивной мутации, которая по типу эффекта соответствует мутации *rb* и известно, что ее носители отличаются мозговым фенотипом семян, простыми крахмальными гранулами и сниженным содержанием амилозы в крахмале в сравнении и с гладкосемянными и с мозговыми сортами-носителями мутации *r* [7, 12, 16].

Что касается эффекта мутации *rb* по содержанию крахмала, то мнения разных авторов полностью совпадают в признании факта существенного снижения содержания крахмала этой мутацией в сравнении с гладкосемянными горохами. Вместе с тем одни авторы [12] считают, что мутация *rb* снижает содержание крахмала в той же мере, что и мутация *r*, тогда как другими авторами [7, 15, 16] показано, что мутация *r* сильнее снижает содержание крахмала, чем мутация *rb*. При этом полученные результаты подтвердили неаллельную природу мутаций *r* и *rb*, первая из которых локализована в седьмой хромосоме, тогда как вторая — в третьей [21].

Самым эффективным способом практического использования мутации *rb* считается получение ее комбинации с мутацией *r*, поскольку

носители рецессивных гомозигот по обоим этим локусам значительно уступают по содержанию крахмала носителям моногенных рецессивов по каждому локусу [12, 15]. Есть все основания предполагать, что такая сильная депрессия содержания крахмала сопровождается значительным повышением содержания сахаров в семенах технической спелости и улучшением органолептических характеристик овощного гороха. Поэтому выделенный в наших опытах генетический источник рецессивной мутации *rb* был включен в систему регулярных скрещиваний с неродственными по происхождению сортами-носителями мутации *r* для создания на этой основе исходного материала для селекции овощного гороха. Этот генетический источник зарегистрирован в Национальном центре генетических ресурсов растений Украины.

Выводы

Выделен оригинальный генетический источник крахмала-модифицирующей моногенной мутации гороха *rb*, который включен в гибридизацию с источниками мутации *r* для расширения генетической основы селекции овощных сортов гороха.

Список литературы

1. Мережко А. Ф. Принципы поиска, создания доноров ценных признаков в селекции растений // Идентифицированный генофонд растений и селекция. — СПб, 2005. — С. 189–205.
2. Андреев Н. П. Основы производства нативных крахмалов (научные аспекты). — М.: Пищепромиздат, 2001. — 289 с.
3. *Carbohydrates in grain legume seeds: Improving nutritional quality and agronomic characteristics* / C. L. Hedley Ed. — Wallingford, UK: CAB Int. Publ., 2001. — 322 p.
4. Casey R., Domoney C., Smith A. M. Biochemistry and molecular biology of seed products // *Peas: genetics, molecular biology and biotechnology*; R. Casey, D. R. Davies Eds. — Cambridge: CAB Int., 1993. — P. 121–164.
5. Jansman A. J. M. Bioavailability of proteins in legume seeds // *Grain Legumes*. — 1996. — № 11. — P. 18–19.
6. *Starch chemistry and technology*, 3rd ed. / J. Be Miller, R. Whistler Eds. — Amsterdam — Boston — Heidelberg — London — New York — Oxford — Paris — San-Diego — San Francisco — Singapore : Acad. Press, Elsevier Publ., 2009. — 900 p.

7. Hedley C. L., Bogracheva T. Ya., Lloyd J. R., Wang T. L. Manipulation of starch composition and quality in pea seeds // Agri-food quality: an intradisciplinary approach / G R. Fenwick, C. L. Hedley, R. C. Richards, S. Khorkar Eds. — Cambridge : Royal Soc. Chem., 1996. — P. 138–148.
8. Boyer C. D., Hannah L. C. Kernel mutants of corn // Specialty Corns; A. R. Hallauer Ed. — Boca Raton — London — New York — Washington, D. C. : CRC Press, 2001. — P. 10–40.
9. Gritton E. T. Pea breeding // Breeding vegetable crops: M. J. Basset Ed. — Westport, CT : AVI Publ. Co., 1986. — P. 283–319.
10. Genetic improvement of vegetable crops / G. Kaloo, B. O. Berghat Eds. — Oxford: Pergamon Press, 1993. — 833 p.
11. Василенко А. О., Дерезізова О. Ю., Тымчук С. М., Поздняков В. В., Тымчук В. М. Вміст сухої речовини та цукрів у технічно стиглому зерні різних сортів овочевого гороху // Таврійський науковий вісник. — 2011. — Вип. 76. — С. 26–33.
12. Wang T. L., Hedley C. L. Genetic and developmental analysis of the seed // Peas: genetics, molecular biology and biotechnology; R. Casey, D. R. Davies Eds. — Cambridge: CAB Int., 1993. — P. 83–120.
13. Martin C., Smith A. Starch biosynthesis // The Plant Cell. — 1995. — V. 7. — P. 971–985.
14. Hylton C., Smith A. M. The *rb* mutation of peas causes structural and regulatory changes in ADP glucose pyrophosphorylase from developing embryos // Plant Physiol. — 1992. — V. 99. — P. 1626–1634.
15. Wang T. L., Bogracheva T. Y., Hedley C. L. Starch: as simple as A, B, C? // J. exp. Bot. — 1998. — V. 49. — P. 481–502.
16. Lloyd J. R., Wang T. L., Hedley C. L. An analysis of seed development in *Pisum sativum*. XIX. Effect of mutant alleles at the *r* and *rb* loci on starch grain size and on the content and composition of starch in developing pea seeds // J. exp. Bot. — 1996. — V. 47. — P. 171–180.
17. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта. — М. : Агропромиздат. — 1985. — 351 с.
18. Методы биохимического исследования растений / Под ред. А. И. Ермакова. — Л. : Агропромиздат, 1987. — 430 с.
19. Juliano B. O. A simplified assay for milled-rice amylase // Cereal Sci. Today. — 1971. — Vol. 16. — P. 334–340.
20. Лакин Г. Ф. Биометрия. — М. : Высшая школа, 1973. — 343 с.
21. Weeden N. F., Wolko B. Linkage map for the garden pea (*Pisum sativum* L.) // Genetic maps. Locus maps of complex genomes, 5th ed.; S. J. O'Brien Ed. — Cold Spring Harbor — New-York : Cold Spring Harbor Lab. Press, 1990. — P. 6.106–6.112.

Представлено Т. К. Терновською
Надійшла 10.03.2017

ОЦІНКА КОЛЕКЦІЙНИХ ЗРАЗКІВ ГОРОХУ ПОСІВНОГО (*PISUM SATIVUM* L.) НА НАЯВНІСТЬ НОСІЇВ МУТАЦІЇ *r* ТА *rb*

А. О. Василенко¹, С. М. Тымчук², В. В. Поздняков¹,
О. Ю. Дерезізова¹, І. М. Безуглий¹

¹ Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН
61060, Україна, м. Харків, пр-кт Московський 142,
e-mail: yuriev1908@gmail.com, antine12@mail.ru

² Інженерна академія України
61046, Україна м. Харків, ул. Дм. Пожарського, 2/10,
e-mail: eau.7788982@gmail.com

Мета. Провести оцінку колекційних зразків гороху посівного для ідентифікації носіїв мутації *r* та *rb*. **Методи.** Вирощування зразків гороху проводили в польових умовах і насіння отримували від контрольованого самозапилення. Визначення форми крохмальних гранул проводили по мікрофотографіям. Гранули фотографували за допомогою комп'ютерної цифрової камери DMC-300 на мікроскопі «Біолам-15» (об'єктив × 40). Вміст крохмалю визначали поляриметричним методом Еверса, а вміст амілози — колориметричним методом В. О. Juliano. Отримані результати обробляли статистично. Вирощування зразків проводили у польових умовах. **Результати.** Підтверджено істотний ефект мутації *r* та *rb* по вмісту і фракційному складу крохмалю в насінні гороху. В середньому у гладконасінневих (*R*) зразків вміст крохмалю становив 39,94 %, а вміст амілози в крохмалі — 45,90 %, у носіїв мутації *r* — відповідно — 31,16 % та 67,70 %, а у носіїв мутації *rb* — 26,85 % та 28,15 %. Ідентифіковано зразок з мозковим насінням та простими крохмальними гранулами. Встановлено, що цей зразок є носієм рецесивної мутації гороху *rb*, що неалельна до мутації *r* і співпадає, за типом ефекту, з мутацією *rb*. **Висновки.** Виокремлено оригінальне генетичне джерело крохмаль-модифікуючої моногенної мутації гороху *rb*, що включено до гібридизації з джерелами мутації *r* з метою розширення генетичної основи селекції сортів гороху з мозковим типом насіння.

Ключові слова: горох посівний (*Pisum sativum* L.), генетичне різноманіття, мутації *r* та *rb*, фенотип насіння, форма крохмальних гранул, вміст крохмалю вміст амілози в крохмалі.

EVALUATION OF THE GREEN PEA (*PISUM SATIVUM L.*) COLLECTION FOR PRESENCE OF CARRIERS OF *r* AND *rb* MUTATIONS

A. A. Vasylenko¹, S. M. Tymchuk², V. V. Pozdnyakov¹, O. Yu. Derebizova¹, I. M. Bezuglyi¹

¹ Plant Production Institute nd. a. V. Ya. Yuryev NAAS
61060, Ukraine, Kharkiv, Moskovskiy pr., 142
e-mail: yuriev1908@gmail.com, antine12@mail.ru

² Academy of Engineers of Ukraine
61046, Ukraine, Kharkiv, Dm. Pozharsky str. 2/10
e-mail: eau.7788982@gmail.com

Objective. To evaluate the green pea (*Pisum sativum L.*) collection in order to identify carriers of *r* and *rb* mutations in it. **Methods.** Pea accessions were grown in the field, and seeds were produced under controlled pollination. The starch granule shape was determined in micrographs taken with a computer digital microscopic camera DMC-300 through a Biolam-15 microscope (object lens × 40). The starch content was determined polarimetrically by the Evers method and the amylose content colorimet-

rically — by the BO Juliano method. The data were statistically processed using analysis of variance. **Results.** The effect of *r* and *rb* mutations on the starch content and fractional composition in pea seeds was confirmed. In smooth-seed accessions the average starch content was 39,9 %, and the amylose content in starch was 45,9 %, while in *r* mutation carriers these contents were 31,2 % and 67,6 %, respectively, and in *rb* mutation carriers — 26,9 % and 28,2 %, respectively. An accession with marrowfat seeds, roundish starch granules and a low content of amylose in starch was identified. It was established that this accession was a carrier of a recessive mutation that is not allelic to *r* mutation and coincides with *rb* mutation by the effect type. **Conclusions.** A new genetic source of starch-modifying monogenic *rb* mutation of pea was identified. It was involved hybridization with sources of *r* mutation to expand the genetic basis of pea cultivar breeding. **Keywords:** peas, *Pisum sativum*, genetic diversity, *r*, *rb*, seed phenotype, starch grain shape, starch content, amylose content.