

**КОСТЕРИН**

**Олег Энгельсович**

**ЭВОЛЮЦИЯ И ГЕНОГЕОГРАФИЯ  
ДИКОРАСТУЩИХ ФОРМ РОДА ГОРОХ (*PISUM L.*)**

**03.02.07 – генетика**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**Диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук**

Новосибирск – 2017

Работа выполнена в лаборатории генетики и эволюции бобовых растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск

Официальные оппоненты:

**Агафонов Александр Викторович**,  
доктор биологических наук, старший научный сотрудник, ведущий научный сотрудник лаборатории интродукции редких и исчезающих видов растений, ФГБНУ Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения РАН, г. Новосибирск

**Горошкевич Сергей Николаевич**,  
доктор биологических наук, доцент, заведующий лабораторией дендрэкологии ФГБНУ Институт мониторинга климатических и экологических систем Сибирского отделения РАН, г. Томск

**Лухтанов Владимир Александрович**,  
доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории систематики насекомых ФГБНУ Зоологический институт РАН, г. Санкт-Петербург

Ведущая организация:

ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова», г. Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 201\_ г. на \_ заседании диссертационного совета Д 003.011.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, ученой степени доктора наук в ИЦиГ СО РАН в конференц-зале по адресу: 630090 г. Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, 10, тел. (383) 363-49-06, факс: (383) 333-12-78, e-mail: dissov@bionet.nsc.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института <http://www.bionet.nsc.ru>.

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 201\_ г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы** Горох (*Pisum sativum* L.) является одной из самых холодоустойчивых бобовых культур. Мировая продукция зернового гороха в 2009 г. составила 10,4 мегатонн (Smýkal et al., 2012). При этом бобовые культуры являются почти единственным источником растительного белка, составляющего у гороха 23-25% сухого веса семян (Bastianelli, 1998). Горох может приобрести важнейшее значение для продовольственной безопасности России, расположенной преимущественно в высоких широтах. Это уникальная культура, овощная, зерновая и кормовая, также использование гороха в севообороте в определенной степени восстанавливает плодородие почвы. При этом горох является и одной из наидревнейших культур, и старейшим генетическим объектом. В настоящее время особую важность приобрели такие задачи селекции, как увеличение продуктивности на единицу посевной площади в связи с растущим населением Земли и адаптация культур к меняющемуся климату. Показано, что потепление, наблюдавшееся с 1981 по 2002 гг. по всему земному шару, привело к потерям урожая основных культур – около 40 млн т (5 млрд долларов) (Lobell, Field, 2007). Потепление смещает области, благоприятные для возделывания определенных культур, к северу (Hatfield, 2011), при этом в будущем для большинства культур эти площади сократятся (Ramirez-Villegas et al., 2013).

Любая селекция основана на ресурсе генетического разнообразия. Для большинства культур генетическое разнообразие, доступное для традиционной селекции, оказывается лишь малой частью потенциально возможного. Доместикация большинства культурных растений происходила в ограниченном районе, откуда практика возделывания данной культуры распространялась вместе с первоначальным генетическим пулом. В последнее время данная точка зрения оспаривается сторонниками продолженной модели доместикации (Tanno, Wilcox, 2006; Weiss et al., 2006; Fuller, 2007; Allaby et al., 2008; Brown et al., 2009; Glémin, Battailon, 2009; Fuller et al., 2011, 2012; Asouti, Fuller, 2012). Эти авторы предполагают, что на Ближнем Востоке доместикация растений происходила по всей территории Плодородного полумесяца, включающего возвышенности Палестины и Ливана, Тавр, Антитавр, Загрос и бассейны Иордана, Оронта и истоков Тигра и Евфрата, т. е. на территории около 750 × 1 500 км, и была постепенным процессом, продолжавшимся около 3 тыс. лет. Сторонники гипотезы «первоначального ядра», полагают, что доместикация протекала в течение всего лишь сотен лет на территории не более 150 × 250 км, расположенной в турецком Курдистане (Lev-Yadun et al., 2000; Gopher et al., 2001; Abbo et al., 2010; 2011, 2012, 2013), где и в настоящее время распространены сообщества, включающие нескольких предков культур-основателей (Abbo et al., 2013).

Природное генетическое разнообразие рода Горох (*Pisum* L.), в диком состоянии широко распространенного в Средиземноморье и Передней Азии, оставалось за рамками как исследований, так и селекционной работы с горо-

хом, почти до конца XX в. Данные, полученные на основании разных молекулярных маркеров (Hoey et al., 1996; Lu et al., 1996; Ellis et al., 1998; Vershinin et al., 2003; Jing et al., 2007; 2010; Zaytseva et al., 2012, 2015), показали, что культурный горох представляет лишь одну из множества филетических ветвей вида посевной горох. Большинство прочих ветвей (за исключением узкоареального *Pisum abyssinicum*) никогда не вовлекалось в селекционный процесс. Специальное исследование 121 маркера, включая изозимы и RAPD, SSR и STS-маркеры, выявило очень небольшое генетическое разнообразие европейских сортов в сравнении с широким разнообразием, присущим виду в целом (Baranger et al., 2004).

К сожалению, авторы обзоров и экспериментальных работ, как правило, некритично воспроизводят таксономические концепции своих источников, тем самым поддерживая и углубляя таксономическую путаницу. Мы будем придерживаться последней системы рода по Н. Макстеду и М. Амброузу (Maxted, Ambrose, 2001). В этой системе принимаются существующими три вида гороха: горох красно-желтый (*Pisum fulvum* Sibth et Smith.), дикий; 2), горох посевной (*Pisum sativum* L.), представленный двумя подвидами, культурным *P. sativum* L. subsp. *sativum* и диким *P. sativum* L. subsp. *elatius* (Bieb.) Asch. & Graebn. sensu lato; 3) горох абиссинский (*Pisum abyssinicum* A. Br.)

Генетическое разнообразие диких форм гороха важно для селекции прежде всего по следующим направлениям: 1) устойчивость к вредителям и широкому спектру патогенов (см. ниже); 2) устойчивость к абиотическому стрессу, прежде всего к экстремальным температурам (Ali et al., 1994; Coyne et al., 2011); 3) питательная и кормовая ценность (North et al., 1989; Domoney et al., 1991; Bastianelli et al., 1998; Heng et al., 2006); 4) агротехнические преимущества, такие как ветвистость (Murfet, Reid, 1993), возможность зимовки; 5) особенности симбиотической азотфиксации. Объем данных, имеющийся по каждому из этих пунктов, убывает в порядке их приведения. Лучше всего изучен вопрос устойчивости. Известно, что *P. fulvum* устойчив к гороховой зерновке (Clement et al., 2002, 2009; Byrne et al., 2008; Aryamanesh et al., 2012, 2014), ржавчине (Barilli et al., 2009, 2010), мучнистой росе (Fondevilla et al., 2007b) и аскохитозу (Wroth, 1998; Fondevilla et al., 2005; Carrillo et al., 2013). Некоторые дикие формы посевного гороха показали устойчивость к нематоде *Heterodera goettigniana* (Vito, Perrino, 1978), паразите *Orobanche crenata* (Valderrama et al., 2004), мучнистой росе (Fondevilla et al., 2007a, 2008, 2011), фузариозам (McPhee et al., 1999; Hance et al., 2004), аскохитозу (Fondevilla et al., 2005; Carrillo et al., 2014) и белой гнили (Porter et al., 2009). Дикие формы рассматриваются как генетические ресурсы для преодоления абиотического стресса: так, у *P. fulvum* наблюдается высокая скорость роста и длина корней, у некоторых *P. sativum* subsp. *elatius* снижена испаряемость влаги, а образец из Италии выживает при температурах до  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Ali et al., 1994).

На пути к использованию генетического разнообразия диких форм гороха в селекции достигнуты скромные успехи по созданию перспективного исходного материала для селекции. Первым этапом является анализ наследования хозяйственно ценных признаков. В популяции гибридов  $F_2$  *P. sativum* и

*P. fulvum* было выявлено 3 главных и 5 второстепенных QTL, ответственных за 95 % изменчивости по устойчивости к гороховой зерновке за счет гибели личинок в семядолях, 3 главных и 2 второстепенных QTL в сумме отвечали за 70 % изменчивости по устойчивости за счет неспособности личинок проникнуть в семена и один QTL объяснял 8,8 % изменчивости по устойчивости за счет неспособности личинок проникнуть внутрь боба (Aryamanesh et al., 2014). У *P. fulvum* обнаружен ген с доминантным эффектом, обеспечивающий устойчивость к мучнистой росе, неаллельный двум генам с подобным эффектом, известным у посевного гороха (Fondevilla et al., 2010). В F<sub>2</sub> от скрещивания другого образца *P. fulvum* и культурного гороха локализован QTL, отвечающий за 63 % изменчивости по устойчивости к ржавчине (Varilli et al., 2010). Анализ гибридов образца P665 *P. sativum* subsp. *elatius* с культурным горохом выявил два QTL, отвечающих за устойчивость к заразице (Valderrama et al., 2004), два QTL устойчивости к стеблевой гнили (Fondevilla et al., 2012) и 16 QTL устойчивости к аскохитозу (Fondevilla et al., 2007a, 2008, 2011; Carillo et al., 2014). Лишь одна работа продвинулась дальше изучения наследования полезных свойств. Aryamanesh et al. (2012) выбрали устойчивый к зерновке гибрид в F<sub>5</sub> от скрещивания культурного гороха с *Pisum fulvum*, бэкроссировали его на культурный горох, после чего в течение 5 поколений вели отбор на устойчивость, получив 5 устойчивых линий и тем самым осуществив трансгрессию устойчивости от *P. fulvum* к *P. sativum*.

**Степень разработанности темы диссертации.** До недавнего времени ресурс природного генетического разнообразия гороха оставался не востребуемым и до сих пор очень мало изучен. В мировых коллекциях имеется всего около 100 образцов дикого гороха. В ходе репродукции этот материал подвергался риску спонтанного скрещивания с другими генотипами. Образцы старых сборов часто лишены достаточной информации об их происхождении. Лишь в последнее время появился интерес к максимально широкому сбору природного материала как дикого гороха, так и диких сородичей иных культур (Maxted, Kell, 2009; Maxted et al., 2012).

Использование природного разнообразия дикого гороха затруднено репродуктивными барьерами. Барьеры между посевным горохом и видами *Pisum fulvum*, *P. abyssinicum*, как минимум частично связаны с реципрокными транслокациями (Ben-Ze'ev, Zohary, 1973; Conicella, Errico, 1990; Errico et al., 1991). Однако роль транслокаций в создании репродуктивной изоляции у гороха преувеличена, поскольку полустерильность пыльцы и даже нарушения в мейозе вызываются также конфликтом ядра и пластид (Богданова, Галиева, 2009; Bogdanova et al., 2012; 2014; 2015). Еще одной проблемой является недостаточность знаний о разнообразии дикорастущих форм гороха. Как правило, генетики и селекционеры полагают таксоны гомогенными внутри и охорошо отличающимися друг от друга, как следствие, они часто не учитывают географическое происхождение образцов. Такой подход был назван «таксономической ловушкой» (Kosterin, Bogdanova, 2014).

Анализ разработанности темы диссертации говорит о необходимости нового, всестороннего и детального, с учетом географической и генетической информации, исследования диких представителей рода *Pisum* и пересмотра как его современной структуры, так и истории его дивергенции и расселения. Наведение порядка в этой области выглядит даже не столько своевременным, сколько запоздалым. В наши дни идет исчезновение местообитаний дикого гороха в связи с деградацией растительных сообществ вследствие прямого и непрямого воздействия человека.

**Цель и задачи исследования.** Работа выполнена в рамках актуальной и перспективной для селекции цели всестороннего изучения дикорастущих представителей рода Горох (*Pisum* L.), а именно его природного ареала и истории его формирования, эволюционной истории и современного генетического разнообразия. Задачами данной работы являлись:

1. Рассмотрение генетического разнообразия дикорастущих форм рода Горох в эволюционном, географическом и гибридологическом контекстах, а именно реконструкция филогении рода, истории его дивергенции и расселения его филетических линий по ареалу и характера их взаимодействия между собой.
2. Критический анализ имеющейся литературы по таксономии, биогеографии, экологии, филогенетике, филогеографии и репродуктивной совместимости дикорастущих форм рода Горох; а также проверка принадлежности к дикорастущим формам гороха имеющихся в наличии образцов, отнесенных к таковым в основных коллекциях генетических ресурсов культурных растений.
3. Формирование репрезентативной коллекции диких форм гороха и анализ ее в отношении ряда молекулярных маркеров. Формирование минимального базового набора образцов, представляющего генетическое разнообразие гороха Восточного Средиземноморья.
4. Выявление молекулярных маркеров, удобных для анализа геногеографии дикорастущих форм гороха и выделение на этой основе основных эволюционных линий внутри рода.
5. Проведение филогенетического анализа с использованием генов, кодирующих гистон H1, сопоставление результатов с полученными на основе других маркеров и выделение основных эволюционных линий гороха.
6. Нанесение на географическую карту распространения основных эволюционных линий гороха, выделенных на основе молекулярно-генетического анализа, и реконструкция истории эволюции и расселения рода.

7. Выявление образцов, наиболее близких к дикорастущему предку культурного гороха, и определение их современного ареала.

8. Выявление репродуктивных барьеров между образцами базового набора путем их реципрокного скрещивания по диаллельной схеме. Обсуждение полученных результатов в контексте различных концепций вида и таксономической системы рода Горох.

9. Уточнение внутривидовой таксономии *Pisum sativum* с учетом выявленного генетического разнообразия, генетического родства и репродуктивной совместимости исследованных представителей вида.

**Научная новизна работы.** Среди культурных растений горох отличается одним из наиболее обширных ареалов своих диких сородичей. Более того, эти сородичи принадлежат к тому же самому виду, что и сам культурный горох, тогда как ареалы двух других видов гороха ограничены по площади и полностью перекрываются ареалом гороха посевного. Неудивительно, что на такой территории горох претерпел значительную дивергенцию локальных популяций, что, однако, не нашло своего адекватного отражения в существующей таксономии. Проведенный филогенетический анализ с точной географической привязкой образцов, в сочетании с геногеографическим анализом распространения аллелей нескольких эволюционных маркеров, позволил выявить основные линии эволюции посевного гороха в природе и, что наиболее важно, проследить их распространение по ареалу гороха. Это дало возможность реконструировать историю заселения ареала различными эволюционными линиями гороха. Посредством гибридологического анализа данная картина была дополнена паттерном реципрокной репродуктивной изоляции представителей основных эволюционных линий. В совокупности, эти данные значительно углубляют знания о составе, структуре и истории рода горох и тем самым способствует эффективному использованию его разнообразия.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Полученные представления о филогенетической структуре рода горох позволили выбрать представителей различных эволюционных ветвей в качестве небольшого набора линий, наиболее полно представляющих генетическую изменчивость гороха в природе. Такой набор удобен для использования в качестве исходного материала для селекции с вовлечением генетических ресурсов диких форм. Геногеографическое исследование природного ареала рода горох выявило частные ареалы отдельных эволюционных ветвей, включая их периферические области, где дикие формы существуют в экстремальных природных условиях. Это открывает перспективы для более адресной селекционной работы, направляя поиск скрытого генетического разнообразия дикорастущих форм в природе и облегчая выбор генетически контрастных форм, адаптированных к экстремальным условиям среды. По результатам работы разработа-

на одна практическая рекомендация по повышению эффективности отдаленных скрещиваний гороха с участием дикорастущих форм. Некоторые результаты работы использованы в курсе лекций «Генетика», читаемом автором на третьем курсе Факультета естественных наук и Медицинского факультета Новосибирского Национального Исследовательского Государственного Университета.

**Методология и методы диссертационного исследования.** Работа основана на анализе литературных данных, сборе репрезентативного материала дикорастущих форм гороха и его экспериментальном исследовании. Анализ литературных данных носил критический характер, прежде всего в отношении дикорастущего либо культурного статуса обсуждаемых форм, принимаемой авторами таксономической системы рода Горох (*Pisum L.*) и используемого ими критерия вида; кроме того, с большой осторожностью рассматривались данные о наличии у тех или иных дикорастущих форм кариологических отличий от культурного подвида гороха. Репрезентативный материал по дикорастущим формам гороха собирался из разных источников – из мировых генетических коллекций ФИЦ Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (Санкт-Петербург, Россия), фирмы «Агритек» (Шумперк, Чешская Республика), Центра Джона Иннеса (Норидж, Великобритания), а также собственных сборов в природе. Выращивание растений и их скрещивание проводилось в гидропонной теплице Лаборатории искусственного выращивания растений ФИЦ ФГБНУ Институт цитологии и генетики ИГиГ СО РАН. Из молекулярно-биологических процедур использовались электрофорез белков в полиакриламидном геле в кислых условиях, полимеразная цепная реакция, анализ полиморфизма длины рестрикции амплифицированных фрагментов (CAPS-анализ), секвенирование ДНК по Сэнгеру; обработка последовательностей проводилась общепринятыми пакетами программ.

**Личный вклад автора.** Анализ литературных данных проводился автором. Поиск и сборы природных новых образцов дикого гороха проводился лично автором либо по его инициативе. Основной объем CAPS-анализа маркеров *rbcL*, *cox1* и электрофоретический анализ SCA проводился автором. Секвенирование спейсера *psbA-TrnH* и генов гистона H1 и филогенетический анализ последних проводился совместно с О.О. Зайцевой и А.В. Мглинцом. Геногеографические реконструкции проводились автором. Выращивание образцов гороха и анализ признаков гибридов проводились автором, скрещивания – автором при участии В.С. Богдановой.



## Основные положения, выносимые на защиту.

- Филогенетическая и геногеографическая реконструкция истории рода требует таксономического переопределения материала, уточнения его дикорастущего либо культурного статуса и учета географического происхождения; многие образцы гороха, значащиеся в мировых генетических коллекциях в качестве дикорастущих, не являются таковыми.
- Дикорастущие формы посевного гороха глубоко дивергировали на две эволюционные линии, маркированные комбинациями трех диморфных молекулярных маркеров из трех клеточных геномов и хорошо выявляющиеся на филогенетических реконструкциях на основе генов гистона H1.
- Вид *Pisum sativum* возник в Восточном Средиземноморье, имея предковую комбинацию А молекулярных маркеров *rbcL*, *cox1* и *SCA*, расселился на запад по Северной Африке, проник в Южную Европу, приобретя промежуточную комбинацию С, откуда в ходе обратной, восточной миграции в Причерноморье вновь проник в Восточное Средиземноморье, имея апоморфную комбинацию В и встретившись с носителями исходной комбинации А в Закавказье и Малой Азии.
- Культурный подвид посевного гороха возник в результате доместикации представителей эволюционной линии В.
- Делеция размером в 8 нуклеотидов в пластидном спейсере *psbA-trnH* является удобным молекулярным маркером, специфичным для культурного подвида гороха.
- Первичная структура гена *His5* одного из субтипов гистона H1 информативна для разрешения филогении рода *Pisum* на меж- и внутривидовом уровне.
- Сложный и нересипрочный характер отношений репродуктивной совместимости между отдаленными представителями посевного гороха (*Pisum sativum*) не может быть адекватно учтен в иерархически организованной ботанической систематике, однако в качестве практического компромисса предлагается система из трех подвидов..
- Большинство дикорастущих форм посевного гороха не имеют реципрокных транслокаций, отличающих их от культурного подвида.

**Апробация результатов и степень их достоверности.** Материалы диссертации докладывались автором на русско-французской конференции «Проблемы и перспективы биотехнологии растений» 21-24 октября 2008 г., Новосибирск, на международной конференции «Генетика растений, геномика и биотехнология» 7-10 июля 2010 г., Новосибирск, на конференции ВОГиС «Проблемы генетики и селекции» 1-7 июля 2013 г., Новосибирск, на экспертном совещании по диким родственникам гороха 30 сентября – 1 октября 2013 г. в Центре Джона Иннеса в г. Норидж, Великобритания, а также на отчетных сессиях Института цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, 2007, 2008, 2011 и 2016 гг. Достоверность результатов обеспечена применением надлежащей статистической обработки данных, стандартными условиями выращивания растений в тепличном комплексе Лаборатории искусственного выращивания растений, воспроизводимостью данных по молекулярным маркерам, а также прохождением рецензирования и принятия в печать статей в международных журналах по профилю данного исследования, таких как “Heredity”, “Plant Science”, “Genetical Research”, “Gene”, “Molecular Biology Reports”, “Genetic Resources and Crop Evolution”, “Plant Genetic Resources: Characterisation and Utilisation”, “Euphytica”.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 30 статей, из которых 19 в изданиях, рекомендованных Перечнем ВАК РФ, и два учебных пособия.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 324 страницах, содержит 13 таблиц и 29 рисунков. Она состоит из введения, пяти глав, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Глава 1 представляют собой обзор литературы, Глава 2 – материалы и методы. Результаты исследований и их обсуждение представлены в Главах 3 – «Геногеография по молекулярным маркерам», 4 - «Опыт реконструкции филогении рода *Pisum* на межвидовом и внутривидовом уровне с использованием генов гистона H1» и 5 – «Репродуктивная совместимость базового набора образцов, отражающего генетическое разнообразие гороха восточного Средиземноморья». Список литературы содержит 391 источник, из которых 65 – на русском языке.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Глава 1, «Обзор литературы»** состоит из двух частей. Раздел 1.1 посвящен истории гороха как генетического объекта и его исследованию с применением различных генетических и молекулярно-генетических методов. Рассмотрены классические генетические работы на горохе (раздел 1.1.1), применение к гороху различных молекулярных методов по мере их разработки (1.1.2), проблема соответствия групп сцепления и хромосом как цитологических объектов (1.1.3), работы по протеому, транскриптому и расшифровке пластидного генома гороха и усилиям по расшифровке его ядерного генома

(1.1.4); раздел 1.1.5 представляет собой заключение первой части. Вторая часть обзора литературы, 1.2., посвящена таксономии, биогеографии, филогении и генетическому разнообразию рода *Pisum*. Рассмотрено место этого рода в таксономической системе и филогении бобовых растений (1.2.1), таксономия рода *Pisum* (1.2.2), в частности проблема излишнего дробления таксонов за счет генетической изменчивости фенотипа (1.2.2.1), проблема переоценки локально адаптивных признаков общего габитуса для таксономии (1.2.2.2), компромиссная система рода Н. Макстеда и М. Амброуза (1.2.2.3) и связанные с ней проблемы валидных названий (1.2.2.4) и парафилии (1.2.2.5) некоторых таксонов и непоследовательность выделения разновидностей внутри подвидов (1.2.2.6), проблемные таксоны, как то горох абиссинский (1.2.2.7), Йомарда (1.2.2.8), закавказский (1.2.2.9) и азиатский (1.2.2.10.). Далее детально рассматривается ареал (1.2.3), аутоэкология (1.2.4) и особенности популяций (1.2.5) дикорастущих представителей рода. В разделе 1.2.6 обсуждаются проблемы недостатка в генетических коллекциях генетического материала дикорастущего гороха и качества сопроводительной информации к нему, а именно, критерии дикорастущего статуса (1.2.6.1), дизруптивный отбор в ситуации гибридизации и симпатрии (1.2.6.2); основные мировые генетические коллекции гороха (1.2.6.3), отсутствие материала из восточной части ареала рода (1.2.6.4), проблемы дублирования материала в коллекциях (1.2.6.5), некритического использования первоначальных определений (1.2.6.6), а также контаминации и интрогрессии при воспроизведении коллекций (1.2.6.7). В разделе 1.2.7 рассмотрена природа репродуктивных барьеров в роде Горох, в разделе 1.2.8. – существующие гипотезы о сетчатой эволюции и гибридных таксонах в роде горох, в разделе 1.2.9 – существующие на данный момент попытки реконструкции филогении рода молекулярными методами. Завершает главу раздел 1.2.10 - геногеография как решение проблем филогенетики рода *Pisum*.

**Глава 2, «Материалы и методы»** состоит из шести разделов. Первые три посвящены исследованному материалу, а именно сбору дикорастущего гороха (*P. sativum* subsp. *elatius* s.l.) в природе, в результате которого мировая коллекция пополнилась 5 новыми образцами из Крыма, Южной Франции, Каталонии и Португалии (2.1), перечню использованных образцов гороха (2.2) и опытной проверке дикорастущего статуса образцов, полученных в качестве таковых (2.3), причем последний из упомянутых разделов является частью результатов, полученных в настоящем исследовании, в частности, в соответствии с которыми 15 образцов были исключены из дикорастущих. Далее следуют разделы, посвященные выращиванию растений (2.4), методам оценки репродуктивной совместимости, включая статистическую обработку полученных данных (2.5) и молекулярные методы анализа (2.6), как-то: выделение ДНК (2.6.1), полимеразная цепная реакция, рестрикция эндонуклеазами и секвенирование (2.6.2), выделение и электрофорез альбуминов семян (2.6.3) и компьютерный анализ последовательностей (2.6.4).

## Глава 3. «Геногеография по молекулярным маркерам»

**3.1. Три диморфных диагностических маркера.** Исследование трех диморфных молекулярных маркеров из трех разных геномов клетки позволило разбить все многообразие рода Горох на три группы, хорошо различимые и на филогенетических реконструкциях. Обнаружение этих маркеров было в значительной степени случайным. Ядерный маркер SCA является экстрагируемым хлорной кислотой альбумином семян (Smirnova et al., 1992), который анализировался электрофоретически на белковом уровне: различается «медленный» вариант SCA<sup>s</sup>, имеющий 9 остатков лизина, и «быстрый» вариант SCA<sup>f</sup> с 10 остатками лизина. В качестве пластидного маркера был выбран фрагмент гена *rbcL* (Bogdanova, Kosterin, 2005), в качестве митохондриального – фрагмент гена *cox1* (Bogdanova, Kosterin, 2006). В случае обоих генов амплифицированный участок различался наличием либо отсутствием сайта опознания определенной эндонуклеазой рестрикции (соответственно AspLEI и PsiI), соответствующие пары аллелей, различимые при помощи CAPS-анализа, обозначены *rbcL+* и *rbcL-* и *cox1+* и *cox1-*.

Три обсуждаемых гена находятся в разных геномах и никак функционально не связаны; более того – сайт рестрикции в гене *rbcL* создается синонимичной заменой, не влияющей на функции белка. Тем не менее, широко-масштабный скрининг коллекции гороха выявил три наиболее часто встречающиеся комбинации аллелей этих маркеров, две же из трех возможных других комбинаций встречены крайне редко. Одна из комбинаций, (*rbcL+*, *cox1+*, SCA<sup>f</sup>), обозначенная буквой А, найдена у всех трех видов гороха и была единственной комбинацией у *P. fulvum* и *P. abyssinicum*, таким образом, она является предковой для рода. Тем самым было определено направление эволюции аллельного сосотояния трех маркеров от комбинации А к комбинации В в следующей последовательности: А → С → D → В (А: SCA<sup>f</sup>, *rbcL+*, *cox1+*; С: SCA<sup>f</sup>, *rbcL+*, *cox1-*; D: SCA<sup>f</sup>, *rbcL-*, *cox1-*; В: SCA<sup>s</sup>, *rbcL-*, *cox1-*); неалфавитная последовательность букв связана с тем, что исторически первыми были обнаружены комбинации А и В.

Комбинация А найдена у всех 11 исследованных образцов *P. fulvum*, у всех 7 исследованных образцов *P. abyssinicum* и у 12 (27%) из 44 исследованных образцов *P. sativum* subsp. *elatius*. Комбинация С найдена только у *P. sativum* subsp. *elatius*, а именно у 17 образцов (37%). Комбинация D найдена у единственного образца *P. sativum* subsp. *elatius* с Сицилии и у 5 образцов, относящихся к *P. sativum* subsp. *sativum*, из которых три принадлежат сомнительному таксону *jomardii*, образованному староместными культурными формами из Египта (см. раздел 2.4.2). Комбинация В найдена у 13 (30%) образцов *P. sativum* subsp. *elatius* и у 38 (86%) из 44 проанализированных образцов *P. sativum* subsp. *sativum*. Редкие комбинации найдены у 1 образца *P. sativum* subsp. *elatius* и у 1 образца культурного подвида. Состав комбинаций трех маркеров у 15 образцов, первоначально классифицированных как дикие, но не оказавшихся таковыми, оказался разнообразен: 2 образца комбинации А, 7 образцов комбинации В, 2 образца комбинации D и 4 образца редкой

комбинации. Образцы с комбинацией В, скорее всего, являются неправильно классифицированными представителями культурного подвида. Пять образцов с комбинациями D и R, и 2 образца с комбинацией А, по видимому, являются продуктами недавней интрагнессии дикого и культурного посевного гороха. Тот факт, что два небольших вида рода *Pisum* имеют комбинацию А, культурный подвид *P. sativum* subsp. *sativum* в подавляющем большинстве имеет комбинацию В, а образцы предкового для него дикорастущего подвида *P. sativum* subsp. *elatius* примерно поровну разделились на носителей комбинаций А, В и промежуточной комбинации С, свидетельствует, что комбинация В возникла из комбинации А путем фиксации трех мутаций, внутри подвида *P. sativum* subsp. *elatius*, и именно носитель комбинации В был domesticiрован на Ближнем Востоке.

**3.2. Географическое распространение комбинаций диагностических маркеров.** На Рис. 1 показаны места происхождения имеющихся в нашем распоряжении образцов дикорастущего подвида посевного гороха *P. sativum* subsp. *elatius*. Наиболее широкий ареал, простирающийся от Алжира до Грузии имеет плезиоморфная (предковая) комбинация А, при этом она занимает южную часть естественного ареала рода в целом. Носители этой комбинации известны из Алжира, с Менорки (единственные образцы оттуда), из Израиля, где подавляющим образом преобладают (7 из 8 картируемых образцов), из Турции (2 образца) и Грузии (1 образец). Представители комбинации С имеют наиболее компактный ареал, охватывающий Южную Европу, включая остров Сицилию, полуострова Пиренейский, Апеннинский и Афон и континентальные районы - Южную Францию и Южную Венгрию. Единственный дикорастущий носитель с комбинацией D также происходит из Сицилии (второй образец оттуда). Представители комбинации В находимы на востоке ареала вида: на юге Восточной Европы (Болгария, Крым), Кавказе (Грузия), на юге Турции, в Сирии и на спорной территории Голанских высот.

**3.3. Реконструкция истории расселения дикого гороха в Средиземноморье.** Данные Рис. 1 позволяют реконструировать следующий филогеографический сценарий. В настоящее время наибольшее разнообразие дикорастущих форм *P. sativum* обнаруживается в Леванте в узком смысле (Израиль, Сирия, Ливан, Иордания), который является также ареалом второго дикорастущего вида гороха, *P. fulvum*. Это говорит в пользу того, что местом возникновения и первичного расселения рода *Pisum* являлась Передняя Азия или конкретно Левант (в узком смысле), откуда носители предковой комбинации А расселились в Северную Африку и, возможно, Малую Азию вплоть до Закавказья. Колонизация диким горохом Южной Европы сопровождалась фиксацией мутации в гене *cox1*, превратившей комбинацию А в комбинацию С, представители которой занимает этот регион в наши дни. Кроме того, представитель комбинации С найден на Сицилии. Эта колонизация могла быть связана с одним из похолоданий плейстоцена, сопровождавшихся падением уровня моря и возникновением сухопутных мостов.

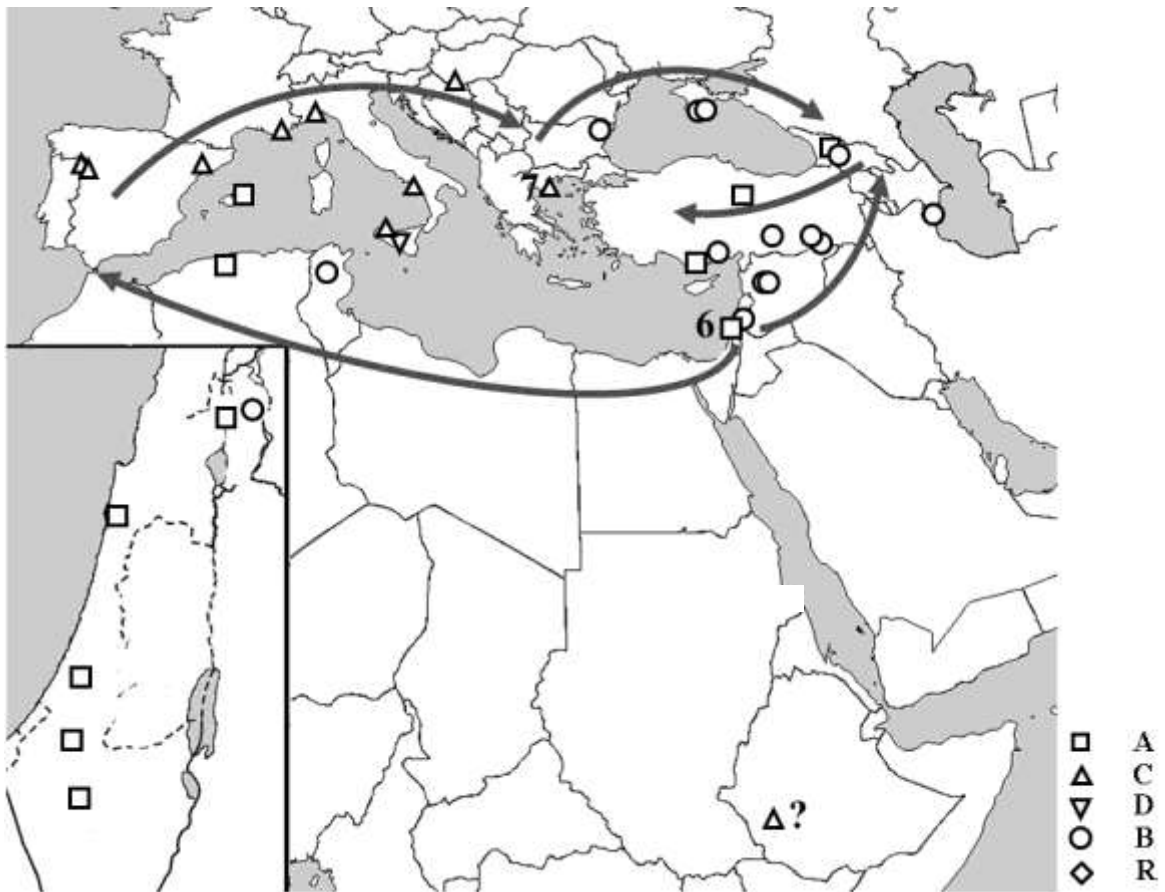


Рис. 1. Географическое распространение дикорастущих форм *P. sativum* (*P. sativum* subsp. *elatius*), несущих различные комбинации (А, С, D, В) трех изучаемых маркеров. Цифры отражают количество образцов из одной точки в масштабе карты. Вынос показывает происхождение израильских образцов. Стрелки показывают направления предполагаемых миграций.

Следующая переходная комбинация D найдена у единственного дикорастущего образца также из Сицилии, и о каком-либо современном ареале носителей комбинации D говорить не приходится. Однако эта комбинация с необходимостью была переходным звеном к комбинации В, носители которой широко распространены и в наше время, имея четко очерченный ареал, занимающий северо-восточную и восточную часть ареала вида (и рода): Болгария, Крым, Закавказье, Сирия и Турция, причем в трех последних регионах они сосуществуют бок о бок с носителями предковой комбинации А.

Таким образом, мы можем реконструировать возникновение вида *P. sativum* (и рода *Pisum*) в Восточном Средиземноморье, его миграцию на запад, а потом и на северо-запад, и обратную миграцию в восточном направлении в Восточное Средиземноморье через Тавро-кавказский регион, в результате чего мигранты встретились с автохтонными формами, оставшимися на месте своего возникновения. В ходе этой миграции были зафиксированы мутации в трех изученных нами маркерах, превратившие комбинацию А в комбинацию В. Доместикация гороха, вместе с другими культурами-основателями, происходила в Леванте. Хотя Передняя Азия была возможной родиной гороха посевного как вида и дикорастущих форм *P. sativum* с предковой комбинацией

А, не они, а именно носители комбинации В были доместифицированы и дали начало всему культурному подвиду *P. sativum* subsp. *sativum*.

**3.4. Попытка сужения области вероятного происхождения культурного гороха путем анализа межгенного спейсера *psbA-trnH*.** Пластидный межгенный спейсер *psbA-trnH*, рекомендован для баркодинга растений (Kress et al., 2005; Kress, Erickson, 2007; Sass et al., 2007). У гороха он оказался коротким – у большинства образцов всего 201 н. п., при диапазоне 119-1094 у цветковых растений (Kress et al., 2005). Он был просеквенирован нами у 74 образцов, в частности у всех имеющихся дикорастущих. Всего выявлено 5 аллелей; от базового аллеля, доминирующего среди дикорастущих форм, четыре остальных отличались двумя нуклеотидными замещениями, делецией и дупликацией. Замена С→Т в позиции 64 была обнаружена у всех трех анализированных образцов *P. abyssinicum* и только у них. Замена Т→G в позиции 75 была найдена у пяти образцов из разных регионов, четыре из которых – дикорастущие. Совершенная тандемная дупликация АТGАААА в позициях 165-171 найдена у двух дикорастущих образцов из Причерноморья.

Делеция одной копии совершенной тандемной дупликации ТTAGAAGA в позициях 142-149 найдена у 14 из 15 проанализированных представителей культурного подвида (*P. sativum* subsp. *sativum*); исключительный образец несет признаки контаминации. Мы можем таким образом предположить, что эта делеция имела уже у предка культурного подвида. В связи с этим возникает вопрос – какие дикие образцы имеют ту же делецию. Мы нашли ее у семи образцов, исходно классифицированных как дикие. Однако только два из них – WG10925 из Болгарии и VIR2998 из Грузии – оказались действительно дикорастущим горохом со спонтанно раскрывающимися бобами. Болгария и Грузия не фигурируют в реконструкциях места доместикации гороха, хотя Закавказье недалеко от Юго-Восточной Турции, где она предположительно имела место (Lev-Yadun et al., 2000).

**3.4. Внешние признаки дикорастущих представителей *Pisum sativum* в свете их геногеографического анализа.** После критического пересмотра материала по дикорастущему гороху и исключения образцов, имеющих нераскрывающиеся бобы (фенотип *dro*) оказалось, что большинство дикорастущих представителей линии В имеют неяркие, почти не раскрывающиеся цветки на коротких цветоносах. У двух образцов из Турции парус раскрывается, цветки, тем не менее, мелкие и бледноокрашенные. Лишь образцы SE2 (Крым), VIR2998 (Грузия) и VIR4014 (Армения) из Закавказья имеют «нормальный гороховый» цветок – среднего размера, широкооткрытый, с окрашенными крыльями. Напротив, все носители комбинаций А и С имеют широкооткрытые цветки с интенсивной антоциановой пигментацией хотя бы на крыльях; цветоносы от очень коротких до очень длинных. У группы низкорослых образцов из Израиля («южный *humile*») 711-714 цветки мелкие, с коротким парусом, но широкооткрытые, с той или иной степени интенсивности пигментацией на парусе. Среди носителей комбинации А един-

ственным исключением является необычный образец из Грузии WG26109 со слабо пигментированными, не всегда раскрывающимися цветками на длинных цветоносах. Скорее всего, первоначально линия В имела нормально развитый цветок; такой горох сохранился в дикости в Закавказье и именно он был domestцирован. Некоторая редукция цветка произошла у некоей сублинии в пределах эволюционной линии с комбинацией В, потомков которой мы в основном и находим в современной природе, наряду с носителями комбинаций А и С.

#### **Глава 4. «Опыт реконструкции филогении рода *Pisum* на межвидовом и внутривидовом уровне с использованием генов гистона H1»**

**4.1. Актуальность филогенетического исследования рода *Pisum* с использованием генов гистона H1.** Гистон H1 – облигатный белковый компонент хроматина эукариот, связывающийся с линкерной ДНК. Он участвует в стабилизации структуры хроматина высокого порядка (Allan et al., 1986; Bharath et al., 2003). Связь гистона H1 с ДНК лабильна и обратима, поэтому он находится в хроматине в состоянии динамического равновесия (Bustin et al., 2005; Misteli et al., 2000; Th'ng et al., 2005; Zlatanova et al., 2000), а его относительная концентрация меняется от ткани к ткани (Fan et al., 2003, 2005; Pearson et al., 1984). Таким образом, гистон H1 представляет собой весьма изменчивый компонент «молекулярной среды» для экспрессии любого гена генома. В отличие от коровых гистонов, гистон H1 – весьма эволюционно изменчивый белок (Doenecke et al., 1997; Happel and Doenecke, 2009), вплоть до того, что во многих неродственных группах организмов по нему наблюдался аллельный полиморфизм (Kosterin et al., 1994). У большинства организмов есть несколько неаллельных субтипов гистона H1, которые могут иметь определенную функциональную специфичность (Happel and Doenecke, 2009; Izzo et al., 2008; Ponte et al., 1998; Sancho et al., 2008) и различаться сродством к хроматину (De et al., 2002; Th'ng et al., 2005). Некоторые субтипы гистона H1 могут участвовать в регуляции экспрессии определенных наборов генов (Jedrusik and Schulze, 2001; Sancho et al., 2008; Takami et al., 2000). Спектр субтипов гистона H1 может меняться в ходе онтогенеза и в процессе клеточной дифференциации (Cole, 1987; Doenecke et al., 1997; Ponte et al., 1998) и быть важным фактором дифференциальной активности генов (Brown et al., 1996, 1997; Sera and Wolffe, 1998; Th'ng et al., 2005). Как следствие, изменчивость структуры молекулы гистона H1 может быть вовлечена в «доводку» паттерна экспрессии многих генов (Alami et al., 2003) и тем самым участвовать в адаптивной эволюции (Berdnikov et al., 1993a,b).

Так, у насекомых наблюдалась корреляция между изменчивостью электрофоретической подвижности гистона и числом видов в отряде, что говорит о регулярном участии генов гистона H1 в адаптивных процессах, сопровождающих видообразование (Berdnikov et al., 1993b). Выявлена отрицательная корреляция частоты одного из аллельных вариантов субтипа H1-5 в региональных выборках местных форм гороха с суммой температур вегета-



ционного периода (Бердников и др., 1989; Berdnikov et al., 1993a). В опытах с почти-изогенными линиями гороха, выявлено влияние замещений аллельных вариантов отдельных субтипов гистона H1 на некоторые количественные признаки (Berdnikov et al., 1999, 2003; Bogdanova et al., 1994, 2007).

Вследствие высоких темпов эволюционной изменчивости гены гистона H1 могли бы оказаться полезными для филогенетических реконструкций на достаточно малых отрезках времени, вплоть до внутривидового уровня. Однако использование генов гистона H1 в качестве филогенетических маркеров встречает затруднение в виде отсутствия универсальных праймеров. Перспективными могут оказаться подходы, основанные на использовании эволюционной консервативности глобулярного домена этой молекулы.

Ранее мы установили, что гистон H1 гороха представлен как минимум семью неаллельными субтипами 1-7, кодируемыми уникальными паралогичными генами, пять из которых (субтипы 2-6) тесно сцеплены в кластер *His(2-6)* длиной около 1,5 сМ (Kosterin et al., 1994). Наиболее электрофоретически подвижный субтип 7 присутствует лишь в хроматине молодых тканей (там же). Расшифрованные на данный момент гены субтипов 1, 3, 5, 6 и 7 содержат интрон (Berdnikov et al., 2003a; Bogdanova et al., 2005; 2007 и неопубл.), что соответствует репликационно-независимым гистонам, однако субтип 7 имеет свойства замещающего гистона.

**4.2. Изменчивость первичной структуры генов субтипов 5 и 7 гистона H1 гороха.** Для секвенирования мы прежде всего выбрали минорный субтип 5, кодируемый геном *His5*, входящим в кластер *His(2-6)*, поскольку первичная структура его кодирующей части и ближайшего окружения была установлена ранее (Bogdanova et al., 2005). Кроме того, для одного из аллелей гена *His5* были получены свидетельства его возможного участия в адаптации к холодному климату у примитивных культурных форм (Berdnikov et al., 1993a), что вызывает дополнительный интерес к этому гену. Ген *His5* был просеквенирован у 65 дикорастущих и культурных образцов гороха. Всего выявлено 36 аллелей гена *His5*, а среди них – 14 групп, включающих более одного образца и имеющих идентичные аллели *His5*. В 36 выявленных аллелях в сумме найдена 91 нуклеотидная замена в 87 полиморфных сайтах. Среднее нуклеотидное разнообразие  $Pi$  составило 0,0147, частота синонимичных замен на синонимичный сайт была оценена (с помощью модели Джукса-Кантора) как 0,027, а несинонимичных замен на несинонимичных сайт – как 0,010, отношение второй величины к первой  $\omega = 0,37$ . Выявлено 45 изменчивых аминокислотных сайтов, 10 из них – в N-терминальном гидрофильном домене молекулы (его длина составляет 50 аминокислотных остатков), 5 – в центральном глобулярном домене (длиной 68 остатков) и больше всего – 29 – в протяженном C-терминальном гидрофильном домене, составляющем 129-142 аминокислотных остатков. В C-терминальном домене ожидаемо найдено несколько делеций и дупликаций. Инсерция 7 аминокислотных остатков в позиции 178, представляющая собой третью копию тандемного повтора КРКАААА, была найдена у двух образцов *P. fulvum*, а делеция остатков КРКАВА в той же по-

зиции – еще у четырех образцов также *P. fulvum*; т.е. данный район С-терминального домена оказался изменчив именно в пределах этого вида, у которого найден и «стандартный» вариант последовательности. Делеция 5 аминокислотных остатков в позиции 235 обнаружена у местного образца культурного гороха из Таджикистана. Таким образом, среди 12 образцов *P. fulvum* мы нашли дупликацию (2 образца) и делецию (4 образца), против одной делеции у 53 образцов *P. sativum*.

Весьма интересна группа из 10 образцов (для трех из них последовательность расшифрована частично), имеющая аллель, несущий замену остатка лизина на остаток аспарагина, что приводит к замедлению электрофоретической подвижности белка. Именно такая электроморфа демонстрирует отрицательную корреляцию с суммой температур вегетационного периода, так что наибольшая его частота обнаруживается в Северной России, Таджикистане и Афганистане (Бердников и др., 1989; Berdnikov et al., 1993a). Мы сделали предположение, что этот аллель имеет селективное преимущество в условиях более сурового климата. Оказалось, что эти 10 образцов, происходящих из отдаленных регионов, имеют идентичный аллель гена *His5*, что говорит о его недавнем расселении.

Ген *His7* кодирует самый электрофоретически мобильный субтип 7, присутствующий в хроматине только молодых, активно растущих органов растения (Kosterin et al., 1994). По всей видимости, его присутствие необходимо в транскрипционно-активном хроматине. Этот ген был просеквенирован нами у 56 образцов. Выявлено 32 аллеля, кодирующие 15 вариантов белка, и 43 нуклеотидных замены в 40 полиморфных сайтах; найдено 10 групп, включающих более одного образца с идентичными аллелями. Величина  $Pi$  составила 0,0123, частота синонимичных замен на синонимичный сайт - 0,036, а несинонимичных замен на несинонимичных сайт – 0,005,  $\omega = 0,15$ . В белковом продукте всего имеется 14 переменных позиций – 2 в консервативном глобулярном домене и 12 в С-терминальном домене. Как и в случае *His5*, делеции найдены только в участке гена, кодирующем С-терминальный домен молекулы. Делеция трех аминокислотных остатков KTS в позициях 98-100 обнаружена у дикорастущего образца из Греции, делеция KAAAKPKA в позициях 129-136 найдена у тестерной линии WL1238.

**4.3. Филогенетический сигнал генов «заменимого» и «незаменимого» субтипов H1-5 и H1-7 гистона H1 гороха.** На Рис 2. приведены филогенетические реконструкции, полученные методом максимальной парсимонии на основании первичной структуры генов *His5* и *His7*, расшифрованной для одного и того же набора из 56 образцов. Мы видим, что дерево, построенное на основании *His5*, дает хорошее филогенетическое разрешение, с несколькими ветвями, отличающимися очень хорошей бутстрап-поддержкой. Наоборот, дерево, реконструированное на основе гена *His7*, показывает низкую бутстрап-поддержку большинства кластеров, которые следует признать статистически недостоверными. Достаточную поддержку имеют лишь несколько очень мелких кластеров. Даже ветвь вида *Pisum fulvum* на этом дереве имеет бутс-

трап-поддержку всего 29%, причем два образца находятся за пределами этой ветви.

Параметр  $\omega$ , вычисляемый как отношение частоты несинонимичных замен среди несинонимичных сайтов к частоте синонимичных замен среди синонимичных сайтов, отражает давление очищающего отбора на последовательность. Значение этого параметра для *His5* оказалось в 2,5 раза выше, чем для *His7*. что означает более жесткие ограничения на белковый продукт гена *His7* по сравнению с *His5*. Это же отражается и в количестве различных аминокислотных последовательностей белковых продуктов, выявленных на одном и том же наборе образцов: 15 для субтипа Н1-7 против 25 для субтипа Н1-5. Заметим, что ни одна из 12 замен аминокислотных остатков у Н1-7 не меняет положительный заряд молекулы, тогда как у Н1-5 найдено 7 таких замен. При этом любопытно, что нуклеотидное разнообразие, а именно среднее число замен во всех парах последовательностей, по гену *His7* лишь немногим уступало таковому по гену *His5*.

Эти результаты предполагают, что функционально уникальный субтип Н1-7, по-видимому, находится под гораздо более жесткими эволюционным ограничениями, чем минорный субтип Н1-5, входящий в группу субтипов со сходными свойствами. Невысокая адаптивная ценность присутствия Н1-5 приближает изменчивость его гена к нейтральному режиму, оптимальному для реконструкции филогении, тогда как эволюционная изменчивость гена *His7* в основном ограничена синонимичными заменами. Таким образом, пригодность генов гистона Н1 для филогенетических реконструкций у растений зависит от того, какой именно из них выбран.

Филогенетическое дерево, реконструированное байесовским методом для конкатенированных последовательностей генов *His5* и *His7* показано на Рис. 3. Топология этого дерева в целом напоминает таковую, реконструированную только на основе *His5*, но в еще большей степени подчеркивает реальность важной дихотомии внутри вида. На этом дереве род *Pisum* имеет три равномошных ветви: 1) *P. fulvum*; 2) представители *P. sativum* subsp. *elatius*, имеющие комбинации А или С, а также *P. abyssinicum* (группа А) и 3) представители *P. sativum*, имеющие комбинацию В, как дикорастущие *P. sativum* subsp. *elatius* s.l., так и культурные *P. sativum* subsp. *sativum* – далее «линия В». Дерево, построенное на основе конкатенированных *His5* и *His7* методом максимального правдоподобия, имеет сходную топологию. Если на реконструкциях, основанных на одном только гене *His5*, носители комбинаций А и С образовывали группу, базальную для *P. sativum*, то добавление последовательности *His7*, которая сама не несет достаточного филогенетического сигнала, превратило эту группу в ветвь, равномошную ветвям *P. fulvum* и носителей комбинации В среди *P. sativum*. – далее «линия АС».

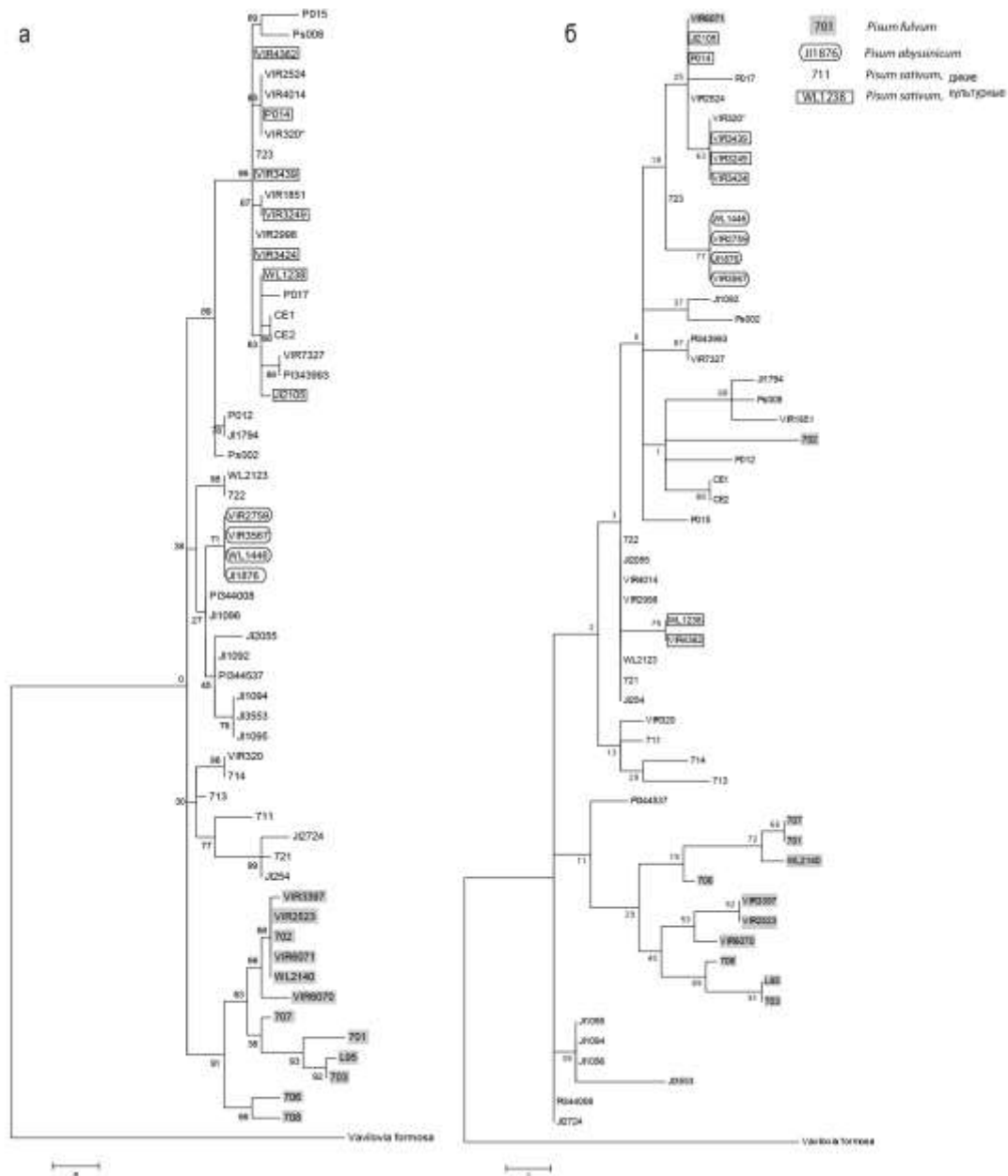


Рис. 2. Реконструкции филогенетического дерева представителей рода *Pisum*, полученные на одном и том же наборе из 56 образцов на основании первичной структуры генов *His5* (а) и *His7* (б) субтипов Н1-5 и Н1-7 гистона Н1, соответственно, методом максимальной парсимонии.

**4.4. Филогеографические следствия филогенетического анализа, проведенного на основании генов гистона Н1.** Все филогенетические реконструкции, включая наши, сходятся в том, что первая дивергенция рода *Pisum* отделяет хорошо очерченный вид *P. fulvum* и гетерогенный вид *P. sativum*, внутри которого имеются многие ветви разнообразных дикорастущих форм, маленькая ветвь *P. abyssinicum*, и мощная ветвь, включающая культурные формы *P. sativum*. В более ранних реконструкциях наиболее загадочной оставалась структура дикорастущих форм *P. sativum*, которая не могла быть адекватно разрешена ввиду путаницы в исходном материале. Наш анализ имеет два преимущества: 1) дикорастущие формы тщательно отделены от культурных и предположительно гибридных и 2)

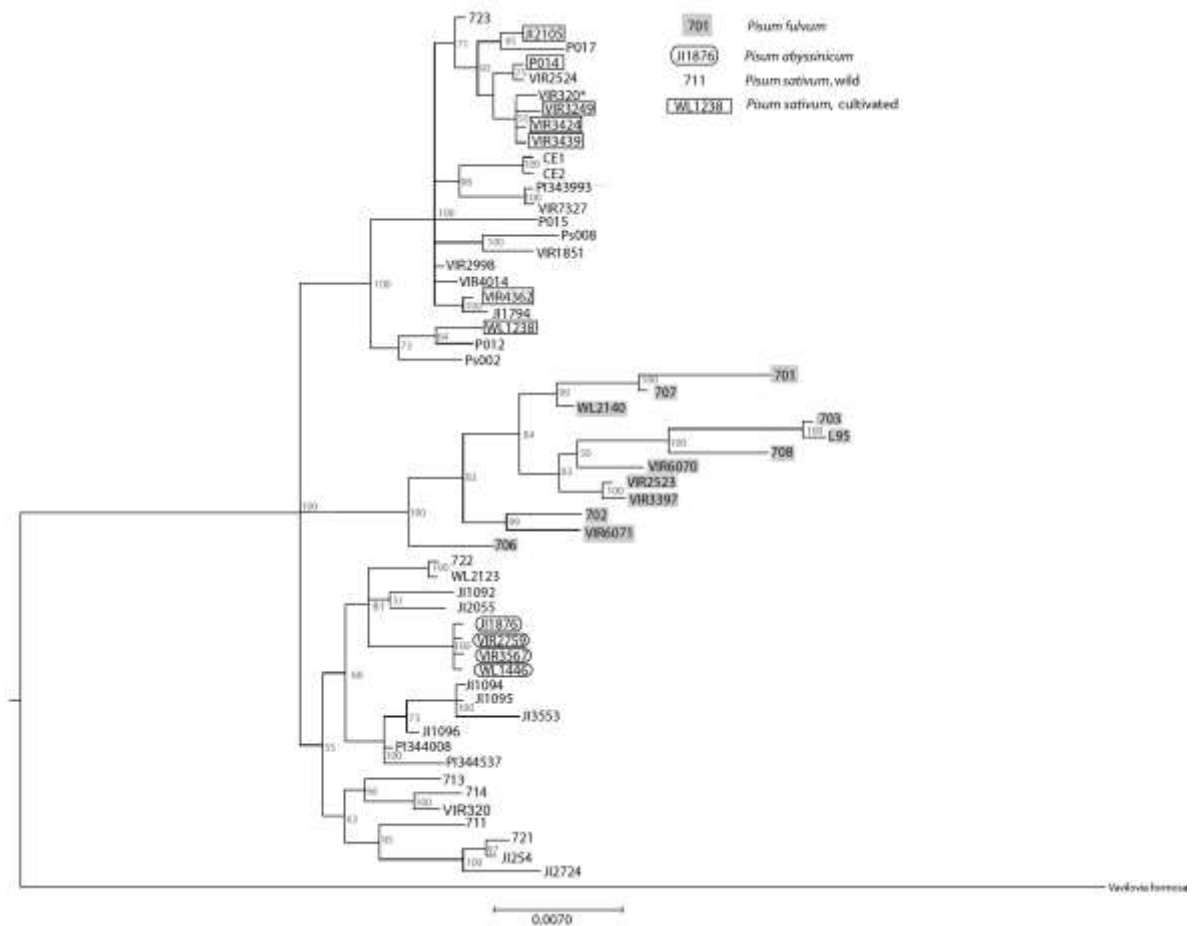


Рис. 3. Филогенетическое дерево представителей рода *Pisum*, реконструированное байесовским методом на основании конкатенированных последовательностей *His5* и *His7*.

рассматриваются совместно в составе условного подвида *P. sativum* subsp. *elatius* sensu Maxted et Ambrose lato, без каких-либо априорных таксономических презумпций. Наши реконструкции подтверждают реальность линий АС и В, то есть важного эволюционного события, состоявшего в отделении мощной ветви линии В, представители которой были впоследствии доместрированы.

**4.5. Возможная таксономическая интерпретация проведенного геногеографического и филогенетического анализа.** Важным результатом проведенного филогеографического анализа трех диморфных маркеров и филогенетической реконструкции на основании генов гистона H1 является выявление мощной эволюционной ветви линии В, выделившейся из предковой для нее линии АС, причем эволюция ветви В была связана с миграцией ее представителей в Европе в восточном направлении. В обширном регионе вторичного контакта носителей комбинаций А и В – Турции и Закавказье, мы находим некоторые образцы с «рекомбинантными» комбинациями D и R, но ни один из них не является дикорастущим, имеющим раскрывающиеся бобы (фенотип Dpo). Таким образом, носители комбинаций А и В в природе скорее всего не скрещивались.

Из практических соображений целесообразно оставить за культурным горохом статус подвида, *P. sativum* subsp. *sativum*. Это делает парафилитичным предковый дикорастущий таксон, подвергшийся доместикиции. Таким образом, мы заранее отказываемся от филогенетической таксономии и признаем возможность парафилетических внутривидовых таксонов гороха. Линия АС несет плезиоморфные аллели двух из трех молекулярных маркеров, *rbcL* и *SCA* и не имеет своих синапоморфий, в то время как линия В имеет синапоморфные аллели всех трех маркеров, что делает линию АС парафилетичной. В то же время на филогенетической реконструкции полученной для конкатенированных *His5* и *His7*, линия В и линия АС предстают как равноправные ветви.

Было бы целесообразно придать линии АС и дикорастущим представителям линии В статус подвидов. Согласно правилам ботанической номенклатуры, для линии АС приоритетным оказывается название *Pisum sativum* L. subsp. *biflorum* (Rafin.) Soldano. *Pisum elatius* был описан из Грузии, под описание подходят грузинские образцы VIR1851 и VIR2998, принадлежащие к линии В, из которых оба имеют бугорчатую семенную оболочку (фенотип Gty), первый имеет нераскрывающиеся бобы (фенотип dro), а второй – раскрывающиеся (фенотип Dro); т.е. второй является дикорастущим горохом, а первый, возможно, продуктом интрогрессии. Таким образом, название *P. elatius* было предложено скорее всего для дикорастущих представителей линии В. Название *Pisum sativum* L. subsp. *syriacum* Berger было предложено в качестве замещающего для названия *P. humile* Boiss et Noe, являющегося младшим синонимом. Для него сохраняется типовой материал *P. humile*, происходящий из Баккер-Мааден из Восточной Анатолии в современном понимании. Три имеющиеся оттуда дикорастущих образца принадлежат к линии В. Скорее всего подвидовое название *P. sativum* subsp. *syriacum* также относится к линии В.

Предложена предварительная система подвидов *P. sativum*: 1) *Pisum sativum* L. subsp. *biflorum* (Rafin.) Soldano – дикорастущий горох линии АС, распространен в Средиземноморье, на восток минимум до Грузии. 2) *Pisum sativum* L. subsp. *elatius* (Bieb.) Schmalh. – дикорастущий горох линии В. Распространен в Причерноморье, Сирии, Турции, на Голанских Высотах. 3) *Pisum sativum* L. subsp. *sativum* – культурный горох с нераскрывающимися бобами, комбинация В.

## **Глава 5, «Репродуктивная совместимость базового набора образцов, отражающего генетическое разнообразие гороха Восточного Средиземноморья»**

**5.1. Базовый набор образцов, отражающий генетическое разнообразие гороха Восточного Средиземноморья.** Раздел описывает формирование небольшого (8 образцов) набора генетически отдаленных образцов, отражающих основные направления эволюции рода Горох и его генетического разно-

образия в Восточном Средиземноморье. Он был сформирован, следуя принципу «без чего нельзя обойтись». В него вошли: тестерная линия WL1238 (комбинация В) как представитель культурного подвида *P. sativum* subsp. *sativum*, по одному образцу отдельных видов гороха - *Pisum fulvum* (WL2140, Иерусалим) и *P. abyssinicum* (VIR2759, Эфиопия) (комбинация А), представители трех условных групп дикорастущих форм *P. sativum* из Израиля, выделенных Ben-Ze'ev и Zohary (1973) «*elatius*» (721), «южный *humile*» (712 = L100) (комбинация А) и «северный *humile*» (JI1794 = 716, комбинация В). В качестве дикорастущего гороха из Тавро-Кавказского региона вошел образец СЕ1 из Крыма (комбинация В). Добавлен образец VIR320 неясного происхождения, (комбинация А) продемонстрировавший в скрещиваниях с культурным горохом весьма интересный случай ядерно-цитоплазматического конфликта с ярким фенотипическим эффектом (Bogdanova, Berdnikov, 2001; Богданова, Костерин, 2006; Bogdanova, 2007; Bogdanova et al., 2009; 2012). Этот набор можно расширить до опорного набора рода Горох в целом, включив в него образцы, представляющие Балканский (JI1096, п-ов Афон) и Пиренейский полуострова (PE1 = JI3557, СВ Португалия) (комбинация С), Северную Африку (IG 64350, Алжир, комбинация А), носителя комбинации D из Сицилии (PI344537) и некоторые дополнительные образцы из Восточного Средиземноморья: носителя комбинации А из Грузии (WG 26109) и представителя так называемой var. *brevipedunculata* (комбинация В) из Сирии (JI3233). В главе дано подробное описание указанных образцов и их фенотип в отношении генов с видимым проявлением.

**5.2. Схема эксперимента по диаллельному скрещиванию.** Восемь образцов базового набора Восточного Средиземноморья были скрещены в выровненных условиях теплицы в обоих реципрокных направлениях все со всеми, а также сами с собой; всего  $28 \times 2 + 8 = 64$  направления скрещиваний, не менее 30 скрещиваний в каждом направлении, всего около 3,5 тысяч скрещиваний. Оценивались эффективность скрещивания (количество гибридных семян на один опыленный цветок), количественные признаки, мужская и женская фертильность гибридов  $F_1$ . Полные данные приводятся, ввиду их практической важности, для скрещиваний с представителем культурного гороха (WL1238). Для остальных скрещиваний в работе приводятся данные по фертильности пыльцы, отражающей основные репродуктивные барьеры, в упрощенной графической форме. Значение фертильности (доля жизнеспособных пыльцевых зерен) условно классифицировано на градации 1, 2, 3, 4: соответственно  $<1/3$  (около  $1/4$ ); от  $1/3$  до  $2/3$  (около  $1/2$ ), от  $2/3$  до  $9/10$  (около  $3/4$ ), более 0,9 (около 1, полная фертильность).

**5.3. Скрещивания с культурным посевным горохом (*Pisum sativum* subsp. *sativum*).** Подробно, в 4 таблицах, приводятся данные по эффективности скрещиваний, массе семян гибридов  $F_1$ , внешности и количественным признакам растений гибридов  $F_2$ , в том числе фертильность их пыльцы. Наиболее серьезные репродуктивные барьеры культурный горох ожидаемо демонстри-

рует с представителями других видов, *P. fulvum* и *P. abyssinicum*, они особенно сильны при использовании последних в качестве материнского родителя, когда образуются единичные семена на сотни скрещиваний. В случае *P. fulvum* шесть гибридов, полученных в этом направлении скрещиваний, были слабы и страдали от конфликта ядра и пластид, компенсируемого присутствием отцовских пластид. Фертильность пыльцы этих растений варьировала от 2 до 32%, и только 4 растения дали несколько семян. В случае *P. abyssinicum*, единственное полученное растение выросло до 192 см в высоту, фертильность пыльцы его цветков варьировала от 22 до 33%, но оно произвело только два семени. Реципрокные гибриды произвели больше, но все равно немного семян, которые выросли в довольно мощные растения с невысокой мужской и женской фертильностью (причем гибриды WL1238 × WL2140 произвели в пять раз больше семян на растение, чем гибриды WL1238 × VIR2759). Таким образом, репродуктивный барьер культурного подвида с *P. abyssinicum* оказался гораздо более серьезным, чем с *P. fulvum*.

Остальные скрещивания проводились с представителями *Pisum sativum* в широком смысле. Среди них мы столкнулись с двумя случаями сильных односторонних барьеров: WL1238 × L100, где гибридные эмбрионы не развивались (при нормальном развитии семенной оболочки!), и VIR320 × WL1238, с сильными аномалиями гибридов F<sub>1</sub>. Природа первого явления неизвестна; генетический анализ второго случая, проведенный В.С. Богдановой с коллегами (Bogdanova et al. 2009), показал, что VIR320 имеет уникальный аллель ядерного гена *Scs2* группы сцепления V, участвующего в ядерно-цитоплазматическом конфликте. Более слабое развитие боковых ветвей и более низкая мужская и женская фертильность гибридов F<sub>1</sub> WL1238 × 721 по сравнению с реципрокными связана с характерным для 721 аллелем гена *Scs1*, несовместимым с цитоплазмой WL1238; этот ген также участвует в снижении фертильности пыльцы и у гибридов VIR320 и L100 с культурным горохом (Ядрихинский, Богданова, 2011; Bogdanova et al. 2014). Сходный, но еще менее сильный эффект наблюдался у гибридов F<sub>1</sub> JI1794 × WL1238, которые уступали реципрокным в отношении общего габитуса и семенной продуктивности. Однако эти эффекты не связаны с жизнеспособностью мужских либо женских гаметофитов, и мужская пыльца гибридов была полностью фертильна. Только гибриды образца CE1 из Крыма с WL1238 не демонстрировали никаких реципрокных различий и были полностью фертильны. Образцы JI1794, CE1 и WL1238 относятся к линии В, поэтому их полная совместимость на уровне фертильности пыльцы выглядит естественной.

**5.4. Скрещивания с горохом красно-желтым (*Pisum fulvum*).** Во-первых, нам не удалось получить всего один класс гибридов, WL2140 × VIR320. (Это именно те образцы, которые демонстрируют яркие фенотипические проявления конфликта ядра и пластид при скрещивании с культурным подвидом. По видимому, их несовместимость с культурным горохом основана на разных аллелях генов, вовлеченных в конфликт.) Этот результат развенчивает миф о неспособности *P. fulvum* к отдаленным скрещиваниям в качестве материнско-



го родителя. Во-вторых, во всех этих скрещиваниях фертильность пыльцы гибридов  $F_1$  не превышала 50%. Этот результат не противоречит допущению, что образец WL2140 отличается от других как минимум одной транслокацией. В-третьих, из 7 пар реципрокных гибридов в 4 не наблюдалось существенных различий по фертильности пыльцы. Исключение составляют скрещивания с WL1238 и L100, где фертильность почти вдвое ниже, когда WL2140 выступает материнским растением, и скрещивания с VIR320, где WL2140 в качестве материнского растения вообще не дал семян. В-четвертых, *P. fulvum* формально оказывается ближе высокорослому, с крупными цветами образцу 721 из того же региона (Израиль) и низкорослому культурному виду *P. abyssinicum* из Йемена и Эфиопии. Возможно, это косвенно подтверждает предположительно гибридогенную природу *P. abyssinicum*. В-пятых, реципрокные гибриды образцов VIR2759 (*P. abyssinicum*) и 721 с WL2140 имеют мужскую фертильность на одинаковом уровне около 50%, такую же фертильность имеют гибриды L100 x WL2140 и почти такую же (34,5%) – гибриды WL1238 x WL2140. Это означает, что кариотипы этих четырех образцов если и отличаются от кариотипа WL2140, то не более чем одной транслокацией. В то же время Ben-Ze'ev, Zohary (1973) предполагали, что *P. fulvum* отличается от *P. sativum* subsp. *sativum* двумя транслокациями, а образцы 721 и 712 (= L100) – одной транслокацией, затрагивающей иные хромосомы. В таком случае образцы 721 и 712 должны были бы отличаться от *P. fulvum* сразу тремя реципрокными транслокациями, что привело бы к фертильности пыльцы на уровне не более 15%. По всей видимости допущения указанных авторов о транслокациях неверны.

**5.5. Скрещивания с абиссинским горохом (*Pisum abyssinicum*).** В отличие от ситуации с *P. fulvum*, те или иные отличия наблюдались в пяти из семи пар реципрокных скрещиваний - кроме скрещиваний с CE1 (фертильность в обоих направлениях около 1/4) и WL2140 (фертильность на уровне 1/2), а гибридов не удалось получить уже в двух случаях, где *P. abyssinicum* выступал в роли материнского родителя: VIR2759 x L100 и VIR2759 x 721. Образец VIR2759 в качестве материнского родителя дает гибриды более фертильные, чем реципрокные, в двух случаях (с WL1238 и J11794), а в двух случаях гибриды получились только в этом направлении (с L100 и 721). Особый интерес представляют случаи высокой фертильности, указывающие на образцы, наиболее совместимые с *P. abyssinicum*. Это гибриды VIR2759 x VIR320 и 721 x VIR2759. В последнем случае наблюдается полная фертильность пыльцы. Этот результат, во-первых, указывает на вероятного родственника того генотипа, который участвовал в формировании *P. abyssinicum* за счет гибридизации с *P. fulvum*. Во-вторых, VIR2759 и 721 имеют идентичный кариотип. Формально фертильность пыльцы на уровне 3/4 у гибридов VIR2759 x 320 указывает на то, что и эти образцы не различаются транслокациями.

**5.6. Скрещивания между дикорастущими представителями посевного гороха (*Pisum sativum* subsp. *elatius* sensu Maxted et Ambrose lato).** Не удалось получить гибридов в двух направлениях скрещиваний: 721 x CE1, CE1 x L100. Два гибрида с VIR320 в качестве материнского растения с CE1 и 721 демонстрируют те же аномалии, что и при опылении этой линии культурным подвидом – мозаичный хлороз и резкую редукцию прилистников и листочков, в результате чего растение дает многочисленные плетевидные зеленоватые побеги с минимальной фотосинтезирующей поверхностью. Несомненно, это проявление того же конфликта ядра и цитоплазмы, что и при опылении VIR320 пыльцой культурного гороха. Таким образом, эффект связан не с таксономической принадлежностью отцовского образца, а с его конкретным генотипом.

На Рис. 4 показаны отношения мужской фертильности между скрещенными представителями *P. sativum*. Во-первых, мы видим всего одну пару реципрокных гибридов, где высокая фертильность наблюдается в обоих направлениях – между VIR320 и L100. В остальных случаях высокофертильные гибриды дает только одно реципрокное направление, второе же, по всей видимости, страдает от конфликта ядра и цитоплазмы. Во-вторых, весь граф отношений мужской фертильности оказался связным, без промежутков. Более того, все образцы оказались связанными высокофертильными гибридами не менее чем с двумя другими образцами. Больше всего таких связей – 6 – показал образец VIR320, притом что именно он известен яркими проявлениями конфликта ядра и пластид в отдаленных скрещиваниях. Можно сделать неожиданный вывод, что он является хорошим «мостом» для отдаленной гибридизации. WL1238 имеет пять связей полной фертильности в скрещиваниях с другими образцами. Группа представителей линии В оказалась высокосвязанной полностью фертильными отношениями, но только через WL1238, тогда как между CE1 и Л1794 есть только одна связь на уровне фертильности пыльцы около 3/4.

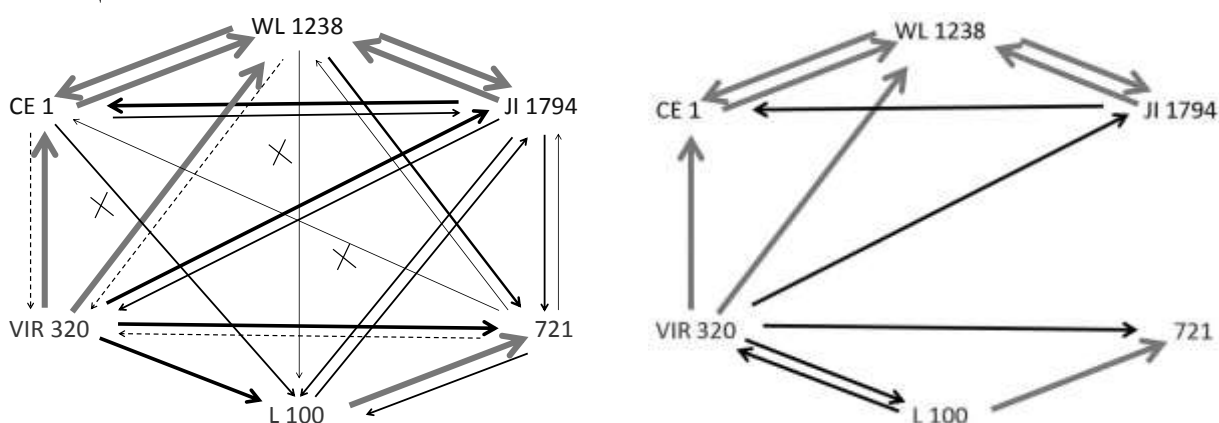


Рис. 4. Фертильность пыльцы реципрокных гибридов  $F_1$  образцов *Pisum sativum* между собой. Стрелки указывают направление переноса пыльцы; на рисунке слева их толщина соответствует уровню фертильности пыльцы гибридов  $F_1$  по 4 градациям – около 1/4, около 1/2, около 3/4 и полная фертильность; пунктиром обозначены направления с гибридами аномального габитуса. X – гибриды отсутствуют. На рисунке справа показаны только две последние градации фертильности пыльцы.

Полученные данные говорят о том, что среди шести исследованных образцов вообще нет реципрокных транслокаций, вопреки данным (Ben-Ze'ev, Zohary, 1973). По всей видимости неполная фертильность пыльцы определяется ядерно-цитоплазматическим конфликтом, а следовательно и низкая фертильность гибридов между группами образцов L100-721 и J11794-WL1238 имеет ту же природу, а не обусловлена кариологически.

**5.7. Отношения репродуктивной совместимости образцов базового набора и таксономия гороха.** Наши данные показывают, как осторожно следует пользоваться внутривидовой таксономией *Pisum sativum*. Скрещивая культурные и дикие формы, можно столкнуться как с серьезными однонаправленными репродуктивными барьерами, так и с более мягкими формами барьеров, связанными с падением фертильности пыльцы, которые могут иметь симметричный либо асимметричный характер у гибридов первого поколения. Характер совместимости невозможно предсказать заранее, исходя из внешних признаков растения, а ориентация на таксономическую принадлежность контрпродуктивна, поскольку сами внутривидовые таксоны гороха во многом иллюзорны. Наше разделение образцов на представителей линий АС и В более адекватно, так как образцы чаще оказываются совместимыми в пределах линий, особенно в линии В, чем между линиями. Однако и внутри линий встречаются самые разные варианты несовместимостей (в линии АС – вплоть до полной), а относящийся к линии АС образец VIR320 ведет себя в разных скрещиваниях весьма необычно. В гибридизационных опытах и филогенетических реконструкциях не следует пользоваться внутривидовой таксономией и с осторожностью - видовой таксономией.

**5.8. Скрещивания сами-с-собой.** Искусственное опыление было одной из первых экспериментальных технологий в генетике, и процедура скрещиваний гороха не изменилась со времен Менделя: лодочка разрезается прежде чем венчик приобретает окраску и раскрывается, пыльники удаляются и нужная пыльца наносится на рыльце. Она основывается на двух допущениях: (а) пестик приобретает компетенцию к опылению до раскрытия венчика и (б) после раскрытия венчика дальнейшее опыление маловероятно, подразумевающих, что горох - облигатный самоопылитель. Однако цветки гороха привлекают пчелиных и перекрестное опыление все же возможно (Loenning, 1984). Мы сравнили результат искусственного опыления своей собственной пыльцой восьми форм гороха тремя разными методами. После стандартной кастрации пестики опылялись пыльцой, взятой у того же самого образца, одним из трех способов: 1) сразу после кастрации; 2) когда венчик уже раскрыт и окрашен (отложенное опыление) - на следующий день после кастрации у всех образцов, кроме образца 721, который опылялся на второй день; 3) дважды, как при способах 1 и 2 (двукратное опыление). Все три метода применялись случайным образом к цветкам с одних и тех же растений. Для каждого образца и способа подсчитывалось число проведенных скрещиваний ( $C$ ), бобов ( $P$ ) и семян ( $N$ ), а также вычислялось среднее число бобов на скрещи-

вание, ( $p = P/C$ ), семян на боб ( $s = N/P$ ) и семян на скрещивание ( $e = N/C$ ); последний параметр и отражал эффективность скрещивания. Полученные данные позволяют предположить, что эффективность скрещиваний ограничивается неопылением семяпочек, а не повреждением пестика.

Значение  $e$ , т.е. среднее число полученных семян на одно скрещивание, показало статистически значимые различия между способами опыления у пяти и не показало у трех образцов. Наиболее сильный эффект наблюдался у образца 721, где значение  $e$  показало более чем десятикратное увеличение от способа 1 к способу 2 (с 0,11 до 1,32) и далее увеличилось еще примерно в полтора раза к способу 3. В силу плохой воспроизводимости результатов для трех из четырех образцов, для которых проводились повторные опыты, мы можем обсуждать только сильные, воспроизводимые эффекты.

В опыты были вовлечены две культурные, независимо доместцированные, формы гороха: культивируемый всесветно *P. sativum* subsp. *sativum* и эндемичный для Йемена и Эфиопии *P. abyssinicum*. Для них различий между способами опыления в значении  $e$  не наблюдалось. Это означает, что оба образца являются самоопылителями, а для культурного гороха лучше всего подходит стандартная процедура скрещивания.

Для остальных шести, дикорастущих образцов способ 2, как правило, давал большие значения  $e$  чем способ 1. Это означает, что у диких форм пестик сохраняет компетенцию к опылению после раскрытия венчика, что означает способность к спонтанному перекрестному опылению, которое в естественных условиях может быть адаптивным. Отложенное опыление (способ 2) может быть рекомендовано для скрещивания любого дикого гороха, поскольку по сравнению со стандартной процедурой (способ 1) оно дает те же или лучшие результаты. Двукратное опыление (способ 3) более трудоемко и в большинстве случаев приблизительно столь же эффективно, как способ 2.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ литературных данных вскрыл значительные пробелы в наших знаниях о естественном ареале рода Горох (*Pisum* L.) вообще и вида горох посевной (*Pisum sativum* L.). В мировых коллекциях полностью отсутствуют образцы дикорастущего гороха из Аравии, Туркменистана, Молдовы, с Кавказа, очень мало образцов дикорастущего гороха из Закавказья и Северной Африки, причем их географическое происхождение и чистота оставляют определенные сомнения. Данная работа позволила сформулировать актуальное и срочное направление дальнейших полевых исследований - сбор дикорастущих образцов посевного гороха в указанных регионах, особенно ввиду быстрой деградации средиземноморских растительных сообществ вследствие возрастающей антропогенной нагрузки и быстрых климатических изменений. Эта работа может получить важное значение при использовании вновь выявляемого генетического разнообразия в селекции гороха.

В то же время детальный анализ материала из нескольких мировых генетических коллекций показал, что часть его ошибочно отнесена к дикорастущим формам посевного гороха. Можно заключить, что эффективность исследований филогении рода Горох (*Pisum* L.), проводившихся другими авторами ранее, была невысокой в силу субъективных факторов: отсутствие единой последовательно проводимой таксономической системы, некритическое отношение к таксономической атрибуции за почти сотню лет аккумуляции материала. Внимание к действительному дикорастущему либо культурному статусу исследуемых образцов, их географическому происхождению и в то же время игнорирование их первоначальной таксономической атрибуции, позволило нам получить более ясные филогенетические и геногеографические результаты и реконструировать важные события в эволюционной истории рода.

Так, нами выявлена важная дивергенция внутри дикорастущих представителей вида *P. sativum*: в то время как значительная их часть имеет комбинацию А плезиоморфных аллелей трех молекулярных маркеров ( $rbcL^+$ ,  $coxI^+$ ,  $SCA^f$ ) либо производную комбинацию С ( $rbcL^+$ ,  $coxI^-$ ,  $SCA^f$ ), отличающуюся от комбинации А одной мутацией, выделяется мощная эволюционная ветвь, имеющая апоморфную комбинацию В ( $rbcL^-$ ,  $coxI^-$ ,  $SCA^s$ ). Мы условно назвали первых эволюционной линией АС, а вторых – эволюционной линией В. Реальность этой дихотомии подтверждается филогенетической реконструкцией на основе первичной структуры генов гистона H1.

На основании филогенетического анализа предварительно предлагается компромиссная система из трех подвидов *P. sativum*: *Pisum sativum* L. subsp. *biflorum* (Rafin.) Soldano, *Pisum sativum* L. subsp. *elatius* (Bieb.) Schmalh. и *Pisum sativum* L. subsp. *sativum*. Между подвидами наблюдаются существенные, хотя и преодолимые, репродуктивные барьеры. В такой трактовке подвиды *P. sativum* subsp. *biflorum* и *P. sativum* subsp. *elatius* оказываются парафилетическими и во вторых, различаются только молекулярными диагностическими признакам. Впрочем, молекулярная идентификация этих подвидов состоит в проверке наличия сайта рестрикции AspLEI в пластидном гене *rbcL* и не составляет труда.

Анализ географического происхождения дикорастущих представителей линий АС и В позволил реконструировать историю эволюции и расселения вида *P. sativum* в диком состоянии. Вид возник в Восточном Средиземноморье, где он и поныне представлен носителями предковой комбинации А. Этот регион является и местом возникновения самого рода *Pisum*, поскольку именно там расположен ареал второго вида гороха, *P. fulvum* (также с комбинацией А). Оттуда вид *P. sativum* расселился на запад, предположительно по Северной Африке, проник в Южную Европу, зафиксировав мутацию в гене *coxI* и тем самым приобретя промежуточную комбинацию С. В ходе обратной, восточной волны миграции в районе Черного моря зафиксировались мутации в двух других молекулярных маркерах, *rbcL* и *SCA*, что привело к возникновению комбинации В. В результате представители линии В заселили

Тавро-Кавказский регион, Малую Азию и даже Голанские Высоты, где встретились с автохтонными носителями исходной комбинации А.

Культурный подвид гороха *P. sativum* subsp. *sativum* относится к эволюционной линии В и возник вследствие доместикации ее дикорастущих представителей. Их подавляющее большинство имеют бледный цветок со слабо раскрывающимся парусом, тогда как культурный горох имеет яркоокрашенный (за исключением носителей аллеля *a*) широкооткрытый цветок. По-видимому, предками культурного гороха выступили немногочисленные ныне (найлены в Крыму и Закавказье) представители линии В с подобным цветком, тогда как формы с полузакрытым цветком распространилась позже.

Помочь в поиске непосредственного предка культурного гороха может специфичная для него делеция длиной 8 нуклеотидных пар в позициях 142-149 пластидного спейсера *psbA-trnH*. Любопытно, что на данный момент она найдена лишь у образцов WG10925 из Болгарии и VIR2998 из Грузии, то есть из регионов, находящихся за пределами предполагаемого района доместикации культур-основателей Старого Света, который одни исследователи располагают в Плодородном Полумесяце в целом, а другие – только в курдских илах Мардин и Диярбакыр Юго-Восточной Турции.

В ходе филогенетического и географического анализа были протестированы новые маркеры для филогенетических реконструкций, а именно гены гистона H1. Оказалось, что ген субтипа H1-7, специфичного для молодых тканей и органов, имел слабый филогенетический сигнал, тогда как ген минорного субтипа H1-5 успешно разрешил филогению рода даже на внутривидовом уровне. Обе последовательности в конкатенированном виде послужили очень хорошим маркером, позволившим реконструировать ветвь АС в качестве равномошной ветви В и даже ветви второго вида, *P. fulvum*.

Сформированный нами базовый набор из 8 образцов, представляющих генетическое разнообразие гороха Восточного Средиземноморья и опыт по их взаимному скрещиванию по диаллельной схеме, включавший всестороннее исследование гибридов первого поколения, позволил выявить весьма сложный паттерн репродуктивных барьеров внутри рода и даже вида *P. sativum*. Во-первых, проблематичный и возможно гибридогенный вид *Pisum abyssinicum* оказался репродуктивно изолированным от *P. sativum* subsp. *sativum* в большей степени, чем несомненный вид *P. fulvum*. Однако он оказался более совместим с некоторыми дикорастущими образцами *P. sativum* subsp. *elatius*, и полностью совместим с одним из них, что говорит против его видового статуса. Отношения репродуктивной совместимости между эволюционно отдаленными представителями вида *Pisum sativum* носят сложный и не реципрокный характер вследствие разнообразных проявлений конфликта ядра и цитоплазмы. Они не могут быть учтены в иерархической таксономической системе, применение же ботанической классификации внутри вида *P. sativum* следует признать контрпродуктивным. Кариотип большинства дикорастущих форм посевного гороха не отличается от кариотипа культурного подвида реципрокными транслокациями.

В опыте по скрещиваниям образцов базового набора сами-на-себя был получен практический результат: при скрещивании дикорастущих форм гороха в роли материнского растения наиболее эффективно опылять открытый цветок через сутки после кастрации бутона, опыление же культурных форм эффективно и сразу после кастрации.

## ВЫВОДЫ.

1. Результативность проводившихся ранее исследований генетического разнообразия и молекулярной филогении рода Горох (*Pisum* L.) ограничивалась такими субъективными факторами, как некритическое отношение к таксономической атрибуции, дикорастущему либо культурному статусу и географическому происхождению исследуемых образцов. Учет географического происхождения и дикорастущего либо культурного статуса образцов с одной стороны и намеренное игнорирование их таксономического определения в коллекциях с другой стороны позволило получить ясную филогенетическую и геногеографическую реконструкцию истории рода.
2. Для генетических исследований, возможного практического использования и уточнения ареала дикорастущих форм гороха (*Pisum* L.) остро необходим отсутствующий в генетических коллекциях материал из восточной части ареала: Ирана, Туркменистана, Кавказа и Аравийского полуострова, желательно пополнение коллекций материалом из Закавказья и Северной Африки.
3. Выявлено 15 образцов посевного гороха (*Pisum sativum* L.), значащихся в коллекциях генетического разнообразия в качестве дикорастущих, но представляющих собой продукты гибридизации дикорастущих и культурных форм, *in situ* или *ex situ*: они имеют нераскрывающиеся бобы и обогащены редкими комбинациями молекулярных маркеров.
4. Среди дикорастущих форм посевного гороха впервые выявлена базовая дивергенция на две эволюционные линии, одна из которых (линия АС) маркирована комбинациями аллелей трех диморфных молекулярных маркеров из трех клеточных геномов А ( $rbcL^+$ ,  $coxI^+$ ,  $SCA^f$ ) либо С ( $rbcL^+$ ,  $coxI^-$ ,  $SCA^f$ ), а вторая (линия В) – комбинацией В ( $rbcL^-$ ,  $coxI^-$ ,  $SCA^s$ ); их реальность подтверждается реконструкцией филогении на основе генов гистона H1.
5. Впервые реконструирована история эволюции и расселения вида горох посевной (*P. sativum*) в дикорастущем состоянии: он возник в Восточном Средиземноморье, имея плезиоморфную комбинацию А трех молекулярных маркеров, расселился на запад предположительно по Северной Африке, проник в Южную Европу, приобретя промежуточную комбинацию С, откуда в ходе обратной, восточной миграции в Причерноморье вновь проник в Восточное Средиземноморье, уже в виде носителей апоморфной комбинации В, где встретился с носителями предковой комбинации А в Закавказье и Малой Азии.

6. Культурный подвид гороха *P. sativum* subsp. *sativum* возник вследствие доместикации представителей эволюционной линии В.
7. Впервые выявлен молекулярный маркер, специфичный для культурного подвида гороха *P. sativum* subsp. *sativum*: делеция длиной 8 нуклеотидных пар в позициях 142-149 пластидного спейсера *psbA-trnH*; среди дикорастущих представителей она найдена лишь у двух образцов из Болгарии и Грузии.
8. Гены гистона H1 впервые протестированы в качестве маркеров для филогенетических реконструкций, при этом показано, что паралогичные гены гистона H1 гороха различаются по применимости в этом качестве: ген уникального субтипа H1-7, специфичного для молодых тканей и органов, мало пригоден для этой цели, тогда как ген минорного субтипа H1-5 успешно разрешает филогению рода *Pisum* даже на внутривидовом уровне.
9. Гибридогенный вид *Pisum abyssinicum* репродуктивно изолирован от *P. sativum* subsp. *sativum* в большей степени, чем морфологически обособленный вид *P. fulvum*, однако более совместим с некоторыми дикорастущими образцами *P. sativum* subsp. *elatius*.
10. Кариотип дикорастущих форм посевного гороха (*P. sativum* subsp. *elatius* s.l.), вовлеченных в гибридологический анализ, не отличается от кариотипа культурного подвида (*P. sativum* subsp. *sativum*) реципрокными транслокациями; сообщения в литературе о присутствии в некоторых из них реципрокной транслокации 4-6 не подтверждаются.
11. Отношения репродуктивной совместимости между эволюционно отдаленными представителями вида *Pisum sativum* носят сложный и нереципрокный характер и не могут быть адекватно учтены в иерархической таксономической системе.



## СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Публикации в печатных изданиях, включенных в перечень ВАК РФ и международные базы данных Web of Science и Scopus

1. Smirnova O.G., Rozov S.M., **Kosterin, O.E.** 1992. Perchloric acid extractable low-Mr albumins SCA and SAA from cotyledons and seed axes of pea (*Pisum sativum* L.). // Plant Science. Vol. 82. P. 1-13.
2. Berdnikov, V.A., F.L. Gorel, V.S. Bogdanova, **O.E. Kosterin**, Y.A. Trusov, and S.M. Rozov. 1999. Effect of a substitution of a short chromosome segment carrying a histone H1 locus on expression of the homeiotic gene T1 in heterozygote in the garden pea *Pisum sativum* L. // Genetical Research. Vol. 70. P. 93-109.
3. Berdnikov, V. A., Gorel, F. L., **Kosterin, O. E.**, Bogdanova, V. S. 2003. Tertiary trisomics in the garden pea as a model of B chromosome evolution in plants. // Heredity. Vol. 91. P. 577-583.
4. **Kosterin, O.E.**, V.S. Bogdanova. 2008. Relationship of wild and cultivated forms of *Pisum* L. as inferred from an analysis of three markers, of the plastid, mitochondrial and nuclear genomes. // Genetic Resources and Crop Evolution. Vol. 55. Iss. 5. P. 735-755.
5. **Костерин О.Э.**, Богданова В.С., Горель Ф.Л., Бердников В.А. 2008. Трисомии гороха (*Pisum sativum* L.) демонстрируют легкий ответ на отбор на повышение плодовитости // Докл. Акад. Наук 2008 – Т. 423 – № 3 – С. 417-420.
6. **Kosterin O.E.**, Galieva E.R., Bogdanova V.S. 2009. The first record of tetrasomy in pea (*Pisum sativum* L.). // Euphytica. Vol. 166. P. 109-121.
7. **Kosterin O. E.**, Zaytseva O. O., Bogdanova V. S. , Ambrose M. 2010. New data on three molecular markers from different cellular genomes in Mediterranean accessions reveal new insights into phylogeography of *Pisum sativum* L. subsp. *elatuis* (Beib.) Schmalh. // Genetic Resources and Crop Evolution. Vol. 57. P. 733-739.
8. Smy'kal P., Kenicer G., Flavell A.J., Corander J., **Kosterin O.**, Redden R.J., Ford R., Coyne C.J., Maxted N., Ambrose M.J. and Ellis N.T.H. 2010. Phylogeny, phylogeography and genetic diversity of the *Pisum* genus. // Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization. Vol. 2010. P. 1-15.
9. 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. Vol. 504.P. 192–202.

10. **Kosterin, O.E.**, V.S. Bogdanova, A.A. Kechin, O.O. Zaytseva, A.K. Yadrikhinskiy. 2012. Polymorphism in a histone H1 subtype with a short N-terminal domain in three legume species (Fabaceae, Fabaeae). // *Molecular Biology Repots*. Vol. 39. P. 10681-10695.
11. **Kosterin O.E.**, Bogdanova V.S. 2014. Efficiently of hand pollination in different pea (*Pisum*) species and subspecies. // *The Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*. Vol. 74. 50-55.
12. **Костерин О.Э.**, Богданова В.С. 2014. Стадия развития цветка, оптимальная для искусственного опыления, варьирует в роде Горох (*Pisum L.*). // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. Т. 18. №3. С. 478-485.
13. **Kosterin O.E.** 2014. The lost ancestor or the broad bean (*Vicia faba L.*) and the origin of plant cultivation in the Near East. // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. Т. 18. № 4-1. С. 831-840.
14. Zaytseva O.O., Gunbin K.V., Mglinets A.V., **Kosterin O.E.** 2015. Divergence and population traits in evolution of the genus *Pisum L.* as reconstructed using genes of two histone H1 subtypes showing different phylogenetic resolution. // *Gene*. Vol. 556. P. 235-244.
15. **Kosterin O.E.**, Bogdanova V.S. 2015. Reciprocal compatibility within the genus *Pisum L.* as studied in F1 hybrids: 1. Crosses involving *P. sativum L.* subsp. *sativum*. // *Genetic Resources and Crop Evolution*. Vol. 62. Iss. 5. P. 691-709.
16. **Костерин О.Э.** 2015. При царе горохе (*Pisum sativum L.*): непростая судьба первого генетического объекта. // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. Т. 19. №. 1. С. 13-26
17. **Костерин О.Э.** 2015. Перспективы использования диких сородичей в селекции гороха (*Pisum sativum L.*). // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. Т. 19. № 2. С. 154-164
18. Zaytseva O.O., Bogdanova V.S., Mglinets A.V., **Kosterin O.E.** 2016. Refinement of the collection of wild peas (*Pisum L.*) and search for the area of pea domestication with a deletion in the plastidic *psbA-trnH spacer* // *Genetic Resources and Crop Evolution*. E-publication ahead of print. DOI 10.1007/s10722-016-0446-4.
19. **Костерин О.Э.** 2017. Горох абиссинский (*Pisum schaeferi* Kosterin nom. nov. pro *Pisum abyssinicum* A. Br.) – проблематичный таксон. // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. – Т. 21. – № 2. – С. 158-169.