

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА БЕЛКОВ СЕМЯН ДЛЯ СОРТОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ЛЮПИНА УЗКОЛИСТНОГО (*Lupinus angustifolius* L.)

Э. Э. Егги, М. С. Вишневская, П. А. Агеева, В. С. Мехтиев,
И. П. Гаврилюк, Н. В. Гапонов, В. Н. Красильников

Белки семян 11 сортов люпина узколистного и родительских форм некоторых из этих сортов изучены методом электрофореза в полиакриламидном геле. Выявлены гетерогенность и полиморфизм полипептидов α - и β -конглютинов и некоторых других белков. Описаны полипептиды, которые могут быть использованы для идентификации сортов. Для сортов с близким составом полипептидов предложены ДНК-маркеры.

Ключевые слова: люпин узколистный; белки семян; ДНК; сортовая идентификация.

Genetics and Selection

USING OF SEED PROTEIN POLYMORPHISM FOR CULTIVAR IDENTIFICATION OF NARROW-LEAFED LUPIN (*Lupinus angustifolius* L.)

E. E. Eggi, M. S. Vishnevskaya, P. A. Ageeva, V. S. Mekhtiev,
I. P. Gavril'yuk, N. V. Gaponov, V. N. Krasil'nikov

The seed proteins of 11 narrow-leaved lupin cultivars and a parent forms of some these cultivars are studied by means of the polyacrylamide gel electrophoresis. The heterogeneity and polypeptide polymorphism of α - and β -conglutins and several other proteins are revealed. The polypeptides which can be used for the cultivar identification are described. DNA-markers are recommended for the cultivars with close the polypeptide composition.

Keywords: narrow-leaved lupin; seed proteins; DNA, cultivar identification.

Люпин — древнейшая возделываемая культура с широким природным потенциалом. Его характеризуют высокая продуктивность зеленой массы и семян с высоким содержанием белка; мощная корневая система, которая не только улучшает физические свойства почв, но и является отличным азотфиксатором и иммобилизатором труднодоступных форм фосфатов. Из четырех видов люпинов, используемых в сельскохозяйственном производстве России (желтый, белый, многолистный, узколистный), *Lupinus angustifolius* L. (узколистный) — самый распространенный как наиболее крупносемянный и скороспелый. Последнее его качество позволяет возделывать эту культуру в северных районах вплоть до 58° с. ш. (Псков – Старая Русса – Кострома – Пермь) [1]. Потенциал *L. angustifolius* не ограничивается свойствами отличного корма и прекрасного сидерата. Содержание алкалоидов, сдерживавшее его использование как продукта питания, превышает допустимые нормы только при выращивании в жарком климате [1, 2]. Кроме того, современные методы селекции позволили у ряда сортов снизить этот показатель до 0,02 %, что соответствует сладким сортам [1].

Показано, что белковый изолят из семян узколистного люпина (сорт Снежеть) представляет собой полноценный, сбалансированный по аминокислотному составу, технологичный продукт, перспективный для использования в различных отраслях пищевой промышленности, а люпиновая сыворотка (побочный продукт выделения изолята) обогащена γ -конглютином и обладает ценностными фармакологическими свойствами [3, 4].

Узколистный люпин, представленный большим разнообразием дикорастущих форм, — перспективный объект селекции, ориентированной на выведение сортов, устойчивых к плотному ценозу, неблагоприятным факторам среды, болезням и вредителям [1].

Для идентификации сортов, линий, гибридов сельскохозяйственных культур, выявления скрытой генетической изменчивости в селекционном материале и репродуцируемых сортах широко применяется электрофорез запасных белков семян. У двудольных используют электрофорез суммарных белков семян или очищенных запасных глобулинов в полиакриламидном геле в диссоциирующей среде. Метод показал хорошие результаты для культур с высоким уровнем внутри-

видовой изменчивости, таких как горох [5], подсолнечник [6], капуста [7], салат [8], огурец, кабачок, перец, морковь [9]. В то же время сорта сои, томата, льна по этим признакам не различались, что связано с малым разнообразием исходных форм при окультуривании этих видов [10, 11].

В настоящее время ведется активное изучения полиморфизма люпинов с помощью анализа ДНК [12–14]. Так, исследование микросателлитов 30 сортов (желтого, белого и узколистного) люпинов с применением 12 праймеров показали высокий уровень межвидового (около 90 %) и межсортового (около 30 %) полиморфизма [12]. Осуществлены успешные попытки регистрации сортов узколистного люпина ISSR-PCR анализом [13].

Характер изменчивости полипептидного состава белков семян *Lupinus angustifolius* L. практически не исследован. Цель нашей работы — изучение полипептидного состава и полиморфизма белков семян узколистного люпина для определения перспектив использования их в сортовой идентификации.

Методы исследования

Материалом для исследования послужили семена 11 районированных сортов люпина узколистного: Снежеть, Белозерный-110, Кристалл, Надежда и Радужный, Немчиновский 97, Немчиновский 846, Смена, Ладный, Дираф 14, Сидерат 38. В исследование были привлечены родительские формы некоторых из них: Узколистный 109, Данко, Першацвет, Уникроп. Также исследовали сорта белого (Пищевой и Дега) и желтого (Надежный) люпинов. Для формирования «соевой» шкалы, необходимой для регистрации спектров, взяты семена сои сорта Добуржанка. Семена получены из коллекции ВНИИ растениеводства им. Н. И. Вавилова и ВНИИ люпина. Семена сортов Снежеть и Радужный взяты разных мест и лет размножения.

Белки экстрагировали настаиванием 5 мг муки семян в 140 мкл электродного буфера (трикс-глициновый, pH 8,3) в течение 1 ч. Электрофорез проводили в 12,5 % ПААГ в диссоциирующей системе с меркаптоэтанолом по Лаемли [15]. Процедура электрофореза и обработки гелевых пластин подробно описана для белков семян гороха [5]. Для регистрации спектров использована «соевая» шкала, в которой каждый компонент обозначен номером, соответствующим его электрофоретической подвижности.

ПЦР анализ проводили методом ISSR [16]. Для исследования люпина был использован праймер HB12 [17].

Результаты и обсуждение

Белки, экстрагированные из семян люпина и разделенные электрофорезом по Лаемли, подобно белкам других двудольных, представлены многокомпонентным спектром, в котором полипептиды расположены от катода к аноду с увеличением молекулярных масс

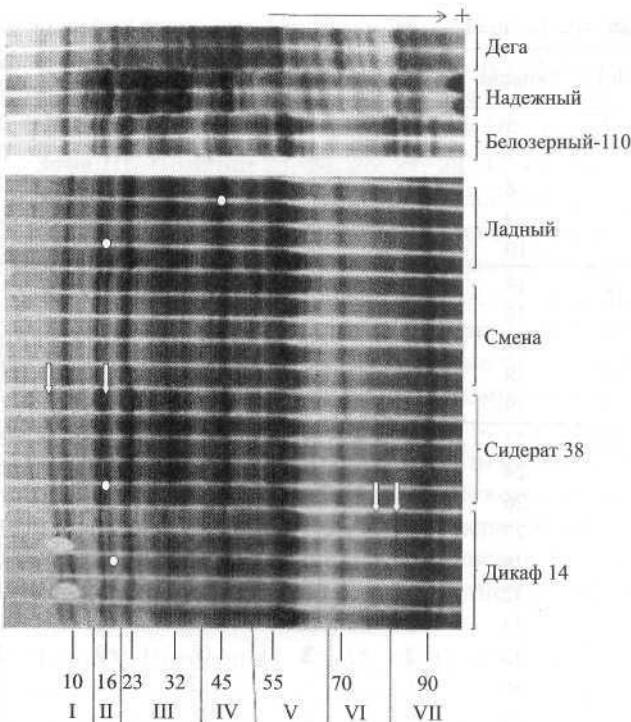


Рис. 1. Электрофорограммы белков, извлекаемых из отдельных семян белого (сорт Дега), желтого (сорт Надежный) и узколистного (сорта Белозерный-110, Дираф 14, Сидерат 38, Смена, Ладный) люпинов. Внизу дана схема с обозначением полипептидных позиций по «соевой» шкале; римскими цифрами обозначены зоны спектра; стрелками отмечены сортоспецифичные полипептиды, точками — полипептидная вариабельность внутри сорта

(рис. 1). Полипептиды запасных глобулинов в таких спектрах формируют интенсивные компоненты. У люпина это конглютины α , β и γ . Для идентификации полипептидов α - и β -конглютинов сравнивали спектры восстановленных и невосстановленных белков [18]. Восстанавливали в присутствии β -меркаптоэтанола, разрывающего дисульфидные связи, которыедерживают полипептиды в субъединицах α -конглютина. В молекулах β -конглютина дисульфидных связей нет. Таким образом, интенсивные полипептиды, не меняющие своего положения после обработки меркаптоэтанолом, принадлежат β -конглютинам. Интенсивные полипептиды, исчезающие в высокомолекулярной части спектра и появляющиеся в нижней, низкомолекулярной части спектра, принадлежат α -конглютинам; γ -конглютин идентифицирован в надосадочной жидкости после осаждения из экстракта α - и β -конглютинов в их изоэлектрических точках. Слабые по интенсивности полипептиды являются альбуминами и выполняют преимущественно ферментативную функцию [18].

При исследовании всей представленной выборки семян узколистного люпина выявлены 55 полипептидных позиций (табл. 1), пронумерованных по «соевой» шкале. Для каждого сорта определена интенсивность компонентов в баллах (от 1 до 5) или их отсутствие (0). Семь полипептидов у всех исследованных сортов узколистного люпина стабильны: 10(3), 32(3), 63(2), 70(2),

Таблица 1. Полипептидный состав семян сортов узколистного люпина (в баллах*)

Зона	Позиция	Белозер- ный-110	Надежда	Смена	Кристалл	Сидерат 38	Немчи- новский 97	Немчинов- ский 846	Ладный	Дикаф 14	Снежеть	Радужный
I	5	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	2
	7	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0
	8	2	2	2	2	2	0	0	2	0	2	2
	9	0	0	0	0	0	3	2	0	2	0	0
	10	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3	3
II	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	16	3	3	2-3	3	5 3	0	0	2 0	1-3	1	1
	17	0	0	0	0	2 0	5	5	0 4	0	0	0
	18	3	3	1-3	3	0 3	2	2	1 0	1-3	1-3	0
	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4
III	23	5	5	5	5	5	5	5	5	5 0	5	5
	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0 5	0	0
	26	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1
	27	2	2	2	2	2	2	2	2	0	2	2
	28	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
	32	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	33	2	2	0-2	2	2	2	2	2	1-3	2	2
	35	2	2	0	0	2	2	2	2	0	0	0
	36	1	1	1,2	2	1	1	1	1	2	2	2
	37	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1
IV	41	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
	42	2	2	2	2 1	2	2	2	1	1	2	2
	43	0	0	0	0 1	0	2	2	2	1	0	0
	44	0	0	0	0	0	3 0	0	0 3	0	0	0
	45	3	3	3	3	3	0 3	3	3 0	3	3	3
	47	2	1	1	2	1	1	0,1	2	1	1	1
	48	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1
V	49	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2
	50	2	0	2	2	2	2	2	2	1,2	0	0
	51	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2,3	2,3
	52	1	2	1,2	0	1	2	2	0	0	0	0
	53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
	54	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	55	3	5	5	5	5	4	4	4	0	0	0
	56	0	0	0	0	0	0	0	0	5	2	2
	58	1	1	2	2	1	2	2	2	0	2	2,3
	59	2	2	0-2	1	2	1	1	1	2	0	0
	60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0-2	0-2
	63	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
VI	70	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	74	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	75	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	76	0	0	0	0,1	0	0	0	1	2	0	0
	77	1	1	1	0	0-2	0	0	0	0	0-2	2
	78	0	0	0	0	0	2	0	2	1	0	0
	79	1	2	0,1	0	2	2	2	0	1	0-2	0-2
	80	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	81	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	82	0	0	0,1	0	0-2	0	0	0	0	0	0
VII	83	2	2	0-2	0,1	0-2	0,1	0,1	0,1	0-2	0	0
	85	2	2	2	2	1,2	2	2	2	2	2	2
	86	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
	87	2	2	2	2	2	1,2	1,2	2	3	0	0
	90	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	95	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

* Интенсивность белкового компонента. Вертикальной чертой отмечены полипептидные варианты, справа от черты — варианты, встретившиеся у меньшего числа семян: Кристалл — 10%; Сидерат 38 — 10%; Немчиновский 97 — 15%; Ладный II зона — 25%; IV зона — 25%; Дикаф 14 — 15%.

85(2), 90(4), 95(2). Эти компоненты спектра могут служить реперами при анализе данной группы сортов. Для удобства анализа многокомпонентного полипептидного спектра в нем выделили семь условных зон.

На рис. 1 представлены полипептидные спектры, полученные из семян белого, желтого и узколистного люпинов. Очевидна четкая межвидовая дифференциация: значительная часть компонентов разных видов люпинов различаются по положению и интенсивности. В спектрах белков семян сортов узколистного люпина большинство компонентов по этим характеристикам совпадают. Вместе с тем сорта имеют специфические отличия: отдельные компоненты, характерные для семян одного сорта, отсутствуют в спектрах семян других сортов. Так, сорт Дикаф 14 отличается наличием компонента 76(2). У сорта Сидерат 38 присутствует компонент 7(2), тогда как у Дикаф 14 его нет, но есть компонент 8(2). У сортов Смена и Ладный этот же компонент 8(1) имеет меньшую интенсивность. Кроме того, наблюдается вариабельность полипептидов внутри сорта. Эта вариабельность может касаться интенсивности компонента, как, например, для компонента 18(1 – 3) сорта Дикаф 14, так и наличия или отсутствия полипептидов 16(2 – 3) и 18(1 – 3), встречаются семена с одним полипептидом 17(4), что также является отличительной особенностью сорта. У этого же сорта семена различаются по наличию полипептидов 44(3) и 45(3).

Таким образом, сорт Ладный представлен несколькими биотипами. Электрофорограммы сорта Смена, приведенные на рис. 1, по всем полипептидным позициям совпадают с электрофорограммами большинства сортов и не имеют внутрисортовой вариабельности по полипептидным позициям. Электрофорограммы белков этого сорта могут использоваться как эталон в анализе других сортов узколистного люпина.

Возможности отдельных полипептидов каждой зоны для идентификации сортов рассмотрены ниже.

Зона I. Позиции 5, 7, 8, 9, 10. Компонент 10(3) стабилен у всех сортов и является реперным. Значительная интенсивность(3) и неизменность положения в спектре в присутствии и отсутствии меркаптоэтанола позволяют идентифицировать его как β -конглютин. Слабые по интенсивности компоненты 5, 7, 8, 9 не являются запасными глобулинами. Они позволяют разделить рассматриваемые сорта по крайней мере на три подгруппы: 1 — Белозерный-110, Надежда, Смена, Кристалл, Ладный; 2 — Сидерат 38, Снежеть, Радужный; 3 — Дикаф 14, Немчиновский 97, Немчиновский 846.

Зона II. Позиции 14, 16, 17, 18, 19. Вариабельная зона. Содержит полипептиды β -конглютина. Наблюдаются различия в полипептидном составе как сортов, так и семян в пределах сорта. Сорта Снежеть и Радужный не имеют внутрисортовой вариабельности и отличаются от всех других сортов по компонентам 14(1), 16(1), 19(4). Сорта Немчиновский 97 и Немчиновский 846 имеют интенсивный компонент в позиции 17(5). У сортов Смена и Дикаф 14 наблюдается варьирование интенсивности компонентов 16 и 18(1 – 3). Сорта Бело-

зерный-110, Надежда, Кристалл сходны по всем позициям между собой, и их компоненты неизменны по интенсивности. В семенах сортов Сидерат 38 и Ладный встречаются два варианта полипептидов 16 – 18.

Зона III. Позиции 23, 24, 26, 27, 28, 32, 33, 35, 36, 37. Зона содержит полипептиды β -конглютина (23, 24, 27, 28), а также кислые полипептиды α -конглютина (35, 36). Полипептид 32(3) является реперным. Полипептид 27(2) β -конглютина стабилен для всех сортов кроме сорта Дикаф 14, у которого этот компонент отсутствует, но есть компонент в позиции 28(2). Кроме того, у этого сорта 15 % семян имеют интенсивный компонент в позиции 24(5), а не в позиции 23(5), как все остальные сорта узколистного люпина. По этой части спектра сорта группируются таким образом: 1 — Снежеть и Радужный; 2 — Смена и Кристалл; 3 — Сидерат, Надежда, Ладный; 4 — Белозерный-110, Немчиновский 97, Немчиновский 846. Анализ этой зоны затруднен насыщенностью сближенными компонентами.

Зона IV. Позиции 41, 42, 43, 44, 45, 47, 48. Основной по интенсивности в этой зоне компонент 45 (β -конглютин). У 85 % семян сорта Немчиновский 97 β -конглютин занимает позицию 44. У сорта Ладный помимо семян с основной позицией 45 обнаружено около 25 % семян с позицией 44. Слабые по интенсивности компоненты 42 и 43 распределяют сорта узколистного люпина по группам соответственно: 1 — 2 и 0 (Снежеть, Радужный, Кристалл, Надежда, Сидерат 38, Смена), 2 — 1 и 1 (Кристалл, Дикаф 14, Ладный), 3 — 1 и 2 (Белозерный-110). Эти слабые по интенсивности компоненты четко дифференцируются только при очень хорошем электрофоретическом разделении. К таким же слабо дифференцируемым относятся компоненты 47 (α -конглютин) и 48 (β -конглютин), интенсивность которых изменяется следующим образом: Снежеть, Радужный, Смена — 1 и 1; Кристалл, Белозерный-110 — 2 и 0; Немчиновский 846, Немчиновский 97, Ладный, Надежда, Сидерат 38 — 1 и 0.

Зона V. Позиции 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 60, 63. Позиции интенсивных полипептидов этой зоны не меняются в присутствии и отсутствии меркаптоэтанола и, таким образом, здесь идентифицированы запасные β -конглютины. Самый интенсивный β -конглютин этой зоны у большинства сортов (Смена, Кристалл, Сидерат 38, Немчиновский 97, Немчиновский 846) занимает позицию 55(4, 5). Однако ряд сортов можно дифференцировать именно по этому глобулину. Так, у сорта Белозерный-110 этот белок представлен двумя компонентами — 55(3) и 56(3). У сорта Дикаф 14 интенсивный β -конглютин смешен в позицию 56(5). Сорта Снежеть и Радужный имеют три компонента β -конглютина в позициях 53(2), 56(2), 58(2). Снежеть и Радужный отличаются только тем, что у Радужного компонент 58 варьирует по интенсивности (2,3), а у Снежеть он стабилен (2). Сорт Дикаф 14, кроме вышеупомянутого, отличается от большинства сортов позициями 49(1), 51(1), 58(0). В группе близких по спектрам сортов Ладный выделяется отсутствием компонента 52(0), а сорт

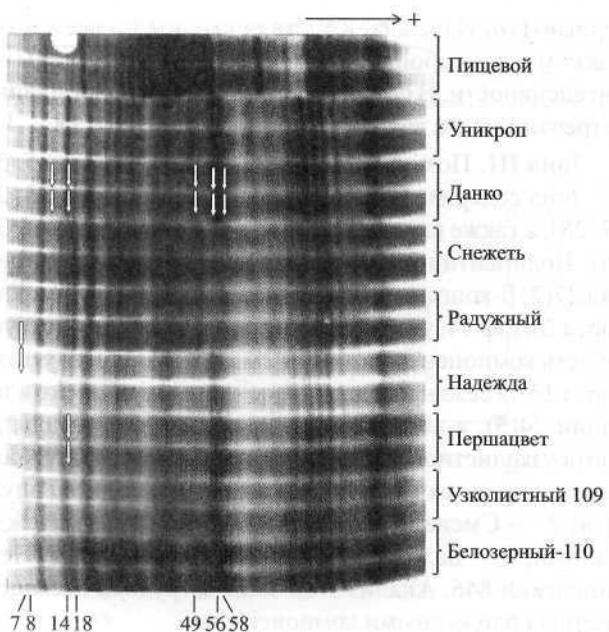


Рис. 2. Электрофорограммы белков семян сортов люпина узколистного и их родительских форм; стрелками отмечены полипептиды, специфические для сортов, внизу обозначены их позиции

Надежда — отсутствием компонента 50(0). Сортовая дифференциация наблюдается и по позициям 64, 65 и 66, но анализ этих очень слабых компонентов возможен только при увеличении концентрации белка.

Зона VI. Позиции 70, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82. Эта зона характеризуется отсутствием интенсивных компонентов, однако для идентификации сортов она в ряде случаев дает ценную информацию; β -конглютины идентифицированы в позициях 70 и 77–79; компонент 70(2) стабилен у всех сортов. Наибольшую информацию можно получить при анализе позиций 77–79. Белозерный-110, Надежда, Смена, Сидерат 38 имеют позиции 77 и 79 с интенсивностью 1 и 2, сорта Снежеть и Радужный имеют тот же набор полипептидов, но с интенсивностью от 0 до 2. У сортов Немчиновский 97 и Дикаф 14 есть компоненты 78 и 79. У Немчиновского

846 присутствует только компонент 79(2), а у сорта Ладный — только 78(2). Сорта Немчиновский 97 и Немчиновский 846 различаются по слабым компонентам 74(0, 1) и 75(1, 0). У сорта Ладный присутствует один компонент 78(2). Сорт Кристалл выделяется почти полным отсутствием четко сформированных белковых позиций в этой зоне. Компонент 82 встретился только у сортов Смена и Сидерат 38, причем не во всех семенах. Сорт Белозерный отличается от других сортов, в том числе от близкого по полипептидным спектрам сорта Надежда, наличием слабого полипептида в позиции 81.

Зона VII. Позиции 83, 85, 86, 87, 89, 90, 95. Компоненты 90(4) и 95(2) — реперные. Полипептиды 89–90 являются основными полипептидами α -конглютина, остальные — β -конглютины. Наиболее информативен в этой зоне компонент 83. Он стабилен с интенсивностью 2 у сортов Дикаф 14 и Надежда и отсутствует у сортов Снежеть и Радужный. Очень слабо этот компонент проявлен в некоторых семенах сортов Немчиновский 97, Немчиновский 846, Кристалл, Ладный. У сортов Смена, Дикаф 14, Сидерат 38 он достаточно интенсивный (2), но также встречается не во всех семенах. Сорта Снежеть и Радужный выделяются отсутствием компонента 83, а также наличием β -конглютина в позиции 86 вместо характерной для других узколистного люпина сортов позиции 87. Компоненты, лежащие ниже зоны 95 (где находится, в частности, γ -конглютин), в этих условиях электрофореза формируются не стабильно. Для их анализа необходимо подобрать другие параметры проведения электрофореза (например, увеличить концентрацию геля).

В табл. 2 суммированы данные о полипептидах, полезных для сортовой идентификации узколистного люпина. Сортоспецифичные полипептиды или группы полипептидов имеют все сорта, кроме сортов Снежеть и Радужный. Последние практически не различаются между собой. Чтобы избежать ошибок, мы анализировали семена этих сортов из разных источников (коллекция ВИР, ВНИИ люпина за 2005, 2007 гг.). Сходство каждый раз подтверждалось. Для выяснения причин такого сходства исследовали белки их родительских форм этих сортов (рис. 2).

В создании сорта Снежеть в качестве родительских форм использованы сорт Таис 69 и гибрид между сортами Данко и Уникроп, а сорта Радужный — дикая африканская форма и сорт Пищевой белого люпина [19]. Нам не удалось найти семена всех исходных форм. В анализ были включены сорта Данко и Уникроп (родительские формы сорта Снежеть) и сорт Пищевой (родительская форма сорта Радужный). У всех исследованных родительских форм не наблюдается такого распределения полипептидов β -конглютина, как у сортов Снежеть и Радужный. Так, наиболее заметные особенности спектров этих сортов [присутствие компонентов 14(1), 19(4), 49(2), 53(2), 56(2) и отсутствие компонентов 9, 17, 18, 35, 50, 59] не наблюдались в спектрах их родителей. Возможно, что дополнительные компонен-

Таблица 2. Полипептиды или группы полипептидов, специфичные для каждого из исследованных сортов узколистного люпина

Сорт	Полипептиды
Белозерный-110	54(3), 55(3)
Смена	48(1)
Сидерат 38	5(2), 16(3, 5), 17(0, 2), 18(0, 3), 77(0–2), 82(0–2)
Немчиновский 846	9(2), 17(5), 41(2)
Дикаф 14	9(2), 23(0, 5), 24(0, 5), 28(2), 56(5), 76(2)
Надежда	26(1), 50(0)
Кристалл	72(0), 79(0)
Немчиновский 97	9(3), 17(5), 44(0, 3), 45(0, 3), 78(2)
Ладный	16(0, 2, 3), 17(0, 4), 18(1–3), 44(0, 3), 45(0, 3), 78(2), 79(2)
Снежеть и Радужный	5(2), 19(4), 49(2), 53(2), 56(2), 60(0–2), 86(2)

ты в спектрах сортов Снежеть и Радужный внесены неизученными нами родителями. Отсутствие нескольких родительских полипептидов позволяет предположить использование в селекции сортов Снежеть и Радужный достаточно отдаленных скрещиваний [6, 20]. Полученные нами результаты оставляют открытым вопрос о причинах сходства белков семян сортов Снежеть и Радужный и их обоснованности от других сортов узколистного люпина.

Сорт Дикаф 14 выделяется в ряду других узколистных люпинов наличием полипептидов 9(2), 28(2), 49(1), 56(5), 76(2) и отсутствием полипептидов 8, 27, 55. Наиболее существенной особенностью спектров этого сорта является наличие у 15 % семян интенсивного β -конглютина в позиции 24.

Очень близкие между собой сорта Немчиновский 97 и Немчиновский 846 характеризовались наличием полипептида 9, отсутствующего у большинства сортов. Между собой эти сорта различались одним полипептидом. У большинства сортов, в том числе и у Немчиновского 846, присутствовал полипептид β -конглютина в позиции 45. У Немчиновского 97 эта позиция наблюдалась в 10 % семян, а основная масса семян имела этот конглютин в позиции 44.

Наиболее заметной отличительной особенностью спектров сорта Ладный явилось наличие двух вариантов в интервале позиций 16 – 18, вариабельность смежных позиций компонента 44(0, 5), 45(0, 5) и отсутствие компонента 83, встречающегося у других сортов с различной частотой и интенсивностью (0, 1, 2).

В спектрах сорта Сидерат 38 присутствует компонент 5(2), что отмечалось еще только у сортов Снежеть и Радужный. В интервале позиций 16 – 18 у этого сорта наблюдалось два варианта набора полипептидов отличных от других сортов (табл. 2). Кроме того, в отдельных семенах этого сорта присутствовал компонент 82(2), практически не наблюдавшийся у других сортов.

Спектры сортов Белозерный-110, Надежда, Кристалл, Смена совпадали по большинству полипептидных позиций. Тем не менее сорт Белозерный-110 имел два полипептида 54(3) и 55(3), тогда как большинство сортов в этой части спектра характеризовались одним интенсивным полипептидом 55(5). Кроме того, у этого сорта обнаружен сортоспецифический полипептид слабой интенсивности 81(1). Другие сорта этой группы можно различить только по сочетанию слабых по интенсивности компонентов. У сорта Надежда во всех семенах присутствовал компонент 83(2), встречающийся у других сортов с разной интенсивностью — 83(0, 1, 2). Сорт Кристалл в этой группе отличался отсутствием компонентов 52, 77, 79, а также, помимо варианта 42(2) и 43(0), он имел семена с набором полипептидов 42(1) и 43(1). Сорт Смена выделялся только наличием слабого по интенсивности компонента 48.

Мы включили в исследование родительские формы близких по полипептидным спектрам сортов Белозерный-110 и Надежда. Сорт Белозерный-110 получен гибридизацией сортообразца Ласа розового (ВНИИ люпи-

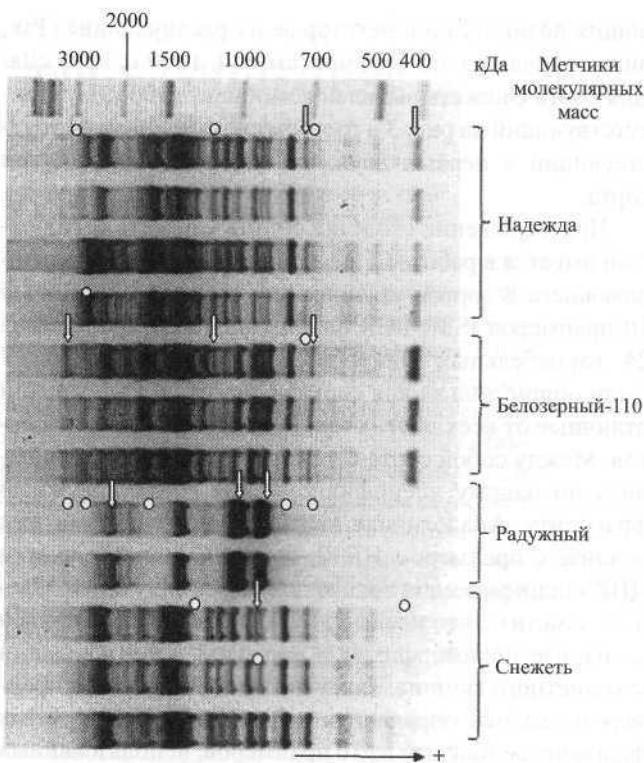


Рис. 3. ISSR спектры сортов узколистного люпина, полученные с праймером HB12; стрелками отмечены фрагменты ДНК, специфические для сорта

на) и сорта Узколистный 109, сорт Надежда — гибридизацией сортов Фрост и Першацвет. Удалось проанализировать по одной из родительских форм от каждого сорта (рис. 3). Сорта Белозерный-110 и Узколистный 109 совпадали по большинству полипептидных позиций, как и сорта Першацвет и Надежда. Их отличия касались полипептидов 7 и 8. Причем Белозерный-110 и Надежда имели набор полипептидов 7(0), 8(1), а сорта Узколистный 109 и Першацвет — 7(2), 8(0). Кроме того, сорта Белозерный-110 и Узколистный 109 различались еще по одной полипептидной позиции: Белозерный-110 — 18(3), Узколистный 109 — 18(0).

Для уточнения полученных данных белкового анализа, а также оценки перспектив сортовой идентификации с помощью ДНК-маркеров в исследование был привлечен микросателлитный анализ с праймером HB12. Сравнивали спектры ДНК фрагментов сортов Надежда, Белозерный-110, Снежеть, Радужный (рис. 3). Как видно из рисунка, для всех исследованных сортов находили специфические фрагменты ДНК. Причем резко выделялся сорт Радужный, как по присутствию интенсивных фрагментов ДНК 800 – 1000 и 2000 кДа, так и по отсутствию фрагментов 600, 1000 и 1500 кДа, характерных для спектров других сортов. Сорт Снежеть по спектру ДНК фрагментов не совпадал с сортами Радужный и незначительно отличался от сортов Белозерный и Надежда. В частности, в его спектре отсутствовали фрагменты 400 и 1200 кДа, присутствующие у сортов Надежда и Белозерный-110. Спектры последних двух сортов имели достаточно много

общих позиций, но и некоторые их различающие. Так, они различались по фрагментам 700, 1200 и 3000 кДа. Для сорта Снежеть выявлен компонент (900 кДа), присутствующий на рис. 3 в третьем спектре снизу и отсутствующий в первых двух, т.е. вариабельный внутри сорта.

Подтверждение сходства сортов Снежеть и Радужный имеется в работе С. Ю. Гришина [13], проанализировавшего 8 сортов узколистного люпина с помощью 10 праймеров ISSR-PCR анализом. По его данным, из 24 вариабельных микросателлитных фрагментов 7 были общие только для сортов Снежеть и Радужный и отличные от всех других или большинства других сортов. Между собой сорта Снежеть и Радужный различались по одному специальному для сорта Радужный фрагменту. Аналогичная картина получена нами при анализе с праймером HB12, который выявил участки ДНК специфические только для сорта Радужный. Следует заметить, что праймер HB12 весьма перспективен в анализе полиморфизма и сортовой идентификации узколистного люпина. Так, у четырех сортов этим праймером удалось определить не менее 8 полиморфных фрагментов. Каждый из 10 праймеров, использованных С. Ю. Гришиной, выявлял от одного до пяти таких фрагментов. Это свидетельствует о необходимости использования набора праймеров для разработки метода регистрации сортов.

Таким образом, методом электрофореза выявлен полиморфизм и сортовая специфичность белков семян люпина узколистного. Это дает возможность говорить о перспективности такого метода для регистрации и сортовой идентификации этой культуры. Для сортов, трудноразличимых по белкам, обнадеживающие результаты дает анализ ПЦР фрагментов ДНК с праймером HB12, однако на данном этапе методы ДНК анализа представляются нам более дорогостоящими и трудоёмкими.

Заключение

Районированные в России сорта люпина узколистного могут быть идентифицированы по белковым или ДНК маркерам. Маркеры необходимы для защиты прав селекционеров. Они открывают новые перспективы для совершенствования схем семеноводства этой культуры. При отборе родоначальных растений проведение электрофоретического анализа белков каждого из них позволит исключить засорение однородных сортов и

сохранить состав и соотношение биотипов у многокомпонентных сортов. Кроме того, электрофорез — надежный метод контроля сортовой чистоты партий семян и товарного зерна.

Авторы выражают искреннюю благодарность В. И. Костюченко за внимание и интерес к работе и Е. К. Потокиной за методическую помощь.

ЛИТЕРАТУРА

1. Купцов Н. С., Такунов И. П. Люпин (генетика, селекция, гетерогенные посевы). — Брянск, 2006. — 576 с.
2. Агеева П. А., Борисова С. Н. / Кормопроизводство. 2001. № 1. С. 14.
3. Indena S., Morazzoni P., Duranti M. / PST/EP2004/001111.06.02.2004.
4. Scarafoni A., Cataldo A., Magni C., Duranti M. / Proceeds. of the 10th Int. Lupin Conf. 2002. P. 314.
5. Идентификация сортов и регистрация генофонда культурных растений по белкам семян / Под ред. В. Г. Конарева. — СПб., 2000. — 186 с.
6. Анисимова И. Н. / Аграрная Россия. 2002. № 3. С. 52 – 58.
7. Фарбер С. П. / Аграрная Россия. 2002. № 3. С. 59 – 62.
8. Якупова И. А., Анисимова И. Н., Шашилова Л. И. / Аграрная Россия. 2005. № 2. С. 26 – 30.
9. Гаврилюк И. П., Губарева, Н. К., Смирнова Е. В., Пыженков В. И. / Аграрная Россия. 2005. № 2. С. 13 – 19.
10. Редько Ю. В. Тез. докл. Межд. науч.-практ. конф. «Люпин и амарант — источники новых пищевых и диетических продуктов». — СПб., 1996. С. 60 – 62.
11. Кутузова С. Н., Гаврилюк И. П., Егги Э. Э. / Тр. по прикл. бот., генет., селек. 1999. Т. 156. С. 29 – 39.
12. Артюхова А. В. Брянский гос. унив. / E-mail: nasteva@list.ru.
13. Гришин С. Ю. Брянский гос. унив. / E-mail: граeуxxxx@mail.ru.
14. Yorgancilar M., Babaoglu M., Hakki E. E., Atalay E. / Afric. J. Biotechnol. 2009. V. 8. No. 15. P. 3524 – 3530.
15. Laemli U. K. / Natura. 1970. V. 227. No. 4. P. 680.
16. Reddy M. P., Sarla N., Siddig E. A. / Euphytica. 2002. V. 128. P. 9 – 17.
17. Sudisha J., Kumar A. S., Niranjana S. R., et al. / Australasian Plant Paphol. 2009. V. 38. P. 216 – 221.
18. Домороценкова М. Л., Демьяненко Т. Ф., Мехтиев В. С., Егги Э. Э. / Хран. и перераб. сельхозсырья. 2009. № 10. С. 53 – 56.
19. Агеева П. А., Лукашевич М. И., Саввичева И. К. и др. / Сорта селекции Всероссийского научно-исследовательского института люпина. — Брянск, 2005. — 120 с.
20. Конарев В. Г. Белки растений как генетические маркеры. — М.: Колос, 1983. — 320 с.

Поступила 10.02.2012

Егги Э. Э., канд. биол. наук; Вишневская М. С.; Гаврилюк И. П., докт. биол. наук
ВНИИ растениеводства им. Н. И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург
ipg1011@mail.ru

Мехтиев В. С., канд. техн. наук; Красильников В. Н., докт. техн. наук
Санкт-Петербургский торгово-экономический институт, Санкт-Петербург
Агеева П. А., канд. с.-х. наук; Гапонов Н. В., канд. биол. наук
ВНИИ люпина, Брянск