
ГЕНЕТИКА, МИКРОБИОЛОГИЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

GENETICS, MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY

УДК 582.736:633.367.1:577.13

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АЛКАЛОИДНЫХ И БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ В КАЧЕСТВЕ МАРКЕРНЫХ ПРИЗНАКОВ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ ОБРАЗЦОВ РАЗНЫХ ВИДОВ ЛЮПИНА

И. Ю. РОМАНЧУК¹⁾, В. С. АНОХИНА¹⁾, И. Б. САУК¹⁾, В. В. ДУКСИНА¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь

Приведены результаты исследования компонентов алкалоидного и белкового комплексов разных видов люпина (*Lupinus* L.). У коллекционных образцов люпина желтого, белого, узколистного и других видов установлено

Образец цитирования:

Романчук И. Ю., Анохина В. С., Саук И. Б., Дуксина В. В. Использование алкалоидных и белковых комплексов в качестве маркерных признаков генетической характеристики образцов разных видов люпина // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 1. С. 49–55.

For citation:

Ramanchuk I. Y., Anokhina V. S., Sauk I. B., Duksina V. V. Use alkaloid and protein complexes as a marker genetic characteristics of samples of different species of lupine. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 1. P. 49–55 (in Russ.).

Авторы:

Ирина Юрьевна Романчук – научный сотрудник сектора генетики растений научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

Вера Степановна Анохина – кандидат биологических наук, доцент; заведующий сектором генетики растений научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

Ирина Борисовна Саук – старший научный сотрудник сектора генетики растений научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

Валентина Викторовна Дуксина – научный сотрудник сектора генетики растений научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

Authors:

Irina Ramanchuk, researcher at the plant genetics sector at the laboratory of molecular genetics and biotechnology at the department of genetics, faculty of biology.

Vera Anokhina, PhD (biology), docent; head of the plant genetics sector at the laboratory of molecular genetics and biotechnology at the department of genetics, faculty of biology. anokhina@tut.by

Irina Sauk, researcher at the plant genetics sector at the laboratory of molecular genetics and biotechnology at the department of genetics, faculty of biology.

Valentina Duksina, researcher at the plant genetics sector at the laboratory of molecular genetics and biotechnology at the department of genetics, faculty of biology.

наличие видоспецифичных компонентов алкалоидного комплекса. Отмечено также отсутствие полиморфизма по этому показателю у образцов люпина узколистного в течение разных этапов онтогенеза растений. Показана возможность применения белковых спектров различных образцов для установления филогенетических связей внутри вида даже при незначительном полиморфизме компонентов спектра. С помощью методов гибридизации и мутагенеза получены новые образцы люпина узколистного с аллелем устойчивости к антракнозу. Приведенные результаты могут быть использованы для составления биохимической части паспорта сорта.

Ключевые слова: люпин; виды; алкалоиды; запасные белки.

Благодарность. Исследования проведены при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований и в рамках программы «Генофонд».

USE ALKALOID AND PROTEIN COMPLEXES AS A MARKER GENETIC CHARACTERISTICS OF SAMPLES OF DIFFERENT SPECIES OF LUPINE

I. Y. RAMANCHUK^a, V. S. ANOKHINA^a, I. B. SAUK^a, V. V. DUKSINA^a

^aBelarusian State University, Nezavisimosti avenue, 4, 220030, Minsk, Republic of Belarus

Corresponding author: anokhina@tut.by

Biochemical and molecular-genetic analysis of BSU core collection samples have shown wide diversity of parent lines, cultivars and variants according to examined marker-based traits. According to alkaloid content of vegetative parts and seeds analysis in yellow lupin, sources of high and low alkaloid content were found, with means of further practical use in various direct in of selection. Also, its confirmed there is presence of rare storage protein components, which can be recommended for cultivar certification. Data of biochemical polymorphism in samples are confirmed also by molecular-genetic marking results.

Key words: lupine; species; alkaloids; storage proteins.

Acknowledgements. The research was carried out with the support of the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research and out within the framework of the «Genofond» program.

Введение

Значимость культуры люпина в сельском хозяйстве обусловлена его биологическими характеристиками: высоким содержанием легкоусвояемого белка, мощной корневой системой, делающей доступными питательные вещества из глубоких слоев почв, азотфиксирующей способностью в симбиозе с бактериями, благодаря чему возможно использовать разные виды люпина на сидеральные, кормовые, лекарственные, а также в перспективе и пищевые цели [1; 2].

Для эффективного подбора родительских компонентов скрещивания в зависимости от целей и направлений селекции возникает необходимость их идентификации по комплексу признаков как морфологических, так и биохимических и молекулярно-генетических.

Материалы и методы исследований

Алкалоидность определяли в семенах и зеленой массе разных видов люпина по [3]. Электрофорез и изучение компонентов спектра проводили по [4; 5]. Детекцию гена антракнозостойчивости осуществляли с применением праймера AnMan [6].

Результаты и их обсуждение

Изучение количественного содержания и качественного состава алкалоидного комплекса различных образцов люпина показало значительные колебания этих показателей в зависимости от года возделывания, а также места репродукции. При этом качественный состав алкалоидного комплекса сортов разных видов люпина был практически неизменным независимо от условий возделывания (табл. 1 и 2), что подтверждается также данными других исследований [7–9].

Необходимо отметить, что у отдельных сортов люпина желтого нами был выявлен алкалоид индольной группы грамин в отличие от наличия только хинолизидиновых алкалоидов у других форм.

Большинство из граминсодержащих образцов относились к сортам польской селекции либо являлись формами, полученными от скрещивания этих сортов с другими, не содержащими грамина. С использованием чистого алкалоида грамина установлена иная по сравнению с хинолизидиновыми алкалоидами длина волны поглощения спектра грамином, что позволяет легко идентифицировать граминсодержащие формы (рис. 1), что было показано нами впервые [10].

Анализ качественного состава алкалоидного комплекса подтвердил наличие основных алкалоидов: люпинина и спартеина – у люпина желтого, люпинина и 13-гидроксилюпинина – у люпина узколистного, альбина – у люпина белого. Наличие разных алкалоидов в названных видах люпина дает основания для их использования при идентификации и служит маркерным признаком между видами (см. табл. 1) [11].

У отдельных образцов с минимальным содержанием алкалоидов не удалось провести анализ качественного состава алкалоидного комплекса.

Таблица 1

Алкалоидный комплекс разных видов люпина

Table 1

Alkaloid complex of different types of lupine

Вид	Известные алкалоиды-стандарты, имеющиеся в наличии						Неизвестные алкалоиды
	Г	П	СП	ЛА	13ГЛ	ЛИ	
<i>Lupinus albus</i> , сорт Пищевой	–	–	+	+	+	–	+
<i>L. albus</i> № 1165	–	–	+	+	+	–	+
<i>L. hybridus</i> Lem.	–	–	–	+	+	–	–
<i>L. elegans</i> H. B. K.	–	–	+	+	+	–	–
<i>L. subcarnosus</i> Hook.	–	–	+	+	+	–	–
<i>L. digitatus</i> Forsk.	–	–	–	–	–	–	+
<i>L. linifolius</i> Roth.	–	–	–	–	–	–	+
<i>L. termis</i>	–	–	–	–	–	–	+
<i>L. luteus</i> L.	+	–	+	–	–	+	–
<i>L. angustifolius</i> L.	–	+	–	+	+	–	–
<i>L. mutabilis</i> L.	–	–	–	+	–	–	+

Примечание. Г – грамин; П – пахикарпин; СП – спартеин; ЛА – люпинин; 13ГЛ – 13-гидроксилюпинин; ЛИ – люпинин.

Таблица 2

Алкалоидный комплекс сортообразцов люпина узколистного

Table 2

Alkaloid complex varieties of blue lupine

Образец сорта	Место возделывания	Алкалоидность, % относительно сухого вещества (ОСВ)	Алкалоиды						Другие алкалоиды
			П	СП	ЛА	13ГЛ	ЛИ	ЦОГЛ	
Результаты экологического испытания (семена)									
Вясковы	Жодио	≤ 0,013*				+			+
	Пружаны	≤ 0,013*				+			+
	Минск	0,042 ± 0,001*				+	+		+
Лангуст	Жодио	0,048 ± 0,000*			+				+
	Пружаны	0,031 ± 0,003*			+				
	Минск	0,057 ± 0,002*				+			

Образец сорта	Место возделывания	Алкалоидность, % относительно сухого вещества (ОСВ)	Алкалоиды						Другие алкалоиды
			П	СП	ЛА	13ГЛ	ЛИ	ЦОГЛ	
Радужный	Жодино	$\leq 0,013^*$							
	Пружаны	$\leq 0,013^*$							
	Минск	$0,022 \pm 0,000^*$	+		+				
Прывабны	Жодино	$\leq 0,013^*$							
	Пружаны	$\leq 0,013^*$	+						
	Минск	$\leq 0,013^*$			+				
Добрыня	Жодино	$0,030 \pm 0,001^*$				+			+
	Пружаны	$0,032 \pm 0,001^*$				+			+
	Минск	$0,040 \pm 0,000^*$				+			+
Дзіўны	Жодино	$0,072 \pm 0,000^*$	+						
	Пружаны	$0,077 \pm 0,001^*$	+		+				
	Минск	$0,075 \pm 0,002^*$				+			+
Знічка	Жодино	$0,074 \pm 0,001^*$							+
	Пружаны	$0,074 \pm 0,000^*$							+
	Минск	$0,084 \pm 0,003^*$							+
Результаты исследования на разных этапах развития растений									
Брянский 1121	Семена	$0,086 \pm 0,003^*$		+					+
	Листья	$0,067 \pm 0,005^*$	+						+
Брянский 123	Семена	$0,095 \pm 0,000^*$		+					+
	Листья	$0,047 \pm 0,001^*$	+						+
Миртан	Семена	$0,232 \pm 0,000^*$		+		+			+
Шляггіе	Семена	$\leq 0,013^*$							+
Хвалько	Семена	$0,212 \pm 0,000^*$	+			+			+
Кристалл	Семена	$0,115 \pm 0,001^*$	+			+			+

* Результаты достоверны при P не менее 0,05. ЦОГЛ – циннамоилоксигидроксилупанин.

В работах [4; 5; 12] показано, что люпин узколистый (*L. angustifolius* L.) и люпин белый (*L. albus* L.) имеют большую степень разнообразия в спектрах запасных белков, что связано, видимо, с достаточно широким использованием в селекции исходного материала из разных мест происхождения. Сорта же люпина желтого (*L. luteus* L.) не показывают такого разнообразия белковых спектров и обладают большей гомологией запасных белков. Сходные данные были получены и при исследованиях в БГУ коллекций двух видов люпина [13]. Спектры, полученные в результате исследований и представленные в виде статистических таблиц, были обработаны с помощью пакета программ *Statistica 8.0*.

Выявленные различия обеспечили возможность построения филогенетического древа сортов стержневых коллекций люпина желтого и узколистного, имеющихся в БГУ, результаты которого подтверждались также историей происхождения сортов (рис. 2 и 3).

Однако полная информация о происхождении и близкородственных связях известна сегодня не для всех образцов. В связи с этим применение белковых маркеров способствовало выделению среди образцов двух стержневых коллекций (люпина желтого и узколистного) близкородственных и филогенетически удаленных групп, что может использоваться при разработке программ дальнейшей селекции люпина для разных целей.

По данным молекулярно-генетического анализа, нами также выявлен полиморфизм внутри видов как по праймерам хозяйственно ценных признаков, так и по праймерам генов функциональных белков. На основании системы скрещиваний и методов мутагенеза получены новые перспективные генотипы с генами устойчивости к антракнозу (пример приведен на рис. 4 в дорожках 4; 5; 7 у образцов 64/09, контроль; 58/09, 750 Гр; 58/09, контроль).

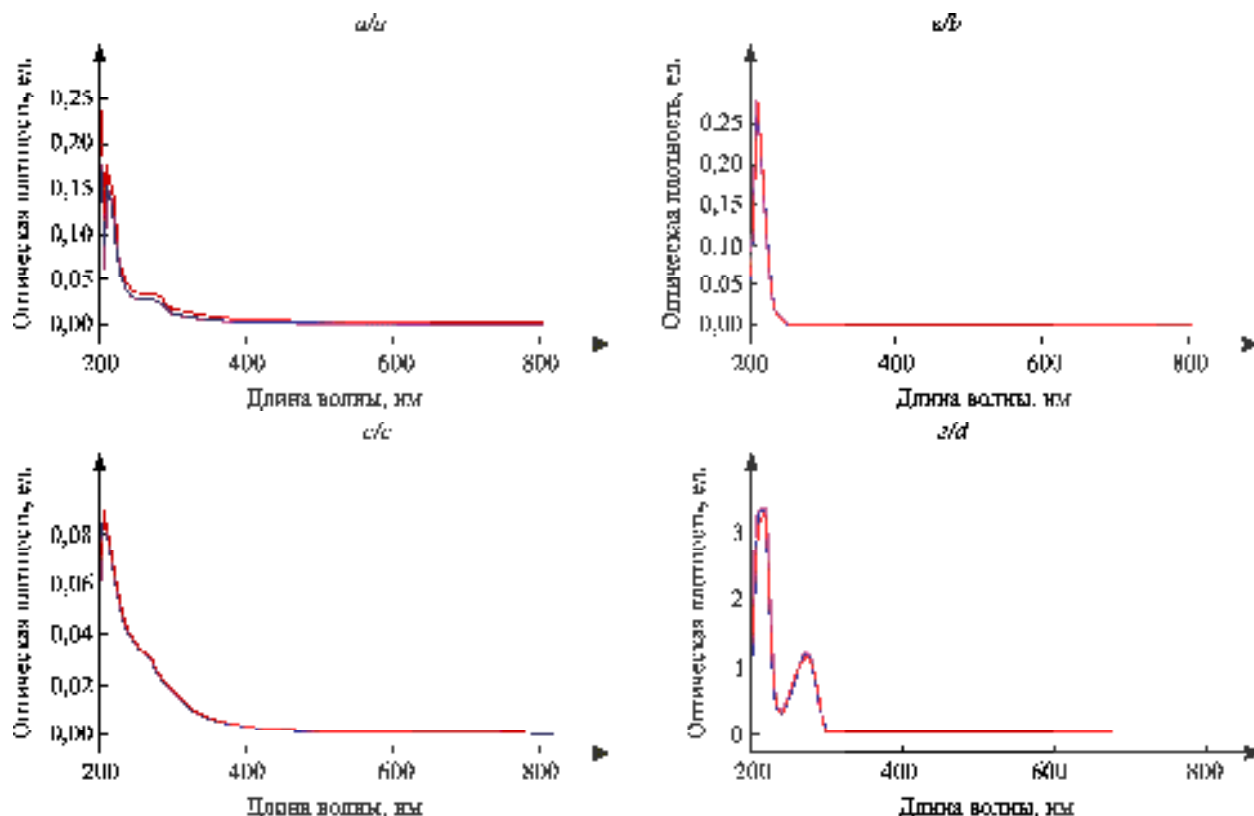


Рис. 1. Спектры поглощения алкалоидов-стандартов при разведении в 1 % соляной кислоте:
а – спартеина сульфат пятиводный; б – люпанина перхлорат; в – люпинин; г – грамин чистый. Цветом выделены повторности опыта: красным – первая; синим – вторая; фиолетовым – третья
Fig. 1. The absorption spectra of the alkaloids standards at a dilution of 1 % hydrochloric acid:
а – sparteine sulfate; б – lupanine perchlorate; в – lupinine; г – gramine pure. Color is marked repetition of the experiment:
red – the first; blue – the second; purple – the third

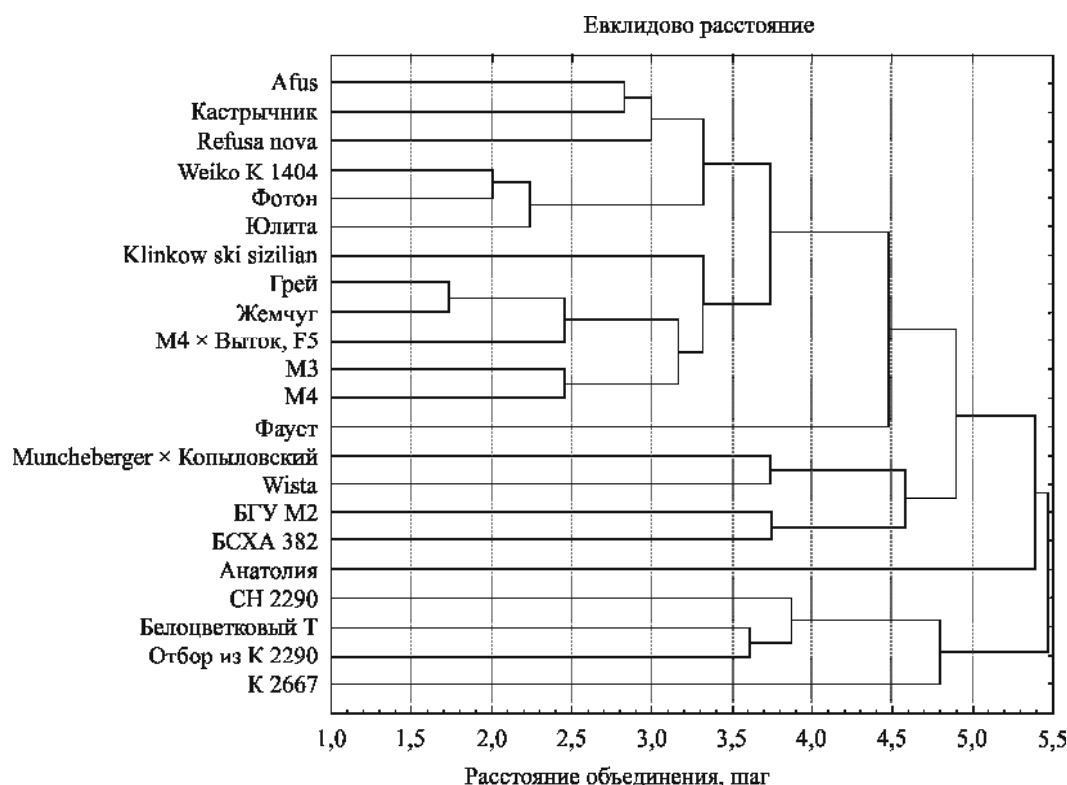


Рис. 2. Филогенетическое древо люпина желтого, построенное по спектрам запасных белков
Fig. 2. The phylogenetic tree of yellow lupine, built from the spectra of storage proteins

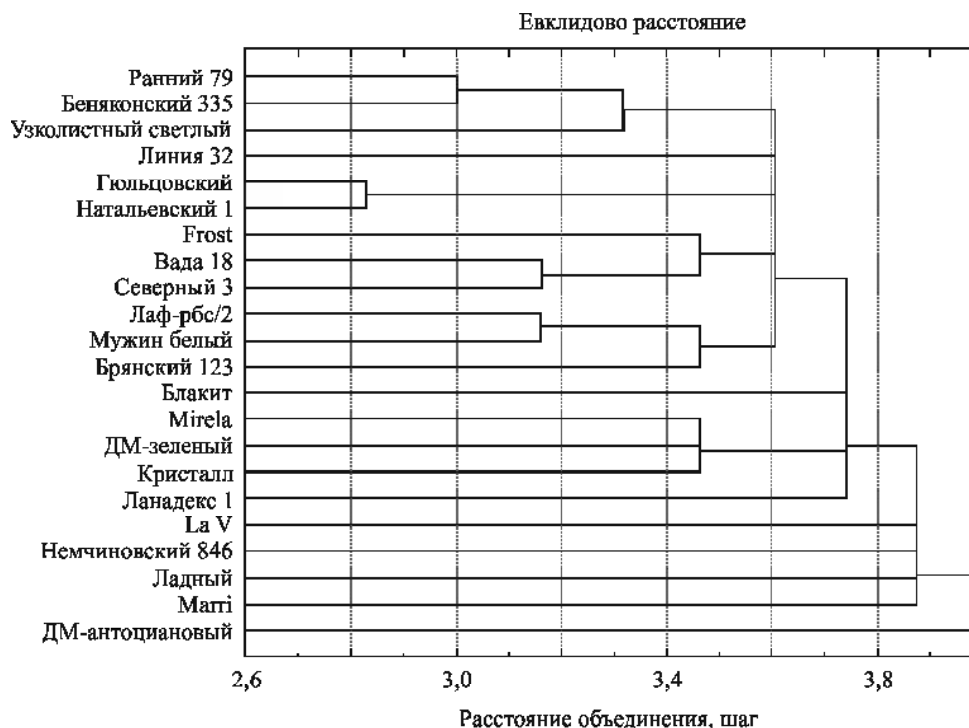


Рис. 3. Филогенетическое древо люпина узколистного, построенное по спектрам запасных белков

Fig. 3. The phylogenetic tree of blue lupine, built from the spectra of storage proteins

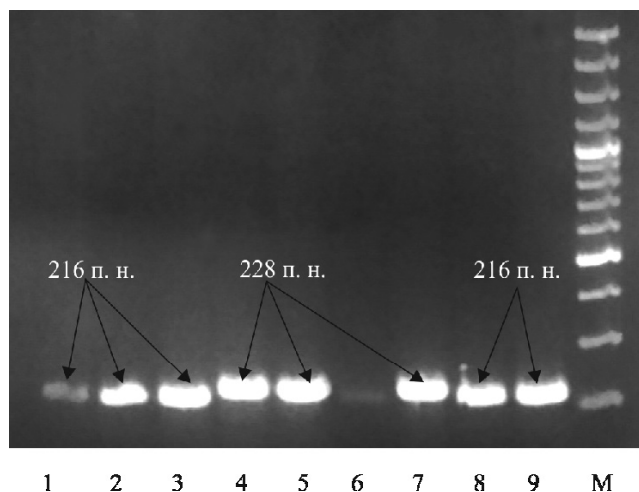


Рис. 4. Родительские и мутантные образцы с перспективным аллелем антракнозустойчивости (228 п. н.) [6] по праймеру AnMan: 1 – Кристалл (1000 Гр); 2 – Кристалл (750 Гр); 3 – Кристалл (контроль); 4 – 64/09 (контроль); 5 – 58/09 (750 Гр); 6 – 58/09 (1000 Гр); 7 – 58/09 (контроль); 8 – Фазан (1000 Гр); 9 – 836/05 (контроль); М – маркер молекулярного веса от 1500 до 100 п. о.

Fig. 4. Parent and mutant samples with allele resistance to anthracnose (228 bp) [6] on the primer AnMan: 1 – Crystal (1000 Gy); 2 – Crystal (750 Gy); 3 – Crystal (control); 4 – 64/09 (control); 5 – 58/09 (750 Gy); 6 – 58/09 (1000 Gy); 7 – 58/09 (control); 8 – Fasan (1000 Gy); 9 – 836/05 (control), M – DNA Ladder, Fermentas (1500–100 bp)

Заключение

На основании проведенных исследований в секторе генетики растений кафедры генетики биологического факультета БГУ были изучены стержневые коллекции люпина желтого и узколистного по комплексу биохимических и молекулярно-генетических признаков и составлены паспорта образцов, которые обеспечивают защиту авторских прав. Полученные данные также следует учитывать при подборе родительских компонентов в случае селекции люпина на различные цели.

Библиографические ссылки

1. Анохина В. С., Дебелый Г. А., Конорев П. М. Люпин: селекция, генетика, эволюция. Минск, 2012.
2. Купцов Н. С., Привалов Ф. И., Матыс И. С. Стержневая генетическая коллекция *Lupinus angustifolius* L.: генетика, формирование биологического банка генов, использование. Минск, 2014.
3. Яговенко Т. В., Рудометкина М. В., Рудометкин С. В. и др. Усовершенствованный колориметрический метод определения алкалоидов в люпине // Кормопроизводство. 2004. № 3. С. 27–29.
4. Идентификация сортов и регистрация генофонда культурных растений по белкам семян / под ред. В. Г. Конарева. СПб., 2000.
5. Eggi Э. Э. Идентификация сортов люпина узколистного (*Lupinus angustifolius* L.) с использованием электрофоретического спектра полипептидов белков семян. СПб., 2013.
6. Yang H., Renshaw D., Thomas G., et al. A strategy to develop molecular markers applicable to wide range of crosses for marker assisted selection in plant breeding: a case study on anthracnose disease resistance in lupin (*L. angustifolius* L.) // Mol. Breeding. 2008. Vol. 21. P. 473–483.
7. Kamel K. A., Swiecicki W., Kaczmarek Z., et al. Quantitative and qualitative content of alkaloids in seeds of a narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.) // Genet. Resour. Crop. Evol. 2015. Vol. 3. P. 239–245.
8. Świecicki W., Kamel K., Barzyk P. Alkaloids in seeds of the Polish *Lupinus angustifolius* L. collection // Proc. Book of the XIV Int. Lupin conf. (Milan, 21–26 June, 2015). Milan, 2015. P. 129.
9. Mulder P. P. J., de Nijs M. Determination of quinolizidine alkaloids in lupin flour by LC-MS/MS A promising novel way of analysis // Proc. Book of the XIV Int. Lupin conf. (Milan, 21–26 June, 2015). Milan, 2015. P. 75.
10. Анохина В. С., Цибульская И. Ю. О возможности использования современных методических приемов анализа качественного состава комплекса алкалоидов люпина // Материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 125-летию со дня рождения С. И. Жегалова (Москва, 7–9 авг. 2006 г.). М., 2006. Т. 2. С. 46–48.
11. Романчук И. Ю., Анохина В. С. Алкалоидный и белковый комплексы как маркерные признаки для генетической характеристики видов люпина // Материалы Междунар. науч. конф. (Санкт-Петербург, 1–3 нояб. 2016 г.). СПб., 2016. С. 87–89.
12. Eggi Э. Э., Вишневецкая М. С., Агеева П. А. и др. Использование полиморфизма белков семян для сортовой идентификации люпина узколистного (*Lupinus angustifolius* L.) // Аграр. Россия. 2012. № 4. С. 2–8.
13. Романчук И. Ю., Анохина В. С., Саук И. Б. и др. Молекулярно-генетическая и биохимическая характеристика образцов стержневой коллекции люпина желтого // Тр. БГУ. Сер.: Физиол., биохим. и мол. основы функционирования биосистем. 2015. Т. 10, №. 1. С. 127–132.

References

1. Anokhina V. S., Debeliy G. A., Konorev P. M. Lupin: selektsiya, genetika, evolutsiya [Lupine: selection, genetic, evolution]. Minsk, 2012 [in Russ.].
2. Kuptsov N. S., Privalov F. I., Matys I. S. Sterzhnevaya geneticheskaya kollektsiya *Lupinus angustifolius* L.: genetika, formirovanie biologicheskogo banka genov, ispol'zovanie [Core genetic collection *Lupinus angustifolius* L.: genetic, the formation of biological gene bank, the use]. Minsk, 2014 [in Russ.].
3. Yagovenko T. V., Rudometkina M. V., Rudometkin S. V., et al. Usovershenstvovannyi kolorimetricheskii metod opredeleniya alkaloidov v lyupine [Advanced colorimetric method for the determination of alkaloids in lupine]. *Kormoproizvodstvo*. 2004. No. 3. P. 27–29 [in Russ.].
4. Identifikatsiya sortov i registratsiya genofonda kul'turnykh rastenii po belkam semyan [Identification of varieties and registration of the genofond of cultivated plants by seed proteins] / ed. by V. G. Konarev. Saint Petersburg, 2000 [in Russ.].
5. Eggi E. E. Identifikatsiya sortov lyupina uzkolistnogo (*Lupinus angustifolius* L.) s ispol'zovaniem elektroforeticheskogo spektra polipeptidov belkov semyan [Identification of varieties of blue lupine (*Lupinus angustifolius* L.) using electrophoretic spectrum of polypeptides seed proteins]. Saint Petersburg, 2013 [in Russ.].
6. Yang H., Renshaw D., Thomas G., et al. A strategy to develop molecular markers applicable to wide range of crosses for marker assisted selection in plant breeding: a case study on anthracnose disease resistance in lupin (*L. angustifolius* L.). *Mol. Breeding*. 2008. Vol. 21. P. 473–483.
7. Kamel K. A., Swiecicki W., Kaczmarek Z., et al. Quantitative and qualitative content of alkaloids in seeds of a narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Genet. Resour. Crop. Evol.* 2015. Vol. 3. P. 239–245.
8. Świecicki W., Kamel K., Barzyk P. Alkaloids in seeds of the Polish *Lupinus angustifolius* L. collection. *Proc. Book of the XIV Int. Lupin conf. (Milan, 21–26 June, 2015)*. Milan, 2015. P. 129.
9. Mulder P. P. J., de Nijs M. Determination of quinolizidine alkaloids in lupin flour by LC-MS/MS A promising novel way of analysis. *Proc. Book of the XIV Int. Lupin conf. (Milan, 21–26 June, 2015)*. Milan, 2015. P. 75.
10. Anokhina V. S., Tsibul'skaya I. Yu. O vozmozhnosti ispol'zovaniya sovremennykh metodicheskikh priemov analiza kachestvennogo sostava kompleksa alkaloidov lyupina [On the possibility of the use of modern teaching methods of the analysis of qualitative composition of the complex alkaloid lupine]. *Proc. Int. sci. and pract. conf. (Moscow, 7–9 August, 2006)*. Moscow, 2006. Vol. 2. P. 46–48 [in Russ.].
11. Romanchuk I. Yu., Anokhina V. S. Alkaloidnyi i belkovyi komplekсы kak markernye priznaki dlya geneticheskoi kharakteristiki vidov lyupina [Alkaloid and protein complexes as marker signs for genetic characteristics of species of lupin]. *Proc. Book Int. sci. conf. (Saint Petersburg, 1–3 Novemb., 2016)*. Saint Petersburg, 2016. P. 87–89 [in Russ.].
12. Eggi E. E., Vishnevskaya M. S., Ageeva P. A., et al. Ispol'zovanie polimorfizma belkov semyan dlya sortovoi identifikatsii lyupina uzkolistnogo (*Lupinus angustifolius* L.) [Using polymorphism seed proteins for varietal identification of blue lupine (*Lupinus angustifolius* L.)]. *Agrarnaya Rossiya*. 2012. No. 4. P. 2–8 [in Russ.].
13. Romanchuk I. Yu., Anokhina V. S., Sauk I. B., et al. Molekulyarno-geneticheskaya i biokhimicheskaya kharakteristika obraztsov sterzhnevoi kollektsii lyupina zheltogo [Molecular genetic and biochemical characterization of samples of core collection of yellow lupine]. *Tr. BGU. Ser.: Fiziol., biokhim. i mol. osnovy funkts. biosist.* 2015. Vol. 10, No. 1. P. 127–132 [in Russ.].