

Комплексная оценка образцов люпина узколистного (*Lupinus angustifolius* L.) из коллекции ВИР в условиях Беларуси

DOI: 10.30901/2227-8834-2021-3-74-85
 УДК 633.367.1:57.084.2:577.13:577.112.825
 Поступление/Received: 15.09.2021
 Принято/Accepted: 02.09.2021



Complex assessment of narrow-leaved lupine (*Lupinus angustifolius* L.) accessions from the VIR collection in Belarus

В. С. АНОХИНА^{1*}, И. Ю. РОМАНЧУК¹, И. Б. САУК¹,
 Г. П. ЕГОРОВА², М. А. ВИШНЯКОВА²

V. S. ANOKHINA^{1*}, I. YU. RAMANCHUK¹, I. B. SAUK¹,
 G. P. EGOROVA², M. A. VISHNYAKOVA²

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

* ✉ anokhina@tut.by, anokhina@bsu.by

² Федеральный исследовательский центр
 Всероссийский институт генетических ресурсов
 растений имени Н.И. Вавилова,
 190000 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44
 ✉ m.vishnyakova.vir@gmail.com

¹ Belarusian State University,
 4 Nezavisimosti Ave., Minsk 220030,
 Republic of Belarus

* ✉ anokhina@tut.by, anokhina@bsu.by

² N.I. Vavilov All-Russian Institute
 of Plant Genetic Resources,
 42, 44 Bolshaya Morskaya Street,
 St. Petersburg 190000, Russia
 ✉ m.vishnyakova.vir@gmail.com

В Минском районе Республики Беларусь изучено и описано по комплексу морфобиологических признаков, биохимическим и молекулярно-генетическим характеристикам 50 образцов люпина узколистного различного происхождения из коллекции ВИР им. Н.И. Вавилова. По результатам полевых и лабораторных исследований выделено 10 перспективных образцов, которые рекомендованы для использования в региональной селекции и включены в рабочую коллекцию Белорусского государственного университета.

Ключевые слова: алкалоиды, запасные белки, молекулярные маркеры, селекционно значимые признаки.

Fifty narrow-leaved lupine accessions of various origin from the VIR collection were studied in Minsk District, Republic of Belarus, and described by a set of morphobiological, biochemical and molecular-genetic characters. According to the results of field and laboratory studies, 10 promising accessions were selected. They are recommended for use in regional breeding programs and included in the working collection of the Belarusian State University.

Key words: agronomic traits, alkaloids, plant productivity, proteins.

Введение

Обогащение генофонда любой культуры крайне актуально, с одной стороны, для привлечения в селекционный процесс новых аллелей хозяйственно ценных признаков, способствующих расширению его генетической основы, с другой – для накопления и сохранения аллелей, невостребованных сегодня, но, возможно, представляющих ценность в моделях сортов будущего, для увеличения возможностей диверсификации использования культуры и т. п.

Пополнение генофонда возможно за счет гибридизации для получения новых комбинаций признаков и выявления рецессивных аллелей, путем мутагенеза для получения новых генотипов и фенотипов, а также пополнения коллекций гермоплазмы путем обмена с другими генбанками и селекционными учреждениями. При любом способе получения нового генетического материала необходимо его изучение с целью характеристики по комплексу признаков. При получении коллекционных образцов из удаленных генбанков большую роль играет оценка их адаптационных способностей в новых экологических условиях.

Объект исследования – люпин узколистный (*Lupinus angustifolius* L.), наиболее широко возделываемый из всех культивируемых видов люпина в мире (Gladstones, 1998). Это многофункциональная культура с далеко не полностью использованным потенциалом (Vishnyakova et al.,

2020). В настоящее время его выращивают главным образом в качестве кормовой и сидеральной культуры. Производство кормов на основе люпина в 2,5-3 раза дешевле, чем, например, из сои, при условии равной пищевой ценности (Privalov, Shor, 2015). Возделывание люпина способствует сохранению естественного плодородия почвы за счет азотфиксации и способности его мощной корневой системы проникать глубоко в почву и использовать большое количество питательных веществ, в том числе труднодоступного фосфора (Lambers et al., 2012). Уже сейчас пищевые ингредиенты из зерна люпина (мука, белковые изоляты, концентраты) используются в хлебобулочных и безглютеновых продуктах в европейских странах, но перспективы их использования гораздо шире (Lucas et al., 2015).

Несомненное преимущество люпина узколистного – высокая пластичность и способность расти на сравнительно бедных почвах в разных эколого-географических условиях (Egorova et al., 2020), в том числе в высоких широтах (до 60° с. ш.).

Республика Беларусь (РБ) входит в топ-10 стран – производителей люпина. Он считается оптимальной высокобелковой культурой, причем основные площади в настоящее время заняты именно люпином узколистным (Privalov, Shor, 2015). Однако урожайность культуры пока далека от желаемой, что в большой степени можно отнести за счет недостаточного использования генетического разнообразия генофонда в селекции.

Целью нашей работы было изучение комплекса признаков у образцов из коллекции ВИР в условиях Минского района Республики Беларусь, выделение перспективных форм для использования в селекционном процессе, а также включения в коллекцию люпина Белорусского государственного университета.

Материалы и методы исследований

Изучено 50 образцов люпина узколистного (табл. 1) из коллекции ВИР по морфобиологическим, биохимическим и молекулярно-генетическим параметрам.

Изучение образцов проводили в течение двух лет (2013, 2014 г.) в Ботаническом саду Белорусского государственного университета (БГУ), расположенном на юго-западной окраине г. Минска около деревни Щемыслица (53°49' с. ш., 27°27' в. д.). Земельный участок Ботанического сада БГУ относится к Ошмянско-Минскому агропочвенному району. Почвы здесь дерново-подзолистые, средне- и слабоподзоленные, развиваются на суглинках. Среднегодовая температура воздуха – +5,5°C, средняя температура января равна –6,9°C, июля – +17,8°C. Вегетационный период длится 170–200 дней, безморозный период – около 230 дней. Среднегодовое количество осадков составляет 650 мм. В весенне-летний период участок подвержен подтоплению, что связано как со слабопропускной способностью почв, так и с тем, что направления естественного стока перекрыты дорогами. Характерна высокая влажность воздуха (в холодное время года составляет 90–95%) (Hirilovich, Dzhus, 2009).

Посев семян осуществляли в третьей декаде апреля и первой декаде мая соответственно по годам.

Был проведен комплекс исследований, включающий:

- оценку полевой всхожести семян;
- определение процента выживаемости растений;
- анализ элементов структуры продуктивности растений;
- анализ количества алкалоидов в семенах и в зеленой массе;
- определение компонентного состава белков;
- молекулярное маркирование образцов.

Полевую всхожесть – количество взошедших растений, выраженное в процентах к высеванному количеству семян – определяли ежегодно; для обсуждения взят 2014 г.

Процент выживаемости растений вычисляли как отношение числа выживших к уборке растений к числу взошедших семян в процентах.

Анализ структуры продуктивности проводили по признакам: «число бобов», «число семян», «масса семян с растения» и «масса 1000 семян» в соответствии с методикой ВИР (Vishnyakova et al., 2018) и Международным классификатором СЭВ рода *Lupinus L.* (Stepanova et al., 1985).

Оценку содержания алкалоидов в вегетативной массе растений в полевых условиях определяли в период «бутионизация – начало цветения» экспресс-методом с помощью алкалоидочувствительной бумаги, пропитанной реактивом Драгендорфа (Ertnakov et al., 1987). В зависимости от проявления качественной реакции на бумаге образцы разделяли на безалкалоидные, малоалкалоидные и высокоалкалоидные. В последующем концентрацию алкалоидов в листьях и семенах определяли в лаборатории БГУ по методике Т. В. Яговенко с соавторами (Yagovenko et al., 2005). Для этого семена люпина предварительно измельчали в лабораторной зерновой мельнице

до состояния мелкодисперсной муки. Далее алкалоиды извлекали из полученной муки следующим способом: 0,1 г муки заливали 4 мл 8-процентной трихлоруксусной кислоты. После 16-часовой экстракции взвесь фильтровали, 0,1 мл экстракта вносили в градуированную пробирку с 3,0 мл дистиллированной воды, добавляли 0,15 мл йод-йодного реактива и колориметрировали через 4 мин при длине волны 500 нм. Количество алкалоидов определяли по калибровочной кривой, построенной по препарату алкалоида спартеина сульфату пятиводному (Fluka). По методике допускается использование препарата одного алкалоида для трех видов люпина.

Состав запасных белков изучали в зрелых семенах. Электрофорез в полиакриламидном геле проводили по Леммли в модификации (Konarev, 2000). Учет компонентов белковых спектров проводили, используя в качестве стандарта молекулярного веса белков набор PS-105 (Jena Bioscience, Germany). При этом белок-стандарт с молекулярной массой 63 кДа соответствовал 24-му компоненту шкалы, 25 кДа – 37-му компоненту соевой шкалы по рекомендации (Konarev, 2000).

Дендрограмма построена на основе полиморфизма белковых компонентов изученных образцов с применением пакета программ Statistica 6.0 по методу Уорда (Ward, 1963).

Молекулярное маркирование образцов выполнено с использованием праймеров к генам хозяйственно ценных признаков: нерастрескиваемость бобов (ген *lentus*) – праймер LeM2 (Boersma et al., 2007c), устойчивость к антракнозу (*AnMan*) – AnMan (Yang et al., 2008), отсутствие твердокаменности (*mollis*) – MoA (Boersma et al., 2007a), потребность в яровизации (*Ku*) – KuH (Boersma et al., 2007b). ПЦР проводили по стандартной методике с разделением продуктов амплификации в агарозном или полиакриламидном гелях с последующей окраской бромистым этидием и визуализацией в УФ-трансиллюминаторе.

Результаты

В опыте 2013 г. использовали семена образцов коллекции ВИР разных лет репродукции. Поэтому анализ полевой всхожести семян проводили только в 2014 г. – у семян репродукции 2013 г., выращенной в один год в одном месте. Полевая всхожесть репродуцированных семян значительно различалась (от 32,2 до 100%). Большая часть образцов имела всхожесть в интервале от 71 до 80% (13 образцов) (см. табл. 1, рис. 1).

Выживаемость растений варьировала у изученных образцов от 0 до 100%. Самая низкая выживаемость была характерна для образца к-3619 из Австралии, который за два года показал степень выживаемости 0,0 и 23,6% соответственно. Для образцов, у которых в 2013 г. не было получено полноценных семян, в 2014 г. использовали резервный фонд семян репродукции ВИР.

В 2013 г. 12 образцов (24% всей выборки) показали 100-процентную степень выживаемости. В 2014 г. ни один образец не показал 100% выживаемости. Целый ряд образцов, показавших 100-процентную выживаемость в 2013 г., на следующий год снизил этот показатель до 17,9% (к-2952), 19,04% (к-2631), 27,7% (к-2951) и т. д. Одинаковую или близкую к одинаковой степень выживаемости в оба года показали немногие образцы. У ряда образцов низкая степень выживаемости отмечена в оба года изучения – не более 30% (к-2954, к-3748, к-3813 и др.).

Таблица 1. Полевая всхожесть семян и выживаемость растений образцов люпина узколистного в полевых условиях Ботанического сада Белорусского государственного университета (Минский район; 2013, 2014 г.)

Table 1. Outdoor seed germination and plant survival rate of narrow-leaved lupine accessions in the Botanical Garden of the Belarusian State University (Minsk District; 2013, 2014)

№ по каталогу ВИР / VIR catalogue No.	№ образца в эксперименте / No. of the accession in the experiment	Название образца* / Accession name	Страна происхождения / Accession origin	Полевая всхожесть семян (2014 г.), % / Seed germination (2014), %	Выживаемость растений, % / Plant survival rate, %	
					2013	2014
1618	184	Müncheberger sus.	Германия	89,5	75,0	41,8
1716	185	ЭС 30504	США	68,7	100,0	36,6
1732	186	N.Z. Blue	Австралия	81,2	100,0	58,9
2006	187	Uniwhite	Австралия	81,2	75,0	23,07
2090	188	Uniharvest	Австралия	58,3	100,0	92,8
2096	189	Unicrop	Австралия	58,3	100,0	46,4
2631	190	Chittick	Австралия	87,5	100,0	19,04
2632	191	Yandee	Австралия	93,7	57,1	15,5
3056	192	Danja	Австралия	81,2	42,9	25,6
3766	193	Myallie	Австралия	77,0	100,0	29,7
3603	194	Fest	Австралия	37,5	40,0	55,5
3747	196	Tanjil	Австралия	79,1	30,0	34,2
3786	197	б/н	Австралия	64,5	50,0	51,6
3567	198	Jak	Германия	79,1	57,1	28,9
3566	199	Steb	ЮАР	64,5	62,5	45,1
3610	200	2.84-S0-36-162	Австралия	65,6	20,0	38,0
3619	201	14.85A198-10Ex	Австралия	79,1	0,0	23,6
3625	202	SSL-6	ЮАР	77,0	100,0	40,5
3790	203	б/н	Кения	37,5	33,3	33,3
2703	204	ДС-397	Беларусь	70,8	100,0	17,6
2840	205	ЛАФ-рбс-10	Беларусь	52,0	75,0	36,0
2750	206	БСХА-892	Беларусь	68,7	50,0	39,3
3525	207	БСХА-408	Беларусь	81,2	66,7	50,0
2748	208	БСХА-640	Беларусь	77,0	83,3	48,6
3715	210	б/н	Португалия	68,7	50,0	45,4
2954	211	Вика-65	Беларусь	77,0	25,0	24,3
3764	212	Boltensia	Германия	70,8	87,5	8,82
3815	213	Глат	Беларусь	96,8	44,4	19,3
3798	214	б/н	Германия	75,0	62,5	11,1
3791	215	224 A/01	Португалия	58,3	16,7	59,0
2951	216	Вада	Беларусь	68,7	100,0	27,2
2952	217	Ксеран	Беларусь	69,7	100,0	17,9
3527	218	БСХА-505	Беларусь	64,5	30,0	31,0
3805	219	Вектор	Россия	41,6	77,8	80,0

Таблица 1. Окончание
Table 1. The end

№ по каталогу ВИР / VIR catalogue No.	№ образца в эксперименте / No. of the accession in the experiment	Название образца* / Accession name	Страна происхождения / Accession origin	Полевая всхожесть семян (2014 г.), % / Seed germination (2014), %	Выживаемость растений, % / Plant survival rate, %	
					2013	2014
2833	220	ЛАФ-рбс-5	Беларусь	83,3	80,0	50,0
3762	221	Wogweta	Германия	85,4	66,7	65,0
3828	222	Добрыня	Беларусь	81,3	37,5	48,7
3827	223	Витязь	Россия	32,2	100,0	80,6
2878	224	Линия Н-58-10	Россия	96,8	33,3	32,2
3759	225	б/н	Австралия	78,1	50,0	49,3
3748	227	Wonga	Австралия	71,8	14,3	36,2
2834	228	ЛАФ-рбс-9	Беларусь	82,2	54,5	37,9
3826	229	Брянский сидерат	Россия	38,5	71,4	78,3
3765	230	Voга	Германия	82,1	8,3	61,5
3813	231	Белогорский 310	Россия	77,7	11,1	28,5
3814	232	Олигарх	Олигарх	93,7	62,5	77,7
2950	233	Апва	Беларусь	100	25,0	80,0
2841	234	ДМ 75/84	Беларусь	50,0	66,7	80,0
3561	235	Szaraky	Польша	59,3	40,0	47,3
3551	236	Mut 1 × Frost	Россия	91,6	100,0	65,9

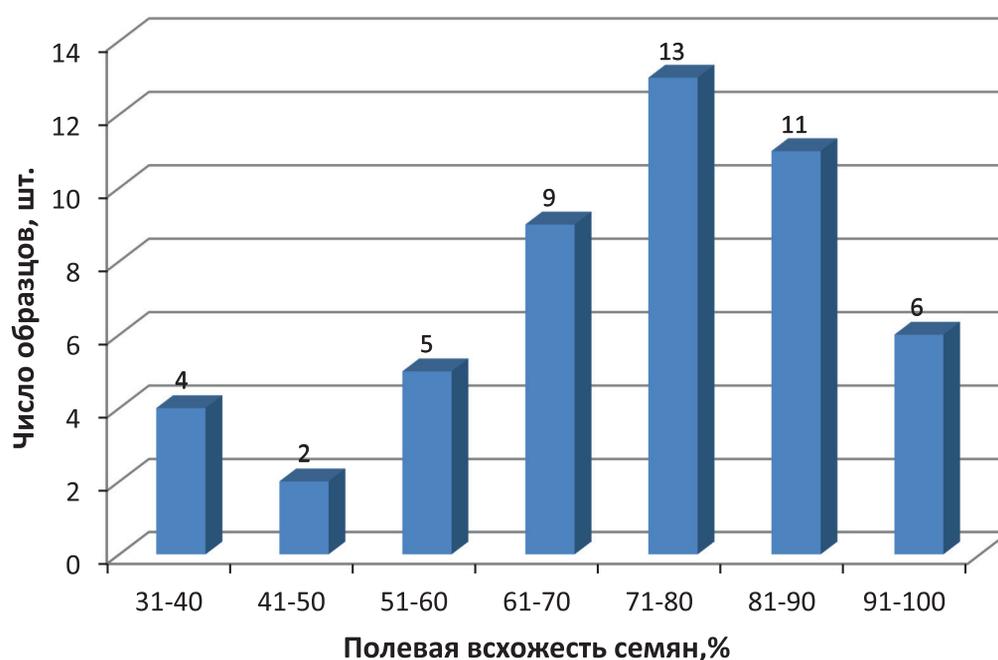


Рис. 1. Распределение изученных образцов по полевой всхожести семян в Ботаническом саду Белорусского государственного университета (Минский район) при посеве репродукции 2013 г.

Fig. 1. Distribution of the studied accessions according to outdoor seed germination in the Botanical Garden of the Belarusian State University (Minsk District) after sowing the reproduction of 2013

Оценка признаков семенной продуктивности показала их значительную изменчивость в пределах изученной выборки:

- *число бобов на растении*: min 3,3 шт. (к-1716), max 40,5 шт. (к-3791). Минимальное варьирование признака ($C_v \leq 50$) характерно для образцов к-3525, 3551, 3603, 3762, 3791. Максимальное варьирование признака ($C_v \geq 100$) характерно для образцов к-2632, 2703, 3764;

- *число семян на растении*: min 9,0 шт. (к-1716), max 135,5 шт. (к-3791). Варьирование признака ($C_v \leq 50$) характерно для образцов к-2632, к-2703, к-2952, к-3747, к-3764 и др., всего 9 образцов. Максимальное варьирование признака ($C_v \geq 100$) характерно для трех образцов к-2631, к-3762, к-3791;

- *масса семян с растения*: min 1,67 г (к-1716), max 13,32 г (к-3791). Максимальное варьирование признака ($C_v \geq 100$) характерно для образцов: к-2703, к-2952, к-3715, к-3747, к-3764 и к-3791;

- *масса 1000 семян*. В соответствии с Международным классификатором СЭВ рода *Lupinus* L. (Stepanova et al, 1985) все изученные образцы относились к группе, характеризующейся средней величиной семян (масса 1000 семян – от 81 до 250 г). Однако классификатор относится ко всему роду, в пределах которого, по оценкам разных авторов, – от 164 (Integrated Taxonomic..., 2018) до 878 видов (Maysuryan, Atabekova, 1974). Размеры семян в пределах рода очень различны: масса 1000 семян – от

< 21 до > 450 г. В пределах изученной нами выборки образцы разделились на группы – мелкосемянные, у которых масса 1000 семян была до 90 г (к-2750, к-2954, к-3603, к-3747 и др. – всего 12 образцов); крупносемянные, с показателем этого признака свыше 120 г (к-26311, к-3828 и др. – всего 10 образцов); остальные 26 образцов мы отнесли к категории среднесемянных. Этот признак был наименее вариабельным из изученных. Всего у четырех образцов коэффициент вариации был более 50, в интервале 52,2–59,5% (к-1732, к-3748, к-3786, к-3828).

Суммарная характеристика изученных образцов по перечисленным элементам семенной продуктивности отображена на рисунке 2.

На основе характеристики образцов по элементам семенной продуктивности и выживаемости растений в полевых условиях отобрано 10 наиболее продуктивных и адаптивных, по нашему мнению, образцов для последующей их лабораторной оценки по биохимическим показателям и характеристике генома по четырем генам селекционно ценных признаков.

Проведенная в поле экспресс-оценка посредством качественной реакции на алкалоидочувствительной бумаге, пропитанной реактивом Драгендорфа, позволила выделить предварительно три группы образцов: безалкалоидные, малоалкалоидные и высокоалкалоидные. Уточняющий анализ содержания алкалоидов

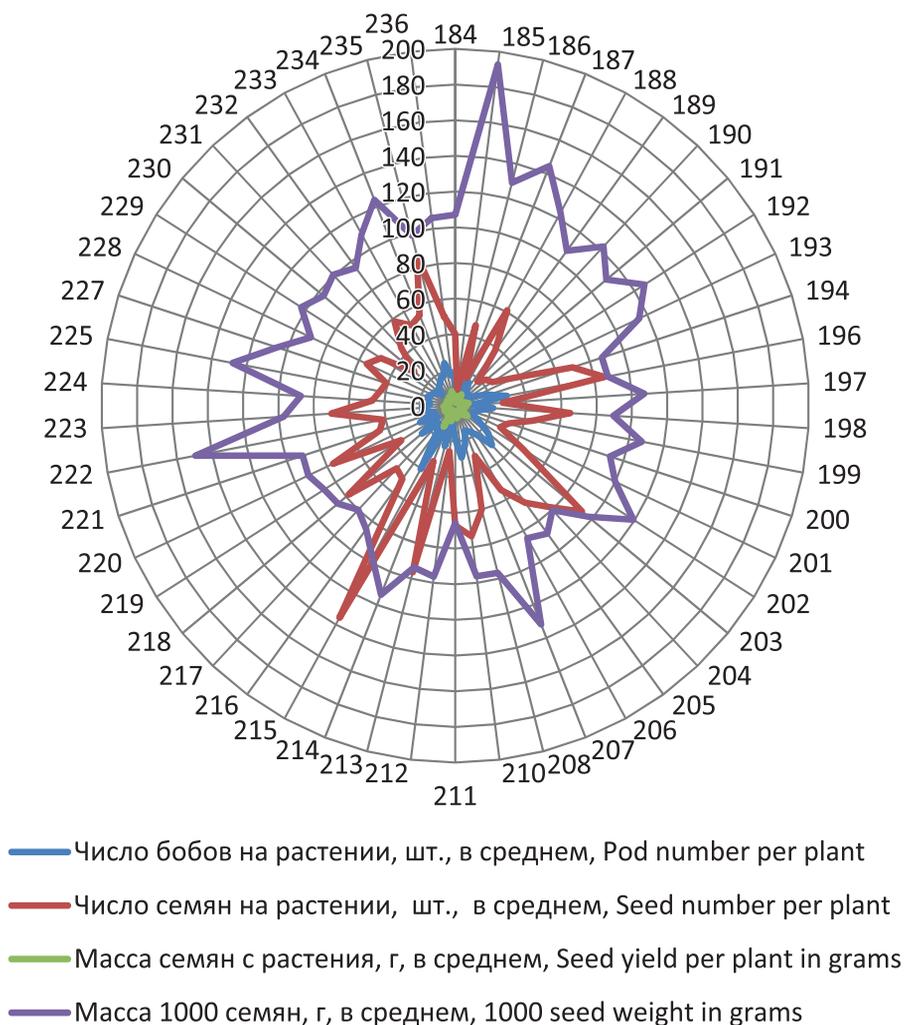


Рис. 2. Полиморфизм изученных образцов по отдельным элементам семенной продуктивности растений (номера образцов соответствуют присвоенным в эксперименте и приведенным в таблице 1)

Fig. 2. Polymorphism of the studied accessions according to seed yield components (Nos. of the accessions were assigned for this experiment and are presented in Table 1)

в вегетативной массе в лабораторных условиях показал, что растения, идентифицированные экспресс-методом как безалкалоидные, при лабораторной оценке содержали 0,01–0,07% алкалоидов, малоалкалоидные – 0,11–0,12% и высокоалкалоидные – более 0,23% (табл. 2). Содержание алкалоидов в листьях не всегда имело положительную корреляцию с концентрацией их в семенах. К примеру, образец 224А/01 показал высокую концентрацию алкалоидов и в листьях (0,232%), и в семенах (0,370%), а сорт 'Витязь' классифицирован нами как безалкалоидный по листьям (0,070%), но при этом имеющий самое высокое содержание алкалоидов в семенах – 0,480% (см. табл. 2).

число общих компонентов. Так, образцы 'Добрыня' (к-3828) и 'Витязь' (к-3827) имеют практически идентичные спектры, отличаясь лишь наличием 17-го компонента у сорта 'Добрыня' и отсутствием 41-го у сорта 'Витязь'. Образцы 'Глат' и 224 А/01 отличаются друг от друга наличием 19-го компонента и 43-го у образца 224 А/01.

У 10 образцов с установленной концентрацией алкалоидов в листьях и в семенах и известным компонентным составом белков осуществлено ДНК-маркирование по четырем генам хозяйственно ценных признаков: *lentus* (нерастрескиваемость бобов), *AnMan* (устойчивость к антракнозу), *mollis* (отсутствие твердосемянности), *ku* (нетребовательность к яровизации).

Таблица 2. Уровень содержания алкалоидов у образцов, отобранных по результатам полевой оценки экспресс-методом для лабораторных исследований

Table 2. Levels of alkaloid content in the accessions selected for laboratory research using a rapid field assessment method

№ по каталогу ВИР / VIR catalogue No.	№ образца в эксперименте / No. of the accession in the experiment	Название образца / Accession name	Качественный анализ на наличие алкалоидов в листьях / Qualitative analysis for the presence of alkaloids in leaves	Концентрация алкалоидов, % / Concentrations of alkaloids, %	
				листья / in leaves	семена / in seeds
3603	194	Fest	м/а	0,124	0,043
3747	196	Tanjil	б/а	0,010	0,088
3567	198	Jak	б/а	0,040	0,047
2748	208	БСХА-640	б/а	0,032	0,038
2954	211	Вика-65	б/а	меньше 0,010	0,075
3815	213	Глат	м/а	0,110	0,072
3791	215	224 А/01	в/а	0,232	0,370
3828	222	Добрыня	б/а	0,041	0,062
3827	223	Витязь	б/а	0,070	0,480
3561	235	Szaraky	б/а	0,039	0,061

Примечание: б/а – безалкалоидные растения; м/а – малоалкалоидные растения; в/а – высокоалкалоидные растения
Note: б/а – non-alkaloid plants; м/а – low-alkaloid plants; в/а – high-alkaloid plants

Электрофоретическое разделение запасных белков позволило выделить компоненты спектра, так называемые реперные (основные), встречающиеся у всех изученных образцов. К ним относятся 18, 23, 30, 42 и 45-й компоненты. При анализе электрофоретических спектров учитывали наличие/отсутствие каждого компонента. Всего у образцов идентифицировали от 12 ('Tanjil' к-3747) до 16 ('Вика-65', к-2954; 'Глат', к-3815; 224 А/01, к-3791) компонентов спектров запасных белков (табл. 3). В отличие от них, минорные компоненты встречаются редко. К ним относятся 13-й компонент, отмеченный лишь у 'БСХА-640' (к-2748); 29-й компонент у образцов 'Вика-65' и 'Szaraky' (к-3561); 21-й компонент характерен только для сорта 'Вика-65'. На основе статистического анализа компонентного состава запасных белков люпина узколистного построена дендрограмма (рис. 3).

Образцы в пределах каждого кластера наиболее схожи по белковым спектрам, то есть имеют максимальное

По данным молекулярного тестирования, все изученные образцы несут аллель твердосемянности гена *mollis*. Отсутствие аллелей генов потребности в яровизации выявлено у образцов 'Tanjil', 'Вика-65', 'Глат', 224 А/01, 'Добрыня'.

Из 10 изученных образцов лишь два содержат в своих геномах алели нерастрескиваемости бобов – сорта 'Добрыня' и 'Витязь'. Несмотря на то что в нашем исследовании не предпринимали оценку поражаемости образцов антракнозом, информация о наличии в изученной выборке источников аллелей устойчивости к этому вредоносному заболеванию очень важна. На рисунке 4 представлен результат визуализации продуктов амплификации с использованием праймера AnMap для отдельных образцов люпина узколистного. Выявлено, что среди изученных образцов половина несет аллель антракнозоустойчивости.

Итоги ДНК-маркирования представлены в таблице 4.

Таблица 3. Спектры запасных белков отдельных образцов у изученных образцов люпина узколистного
Table 3. Storage protein patterns of some narrow-leaved lupine accessions from the studied set

№ по каталогу ВИР / VIR catalogue No.	№ образца в эксперименте / No. of the accession in the experiment	Название образца / Accession name	Компоненты спектра запасных белков / Components of storage protein patterns	Количество компонентов в спектре / Number of components in the pattern
3603	194	Fest	18,20,22,23,25,26,28,30,33,35,41,42,45	13
3747	196	Tanjil	15,18,20,22,26,27,28,30,38,41,42,45	12
3567	198	Jak	14,18,19,20,23,25,27,30,35,38,41,42,45	13
2748	208	БСХА-640	13,18,19,20,23,25,26,28,30,35,39,41,42,45	14
2954	211	Вика-65	14,18,19,20,21,23,25,26,27,29,30,35,39,41,42,45	16
3815	213	Глат	14,15,18,19,20,23,25,27,30,32,35,36,38,40,42,45	16
3791	215	224 А/01	14,15,18,20,23,25,27,30,32,35,36,38,40,42,43,45	16
3828	222	Добрыня	15,17,18,20,23,25,26,30,32,35,39,42,45	13
3827	223	Витязь	15,18,20,23,25,26,30,32,35,39,41,42,45	13
3561	235	Szaraky	16,18,20,23,25,26,29,30,34,35,39,41,42,45	14

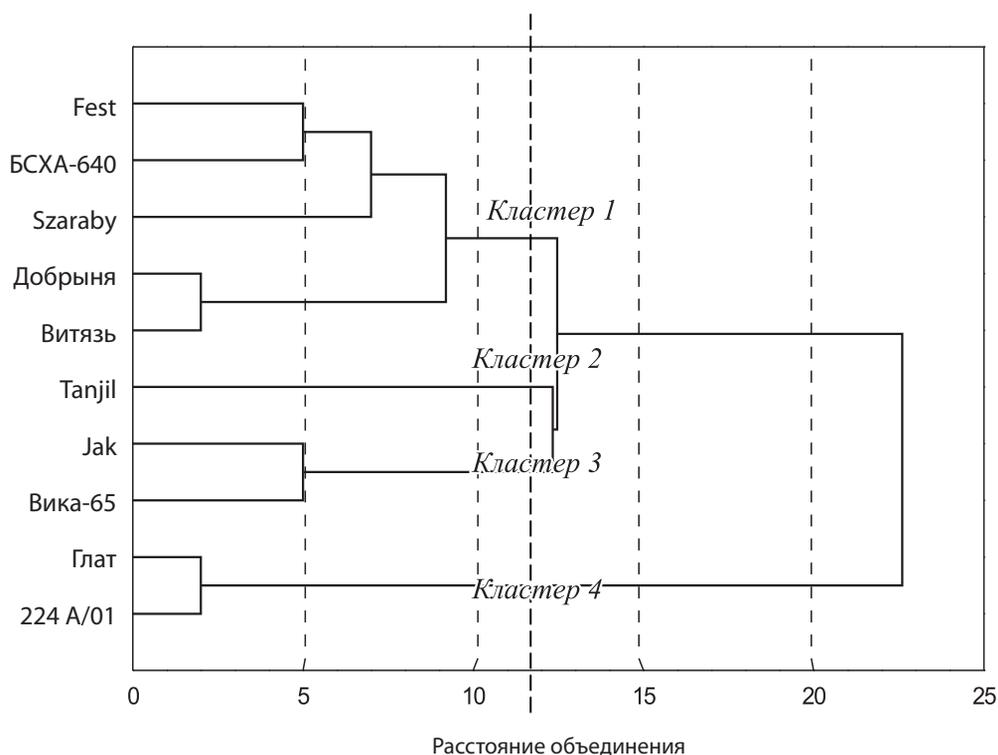


Рис. 3. Дендрограмма изученных образцов люпина узколистного, построенная по спектрам запасных белков по методу Уорда (Ward, 1963)

Fig. 3. Dendrogram of the studied narrow-leaved lupine accessions, constructed according to their storage protein patterns using Ward's method (Ward, 1963)

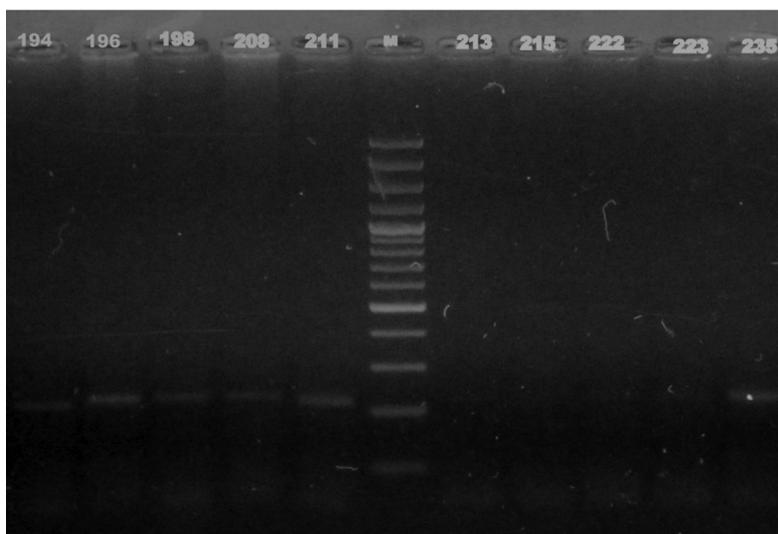


Рис. 4 Визуализация продуктов амплификации с праймером AnMan:

194 – Fest, 196 – Tanjil, 198 – Jak, 208 – Szaraky, 211 – Глат; м – маркер молекулярного веса (2000 пн, Primetech),
213 – Добрыня, 215 – БСХА-640, 222 – Витязь, 223 – Вика-65, 235 – 224 А/01
(номера образцов соответствуют присвоенным в эксперименте и приведенным в таблице 1)

Fig. 4. Visualization of amplification products with the AnMan primer:

194 – Fest, 196 – Tanjil, 198 – Jak, 208 – Szaraky, 211 – Glat, м – marker of molecular weight (2000 bp, Primetech),
213 – Dobrynya, 215 – BSKhA-640, 222 – Vityaz, 223 – Vika-65, 235 – 224 A/01
(Nos. of the accessions were assigned for this experiment and are presented in Table 1)

Таблица 4. Результаты типирования геномов коллекционных образцов люпина узколистного с праймерами хозяйственно ценных генов

Table 4. Genome typing results for narrow-leaved lupine accessions with primers of genes useful for agriculture

№ по каталогу ВИР / VIR catalogue No.	№ образца в эксперименте / No. of the accession in the experiment	Название образца / Accession name	Устойчивость к антракнозу (праймер AnMan, ген AnMan) / Anthracnose resistance (primer: AnMan, gene: AnMan)	Твердокамен- ность семян (праймер MoA, ген mollis) / Seed hardness (primer: MoA, gene: mollis)	Потребность в яровизации (праймер KuH, ген Ku) / Vernalization requirement (primer: KuH, gene: Ku)	Растрескиваемость бобов (праймер LeM, ген lentus) / Pod shattering (primer: LeM2, gene: lentus)
3603	194	Fest	+	+	+	-
3747	196	Tanjil	+	+	-	-
3567	198	Jak	+	+	+	-
2748	208	БСХА-640	-	+	+	-
2954	211	Вика-65	-	+	-	-
3815	213	Глат	-	+	-	-
3791	215	224 А/01	+	+	-	-
3828	222	Добрыня	-	+	-	+
3827	223	Витязь	-	+	+	+
3561	235	Szaraky	+	+	+	-

Обсуждение

Изученная нами выборка из 50 образцов люпина узколистного характеризовалась разным происхождением, селекционным статусом, а также разными морфотипами растений. Для люпина узколистного характерен значительный полиморфизм морфотипов. Однако в настоящем исследовании мы не учитывали особенности архитектуры растений и взаимосвязь семенной продуктивности с морфотипом. На данном этапе мы стремились выявить наиболее продуктивные образцы и охарактеризовать их по содержанию алкалоидов в семенах и зеленой массе, а также наличию аллелей, определяющих наиболее актуальные признаки доместикации: нерастрескиваемость бобов, отсутствие твердосемянности, отсутствие необходимости в яровизации, а также важного признака адаптивности – устойчивости к антракнозу. Образцы, выделившиеся по комплексу изученных признаков, могут стать ценным исходным материалом для селекции.

Уместно напомнить, что селекция люпина узколистного насчитывает менее 100 лет. Ее началом считают дату выявления в генофонде безалкалоидных форм – 1930-е гг. (von Sengbusch, 1931). Неудивительно поэтому, что в генофонде люпина узколистного есть сравнительно стабильные формы (как правило, это сорта научной селекции) и имеется материал, слабо затронутый селекцией. Этим можно объяснить и большую степень выявленной нами изменчивости признаков.

Начало исследованию положило определение полевой всхожести семян. Это признак далеко не всегда входит в число характеристик образцов и отсутствует в дескрипторах. Однако наличие у люпина узколистного твердосемянности послужило поводом для его оценки. Поскольку семена из коллекции ВИР имели разные сроки хранения (от одного до пяти лет) после репродукций в разных географических точках, для чистоты эксперимента мы определили полевую всхожесть только для семян одной, самой свежей (предыдущего года) репродукции в условиях проводимого эксперимента – в РБ. Сравнительно низкие показатели всхожести у многих образцов мы объясняем твердосемянностью, генетические детерминанты которой, как показало молекулярное маркирование образцов, присутствуют во всей изученной выборке.

Важной характеристикой генотипов является их выживаемость в полевых условиях, что может служить одним из показателей степени их адаптивности. Обычно этот показатель изучают при сравнении одной и той же выборки в разных условиях выращивания. Мы предприняли эту оценку для понимания успешности интродукции образцов коллекции ВИР в условия изучения. Большую часть полученных образцов репродуцировали в условиях РБ впервые. Значительная степень внутривидового полиморфизма по этому признаку, выявленная в нашем эксперименте, требует дальнейшего изучения. Факт разной степени выживаемости растений в течение двух лет у одних и тех же образцов можно объяснить также разной степенью выполненности посеянных семян. Пока не находит объяснения факт низкой степени выживаемости белорусских образцов. Полагаем, что хотя бы отчасти межсортную изменчивость этого признака можно объяснить реакцией разных морфотипов на одну и ту же плотность посева. Известно, что образцы имеют разные морфотипы, определяемые различной высотой стебля, характером ветвления, степенью ветвления, детерми-

нантностью роста стебля или ветвей. Пока мы не имеем достаточной доказательной базы объяснения этой изменчивости. Тем не менее, для дальнейшего изучения мы отобрали образцы с высокой степенью выживаемости за два года.

Коллекция изученных форм отличалась широким полиморфизмом по всем анализируемым элементам семенной продуктивности растений (см. рис. 2). Это позволило выявить самые продуктивные образцы, а также крупно- и мелкосемянные. Последние могут быть рекомендованы для селекции на сидеральные и кормовые цели, где предпочтение отдается мелкосемянным формам.

Содержание алкалоидов в семенах и вегетативной массе растений определяет возможное направление их использования. Известно, что по стандартам производства, принятым в России, содержание алкалоидов в семенах люпина, предназначенных для пищевого и кормового назначения, не должно превышать 0,04% (40 мг/100 г) от массы семян (Kuptsov, Takunov, 2006), а в некоторых европейских странах и в Австралии – 0,02% (20 мг/100 г) (Frick et al., 2017). В нашем исследовании найдены как безалкалоидные образцы ('Вика-65', 'Tanjil', 'БСХА-640' и др.), так и высокоалкалоидный образец 224 А/01 с высоким содержанием алкалоидов и в семенах, и в листьях. Выявлены образцы с различным содержанием алкалоидов в листьях и в семенах. К примеру, сорт 'Витязь' охарактеризован как безалкалоидный по листьям и высокоалкалоидный по семенам. У образца 'Fest' (к-3603), напротив, содержание алкалоидов в листьях почти в три раза превосходило таковое в семенах. Полагаем, что эти факты можно объяснить характером и временем экспрессии генов биосинтеза алкалоидов, который, как известно, происходит в листьях, но по мере созревания семян происходит отток алкалоидов в репродуктивную зону растения (Vishnyakova et al., 2020). При условии сохранения высокого содержания алкалоидов в листьях и низкого в семенах в ряде поколений, можно использовать этот признак для создания новой модели сорта. Это, возможно, будет иметь значение в формировании устойчивости растений к неблагоприятным биотическим факторам в полевых условиях и в то же время давать возможность использовать семена этого сорта в кормовых и пищевых целях. При этом выявленный полиморфизм по алкалоидности у перспективных по продуктивности форм следует учитывать при подборе родительских пар для селекции на различные цели: кормовые, пищевые, сидеральные.

Дендрограмма, построенная на основе спектров запасных белков изученных образцов люпина узколистного (см. рис. 3), отражает степень их сходства, которая может быть результатом близкородственного происхождения либо конвергенции геномов в процессе селекции, что также следует учитывать при подборе пар для скрещивания, принимая во внимание отсутствие информации об истории происхождения большинства сортов. Образцы, близкие по белковым спектрам, даже не являясь близкородственными, могут нести в своих геномах, наряду со схожими аллелями белковых компонентов, одинаковые аллели других признаков.

Интересен факт выделения сорта 'Tanjil' в отдельный кластер, что позволяет предположить наличие у него и других, отличающихся аллелей генов. Данное предположение подтверждается и крайне низким содержанием алкалоидов в зеленой массе лишь у этого образца (менее 0,01%).

Сортоспецифичную характеристику компонентов спектра запасных белков, а также степень алкалоидно-

сти люпина можно использовать для создания биохимической составляющей паспорта сорта.

Признак твердосемянности, выявленный косвенно при определении полевой всхожести и подтвержденный молекулярным маркированием образцов, имеет эволюционное значение у дикорастущих люпинов, позволяя сохранять всхожесть семян длительное время в естественных условиях. У селекционных сортов этот признак нежелателен, так как всхожесть семян без скарификации снижается, что ведет к дополнительным затратам при производстве продукции. Все исследуемые по данным ДНК-типирования с праймером МоА образцы люпина узколистного обладают аллелями твердосемянности, в связи с чем перед посевом семена этих образцов нуждаются в скарификации. Следует отметить, что праймер МоА не является косегрегированным непосредственно в ген (Boersma et al, 2007a), чем и может быть объяснено различие во всхожести семян образцов, несущих аллель твердокаменности гена *mollis* по праймеру МоА. Возможно, у части образцов в результате селекции произошла рекомбинация участка «отжига» праймера и непосредственно гена. Данный факт требует дополнительных исследований классическими методами генанализа либо поиска новых методических приемов оценки твердокаменности.

Отсутствие потребности в яровизации приводит к сокращению длины вегетационного периода и возможности возделывания люпина в северных широтах. Однако несколько изученных образцов: 'Fest', 'Jak' (к-3567), 'БСХА-640', 'Szaraky', 'Витязь', по данным молекулярного маркирования, содержат в геноме аллели потребности к яровизации.

Среди изученных образцов аллели устойчивости к антракнозу (см. рис. 4) были обнаружены у образцов – 'Fest', 'Tanjil', 'Szaraky', 'Глат', 'Jak', А-01, поэтому их можно рекомендовать как источники данного признака.

Выводы

В результате двухлетней оценки 50 образцов люпина узколистного из коллекции ВИР, репродуцированных в Минском районе РБ, выявлена широкая изменчивость по элементам семенной продуктивности, содержанию алкалоидов в семенах и в зеленой массе, по белковым спектрам.

Рекомендованы для включения в дальнейший селекционный процесс источники низкого содержания алкалоидов в семенах и листьях – 'Tanjil' (к-3747), 'Szaraky' (к-3561), 'Jak' (к-3567), 'БСХА-640' (к-2748); высокой продуктивности – 224 А/01 (к-3791); крупносемянности – 'Добрыня' (к-3828); оригинальных белковых спектров – 'БСХА-640', 'Вика-65' (к-2954), 'Szaraky'.

Редкие компоненты белковых спектров, выявленные у отдельных образцов, могут быть использованы в качестве маркеров геномов этих образцов.

Среди изученных образцов выявлены формы с наличием в геноме аллелей устойчивости к антракнозу – 'Fest' (к-3567), 'Tanjil', 'Jak', 'Szaraky', 'Глат' (к-3815), 224 А/01; твердосемянности – все образцы; неастрескиваемости бобов – 'Витязь' (к-3827) и 'Добрыня'; потребности в яровизации – 'Fest', 'Jak', 'БСХА-640', 'Витязь', 'Szaraky'.

Наличие внутривидового полиморфизма по изученным признакам, относительно высокая выживаемость растений в условиях РБ позволили включить изученные и выделенные по комплексу признаков перспективные генотипы в рабочую коллекцию люпина БГУ для после-

дующего использования в качестве источников селекционно значимых биохимических и молекулярно-генетических признаков, а их сортоспецифические характеристики учитывать при паспортизации образца.

Работа выполнена: (Республика Беларусь) в рамках государственного задания № 082/54/2016-31-292 «Идентификация коллекционных образцов зернобобовых культур (люпин, нут, кормовые бобы) и создание генетически маркированной коллекции люпина по изученным признакам. Воспроизводство семенного материала гибридов и мутантов люпина и пополнение ими рабочих коллекций. Использование коллекции люпина в учебном процессе для проведения генетического анализа частных культур» Государственной программы «Наукоемкие технологии и техника» подпрограммы 4 «Мобилизация и рациональное использование генетических ресурсов растений национального банка для селекции, обогащения культурной и природной флоры Беларуси» на 2016–2020 годы; (Российская Федерация) в рамках государственного задания согласно тематическому плану ВИР по теме № 0662-2019-0002 «Научное обеспечение эффективного использования мирового генофонда зернобобовых культур и их диких родичей из коллекции ВИР».

The work was performed (Republic of Belarus) within the framework of State Task No. 082/54/2016-31-292 "Identification of collection accessions of leguminous crops (lupine, chickpea, and broad beans) and development of a genetically marked lupine collection according to the studied characters. Reproduction of seed material of lupine hybrids and mutants to replenish working collections. Use of the lupine collection in the educational process for genetic analysis of private crops" of the State Program "Science-intensive technologies and practices", Subprogram 4 "Mobilization and rational use of plant genetic resources from the National Bank for breeding and enrichment of the cultivated and natural flora of Belarus" for 2016–2020; and (Russian Federation) within the framework of the State Task in accordance with the topical plan of VIR for Project No. 0662-2019-0002 "Scientific support for effective utilization of the global genetic diversity of grain legume crops and their wild relatives from the VIR collection".

References / Литература

- Boersma J.G., Buirchell B.J., Sivasithamparam K., Yang H. Development of a PCR marker tightly linked to *mollis*, the gene that controls seed dormancy in *Lupinus angustifolius* L. *Plant Breeding*. 2007a;126(6):612-616. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2007.01417.x
- Boersma J.G., Buirchell B.J., Sivasithamparam K., Yang H. Development of a sequence-specific PCR marker linked to the *Ku* gene which removes the vernalization requirement in narrow-leaved lupin. *Plant Breeding*. 2007b;126(3):306-309. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2007.01347.x
- Boersma J.G., Buirchell B.J., Sivasithamparam K., Yang H. Development of two of a sequence-specific PCR marker linked to the *le* gene that reduces pod shattering in narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Genetics and Molecular Biology*. 2007c;30(3):623-629. DOI: 10.1590/S1415-47572007000400020
- Egorova G.P., Rybnikova V.A., Pomomareva L.T., Nikishkina M.A., Yakusheva A.S. Catalogue of the VIR global

- collection. Issue 909. Narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.). Description of accessions according to their seed productivity elements, chemical composition of seeds, and resistance to anthracnose. St. Petersburg: VIR; 2020. [in Russian] (Егорова Г.П., Рыбникова В.А., Пономарева Л.Т., Никишкина М.А., Якушева А.С. Каталог мировой коллекции ВИР. Выпуск 909. Люпин узколистный (*Lupinus angustifolius* L.). Характеристика образцов по элементам семенной продуктивности, химическому составу семян, устойчивости к антракнозу. Санкт-Петербург: ВИР; 2020). DOI: 10.30901/978-5-907145-15-3
- Ermakov A.I., Arasimovich V.V., Yarosh N.P. Methods of biochemical research in plants (Metody biokhimicheskogo issledovaniya rasteniy). Leningrad: Agropromizdat; 1987. [in Russian] (Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П. Методы биохимического исследования растений. Ленинград: Агропромиздат; 1987).
- Frick K.M., Kamphuis L.G., Siddique K.H.M., Singh K.B., Foley R.C. Quinolizidine alkaloid biosynthesis in lupins and prospects for grain quality improvement. *Frontiers in Plant Science*. 2017;8:87. DOI: 10.3389/fpls.2017.00087
- Gladstones J.S. Distribution, origin, taxonomy, history and importance. In: J.S. Gladstones, C.A. Atkins, J. Hamblin (eds). *Lupins as Crop Plants: Biology, Production, and Utilization*. Wallingford: CAB International; 1998. p.1-36.
- Hirilovich I.S., Dzhus M.A. Dubrava: nature monument of republican significance. (Pamyatnik prirody respublikanskogo znacheniya "Dubrava"). Minsk; 2009. [in Russian] (Гирилович И.С., Джус М.А. Памятник природы республиканского значения «Дубрава». Минск; 2009).
- Integrated Taxonomic Information System. 2018. Available from: <https://www.its.gov/> [accessed Feb. 10, 2020].
- Konarev V.G. (ed.). Identification of varieties and registration of crop genetic diversity according to seed proteins (Identifikatsiya sortov i registratsiya genofonda kulturnykh rasteniy po belkam semyan). St. Petersburg: VIR; 2000. [in Russian] (Идентификация сортов и регистрация генофонда культурных растений по белкам семян / под ред. В.Г. Конарева. Санкт-Петербург: ВИР; 2000).
- Kuptsov N.S., Takunov I.P. Lupine (genetics, breeding, and heterogeneous plantings) (Lyupin [genetika, selektsiya, geterogennyye posevy]). Bryansk; 2006. [in Russian] (Купцов Н.С., Такунов И.П. Люпин (генетика, селекция, гетерогенные посева). Брянск; 2006).
- Lambers H., Bishop J.G., Nopper S.D., Laliberté E., Zúñiga-Feest A. Phosphorus-mobilization ecosystem engineering: the roles of cluster roots and carboxylate exudation in young P-limited ecosystems *Annals of Botany*. 2012;110(2):329-348. DOI: 10.1093/aob/mcs130
- Lucas M.M., Stoddard F.L., Annicchiarico P., Frías J., Martínez-Villaluenga C., Sussmann D. et al. The future of lupin as a protein crop in Europe. *Frontiers in Plant Science*. 2015;6:705. DOI.org/10.3389/fpls.2015.00705
- Maysuryan N.A., Atabekova A.I. Lupine (Lyupin). Moscow: Kolos; 1974. [in Russian]. (Майсурян Н.А., Атабекова А.И. Люпин. Москва: Колос; 1974).
- Privalov Ph.I., Shor V.Ch. Prospects of cultivation, breeding and seed growing of lupine in Belarus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Agrarian Series*. 2015;(2):47-53. [in Russian] (Привалов Ф.И., Шор В.Ч. Перспективы возделывания, селекции и семеноводства люпина в Беларуси. *Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя аграрных навук*. 2015;(2):47-53).
- Stepanova S., Nazarova N., Korneichuk V., Lehmann C., Miko-laichik Y. The international COMECON list of descriptors for the genus *Lupinus* L. Leningrad: VIR; 1985. [in Russian] (Степанова С., Назарова Н., Корнейчук В., Леман Х., Миколайчик Я. Международный классификатор СЭВ рода *Lupinus* L. Ленинград: ВИР; 1985).
- Vishnyakova M.A., Kushnareva A.V., Shelenga T.V., Egorova G.P. Alkaloids of narrow-leaved lupine as a factor determining alternative ways of the crop's utilization and breeding. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(6):625-635. DOI: 10.18699/VJ20.656
- Vishnyakova M.A., Seferova I.V., Buravtseva T.V., Burly-aeva M.O., Semenova E.V., Filipenko G.I., Aleksandrova T.G., Egorova G.P., Yankov I.I., Bulyntsev S.V., Gerasimova T.V., Drugova E.V. VIR global collection of grain legume crop genetic resources: replenishment, conservation and studying: (guidelines). 2nd ed. M.A. Vishnyakova (ed.). St. Petersburg: VIR; 2018. [in Russian] (Вишнякова М.А., Сеферова И.В., Буравцева Т.В., Бурляева М.О., Семенова Е.В., Филипенко Г.И., Александрова Т.Г., Егорова Г.П., Яньков И.И., Булынтцев С.В., Герасимова Т.В., Другова Е.В. Коллекция мировых генетических ресурсов зерновых бобовых ВИР: пополнение, сохранение и изучение: (методические указания). 2-е изд. / под ред. М.А. Вишняковой. Санкт-Петербург: ВИР; 2018). DOI: 10.30901/978-5-905954-79-5
- von Sengbusch R. Bitterstoffarme Lupinen II. *Züchter*. 1931;3:93-209. [in German]
- Ward J.H. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association*. 1963, 58(301):236-244.
- Yagovenko T.V., Rudometkina M.V., Rudometkin S.V., Troshina L.V. An improved colorimetric method for determining alkaloids in lupine. (Usovershenstvovanny kolorimetricheskiy metod opredeleniya alkaloidov v lyupine). *Fodder Production*. 2005;(3):27-29. [in Russian] (Яговенко Т.В., Рудометкина М.В., Рудометкин С.В., Трошина Л.В. Усовершенствованный колориметрический метод определения алкалоидов в люпине. *Кормопроизводство*. 2005;(3):27-29).
- Yang H., Renshaw D., Thomas G.J., Buirchell B., Sweetingham M. 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.). *Molecular Breeding*. 2008;21(4):473-483. DOI: 10.1007/s11032-007-9146-2

Прозрачность финансовой деятельности / The transparency of financial activities

Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

The authors declare the absence of any financial interest in the materials or methods presented.

Для цитирования / How to cite this article

Анохина В.С., Романчук И.Ю., Саук И.Б., Егорова Г.П., Вишнякова М.А. Комплексная оценка образцов люпина узколистного (*Lupinus angustifolius* L.) из коллекции ВИР в условиях Беларуси. Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2021;182(3):74-85. DOI: 10.30901/2227-8834-2021-3-74-85

Anokhina V.S., Ramanchuk I.Yu., Sauk I.B., Egorova G.P., Vishnyakova M.A. Complex assessment of narrow-leaved lupine (*Lupinus angustifolius* L.) accessions from the VIR collection in Belarus. Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding. 2021;182(3):74-85. DOI: 10.30901/2227-8834-2021-3-74-85

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы / The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work

Дополнительная информация / Additional information

Полные данные этой статьи доступны / Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2021-3-74-85>

Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы / The journal's opinion is neutral to the presented materials, the authors, and their employer

Авторы одобрили рукопись / The authors approved the manuscript

Конфликт интересов отсутствует / No conflict of interest

ORCID

Anokhina V.S. <https://orcid.org/0000-0003-3880-1623>
Ramanchuk I.Yu. <https://orcid.org/0000-0001-9006-7206>
Sauk I.B. <https://orcid.org/0000-0002-2156-3377>
Egorova G.P. <https://orcid.org/0000-0002-8645-3072>
Vishnyakova M.A. <https://orcid.org/0000-0003-2808-7745>