

**ОЦЕНКА ГИБРИДОВ ЛЮПИНА УЗКОЛИСТНОГО
РАЗНЫХ ПОКОЛЕНИЙ ПО КОМПЛЕКСУ
МОРФОЛОГИЧЕСКИХ, БИОХИМИЧЕСКИХ
И МОЛЕКУЛЯРНО–ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ**

*Романчук Ирина Юрьевна, старший научный сотрудник,
Анохина Вера Степановна, к.б.н., зав. сектором,
Саук Ирина Борисовна, старший научный сотрудник,
Карпиевич Вадим Александрович, младший научный сотрудник
Белорусский государственный университет*

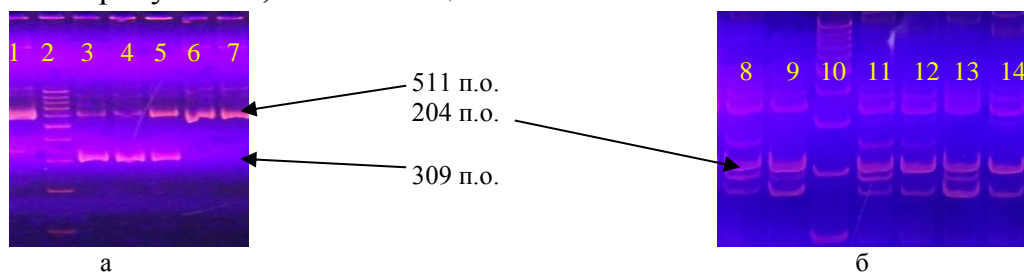
Широкий внутривидовой полиморфизм люпина узколистного требует комплексной оценки биологических и хозяйственно значимых признаков и генов, детерминирующих эти признаки, при определении перспективности каждого генотипа для разных направлений селекции. Эта информация необходима и для составления описательной базы генотипов растений каждой культуры. Преимущества ДНК–маркеров для селекции связаны с возможностью отбора на стадии семян генотипов с интересующими аллелями доместицируемых генов. Это значительно снижает расходы на выделение нового перспективного по ряду признаков образца за счет сокращения сроков селекции и повышения ее эффективности, особенно в случае использования кодоминантных маркеров, позволяющих выявить гомо– и гетерозиготные генотипы. Такое детальное изучение образцов необходимо для защиты авторских прав и при создании паспорта сорта (образца).

В ходе выполнения работ нами были высеяны для восстановления всхожести перспективные образцы люпина узколистного, ранее полученные в БГУ. Выделенные 6 стабильных по морфологическим (окраска цветков и листьев, тип ветвления) и биохимическим (индивидуальный анализ алкалоидности листьев) признакам образцы поколений F4 и F8 были изучены с использованием праймеров хозяйственно ценных признаков люпина, влияющих на урожайность и продуктивность растений. Заболеваемость

люпина антракнозом и растрескиваемость бобов приводят к снижению урожайности за счет снижения качества семян либо за счет потери последних в случае растрескиваемости бобов. Наличие у генотипов генов твердокаменности приводит к снижению всхожести семян, а требовательность к яровизации приводит к удлинению вегетационного периода, что также неблагоприятно для урожайности растений люпина узколистного. В связи с этим проведена оценка геномов отобранных форм с использованием праймеров к генам нерастрескиваемости бобов (гены *tardus* и *lentus* – праймеры TaLi и LeM1 и LeM2 [1,2], соответственно), устойчивости к антракнозу (*LanR1*, *AnSeq3* и *AnSeq4* [3,4]), отсутствию твердокаменности (*mollis* – MoLi) [5] и нетребовательности к яровизации (*ku* – KuH) [6].

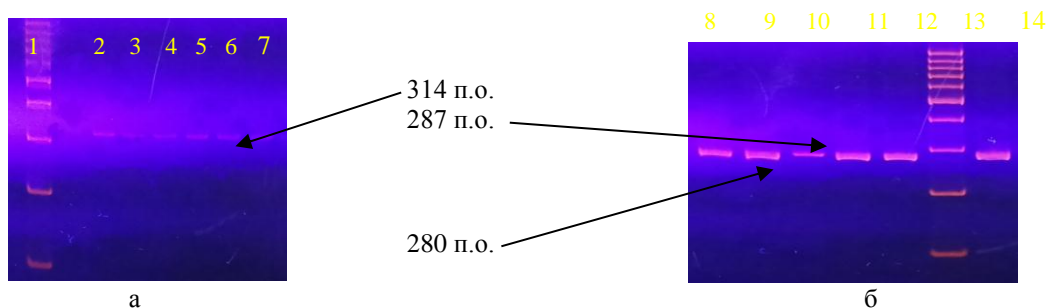
Алкалоидность листьев определяли с помощью алкалоидочувствительной бумаги в полевых условиях и дальнейшим отбором проб с учетом количественного определения уровня алкалоидности по [7]. ДНК выделяли набором Plant DNA Preparation Kit, Jena, Germany. Амплификацию проводили на приборе Agilent Technologies Sure Cycler 8800, а электрофоретическое разделение продуктов амплификации – на приборе Helikon VE-10 при силе тока до 25 мА (источник тока ДНК-технологии Эльф-4). После окрашивания гелей бромидом этидиума проводили визуализацию электрофореграмм и оценку полученных результатов.

Отобранные по результатам фенологических наблюдений относительно стабильные генотипы были изучены по наличию у них генов (аллелей), детерминирующих хозяйственно значимые признаки. Результаты оценки по ДНК-маркированию и фенотипическим характеристикам представлены на рисунках 1,2 и в таблице.



1 – F4 Миртан x Дикаф-14, 2 – маркер молекулярного веса, 3 – F4 К 1992 x Apendrilon, 4 – F4 Apendrilon x К 1992, 5 – F4 АН846, 6 – F4 Н846К-2, 7 – F8 М-Д14; 8 – F4 Миртан x Дикаф-14, 9 – F4 К 1992 x Apendrilon, 10 – маркер молекулярного веса, 11 – F4 Apendrilon x К 1992, 12 – F4 АН846, 13 – F4 Н846К-2, 14 – F8 М-Д14

Рисунок 1– Результаты типирования образцов люпина узколистного: а – по праймеру *TaLi* к гену нерастрескиваемости бобов *tardus*, б – по праймеру *LeM2* к гену *lentus*



1 – маркер молекулярного веса, 2 – F4 Миртан х Дикаф–14, 3 – F4 К 1992 х Apendrilon, 4 – F4 Apendrilon х К 1992, 5 – F4 АН846, 6 – F4 Н846К–2, 7 – F8 М–Д14; 8 – F4 Миртан х Дикаф–14, 9 – F4 К 1992 х Apendrilon, 10 – F4 Apendrilon х К 1992, 11 – F4 АН846, 12 – F4 Н846К–2, 13 – маркер молекулярного веса, 14 – F8 М–Д14

Рисунок 2– Результаты типирования образцов люпина узколистного: а – по праймеру *MoLi* к гену отсутствия твердокаменности семян *mollis*, б – по праймеру *KuH* к гену *ku* – нетребовательность к яровизации

Полученные данные полевой и лабораторной оценки позволяют заключить, что образец Миртан х Дикаф–14 (F4), обладающий детерминированным типом ветвления и безалкалоидной зеленой массой, может быть рекомендован для использования в селекции на кормовые цели как источник низкого содержания алкалоидов, генов нерастрескиваемости бобов, нетребовательности к яровизации и отсутствию твердокаменности семян. Однако его геном не содержит аллелей устойчивости к антракнозу. Близкородственный ему гибрид М–Д14 (F8) несет практически все доместизируемые аллели изученных генов, за исключением аллеля антракнозоустойчивости *AnSeq4*. Для него же характерна синяя окраска цветков и индетерминантный тип ветвления.

Таблица – Данные комплексной оценки выделенных образцов гибридного происхождения люпина узколистного селекции БГУ

| Образец | Тип ветвления | Окраска цветков | Алкалоидность листьев, % ОСВ | Результаты типирования с праймерами к генам хозяйственно ценных признаков | | | | | | |
|------------------------|---------------|-----------------|------------------------------|---|---------------|------|--------------|---------|---------------|-----------|
| | | | | <i>tardus</i> | <i>lentus</i> | | <i>Lanr1</i> | | <i>mollis</i> | <i>ku</i> |
| | | | | TaLi | LeM1 | LeM2 | An-Seq3 | An-Seq4 | MoLi | KuH |
| F4 Миртан х Дикаф–14 | детер | белая | менее 0,02 | D | + | + | s | s | D | D |
| F4 К 1992 х Apendrilon | ветв | синяя | 0,48 ± 0,001* | D+W | + | + | r | – | D | W |
| F4 Apendrilon х К 1992 | ветв | синяя | 0,56 ± 0,013* | D+W | + | + | r | r | D | D |
| F4 Н846К–2 | ветв | белая | 0,30 ± 0,004* | D | + | + | r | s | D | W |
| F4 АН846 | ветв | синяя | 0,27 ± 0,005* | D+W | + | + | – | r | D | W |
| F8 М–Д14 | ветв | синяя | менее 0,02 | D | + | + | r | – | D | D |

Примечания – F – поколение гибрида; детер – растения с детерминированным ветвлением; ветв – растения индетерминантного типа ветвления; ОСВ – относительно сухое вещество; * – достоверно при P не более 0,05; r – аллель устойчивого генотипа; s – аллель восприимчивого генотипа; d – доместизируемый аллель; w – аллель дикого генотипа.

Образец Apendrilon х К 1992 (F4) имеет в своем генотипе все аллели изученных генов, желаемые для создания перспективного генотипа, однако характеризуется высоким уровнем алкалоидности, в связи с чем он может использоваться для селекции на сидеральные цели либо как источник указанных доместизируемых аллелей генов хозяйственно ценных признаков.

Наличие полиморфизма аллелей гена *tardus*, детерминирующего нерастрескиваемость бобов, требует дополнительного отбора в последующих поколениях у образцов К 1992 х Apendrilon (F4) и АН846 (F4).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Development of a co-dominant DNA marker tightly linked to the gene *tardus* conferring reduced pod shattering in narrow-leaved lupin / X. Li [et al.] // *Euphytica*. – 2010. – 176, 1. – P.49–58.
2. Development of two sequence-specific PCR markers linked to the *le* gene that reduced pod shattering in narrow-leaved lupin / J.G. Boersma [et al.] // *Gen. and Mol. Biol.* – 2007. – Vol. 30, № 3. – P. 623 – 629.
3. Application of next-generation sequencing for rapid marker development in molecular plant breeding: a case study on anthracnose disease resistance in *Lupinus angustifolius* L. / H. Yang [et al.] // *BMC Genomics*. – 2012. – 13: 318.
4. Идентификация гена устойчивости к антракнозу *Lanr1* у люпина узколистного с помощью ДНК-маркеров / С. Ю. Гришин [и др.] // *Сельскохозяйственная биология*. – 2015. – Т. 50, № 1. – С. 30–36.
5. A molecular marker linked to the *mollis* gene conferring soft-seediness for marker-assisted selection applicable to a wide range of crosses in lupin breeding / X. Li [et al.] // *Molecular breeding*. – 2012. – 29. – P. 361 – 370.
6. Development of a sequence-specific PCR marker linked to the *Ku* gene which removes the vernalization requirement in narrow-leaved lupin [Текст] / J.G. Boersma [et al.] // *Plant Breeding*. – 2007. – 126. – P. 306 – 309.
7. Усовершенствованный колориметрический метод определения алкалоидов в люпине / Т.В. Яговенко [и др.] // *Кормопроизводство*. – 2004. – № 3. – Стр. 27–29.