

Артюхова Анастасия Валентиновна

**ПАСПОРТИЗАЦИЯ СОРТОВ ЛЮПИНА МЕТОДАМИ
ISSR-PCR и RAPD-PCR ДЛЯ BIOTEХНОЛОГИЧЕСКИХ
ИССЛЕДОВАНИЙ**

Специальность

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Уфа – 2011

Работа выполнена в Инновационном научно-образовательном центре биотехнологии и экологии ГОУ ВПО «Брянский государственный университет имени академика И.Г. Петровского»

Научный руководитель:

Доктор биологических наук
Нам Ирина Ян Гуковна

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук,
профессор
Чемерис Алексей Викторович

Доктор биологических наук,
профессор
Павловская Нинэль Ефимовна

Ведущая организация:

Научно-исследовательский
институт сельского хозяйства
Центральных районов
Нечерноземной зоны
(Московская область,
пос. Немчиновка)

Защита состоится « _____ » _____ 2011г. в _____ часов на заседании Объединенного диссертационного совета ДМ 002.136.01 при Учреждении Российской академии наук Институте биологии Уфимского научного центра Российской академии наук по адресу: 450054, г. Уфа, проспект Октября, 69. Тел./факс (3472) 35-53-62. E-mail: ib@anrb.com

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Уфимского научного центра РАН и на сайте Института биологии Уфимского научного центра <http://ib.anrb.ru/sovet.html>

Автореферат разослан « _____ » _____ 2011 г.

Ученый секретарь
Объединенного диссертационного совета
К.б.н., доцент

Уразгильдин Р.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. В последние десятилетия биотехнологические методы широко используются для проведения исследований в смежных областях науки, в частности, в селекции растений, растениеводстве и семеноводстве (Шевелуха, 2008; Харченко, Глазко, 2009). При этом особое значение имеет разработка современных методов на основе полимеразно-цепной реакции, поскольку метод ПЦР имеет высокую чувствительность, точность и воспроизводимость результатов, скорость и производительность анализа, достаточно прост в исполнении и не требует сложного дорогостоящего оборудования (Сулимова, 2004; Карлов, 2009). ПЦР широко используется в медицине для экспресс-диагностики инфекционных и генетических заболеваний, в исследованиях по филогенетическому анализу разных таксонов животных и растений (Кочиева, 2004; Лукашов, 2009), в генетике и селекции для определения генетического родства сортов разных видов растений (Зайцев, 2001; Нам, 2004), является неотъемлемой частью работ по генетической инженерии (Голденкова, 2003).

Большое значение для современных биотехнологических исследований, а также селекции хозяйственно-ценных культур и семеноводства имеет разработка методов паспортизации сортов растений на основе молекулярных маркеров. Предложенный ранее для анализа генотипов и сортов разных культур метод белковых маркеров (Созинов, 1985; Конарев, 1993) может быть сопряжен с недостаточным полиморфизмом белков, в частности, альбуминов или глобулинов. Для сортовой идентификации некоторых видов растений, в том числе для люпина, метод белковых маркеров оказался непригоден из-за низкого уровня межсортового разнообразия.

Люпин является важной кормовой и сидеральной культурой, характеризуется высоким качеством запасных белков. Для ускорения работ по разработке инновационных биотехнологий создания высокопродуктивных

и устойчивых сортов люпина актуальна разработка метода молекулярных маркеров на основе ДНК и паспортизация сортов и гибридов.

Применение ДНК-маркеров на основе полимеразно-цепной реакции (ISSR-PCR, RAPD-PCR, AFLP, MFLP) позволило расширить возможности для разработки методов молекулярного маркирования с целью паспортизации сортов различных сельскохозяйственных культур, в частности были разработаны молекулярные маркеры хозяйственно-ценных признаков люпина узколистного (Yang, 2004, 2008) и способ идентификации ряда австралийских сортов узколистного люпина (Yuan, 2005). В России подобные исследования на люпине разных видов не проводились.

Цель и задачи исследования. Целью настоящего исследования являлась разработка метода паспортизации сортов люпина разных видов на основе методов ISSR-PCR и RAPD-PCR.

Для достижения цели решались следующие задачи:

- 1) выбор метода выделения ДНК из образцов люпина;
- 2) подбор оптимальных условий проведения ISSR-PCR и RAPD-PCR на ДНК люпина;
- 3) подбор праймеров, обеспечивающих достаточный полиморфизм и стабильную амплификацию полиморфных фрагментов люпина;
- 4) изучение генетического полиморфизма сортов, сортообразцов и гибридных форм люпина;
- 5) составление генетических паспортов сортов люпина узколистного, желтого и белого;
- 6) изучение генетического сходства сортов и сортообразцов люпина узколистного;
- 7) разработка схем дихотомического ключа для идентификации сортов люпина по генетическим паспортам.

Научная новизна и значимость работы. Впервые разработан метод паспортизации сортов люпина трех видов на основе ISSR-PCR. Метод

паспортизации сортов люпина включает протокол выделения ДНК, набор праймеров и условия проведения ISSR-PCR. Составлены паспорта сортов трех видов люпина, возделываемых в России, установлено генетическое сходство сортов. Установлены уровни внутривидового разнообразия, степень генетической дифференциации сортов.

Практическая ценность исследований. Полученные в данной работе паспорта сортов люпина белого, желтого и узколистного будут использованы в селекции, а также для поиска маркеров хозяйственно-ценных признаков при разработке биотехнологий получения высокопродуктивных сортов этого ценного растения. Составленные паспорта могут быть использованы при передаче сортов в Госкомиссию и для контроля чистоты посевного материала.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Метод паспортизации сортов трех видов люпина.
2. Паспорта сортов люпина узколистного, желтого и белого.
3. Дихотомический ключ идентификации сортов люпина.
4. Генетическое сходство сортов люпина узколистного.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы были доложены на международной научно-практической конференции молодых ученых «Теоретические основы применения биотехнологии, генетики и физиологии растений в современной селекции растений и растениеводстве» (Брянск, 2009), международной конференции молодых ученых «Современная биотехнология: фундаментальные проблемы, инновационные аспекты в биотехнологии» (Брянск, 2010), III Всероссийском с международным участием, конгрессе студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз-2010» (Нижний Новгород, 2010), международной конференции молодых ученых «Актуальные проблемы ботаники и экологии» (Ялта, 2010), VI международной научной конференции «Факторы экспериментальной эволюции организмов» (Алушта, 2010).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 7 работ, одна из них в издании, рекомендованном ВАК.

Структура работы. Диссертационная работа состоит из введения, трех глав – обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, и выводов. Список литературы включает 131 источник, в том числе 36 публикаций отечественных авторов и 95 публикаций иностранных авторов. Диссертационная работа изложена на 145 страницах, из которых 105 страниц основного текста и 40 страниц приложений, содержит 18 рисунков и 12 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Материалы и методы

Исследования проводили в Инновационном научно-образовательном центре биотехнологии и экологии Брянского государственного университета имени академика И.Г. Петровского в период с 2008 по 2010 гг. Анализировали семена сортов и форм люпина трех видов: белого (*Lupinus albus* L.), желтого (*L. luteus* L.), узколистного (*L. angustifolius* L.). Образцы для анализа были предоставлены сотрудниками ВНИИ люпина (пос. Мичуринский, Брянская область) и Научно-практического центра НАН Беларуси по земледелию (г. Жодино, Минская область).

1.1. Растительный материал. В работе использованы образцы люпина узколистного: 39 сортов российской, польской, белорусской и австралийской селекции, 6 гибридных, 5 диких форм и 7 образцов биологического банка генов из Белоруссии; 8 сортов люпина желтого и 6 сортов люпина белого.

1.2. Выделение ДНК. Выделение ДНК проводили из сухих семян или гипокотилей шестидневных проростков. Использовали навеску ДНК массой 200 и 400 мг соответственно. Выделение проводили фенол-хлороформным методом с небольшими изменениями (Chomczynski, 1987) или методом СТАВ

(Генная инженерия растений, 1991). Качество и количество полученных препаратов ДНК определялось спектрофотометрическим методом (Епринцев, 2008).

1.3. Проведение PCR. PCR проводили в четырехканальном ДНК-амплификаторе «Терцик» («ДНК-технология», Россия). Для ISSR-PCR и RAPD-PCR использовали праймеры, синтезированные фирмой «Синтол» (Россия), ферменты и реактивы, поставляемые фирмой «СибЭнзим» (Россия).

Температуру отжига праймеров вычисляли с помощью программы VectorNTI (Invitrogen).

Реакционная смесь для ISSR-PCR объемом 20 мкл содержала следующие компоненты: 2 ед. *Taq*-полимеразы E338, 2 мкл 10-кратного SE-буфера AS, 5 mM MgCl₂, 0,25 mM каждого dNTP, 50 пмоль каждого из праймеров, 300 нг тотальной геномной ДНК. Смесь покрывали 20 мкл вазелинового масла.

RAPD-праймеры были разделены на две группы по рассчитанной температуре отжига: выше 18°C и ниже. Для второй группы с целью повышения специфичности анализа увеличили концентрацию буфера и праймеров в два раза, достигнув увеличения температуры отжига.

Реакционная смесь для RAPD-PCR объемом 20 мкл в зависимости от типа праймера содержала следующие компоненты: 1 ед. *Taq*-полимеразы E338, 2 или 4 мкл 10-кратного SE-буфера AS, 5 mM MgCl₂, 0,25 mM каждого dNTP, 100 или 200 пмоль каждого из праймеров, 100 нг тотальной геномной ДНК. Смесь покрывали 20 мкл вазелинового масла.

Условия амплификации были следующими: начальная денатурация 5 мин при 94°C; 35 циклов: денатурация при 94°C – 45 с, отжиг – 45 с и элонгация при 72°C 90 с; заключительная элонгация 7 мин при 72°C.

Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 2% агарозном геле с буфером TBE в присутствии бромистого этидия и визуализировали на UV-транслюминаторе или с использованием системы GelDocXR («BioRad»,

США) и программы для обработки электрофореграмм Quantity One. В качестве маркера размеров фрагментов ДНК использовали M27 («СибЭнзим», Россия). Полиморфными считались фрагменты, присутствующие на электрофореграммах не всех сортов. Составляли бинарную матрицу данных, в которой присутствие фрагмента отмечали «1», а отсутствие – «0».

1.4. Построение древа генетического сходства. Генетические дистанции вычисляли на основе полученной матрицы данных, используя коэффициент несовпадения. Дендрограмму, отражающую генетическое сходство сортов люпина узколистного, строили методом кластерного анализа WPGMA в программе Statistica 6.0 («Stat Soft»).

1.5. Паспортизация сортов. По матрице данных выбрали минимальное количество праймеров, необходимых для составления генетического паспорта сорта. В паспортах праймер обозначали прописной буквой латинского алфавита, справа нижним индексом указывали размер фрагмента, а его отсутствие или присутствие – слева верхним индексом.

1.6. Составление дихотомического ключа. Дихотомический ключ идентификации 39 сортов люпина узколистного составляли на основе матрицы данных по минимальному набору фрагментов, позволяющему однозначно определить каждый из изучаемых сортов. Ключ разрабатывали по принципу составления таксономических ключей для определения видов. На каждом шаге выбирали маркер, позволяющий разделить сорта на две примерно равные части.

2. Результаты и обсуждение

2.1. Выбор метода выделения ДНК из образцов люпина. Для определения оптимальной методики выделения ДНК из растительного материала было выбрано по одному сорту каждого из трех видов люпина. По результатам электрофоретического и спектрофотометрического анализов

ДНК, выделяемая фенол хлороформным методом, отличалась большей чистотой и большим выходом.

2.2. Подбор оптимальных условий проведения ISSR-PCR и RAPD-PCR на ДНК люпина. Оптимизацию условий PCR проводили на ДНК трех сорта белого, желтого и узколистного люпина. При этом варьировали концентрацию ионов Mg^{2+} , *Taq*-полимеразы, ДНК и праймеров, а также температуру отжига праймеров. Оптимальные условия PCR на ДНК люпина описаны в разделе «Материалы и методы».

2.3. Подбор праймеров, обеспечивающих достаточный полиморфизм и стабильную амплификацию полиморфных фрагментов люпина. Для проведения RAPD-анализа использовали 14 RAPD-праймеров. С тремя из них не получили ни одного фрагмента; два праймера продуцировали менее четырех фрагментов ДНК; два праймера не давали полиморфных фрагментов. С остальными RAPD-праймерами удалось получить один-два полиморфных фрагмента (таблица 1). Исключением оказался OPN14, продуцировавший 5 полиморфных фрагментов на ДНК люпина узколистного.

Уровень полиморфизма при RAPD-PCR оказался 16,9% (13 полиморфных фрагментов из 77) для узколистного, 7,3% (3 из 41) для желтого и 10,6% (5 из 47) для белого люпина. Результаты RAPD-PCR на ДНК люпина белого для праймеров OPM20 и OPN04 проиллюстрированы на рисунке 1. Видно, что для обоих праймеров наиболее интенсивные полосы являются мономорфными.

При RAPD-анализе полиморфизм наблюдался только среди минорных фрагментов. Специфика RAPD-PCR состоит в том, что такие ампликоны могут быть невоспроизводимыми в связи с ошибками при отжиге праймеров. Таким образом, метод RAPD-PCR показал очень низкую результативность при анализе полиморфизма люпина и его не использовали в дальнейшей работе.

Характеристика праймеров, использованных в работе

Праймер	Тип	<i>L. albus</i>			<i>L. luteus</i>			<i>L. angustifolius</i>		
		А	Б	В	А	Б	В	А	Б	В
OPC07	RAPD	14	1	7,1	14	1	7,1	9	0	0
OPN04	RAPD	13	1	7,7	16	1	6,3	15	1	6,6
OPN07	RAPD	8	0	0	9	0	0	14	2	14,3
OPN09	RAPD	14	0	0	8	0	0	13	2	15,4
OPN10	RAPD	10	0	0	8	0	0	11	1	9,1
OPN14	RAPD	9	1	11,1	11	1	9,1	14	5	35,7
OPM20	RAPD	11	2	18,2	12	0	0	10	2	20
IS1	ISSR	20	1	5	13	3	23,1	19	1	5,3
IS2 (B)	ISSR	17	6	35,3	12	1	8,3	16	7	43,7
IS3 I	ISSR	20	1	5	19	1	5,3	22	13	59
IS4	ISSR	15	0	0	16	0	0	20	4	20
IS5	ISSR	18	1	5,5	20	0	0	18	2	11,1
IS6 (F)	ISSR	22	0	0	25	4	16	29	5	17,2
UBC809	ISSR	14	2	14,3	18	2	11,1	19	5	26,3
UBC810 (I)	ISSR	20	1	5	22	12	54,5	29	17	58,6
UBC824	ISSR	10	1	10	10	1	10	15	7	46,6
UBC826	ISSR	13	2	15,4	15	6	40	14	0	0
UBC840	ISSR	23	0	0	31	1	3,2	25	0	0
K10	ISSR	15	0	0	11	0	0	15	5	33,3
K11 (J)	ISSR	22	3	13,6	15	1	6,6	26	0	0

Примечание: А – общее количество фрагментов; Б – количество полиморфных фрагментов; В – процент полиморфных фрагментов. В графе «Праймеры» в скобках указаны обозначения, применяемые при паспортизации сортов.

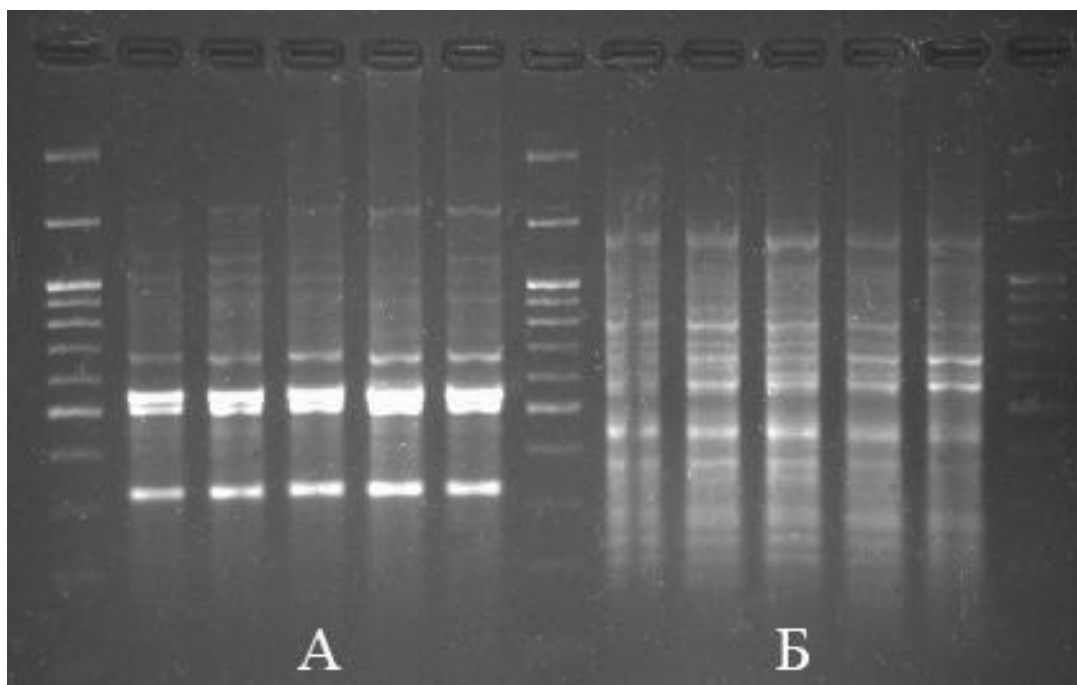


Рис. 1. RAPD-профиль пяти сортов люпина белого.

А – праймер OPM20, Б – праймер OPN04.

Для ISSR-анализа использовали 22 праймера, состоящих из динуклеотидных мотивов с якорными нуклеотидами на 3'-конце. При использовании трех праймеров на электрофореграммах наблюдался лишь высокомолекулярный шлейф. Остальные 19 ISSR-праймеров стабильно воспроизводили от 9 (K30, ДНК люпина узколистного) до 31 (UBC840, ДНК люпина желтого) фрагментов ДНК длиной от 100 до 2500 п.н. Шесть из них не проявили способности продуцировать полиморфные фрагменты, полосы со слабой интенсивностью показали высокую воспроизводимость. В дальнейшей работе при анализе образцов ДНК люпина использовали 13 праймеров (таблица 1).

ISSR-профили, полученные для разных сортов люпина, в основном содержали низкое количество полиморфных полос (от 1 до 6). Лишь с использованием UBC810 для люпина узколистного и желтого удалось получить 17 и 12 полиморфных фрагментов соответственно, и с IS3 – 13 полиморфных фрагментов для люпина узколистного.

2.4. Изучение генетического полиморфизма сортов, сортообразцов и гибридных форм люпина. Межвидовые различия образцов люпина проявлялись при использовании для ISSR-PCR всех 19 праймеров. Межвидовой полиморфизм у люпина оказался очень высок. Только семь праймеров продуцировали один или два мономорфных фрагмента. Процент мономорфных фрагментов для трех видов люпина составил 2,17% (11 из 505 фрагментов).

Например, для праймера K11 (рис. 2) мономорфным для трех видов является только фрагмент размером 505 п. н., а фрагмент размером 460 п. н. является общим для люпина узколистного и желтого. Из-за почти полного несходства спектров эти праймеры малопригодны для анализа родства видов люпина и построения филогенетических деревьев.

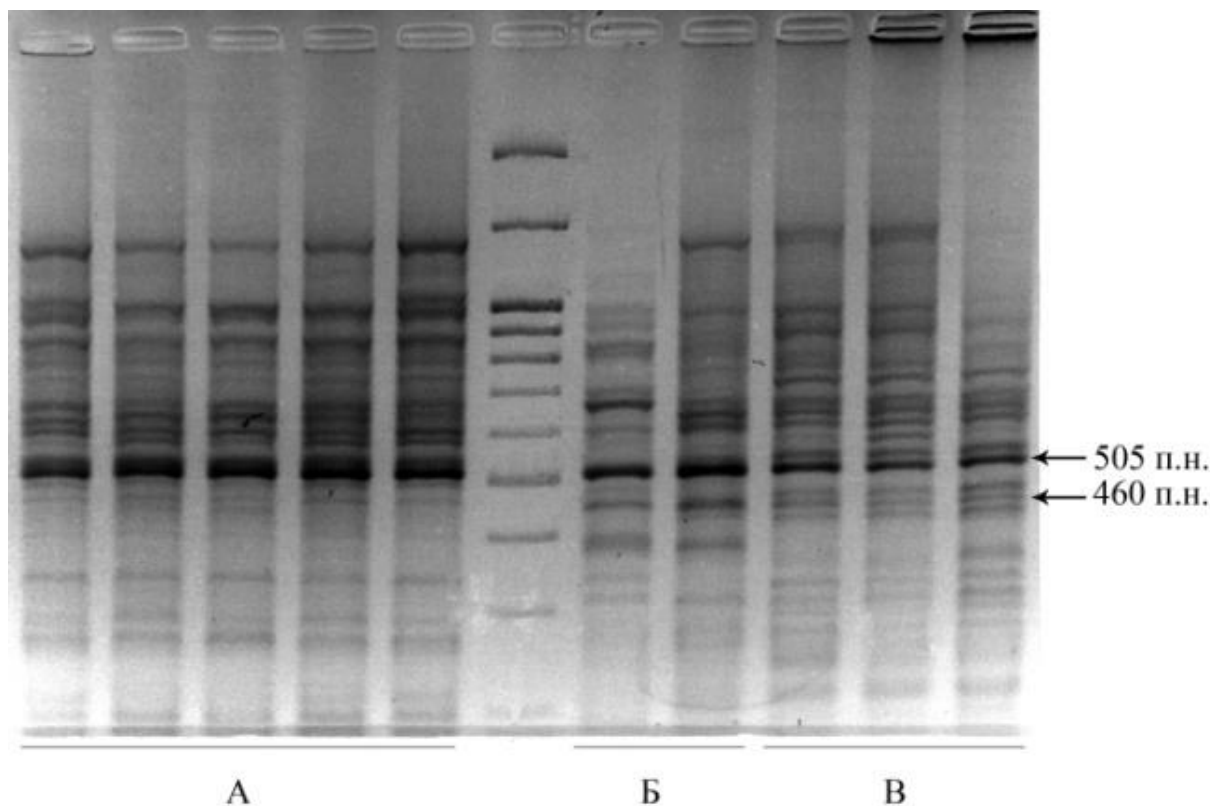


Рис. 2. Электрофореграмма сортов трех видов люпина, полученная при использовании праймера K11:

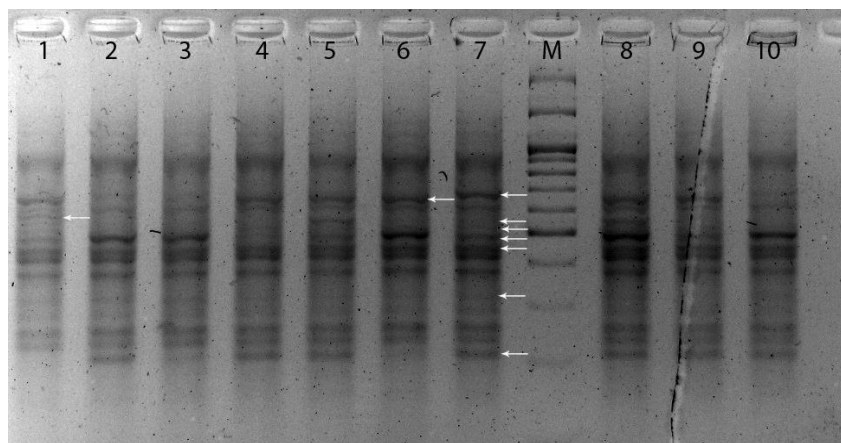
А – люпин белый, Б – люпин желтый, В – люпин узколистный

На рисунке 3 показаны примеры электрофореграмм узколистного (А), белого (Б), и желтого (В) люпина. В спектре имеются полосы, мономорфные для всех сортов вида, и набор полиморфных фрагментов. Внутривидовой полиморфизм, вычисленный по праймерам, синтезировавшим полиморфные фрагменты, составил 32,7% (66 полиморфных из 202 фрагментов) для узколистного люпина, 20,1% (32 из 159) для желтого и 11,7% (17 из 154) для белого.

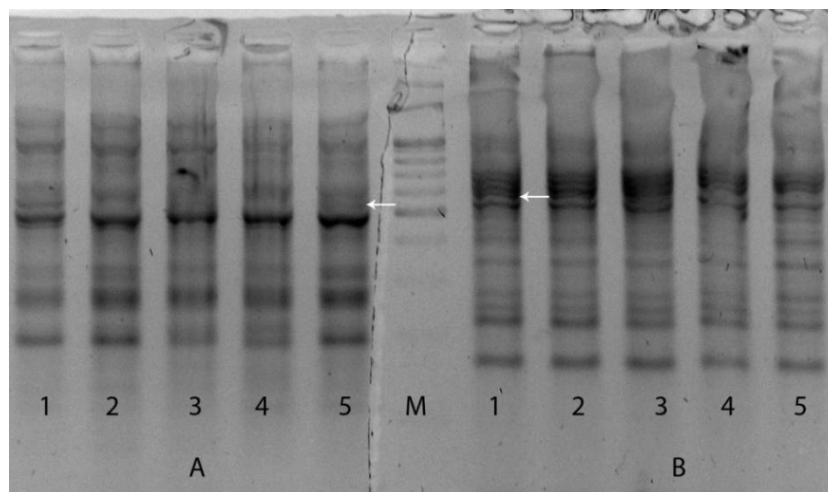
Для 7 сортов узколистного люпина удалось найти ампликоны, присутствие или отсутствие которых является сортоспецифичным. Они могут служить маркерами этих сортов.

В целом следует отметить, что выявленная низкая степень гетерогенности сортов люпина соответствует ожиданиям, т.к. размножение люпина происходит преимущественно самоопылением. Кроме того, большинство современных сортов люпина были получены на основе небольшого числа низкоаллоидных мутантов.

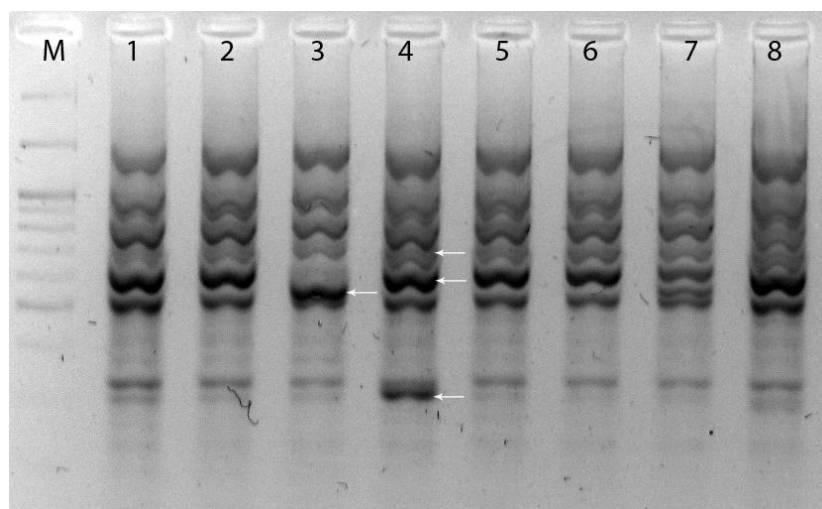
2.5. Составление генетических паспортов сортов люпина узколистного, желтого и белого. На основе данных, полученных в результате ISSR-анализа сортов люпина, были составлены генетические формулы, отражающие полиморфизм по всем ампликонам и праймерам, использованным для каждого вида. Из этих спектров полиморфных полос были выбраны минимальные наборы праймеров, позволяющие надежно идентифицировать любые сорта и формы, изученные в настоящей работе. Примеры генетических паспортов шести сортов каждого вида представлены в таблице 2. Такие паспорта составлены для всех проанализированных сортов и форм люпина: 39 сортов, 6 гибридных, 5 диких форм и 7 образцов биологического банка генов люпина узколистного, 8 сортов люпина желтого и 6 сортов люпина белого. Минимальный набор, позволяющий идентифицировать все изученные образцы, составил 4 праймера для люпина узколистного, 2 – для люпина белого и 1 – для люпина желтого.



А



Б



В

Рис. 3. Электрофореграммы сортов люпина:
 А – узколистного (IS3), Б – белого (К10 – слева, К11 – справа), В – желтого (UNC826).
 Стрелками обозначены полиморфные фрагменты

Таблица 2

Генетические паспорта некоторых сортов люпина

Название и происхождение сорта	Общая формула полиморфных фрагментов
<i>L. angustifolius</i>	
Сидерат 38 (Россия)	${}^1B_{970} {}^1B_{860} {}^0B_{640} {}^1B_{450} {}^1B_{370} {}^1B_{210} {}^1B_{180} {}^1C_{780} {}^0C_{690} {}^1C_{670} {}^1C_{590} {}^1C_{560} {}^1C_{520}$ ${}^1C_{490} {}^1C_{450} {}^0C_{330} {}^1C_{320} {}^1C_{290} {}^1C_{240} {}^1C_{210} {}^0F_{900} {}^0F_{880} {}^0F_{860} {}^1F_{750} {}^1F_{640} {}^0F_{630}$ ${}^1F_{550} {}^1I_{930} {}^1I_{790} {}^0I_{730} {}^1I_{650} {}^1I_{520} {}^1I_{480} {}^1I_{470} {}^1I_{420} {}^0I_{390} {}^1I_{380} {}^1I_{370} {}^1I_{360} {}^1I_{330} {}^0I_{310}$ ${}^0I_{300} {}^1I_{290} {}^0I_{280}$
СН 78-07 (Россия)	${}^1B_{970} {}^1B_{860} {}^0B_{640} {}^1B_{450} {}^1B_{370} {}^1B_{210} {}^1B_{180} {}^1C_{780} {}^0C_{690} {}^1C_{670} {}^0C_{590} {}^1C_{560} {}^1C_{520}$ ${}^1C_{490} {}^1C_{450} {}^0C_{330} {}^1C_{320} {}^1C_{290} {}^1C_{240} {}^1C_{210} {}^0F_{900} {}^0F_{880} {}^1F_{860} {}^1F_{750} {}^1F_{640} {}^0F_{630}$ ${}^1F_{550} {}^1I_{930} {}^1I_{790} {}^0I_{730} {}^1I_{650} {}^1I_{520} {}^1I_{480} {}^1I_{470} {}^1I_{420} {}^0I_{390} {}^1I_{380} {}^1I_{370} {}^1I_{360} {}^1I_{330} {}^0I_{310}$ ${}^0I_{300} {}^1I_{290} {}^0I_{280}$
Барон (Польша)	${}^1B_{970} {}^1B_{860} {}^0B_{640} {}^1B_{450} {}^1B_{370} {}^1B_{210} {}^1B_{180} {}^1C_{780} {}^0C_{690} {}^1C_{670} {}^0C_{590} {}^1C_{560} {}^1C_{520}$ ${}^1C_{490} {}^1C_{450} {}^0C_{330} {}^1C_{320} {}^1C_{290} {}^1C_{240} {}^1C_{210} {}^0F_{900} {}^0F_{880} {}^1F_{860} {}^1F_{750} {}^1F_{640} {}^0F_{630}$ ${}^1F_{550} {}^1I_{930} {}^1I_{790} {}^0I_{730} {}^1I_{650} {}^1I_{520} {}^1I_{480} {}^1I_{470} {}^1I_{420} {}^0I_{390} {}^1I_{380} {}^1I_{370} {}^1I_{360} {}^1I_{330} {}^0I_{310}$ ${}^0I_{300} {}^1I_{290} {}^0I_{280}$
Борута (Польша)	${}^1B_{970} {}^1B_{860} {}^0B_{640} {}^1B_{450} {}^1B_{370} {}^1B_{210} {}^1B_{180} {}^1C_{780} {}^0C_{690} {}^1C_{670} {}^0C_{590} {}^1C_{560} {}^1C_{520}$ ${}^1C_{490} {}^1C_{450} {}^0C_{330} {}^1C_{320} {}^1C_{290} {}^1C_{240} {}^1C_{210} {}^0F_{900} {}^0F_{880} {}^1F_{860} {}^1F_{750} {}^1F_{640} {}^0F_{630}$ ${}^1F_{550} {}^1I_{930} {}^1I_{790} {}^0I_{730} {}^1I_{650} {}^1I_{520} {}^1I_{480} {}^1I_{470} {}^1I_{420} {}^0I_{390} {}^1I_{380} {}^1I_{370} {}^1I_{360} {}^1I_{330} {}^0I_{310}$ ${}^0I_{300} {}^1I_{290} {}^0I_{280}$
Геркулес (Беларусь)	${}^1B_{970} {}^1B_{860} {}^0B_{640} {}^1B_{450} {}^1B_{370} {}^1B_{210} {}^1B_{180} {}^1C_{780} {}^0C_{690} {}^1C_{670} {}^1C_{590} {}^1C_{560} {}^1C_{520}$ ${}^1C_{490} {}^1C_{450} {}^0C_{330} {}^1C_{320} {}^1C_{290} {}^1C_{240} {}^1C_{210} {}^0F_{900} {}^0F_{880} {}^1F_{860} {}^0F_{750} {}^1F_{640} {}^0F_{630}$ ${}^1F_{550} {}^1I_{930} {}^1I_{790} {}^0I_{730} {}^1I_{650} {}^1I_{520} {}^1I_{480} {}^1I_{470} {}^1I_{420} {}^0I_{390} {}^1I_{380} {}^1I_{370} {}^1I_{360} {}^1I_{330} {}^0I_{310}$ ${}^1I_{300} {}^1I_{290} {}^0I_{280}$
Каля (Австралия)	${}^1B_{970} {}^1B_{860} {}^0B_{640} {}^1B_{450} {}^1B_{370} {}^1B_{210} {}^1B_{180} {}^1C_{780} {}^1C_{690} {}^1C_{670} {}^1C_{590} {}^1C_{560} {}^1C_{520}$ ${}^1C_{490} {}^1C_{450} {}^0C_{330} {}^1C_{320} {}^1C_{290} {}^1C_{240} {}^1C_{210} {}^0F_{900} {}^0F_{880} {}^1F_{860} {}^1F_{750} {}^1F_{640} {}^0F_{630}$ ${}^1F_{550} {}^1I_{930} {}^1I_{790} {}^0I_{730} {}^1I_{650} {}^1I_{520} {}^1I_{480} {}^1I_{470} {}^1I_{420} {}^0I_{390} {}^1I_{380} {}^1I_{370} {}^1I_{360} {}^1I_{330} {}^1I_{310}$ ${}^0I_{300} {}^1I_{290} {}^0I_{280}$
<i>L. luteus</i>	
Престиж (Россия)	${}^0I_{650} {}^1I_{600} {}^1I_{550} {}^0I_{430} {}^1I_{400} {}^1I_{370} {}^1I_{350} {}^1I_{250} {}^0I_{200} {}^0I_{170} {}^1I_{160} {}^1I_{150}$
Парис (Польша)	${}^0I_{650} {}^1I_{600} {}^0I_{550} {}^0I_{430} {}^1I_{400} {}^1I_{370} {}^1I_{350} {}^1I_{250} {}^0I_{200} {}^1I_{170} {}^0I_{160} {}^1I_{150}$
Мистер(Польша)	${}^1I_{650} {}^0I_{600} {}^1I_{550} {}^0I_{430} {}^1I_{400} {}^1I_{370} {}^1I_{350} {}^1I_{250} {}^1I_{200} {}^0I_{170} {}^0I_{160} {}^1I_{150}$
Дукат (Польша)	${}^0I_{650} {}^1I_{600} {}^1I_{550} {}^1I_{430} {}^1I_{400} {}^1I_{370} {}^1I_{350} {}^1I_{250} {}^0I_{200} {}^0I_{170} {}^0I_{160} {}^1I_{150}$
Поло (Польша)	${}^0I_{650} {}^1I_{600} {}^0I_{550} {}^1I_{430} {}^1I_{400} {}^1I_{370} {}^1I_{350} {}^1I_{250} {}^0I_{200} {}^1I_{170} {}^1I_{160} {}^0I_{150}$
Лорд (Польша)	${}^1I_{650} {}^1I_{600} {}^1I_{550} {}^0I_{430} {}^1I_{400} {}^1I_{370} {}^1I_{350} {}^1I_{250} {}^0I_{200} {}^1I_{170} {}^0I_{160} {}^0I_{150}$
<i>L. albus</i>	
Гамма (Россия)	${}^1B_{1050} {}^1B_{710} {}^0B_{690} {}^1B_{650} {}^1B_{470} {}^0B_{420} {}^1J_{550} {}^1J_{310} {}^1J_{190}$
Дега (Россия)	${}^1B_{1050} {}^1B_{710} {}^0B_{690} {}^1B_{650} {}^1B_{470} {}^1B_{420} {}^1J_{550} {}^1J_{310} {}^1J_{190}$
Бутан (Польша)	${}^1B_{1050} {}^1B_{710} {}^1B_{690} {}^0B_{650} {}^1B_{470} {}^0B_{420} {}^1J_{550} {}^1J_{310} {}^1J_{190}$
Борос(Польша)	${}^0B_{1050} {}^1B_{710} {}^0B_{690} {}^1B_{650} {}^1B_{470} {}^0B_{420} {}^1J_{550} {}^1J_{310} {}^1J_{190}$
Люцамме (Франция)	${}^0B_{1050} {}^1B_{710} {}^1B_{690} {}^0B_{650} {}^1B_{470} {}^1B_{420} {}^1J_{550} {}^1J_{310} {}^1J_{190}$
Луниверс (Франция)	${}^1B_{1050} {}^1B_{710} {}^1B_{690} {}^1B_{650} {}^1B_{470} {}^1B_{420} {}^1J_{550} {}^1J_{310} {}^1J_{190}$

2.6. Изучение генетического сходства сортов и сортообразцов люпина узколистного. На основе генетических формул была получена дендрограмма генетического сходства сортов люпина узколистного (рис. 4). В целом она согласуется с происхождением сортов из разных селекционных центров, включает четыре кластера. Так, в единые кластеры сгруппировались сорта белорусской (кластер 1) и российской (кластер 2) селекции, а также 5 из 10 польских сортов (кластер 3).

Как и ожидалось, дикие формы из Испании (ИД) кластеризовались отдельно (кластер 4), показав максимальное генетическое расстояние от остальных групп.

Все четыре австралийских образца оказались распределены по дендрограмме по одному. Возможно, это объясняется тем, что в основу австралийской селекции люпина легли европейские сорта разного происхождения.

Равномерно распределены по древу оказались 7 форм биологического банка генов узколистного люпина (БГБ) из Белоруссии. Четырнадцать компонентов БГБ сочетают в себе все идентифицированные хозяйственно-ценные признаки (Купцов, 2006). Они также отобраны из разных источников.

2.7. Разработка схем дихотомического ключа для идентификации сортов люпина по генетическим маркерам. Дихотомический ключ (рис. 5) был составлен для 39 сортов люпина узколистного на основе генетических паспортов. Для его составления достаточным оказалось использование лишь 13 фрагментов трех праймеров (IS3, IS6 и UBC 810).

Достоинство такого способа идентификации заключается в том, что нет необходимости проверки получаемых электрофоретических профилей по всем полиморфным фрагментам всех сортов, для которых созданы формулы. Как правило, для идентификации сорта необходимы не все полиморфные фрагменты. Достаточно определить наличие или присутствие требуемой полосы на электрофореграмме и затем перейти к следующему шагу.

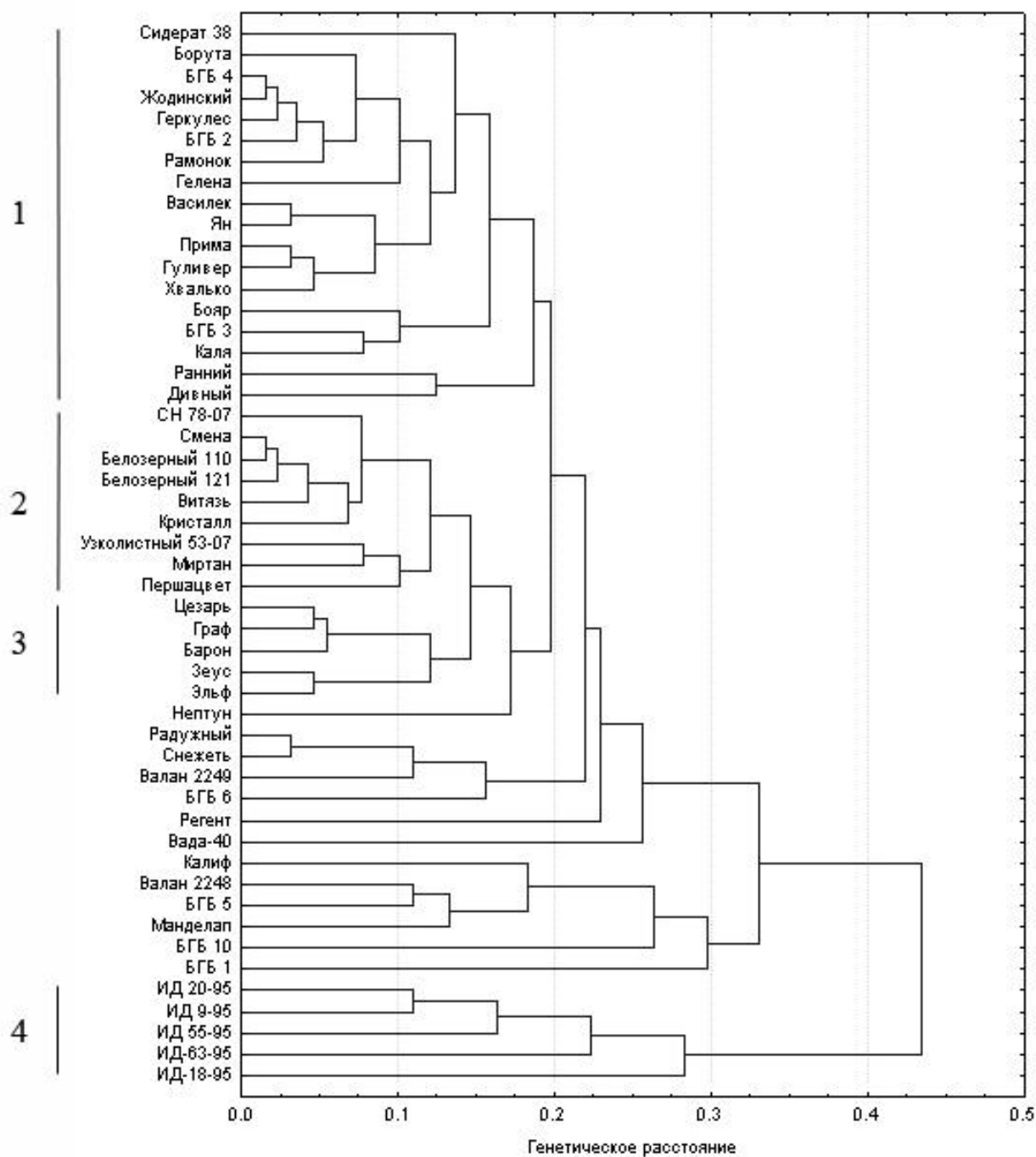


Рис. 4. Дендрограмма генетического сходства сортов люпина узколистного

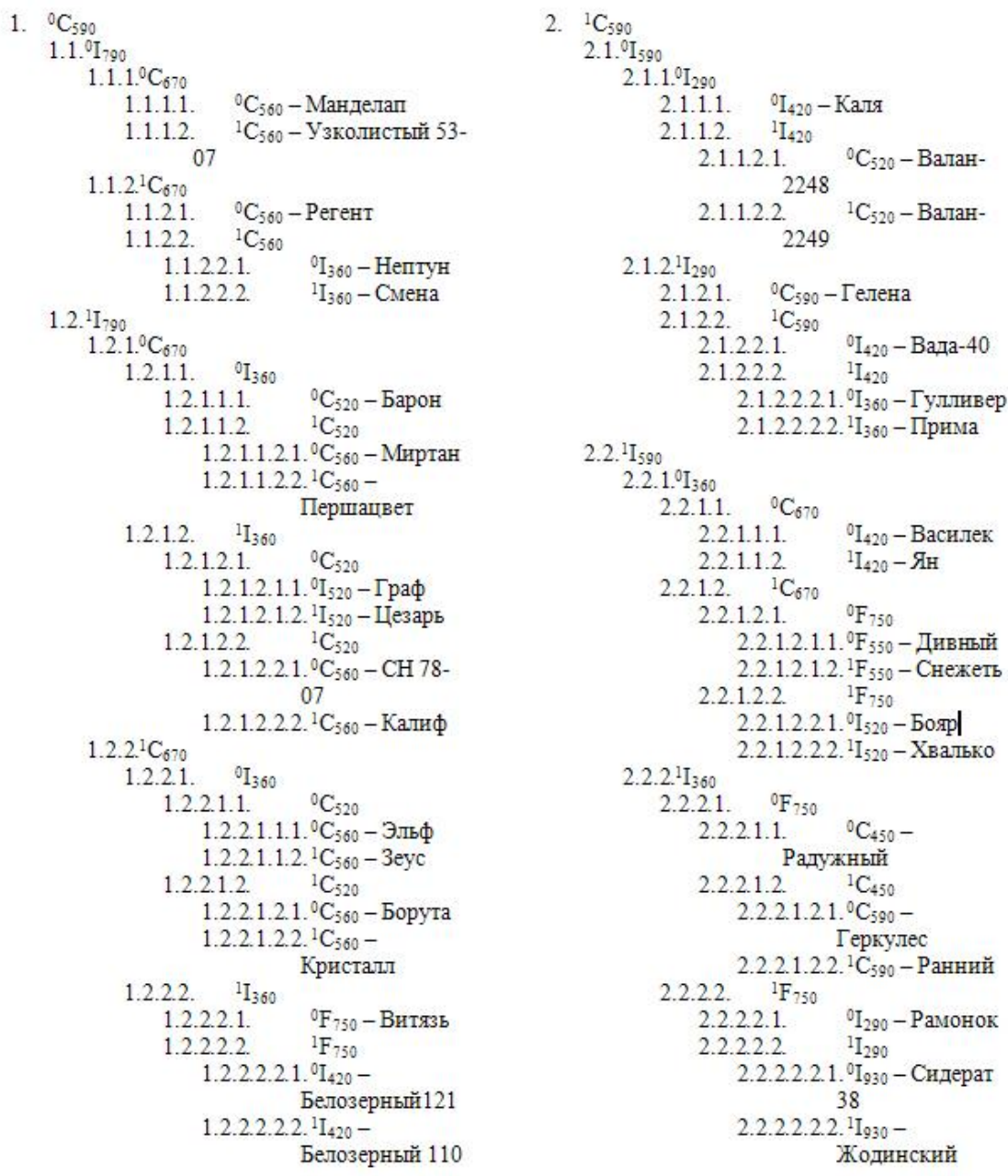


Рис. 5. Дихотомический ключ идентификации сортов люпина узколистного

Выводы

1. На основе ISSR-PCR разработан метод паспортизации сортов трех видов люпина: *Lupinus angustifolius*, *L. luteus* и *L. albus*.

2. Показано, что межмикросателлитные последовательности люпина обладают достаточным уровнем полиморфизма для проведения идентификации сортов: уровень полиморфизма составил 32,7% для узколистного, 20,1% для желтого и 11,7% для белого люпина. Выбрано 11 праймеров, обеспечивающих стабильную амплификацию полиморфных фрагментов ДНК трех видов люпина.

3. RAPD-анализ дает недостаточное количество полиморфных фрагментов (16,9%, 7,3% и 10,6% для люпина узколистного, желтого и белого соответственно) и имеет более низкую воспроизводимость, поэтому использование его для идентификации сортов нецелесообразно.

4. Составлены генетические паспорта 57 сортов, сортообразцов, гибридных и диких форм узколистного, 6 сортов белого и 8 сортов желтого люпина.

5. Минимальный набор для однозначного определения 57 сортообразцов люпина узколистного состоит из четырех праймеров.

6. На дендрограмме генетического родства сортов и форм узколистного люпина, включающей 50 образцов, выявляется 4 кластера, которые в целом отражают селекционное происхождение и генетические связи образцов. Сорты российской, белорусской и польской селекции образуют три отдельных кластера. Дикие формы из Испании образуют четвертый кластер, удаленный от остальных образцов. Формы биологического генетического банка люпина узколистного и австралийские сорта равномерно распределены по всему дереву.

7. Разработана схема дихотомического ключа для идентификации сортов люпина.

Рекомендации производству

1. Генетические паспорта сортов люпина рекомендуется учитывать при государственной регистрации сортов и использовать для контроля сортового соответствия и чистоты семенного материала.
2. Дендрограмму генетического сходства сортов люпина предлагается использовать в селекционном процессе при составлении схем гибридизации с учетом отдаленных эколого-генетических комбинаций.
3. Дихотомический ключ может быть применен для сортовой идентификации растений и семян люпина.
4. Полученный банк полиморфных ДНК-маркеров рекомендуется использовать для разработки метода молекулярного маркирования хозяйственно-ценных признаков.
5. Результаты работы предлагается использовать при составлении курсов биотехнологии, генетики и основ сельского хозяйства в вузах.

Список опубликованных работ по теме диссертации

1. **Артюхова, А.В. Разработка метода паспортизации сортов люпина / А.В. Артюхова, С.Ю. Гришин, М.И. Лукашевич, В.В. Заякин, И.Я. Нам // Вестник Брянского государственного университета. – Брянск: РИО БГУ, 2010. – №4. – С. 82–85.**
2. Артюхова, А.В. Обнаружение генетического полиморфизма внутри различных сортов рода *Lupinus* Брянской области / А.В. Артюхова, М.И. Лукашевич, В.В. Заякин, И.Я. Нам // Теоретические основы применения биотехнологии, генетики и физиологии растений в современной селекции растений и растениеводстве: материалы международной научно-практической конференции молодых ученых. Брянск, 29 июня – 8 июля 2009 г. – Брянск, 2009. – С. 47–51.

3. Артюхова, А.В. Генетический полиморфизм сортов рода *Lupinus* / А.В. Артюхова // Современная биотехнология: фундаментальные проблемы, инновационные аспекты в биотехнологии: материалы международной конференции молодых ученых. Брянск, 26 апреля – 8 мая 2010 г. – Брянск, 2010. – С. 7–13.
4. Гришин, С.Ю. Разработка метода генетических маркеров люпина для использования в селекционном процессе / С.Ю. Гришин, А.В. Артюхова, В.В. Заякин, И.Я. Нам // Современная биотехнология: фундаментальные проблемы, инновационные аспекты в биотехнологии: материалы международной конференции молодых ученых. Брянск, 26 апреля – 8 мая 2010 г. – Брянск, 2010. – С. 37–43.
5. Артюхова, А.В. Использование метода ДНК-маркеров для паспортизации сортов *Lupinus angustifolius* / А.В. Артюхова, С.Ю. Гришин, В.В. Заякин, И.Я. Нам // III всероссийский, с международным участием, конгресс студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз-Россия 2010». Нижний Новгород, 24–28 мая 2010. – Нижний Новгород, 2010. – С. 88–89.
6. Артюхова, А.В. Разработка генетических паспортов сортов *Lupinus angustifolius* / А.В. Артюхова, С.Ю. Гришин, В.В. Заякин, И.Я. Нам // Актуальные проблемы ботаники и экологии: материалы международной конференции молодых ученых. Ялта, 21–25 сентября 2010 г. – Симферополь, 2010. – С. 325–326.
7. Артюхова, А.В. Использование метода ISSR-PCR для выявления генетического полиморфизма сортов разных видов рода *Lupinus* / А.В. Артюхова, С.Ю. Гришин, В.В. Заякин, И.Я. Нам // Факторы экспериментальной эволюции организмов. Т. 8. – Киев: Логос, 2010. – С. 299–302.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность за предоставленный для работы селекционный материал, научные консультации и доброжелательное отношение к работе д.с.-х.н., заместителю директора по научной работе ВНИИ люпина РАСХН Лукашевичу М.И., заведующему лабораторией селекции узколистного люпина ВНИИ люпина РАСХН, к.с.-х.н. Агеевой П.А., заведующему лабораторией селекции люпина НПЦ НАН Беларуси по земледелию, к.с.-х.н. Купцову Н.С. Автор выражает особую признательность научному руководителю, директору ИННО-центра биотехнологии и экологии Брянского государственного университета им. акад. И.Г. Петровского, д.б.н. Нам И. Я., профессору кафедры ботаники БГУ, д.б.н. Заякину В.В. за внимание к работе, помощь в планировании, проведении экспериментальной работы и написании диссертации, а также коллегам, работающим в ИННО-центра биотехнологии и экологии БГУ.