

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ СЕМЯН ДЛЯ СОРТОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВЫСОКОПОЛИМОРФНЫХ КУЛЬТУР НА ПРИМЕРЕ КОЗЛЯТНИКА ВОСТОЧНОГО (*Galega orientalis* LAM.)

Э. Э. Егги

В России электрофорез используется в качестве лабораторного стандартного метода для определения сортовой чистоты партий семян и товарного зерна. Определенную сложность для использования электрофореза представляют перекрестноопыляемые культуры вследствие высокой внутривидовой гетерогенности и большого полиморфизма белковых спектров. Материалом для исследования послужили семена четырех сортов козлятника восточного. Образцы получены из коллекции ВИР. Методом электрофореза изучен компонентный состав белков семян и полиморфизм сортов козлятника восточного. Для выделения белков отдельные семена размалывали, из муки брали навески по 5 мг, которые заливали 140 мкл электродного буфера (трис-глициновый, pH 8,3) и настаивали в течение 1 ч. Электрофорез проводили в 12,5 % ПААГ в диссоциирующей системе с меркаптоэтанолом по Лаемли. Процедура электрофореза и обработки гелевых пластин подробно описана для белков семян гороха. Эта методика нами успешно применяется для анализа семян люпина и других двудольных культур. Белки семян козлятника восточного, разделенные электрофорезом по Лаемли, подобно белкам других двудольных, представлены многокомпонентным спектром, в котором полипептиды расположены от катода к аноду с увеличением молекулярных масс. Анализ основных полипептидов 11S глобулина позволил надежно различать и идентифицировать сорта этой культуры. Обсуждается возможность использования части белкового спектра для идентификации и регистрации полиморфных сортов других культур. Проведенное исследование показывает, что зона основных полипептидов — перспективный объект для разработки метода идентификации сортов козлятника восточного с помощью SDS электрофореза. Мы считаем, что метод следует апробировать и для других перекрестноопыляемых бобовых культур.

Ключевые слова: козлятник восточный; белки семян; сортовая идентификация.

Эффективным методом контроля за составом и соотношением биотипов при создании новых сортов является электрофорез белков семян [1]. Для ряда культур он утвержден международной организацией ISTA в качестве стандартного метода семенного контроля [2]. В России электрофорез используется в качестве лабораторного стандартного метода для определения сортовой чистоты партий семян и товарного зерна [3].

Определенную сложность для использования электрофореза представляют перекрестноопыляемые культуры вследствие высокой внутривидовой гетерогенности и большого полиморфизма белковых спектров. Полиморфизм спектров белков перекрестноопыляемых злаков и проблемы сортовой идентификации по белкам семян подробно рассмотрены для ржи [4] и злаковых трав [5]. Многокомпонентные высокополиморфные спектры проламинов ежи, овсяницы и плевела авторы разделяли на зоны, которые анализировали отдельно. Гардинер [6] успешно применила SDS электрофорез для идентификации 20 сортов и форм красного клевера. Она использовала суммарные белковые спектры из муки более 200 семян.

Мы поставили задачу найти в многокомпонентном электрофоретическом полипептидном спектре семян перекрестноопыляемых бобовых культур зону, пер-

спективную для различения сортов — достаточно гетерогенную, чтобы иметь информацию для анализа и вместе с тем с ограниченным числом компонентов, чтобы анализ был достаточно прост. В качестве объекта исследования был выбран козлятник восточный.

Козлятник восточный (*Galega orientalis* Lam.) — многолетнее, травянистое, перекрестноопыляемое растение семейства бобовых — эндемик Кавказа, который используется местным населением для сенокосов и пастбищ [7]. Культура, характеризуется высокой урожайностью, зимостойкостью, скороспелостью и стабильной семенной продуктивностью, что сочетается с ее высокой питательностью [8]. Для северо-западного региона, в частности для молочного животноводства Ленинградской области, перспективны бобово-злаковые травостой с клевером луговым и козлятником восточным, позволяющие получать высокобелковые корма [9].

Методы исследования

Материалом для исследования послужили семена четырех сортов козлятника восточного. Образцы получены из коллекции ВИР.

Сорт Гале выведен массовым отбором из дикорастущего образца с Северного Кавказа [10]; создан в Эстонском НИИ земледелия и мелиорации, райониро-

ван в 1988 г. Этот сорт был широко распространен в Черноземной зоне России в конце XX в.

Сорт Ялгинский получен Мордовским НИИ сельского хозяйства; выведен методом массового отбора из образца, полученного из ВНИИ кормов [11]; включен в Госреестр по Российской Федерации в 1994 г. [12].

Сорт Надежда создан отбором из дикорастущей популяции [13]; оригинатор — ЗАО НПФ «Российские Семена»; включен в Госреестр по Российской Федерации в 1998 г. [12].

Сорт Тюменский создан многократным массовым отбором из дикорастущей популяции неизвестного происхождения [14]; оригинатор — НИИСХ Северного Зауралья; включен в Госреестр по Российской Федерации в 2001 г. [12].

Для выделения белков отдельные семена размалывали, из муки брали навески по 5 мг, которые заливали 140 мкл электродного буфера (трис-глициновый, pH 8,3) и настаивали в течение 1 ч. Электрофорез проводили в 12,5 % ПААГ в диссоциирующей системе с меркаптоэтанолом по Лаемли [15]. Процедура электрофореза и обработки гелевых пластин подробно описана для белков семян гороха [16], эту методику мы успешно применяем для анализа семян люпина [17] и других двудольных культур.

Результаты и обсуждение

Белки семян козлятника восточного, разделенные электрофорезом по Лаемли, подобно белкам других двудольных, представлены многокомпонентным спектром, в котором полипептиды расположены от катода

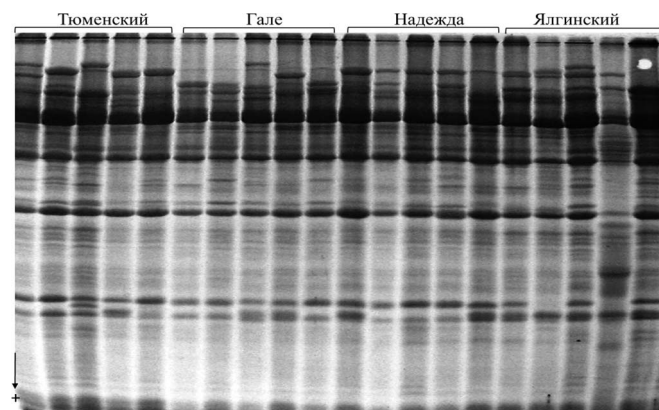


Рис. 1. Электрофореграммы водосолеизвлекаемых белков из отдельных семян четырех сортов козлятника восточного

к аноду с увеличением молекулярных масс (рис. 1). В каждой зоне спектра обнаруживается большое разнообразие состава полипептидов, варьирующих по положению в спектре и интенсивности, что характерно для перекрестноопыляемых растений. Регистрировать и анализировать такое разнообразие является трудной задачей. Наше внимание привлекла компактная зона полипептидов в нижней трети спектра, которая содержала небольшое число четко дифференцированных компонентов.

На рис. 2 представлены электрофореграммы отдельных семян козлятника восточного, полученные в присутствии и отсутствии меркаптоэтанолола. Наиболее интенсивные компоненты спектра принадлежат запасным глобулинам. Как правило, семена двудольных растений содержат два запасных белка, называемые по размеру молекул 7S и 11S глобулинами. Эти белки различаются по четвертичному строению: 7S глобулины не содержат дисульфидных связей, 11S глобулины состоят из кислых (около 40 кДа) и основных полипептидов (около 20 кДа), которые связаны дисульфидными связями. В присутствии меркаптоэтанолола эти связи разрываются, и 11S запасной белок оказывается представленным двумя группами полипептидов в соответствующих частях спектра [17]. Выбранная нами для анализа зона является зоной основных полипептидов 11S глобулина (на рис. 2 отмечена фигурной скобкой). Для сравнительного исследования этой зоны позиции компо-

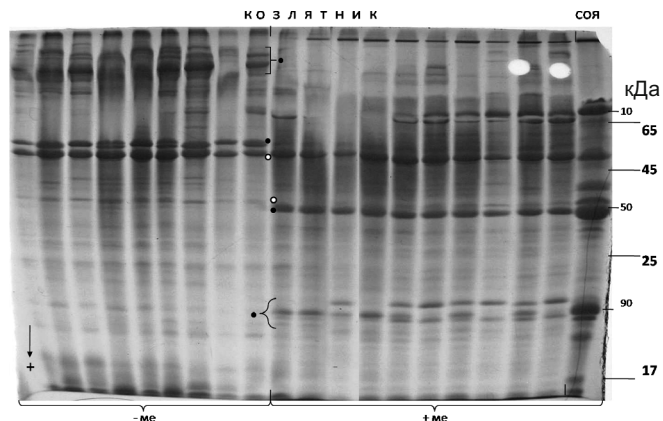


Рис. 2. Электрофореграммы белков семян козлятника восточного: — полипептиды 11S глобулинов; — полипептиды 7S глобулинов; 10, 50, 90 — позиции по «соевой шкале» [17]; 65, 45, 25 и 17 кДа — позиции полипептидного спектра, соответствующие молекулярным массам. Спектры получены в присутствии (+ ме) и отсутствии (- ме) меркаптоэтанолола

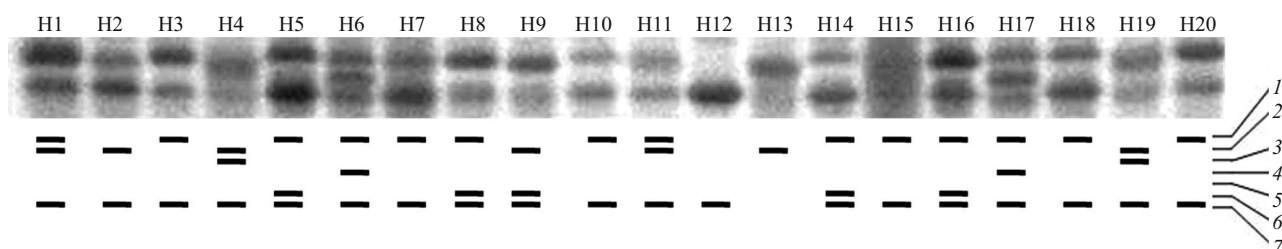


Рис. 3. Регистрация основных полипептидов 20 семян сорта Надежда: 1 — 7 — позиции полипептидов

Таблица 1. Регистрация основных полипептидов 20 семян козлятника восточного сорта Надежда (Н1 – Н20)

| Полипептидная позиция* | Н1 | Н2 | Н3 | Н4 | Н5 | Н6 | Н7 | Н8 | Н9 | Н10 | Н11 | Н12 | Н13 | Н14 | Н15 | Н16 | Н17 | Н18 | Н19 | Н20 |
|------------------------|-----|----|----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1 | 1 | | 1 | | 1 | 1 | 1 | 1 | | 1 | 1 | | | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | 1 |
| 2 | 1 | 1 | | 1 | | | | | 1 | | 1 | | 1 | | | | | | | 1 |
| 3 | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 4 | | | | | | 1 | | | | | | | | | | | 1 | | | |
| 5 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | | | | | 1 | | | 1 | 1 | | | | | 1 | | 1 | | | | |
| 7 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Тип спектра | 127 | 27 | 17 | 237 | 167 | 147 | 17 | 167 | 267 | 17 | 127 | 7 | 2 | 167 | 17 | 167 | 147 | 17 | 237 | 17 |

Здесь и в табл. 2: * — присутствие полипептида в данной позиции обозначено единицей внутри таблицы.

Таблица 2. Частота встречаемости компонентов и типов спектров основных полипептидов у четырех сортов козлятника восточного

| № | Компонент | | | | | | | Тип спектра | Частота встречаемости типов спектров в сортах, % | | | | | | | | | | | |
|-----------|--------------------------------------|----|---|---|----|----|----|-------------|--|------|---------|-----------|--|--|--|--|--|--|--|--|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | | Тюменский | Гале | Надежда | Ялгинский | | | | | | | | |
| 1 | 1 | | | | | | | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | | | | | | | | |
| 2 | 1 | 1 | | | | | | 12 | 0 | 0 | 0 | 1 | | | | | | | | |
| 3 | 1 | 1 | | | | | 1 | 126 | 3 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | | |
| 4 | 1 | 1 | | | | | 1 | 1267 | 1 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | | |
| 5 | 1 | 1 | | | | | | 127 | 3 | 5 | 7 | 0 | | | | | | | | |
| 6 | 1 | | | 1 | | | | 14 | 1 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | | |
| 7 | 1 | | | 1 | | | | 147 | 4 | 3 | 5 | 0 | | | | | | | | |
| 8 | 1 | | | | 1 | 1 | | 156 | 4 | 4 | 2 | 1 | | | | | | | | |
| 9 | 1 | | | | 1 | | | 157 | 2 | 6 | 2 | 8 | | | | | | | | |
| 10 | 1 | | | | | 1 | | 16 | 7 | 1 | 5 | 2 | | | | | | | | |
| 11 | 1 | | | | | 1 | 1 | 167 | 25 | 31 | 8 | 31 | | | | | | | | |
| 12 | 1 | | | | | | | 17 | 30 | 25 | 27 | 13 | | | | | | | | |
| 13 | | 1 | | | | | | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | | | | | | | | |
| 14 | | 1 | 1 | | | | 1 | 237 | 1 | 2 | 2 | 0 | | | | | | | | |
| 15 | | 1 | | | 1 | 1 | | 256 | 0 | 0 | 3 | 0 | | | | | | | | |
| 16 | | 1 | | | 1 | | 1 | 257 | 0 | 0 | 2 | 3 | | | | | | | | |
| 17 | | 1 | | | | | 1 | 26 | 0 | 2 | 3 | 2 | | | | | | | | |
| 18 | | 1 | | | | | 1 | 267 | 4 | 6 | 2 | 12 | | | | | | | | |
| 19 | | 1 | | | | | | 27 | 9 | 4 | 23 | 2 | | | | | | | | |
| 20 | | | 1 | | 1 | | | 35 | 0 | 0 | 1 | 0 | | | | | | | | |
| 21 | | | 1 | | | 1 | | 36 | 0 | 1 | 0 | 0 | | | | | | | | |
| 22 | | | 1 | | | 1 | 1 | 367 | 0 | 1 | 0 | 0 | | | | | | | | |
| 23 | | | 1 | | | | 1 | 37 | 0 | 0 | 1 | 0 | | | | | | | | |
| 24 | | | | | 1 | 1 | | 56 | 0 | 0 | 1 | 1 | | | | | | | | |
| 25 | | | | | 1 | | 1 | 57 | 1 | 0 | 2 | 0 | | | | | | | | |
| 26 | | | | | | 1 | | 6 | 0 | 2 | 0 | 0 | | | | | | | | |
| 27 | | | | | | 1 | 1 | 67 | 3 | 5 | 0 | 24 | | | | | | | | |
| 28 | | | | | | | 1 | 7 | 2 | 1 | 3 | 0 | | | | | | | | |
| | Частота встречаемости компонентов, % | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Тюменский | 80 | 21 | 1 | 5 | 7 | 47 | 85 | | | | | | | | | | | | | |
| Гале | 76 | 19 | 4 | 3 | 10 | 53 | 89 | | | | | | | | | | | | | |
| Надежда | 57 | 43 | 4 | 5 | 13 | 24 | 84 | | | | | | | | | | | | | |
| Ялгинский | 56 | 20 | 0 | 0 | 13 | 73 | 93 | | | | | | | | | | | | | |

Проанализировано по 100 семян каждого сорта; подчеркнуты показатели, выделяющие сорт из общего ряда.

нентов в спектре фиксировали в виде схемы, и эти данные заносили в таблицу, интенсивность белковых компонентов не учитывали.

На рис. 3 и в табл. 1 в качестве примера показана регистрация основных полипептидов 20 семян сорта Надежда. Зарегистрированы спектры основных поли-

Таблица 3. Значения критерия χ^2 при сравнении спектров основных полипептидов внутри сортов козлятника восточного

| Сорт | χ^2 | ν | χ_{05}^2 | χ_{01}^2 |
|-------------|----------|-------|---------------|---------------|
| Тюменский 1 | | | | |
| Тюменский 2 | 12,76 | 15 | 25,00 | 30,58 |
| Гале 1 | | | | |
| Гале 2 | 16,92 | 15 | 25,00 | 30,58 |
| Надежда 1 | | | | |
| Надежда 2 | 19,36 | 18 | 28,87 | 34,81 |
| Ялгинский 1 | | | | |
| Ялгинский 2 | 13,92 | 11 | 19,68 | 24,72 |

Исследованы две выборки (1, 2) по 50 семян; здесь и в табл. 5: χ^2 — значение критерия в эксперименте; χ_{05}^2 и χ_{01}^2 — значение критерия на 95 % -ном и 99 % -ном уровне значимости соответственно и данном показателе степени свободы (ν).

Таблица 4. Результаты сравнения спектров основных полипептидов внутри сортов козлятника восточного с помощью критерия χ^2

| Сорт | Тюменский 1 | Гале 1 | Надежда 1 | Ялгинский 1 |
|-------------|-------------|--------|-----------|-------------|
| Тюменский 2 | — | | | |
| Гале 2 | | — | | |
| Надежда 2 | | | — | |
| Ялгинский 2 | | | | — |

Исследованы две выборки (1, 2) по 50 семян; — — различия недостоверны.

пептидов каждого сорта (по 50 семян в двух выборках), определены семь позиций полипептидов в этой зоне спектра (рис. 3). Сорта различались по частоте встречаемости отдельных компонентов и их сочетаний (типы спектров). Позиций, специфических для отдельных сортов, не обнаружено.

Результаты регистрации всей выборки семян представлены в табл. 2. В данной совокупности семян встретилось 28 типов спектров зоны основных полипептидов. Из них у сорта Тюменского выявлено 16 типов, у сорта Гале — 17 типов, у сорта Надежды — 19 типов, у сорта Ялгинского — 12 типов спектров. В этом ряду сорт Ялгинский оказался более чем другие выровненный по этому признаку. Определена частота встречаемости (%) типов спектров для каждого сорта. В табл. 2 подчеркнуты показатели, выделяющие сорт в ряду других. У сортов Тюменский и Надежда таких показателей три, у сорта Ялгинский — шесть, у сорта Гале ни один показатель не выделялся из общего ряда. Таким образом, в исследованной выборке семян по электрофоретической подвижности основных полипептидов сорт Гале — самый типичный, а сорт Ялгинский — самый оригинальный из представленных сортов. Из подчеркнутых показателей частоты встречаемости типов спектров наиболее значимым нам представляется значительное преобладание спектра 67 у сорта Ялгинский. При визуальном обзоре самих

Таблица 5. Значения критерия при попарном сравнении спектров основных полипептидов четырех сортов (по 100 семян) козлятника восточного

| Сорт | χ^2 | ν | χ_{05}^2 | χ_{01}^2 |
|-----------|----------|-------|---------------|---------------|
| Тюменский | | | | |
| Гале | 24,64 | 20 | 32,41 | 37,57 |
| Надежда | 39,28 | 22 | 33,92 | 40,29 |
| Ялгинский | 63,28 | 19 | 30,14 | 36,19 |
| Гале | | | | |
| Надежда | 57,36 | 23 | 35,17 | 41,64 |
| Ялгинский | 42,32 | 19 | 30,14 | 36,19 |
| Надежда | | | | |
| Ялгинский | 98,84 | 20 | 32,41 | 37,57 |

Таблица 6. Результаты сравнения спектров основных полипептидов четырех сортов (по 100 семян) козлятника восточного с помощью критерия χ^2

| Сорт | Тюменский | Гале | Надежда |
|-----------|-----------|------|---------|
| Гале | — | | |
| Надежда | + | + | |
| Ялгинский | ++ | ++ | ++ |

Различия достоверны: ++ — на 99 %-ном уровне значимости; + — на 95 %-ном уровне значимости; — — различия недостоверны.

спектров это представлялось как наличие у многих семян сорта Ялгинский мощной белковой зоны в нижней части спектра при отсутствии компонентов в других частях спектра. Внизу табл. 2 даны показатели встречаемости отдельных полипептидов для каждого сорта. Здесь обращает на себя внимание показатель компонента 2, встречающийся у сорта Надежда почти в два раза чаще, чем у других сортов.

Чтобы установить степень различия между сортами и возможности сортовой идентификации по спектру основных полипептидов, полученные данные обрабатывали с помощью критерия χ^2 [18]:

$$\chi^2 = 4 \sum \frac{f_1^2}{S} - N,$$

где f_1 и f_2 — число семян с данным типом спектра в сортах 1 и 2 соответственно; S — общее число семян с данным типом спектра в обоих сортах; N — общее число исследованных семян обоих сортов; χ_{01}^2 и χ_{05}^2 — стандартное значение при уровне значимости достоверности различий 99 % (χ_{01}^2) и 95 % (χ_{05}^2); значения χ_{01}^2 и χ_{05}^2 определяются как табличные данные для определенного числа степеней свободы (ν); ν — общее количество типов спектров в сортах 1 и 2 минус единица. Различия достоверны при $\chi^2 > \chi_{01}^2$. Различия недостоверны при $\chi^2 \leq \chi_{05}^2$. При значениях $\chi_{05}^2 > \chi^2 > \chi_{01}^2$ различия достоверны на 95 %-ном уровне значимости.

Таблица 7. Определение различий по частоте встречаемости для спектров основных полипептидов, выделивших сорта козлятника восточного, с помощью критерия U

| Сорт | Ялгинский** | | | | | | Надежда** | | | | Тюменский** | | | |
|-----------|---------------|-----|------|--------------|------|------|---------------|-----|--------------|------|---------------|-----|--------------|------|
| | ЧВ спектра, % | | | Критерий U | | | ЧВ спектра, % | | Критерий U | | ЧВ спектра, % | | Критерий U | |
| | 127* | 17* | 267* | 127* | 17* | 267* | 167* | 27* | 167* | 27* | 126* | 26* | 126* | 26* |
| Тюменский | 3 | 30 | 4 | 1,24 | 2,64 | 1,90 | 25 | 9 | 3,14 | 2,55 | 3 | 0 | — | — |
| Гале | 5 | 25 | 6 | 2,02 | 2,01 | 1,24 | 31 | 4 | 4,09 | 4,14 | 0 | 2 | 1,24 | 0,73 |
| Надежда | 7 | 27 | 2 | 2,64 | 2,33 | 2,64 | 8 | 23 | — | — | 0 | 3 | 1,24 | 1,24 |
| Ялгинский | 0 | 13 | 12 | — | — | — | 31 | 2 | 4,09 | 4,74 | 0 | 2 | 1,24 | 0,73 |

* Тип спектра с частотой встречаемости (ЧВ), выделившей сорт (**), среди других сортов козлятника восточного.

Таблица 8. Результаты сравнения спектров (*) основных полипептидов, выделивших сорта (**) козлятника восточного, с помощью критерия U

| Сорт | Тюменский** | | Надежда** | | Ялгинский** | | |
|-----------|-------------|-----|-----------|-----|-------------|-----|------|
| | 126* | 26* | 167* | 27* | 127* | 17* | 267* |
| Тюменский | | | ++ | + | — | ++ | — |
| Гале | — | — | +++ | +++ | + | + | — |
| Надежда | — | — | | | ++ | + | ++ |
| Ялгинский | — | — | +++ | +++ | | | |

Здесь и в табл. 10: различия значимы на уровне 95 % (+), если $U > 1,96$; на уровне 99 % (++) , если $U > 2,58$; на уровне 99,9 % (+++) , если $U > 3,29$; различия незначимы (—), если $U < 1,96$.

Таблица 9. Определение различий по частоте встречаемости для полипептидов, выделивших сорта козлятника восточного, с помощью критерия U

| Сорт | Частота встречаемости полипептида, % | | Критерий U | |
|-----------|--------------------------------------|----|--------------|-------------|
| | 2* | 6* | Надежда** | Ялгинский** |
| Тюменский | 21 | 47 | 3,22 | 3,65 |
| Гале | 19 | 53 | 3,59 | 2,81 |
| Надежда | 43 | 24 | — | 7,08 |
| Ялгинский | 20 | 73 | 3,39 | — |

* Полипептид (пп) с частотой встречаемости (ЧВ), выделившей сорт (**) среди других сортов козлятника восточного.

С помощью критерия χ^2 мы провели анализ для двух выборок по 50 семян внутри каждого сорта. Данные табл. 3 и 4 показывают, что выборки из 50 семян внутри сорта по критерию χ^2 достоверно не различаются.

Далее с помощью критерия χ^2 мы провели попарное сравнение спектров основных полипептидов для всех представленных сортов. Данные табл. 5 и 6 свидетельствуют о том, что сорт Ялгинский среди исследованных сортов с высокой степенью достоверности может быть идентифицирован по спектрам основных полипептидов при анализе 100 семян. Сорта Надежда и Гале в этом опыте также достоверно различались, но на более низком уровне оценки значимости. Сорта Тюменский и Гале не различались.

Далее мы проанализировали данные табл. 2, а именно определили достоверность различий частоты встречаемости компонентов и типов спектров, выделившихся при визуальной оценке таблицы, с помощью

Таблица 10. Результаты сравнения полипептидов (*), выделивших сорта (**) козлятника восточного, с помощью критерия U

| Сорт | Надежда** 2* | Ялгинский** 6* |
|-----------|-----------------|-------------------|
| Тюменский | ++ | +++ |
| Гале | +++ | ++ |
| Надежда | | +++ |
| Ялгинский | +++ | |

критерия U [19]. Анализировали с помощью этого критерия по формулам

$$p_1 = \frac{x_1 + 0,5}{n_1}; p_1 = p_1 \cdot 100 \%;$$

$$p_2 = \frac{x_2 - 0,5}{n_2}; p_2 = p_2 \cdot 100 \%,$$

где x_1 и x_2 — частоты встречаемости спектров или компонентов сравниваемых сортов 1 и 2, причем $p_1 < p_2$; n_1 и n_2 — число проанализированных семян в сортах 1 и 2.

Из таблицы «значения $2 \arcsin \sqrt{P_y}$ » определены величины Ψ_1 и Ψ_2 и рассчитан показатель U :

$$U = (\Psi_1 - \Psi_2).$$

Значимость различий рассмотрена на трех уровнях: 95, 99 и 99,9 % (табл. 7 – 10).

Как видно из данных табл. 7 и 8, в представленных выборках семян типы спектров 126 и 26 не позволили достоверно отличить сорт Тюменский от сортов Гале, Надежда, Ялгинский. Спектры 167 и 27 на высшем уровне значимости (99,9 %) отличали сорт Надежда от

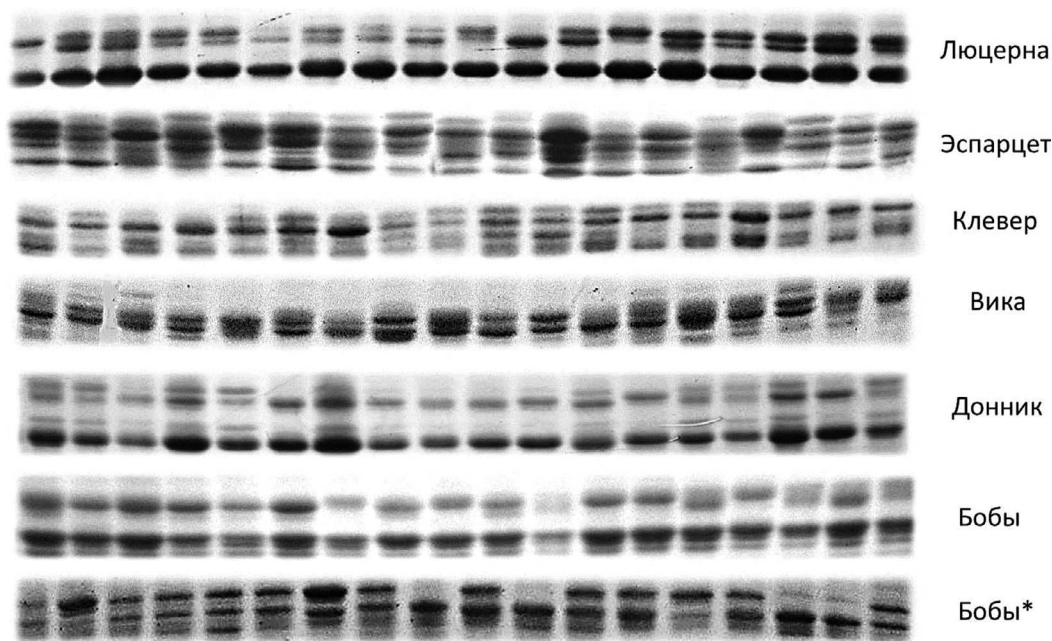


Рис. 4. Электрофореграммы основных полипептидов (бобы* — кислых) перекрестноопыляемых бобовых. Используются семена *Medicago sativa* L. — К-37255, *Onobrychis arenaria* DC. — сорт Султан, *Trifolium pratense* L. — сорт Командор, *V. villosa* Roth. — сорт Степная, *Melilotus albus* Medik. — сорт Донецкий односемянный, *Faba bona* Lindl. — к-1880

сортов Гале и Ялгинский и на более низком уровне (99 и 95 %) от сорта Тюменский. Спектр 127 не позволял различить сорта Ялгинский и Надежда. Он с достоверностью 95 % различал сорта Ялгинский и Гале и с высокой степенью достоверности (99 %) — сорта Ялгинский и Надежда. Спектр 17 достоверно отличал Ялгинский от всех сортов, причем с высокой достоверностью (99 %) от сорта Тюменский. Сочетание полипептидов 267 позволяло достоверно (99 %) различать сорта Ялгинский и Надежда, но не отличало сорт Ялгинский от сортов Тюменский и Гале.

Таким образом, в исследованных выборках семян сочетание полипептидов 167 и 27 с высокой степенью достоверности позволило идентифицировать сорт Надежда среди остальных сортов. Сорт Ялгинский по частоте встречаемости основных полипептидов в сочетаниях 127, 17, 267 с большей или меньшей вероятностью идентифицировался в ряду представленных сортов. Причем все перечисленные типы спектров наиболее четко различали сорта Ялгинский и Надежда. Анализ частот встречаемости типов спектров 26 и 126, по которым был выделен сорт Тюменский, не выявил достоверных различий в сравнениях с другими сортами. Сорт Гале, как было сказано выше, не имел показателей частот встречаемости выделявших его среди других сортов.

Анализ с помощью критерия *U* провели также для полипептидов 2 и 6, выделявших соответственно сорт Надежда и сорт Ялгинский. Как видно из данных табл. 9 и 10, эти полипептиды с высокой степенью достоверности (99 и 99,9 %) позволили в данной выборке семян отличать сорт Надежда по компоненту 2 и сорт Ялгинский по компоненту 6 от всех других.

Из всего представленного выше следует, что сорта Надежда и Ялгинский по составу основных полипепти-

дов достоверно различаются между собой и отличаются от сортов Тюменский и Гале. Сорт Гале не имел в рассматриваемой белковой части спектра признаков, выделивших его в данной группе сортов. Этот сорт имеет самое раннее происхождение и широко распространен. Очевидно, он имеет устойчивую генетическую структуру популяции и его полезные свойства были использованы в селекции других сортов. По составу основных полипептидов сорта Гале и Тюменский оказались очень близкими. Поскольку сорт Тюменский создан отбором из дикорастущей популяции неизвестного происхождения, возможно, и сорт Тюменский связан своим происхождением с сортом Гале.

На рис. 4 представлены электрофореграммы основных полипептидов некоторых перекрестноопыляемых бобовых культур: люцерна посевная, эскарпет песчаный, клевер луговой, донник белый, бобы конские. Как видно, все спектры основных полипептидов бобовых имеют схожую структуру, т.е. имеют ограниченное число позиций, удобное для анализа, и в то же время достаточно гетерогенны, чтобы дать информацию, необходимую для различения сортов. Несомненно, каждая культура, группа сортов или отдельный сорт требует индивидуального подхода. Помимо зоны основных полипептидов могут рассматриваться другие части спектров. Так, в нижней части рис. 4 показана зона кислых полипептидов для конских бобов, дающих сходную картину variability.

Заключение

Таким образом, показано, что зона основных полипептидов — перспективный объект для разработки метода идентификации сортов козлятника восточного с помощью SDS электрофореза. Мы считаем, что метод

следует апробировать и для других перекрестно опыляемых бобовых культур.

Автор выражает искреннюю благодарность проф. И. П. Гаврилюк за организационную помощь, Т. П. Липовицкой за предоставленный семенной материал, Т. И. Пеневой за помощь в математической обработке результатов исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Конарев В. Г.* Белки растений как генетические маркеры. — М.: Колос, 1983. С. 125 – 177.
2. *Cooke R. J.* The standardizations of electrophoresis methods for variety identification / Biochemical identification of varieties: Mater. of III Int. Symp. ISTA. USSR, Leningrad, 1987. — Leningrad: VIR, 1988. P. 14 – 27.
3. Рекомендации по использованию белковых маркеров в сортоиспытании, семеноводстве и семенном контроле / Под ред. В. Г. Конарева. — М.-Л.: Госагропром СССР, ВИР, 1989. С. 3 – 20.
4. *Пенева Т. И., Мартыненко Н. М.* / Идентификация сортов и регистрация генофонда культурных растений по белкам семян. Под ред. акад. РАСХН В. Г. Конарева. — СПб.: ВИР, 2000. С. 38 – 47.
5. *Конарев А. В., Введенская И. О., Насонова Е. А., Перчук И. Н.* Идентификация и регистрация сортов ежи, овсяницы и плевела по проламинам / Идентификация сортов и регистрация генофонда культурных растений по белкам семян. Под ред. акад. РАСХН В. Г. Конарева. — СПб.: ВИР, 2000. С. 60 – 68.
6. *Gardiner S. E., Forde M. B.* / Biochemical Identification of Varieties. — Л.: ВИР, 1988. С. 65 – 73.
7. *Савенкова И. В.* / Сельск., лес. и вод. хоз-во. 2012. № 10. URL: <http://agro.snauka.ru/2012/10/16>.
8. *Абдушаева Я. М., Ильин В. Н., Демидова О. О., Митясова Н. А.* / Фундам. исслед. 2006. № 2. С. 14 – 16.
9. *Никулин А. Б.* / Изв. СПб. гос. агр. унив. 2008. № 7. С. 38 – 39.
10. *Докукин Ю. В.* / <http://beejournal.ru/medonosnaya-baza-i-opylenie/515>.
11. <http://semena58.ru/index.php/kozlyatnik-vostochnyj/yalginskij>.
12. Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. — М., 2012. С. 49 – 50.
13. <http://www.greatbiology.ru/doi-217-1.html>
14. <http://www.ideasandmoney.ru/Ppt/Details/297824>
15. *Laemmli U. K.* / *Natura*. 1970. V. 227. No. 4. P. 680.
16. *Тарлаковская А. М. и др.* / Идентификация сортов и регистрация генофонда культурных растений по белкам семян. Под ред. акад. РАСХН В. Г. Конарева. — СПб., 2000. С. 98 – 110.
17. *Егги Э. Э.* Идентификация сортов люпина узколистного (*Lupinus angustifolius* L.) с использованием электрофоретического спектра полипептидов белков семян (метод. указания). — СПб.: ГНУ ВИР Россельхозакадемии, 2013. С. 3 – 20.
18. *Плохинский Н. А., Маркелова И. О.* / Методы современной биометрии. — М., 1978. С. 188 – 193.
19. *Урбах В. Ю.* / Биометрические методы. — М., 1964. С. 166 – 167.

Егги Э. Э., канд. биол. наук

Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия
zininaanna@yandex.ru

REFERENCES

1. *Konarev V. G.* Belki rastenii kak geneticheskie markery [Protein of plants as genetic markers]. — Moscow: Kolos, 1983. P. 125 – 177 [in Russian].
2. *Cooke R. J.* The standardizations of electrophoresis methods for variety identification / Biochemical identification of varieties: Mater. of III Int. Symp. ISTA. USSR, Leningrad, 1987. — Leningrad: VIR, 1988. P. 14 – 27.
3. *Konarev V. G.* (ed.). Rekomendatsii po ispol'zovaniyu belkovykh markerov v sortoispytanii, semenovodstve i semennom kontrole [Recommendations for the use of protein markers in variety testing, seed production and seed control]. — Moscow – Leningrad: Izd. Gosagroprom SSSR, VIR, 1989. P. 3 – 20 [in Russian].
4. *Peneva T. I., Martynenko N. M.* / *Konarev V. G.* (ed.). Identifikatsiya sortov i registratsiya genofonda kul'turnykh rastenii po belkam semyan [Identification of varieties and registration of the gene pool of cultivated plants for seed proteins]. — St. Petersburg: Izd. VIR, 2000. P. 38 – 47 [in Russian].
5. *Konarev A. V., Vvedenskaya I. O., Nasonova E. A., Perchuk I. N.* Identifikatsiya i registratsiya sortov ezhi, ovsyaniitsy i plevela po prolaminam / *Konarev V. G.* (ed.). Identifikatsiya sortov i registratsiya genofonda kul'turnykh rastenii po belkam semyan [Identification of varieties and registration of the gene pool of cultivated plants for seed proteins]. — St. Petersburg: Izd. VIR, 2000. P. 60 – 68 [in Russian].
6. *Gardiner S. E., Forde M. B.* / Biochemical Identification of Varieties. — Leningrad: Izd. VIR, 1988. P. 65 – 73.
7. *Savenkova I. V.* / Sel'sk., les. i vod. khoz-vo. 2012. No. 10. URL: <http://agro.snauka.ru/2012/10/16> [in Russian].
8. *Abdushaeva Ya. M., Il'in V. N., Demidova O. O., Mityasova N. A.* / *Fundam. issled.* 2006. No. 2. P. 14 – 16 [in Russian].
9. *Nikulin A. B.* / *Izv. SPb. Gos. Agr. Univ.* 2008. No. 7. P. 38 – 39 [in Russian].
10. *Dokukin Yu. V.* / <http://beejournal.ru/medonosnaya-baza-i-opylenie/515> [in Russian].
11. <http://semena58.ru/index.php/kozlyatnik-vostochnyj/yalginskij>.
12. Gosudarstvennyi reestr selektsionnykh dostizhenii, dopushchenykh k ispol'zovaniyu [State register of breeding achievements permitted for use]. — Moscow, 2012. P. 49 – 50 [in Russian].
13. <http://www.greatbiology.ru/doi-217-1.html> [in Russian].
14. <http://www.ideasandmoney.ru/Ppt/Details/2978249> [in Russian].
15. *Laemmli U. K.* / *Natura*. 1970. V. 227. No. 4. P. 680.
16. *Tarlakovskaya A. M. et al.* / *Konarev V. G.* (ed.). Identifikatsiya sortov i registratsiya genofonda kul'turnykh rastenii po belkam semyan [Identification of varieties and registration of the gene pool of cultivated plants for seed proteins]. — St. Petersburg: Izd. VIR, 2000. P. 98 – 1109 [in Russian].
17. *Eggi É. É.* Identifikatsiya sortov lyupina uzkolistnogo (*Lupinus angustifolius* L.) s ispol'zovaniem élektroforeticheskogo spektra polipeptidov belkov semyan (metod. ukazaniya) [Identification of the varieties of blue lupine (*Lupinus angustifolius* L.) using electrophoretic spectrum of seed proteins polypeptides (guidelines)]. — St. Petersburg: Izd. VIR, 2013. P. 3 – 209. [in Russian].
18. *Plokhinskii N. A., Markelova I. O.* / *Metody sovremennoi biometrii* [Methods of contemporary biometrics]. — Moscow, 1978. P. 188 – 1939 [in Russian].
19. *Urbakh V. Yu.* / *Biometricheskie metody* [Biometric methods]. — Moscow, 1964. P. 166 – 1679 [in Russian].

Поступила 20.08.2015