

К.М.Булатова, Р.С.Масоничич-Шотунова, Г.Т.Мейирман, Ш.Мазкират, Р.Ж.Сапарбаев

ТОО «Казахский НИИ земледелия и растениеводства», п. Алмалыбак, Алматинская обл.
(E-mail: bulatova_k@rambler.ru)

Разнообразие сортов и коллекционных образцов эспарцета по спектрам белков

Авторами проведен электрофорез запасных белков семян сортовой популяции эспарцета *Onobrychis viciifolia* (Алма-Атинский 2), коллекционных образцов эспарцета песчаного *Onobrychis arenaria* и закавказского *Onobrychis transcaucasica*. Установлено значительное разнообразие популяций по числу, подвижности и интенсивности компонентов. Высокая гетерогенность сорта Алма-Атинский 2 объясняется изначальной неоднородностью при передаче на сортоиспытание и длительностью возделывания в регионе. Отмечено, что белковые характеристики могут быть полезны как для генетических исследований культуры, так и для использования в качестве маркеров в селекции и семеноводстве сортов.

Ключевые слова: эспарцет, белки семян, электрофорез, разнообразие.

Эспарцет (*Onobrychis Mill.*) является ценной кормовой культурой, насчитывающей более 130 видов, распространенных во многих частях света, включая западную Азию, Европу, западную часть США и Канаду [1, 2].

В странах СНГ эспарцет представлен 62 видами, в культуре широко используются три: виколистный (посевной, европейский, обыкновенный) — *Onobrychis viciifolia* Scop., введенный в культуру около 500 лет назад, песчаный — *Onobrychis arenaria* Kit. D. C., впервые введенный в культуру на Украине в начале XX в., и закавказский (переднеазиатский) — *Onobrychis transcaucasica (antasiatica)* Khin. — самый древний вид эспарцета, имеющий более чем тысячелетнюю историю возделывания в Закавказье [3].

В отличие от других видов трав эспарцет менее требователен к почвам и при наличии влаги в ней дает высокие урожаи даже на самых бедных почвах. Культура отличается высокой зимостойкостью, засухоустойчивостью, отзывчивостью на увлажнение, высокой пластичностью и большой кормовой ценностью [4].

Зеленая масса эспарцета является хорошим в питательном отношении сырьем для сенажа и силоса. Так, в среднем в 100 кг зеленой массы эспарцета содержится 21,7 кормовые единицы и 3,1 кг перевариваемого протеина, в 100 кг сена — 54 кормовые единицы и 10,1 кг перевариваемого протеина, каротина — 2,5 г. В отличие от люцерны при скармливании в зеленом виде эспарцет не вызывает у животных тимпонита. По содержанию белка сено эспарцета уступает только сену люцерны и превосходит сено клевера. В сене эспарцета содержится большое количество кальция и минеральных солей, необходимых для нормального развития продуктивных животных, особенно молодняка [5].

Посевы эспарцета улучшают структуру почвы, обогащают почвы гумусом и азотом, предотвращают эрозию и деградацию почв, нормализуют водный режим агроэкосистем, расширяют биоразнообразие агроценоза, повышают устойчивость агроэкосистем к засухам и опустыниванию территории, укрепляют агроландшафты, улучшают экологическую обстановку и оздоравливают окружающую среду.

В Казахстане эспарцет введен в полевое кормопроизводство в 50-х годах прошлого столетия и в силу своих биологических особенностей получил значительное распространение как перспективная культура для повышения кормовой базы.

В связи с изложенным выше исследования, направленные на изучение генофонда культуры на уровне рода, вида и популяции, являются актуальными.

Белковые маркеры, в частности компоненты запасных белков, широко используются в оценке генетического разнообразия видов сельскохозяйственных растений и выявления внутрисортовой гетерогенности и полиморфности, однако данные о внутривидовой характеристике сортов вида *Onobrychis viciifolia* и других видов рода *Onobrychis Mill.* в литературе отсутствуют, сведения о межпопуляционном разнообразии незначительны.

Профиль запасных белков эспарцета анализировался для выявления межвидовой изменчивости и таксономических уточнений [6]. Авторами не выявлены четкие различия между 8 анализированными видами. На другом наборе образцов рода *Onobrychis Mill.*, включающем 10 видов, установлены ста-

бильные и переменные белковые зоны в электрофоретическом спектре, на чем обосновывается заключение о высоком уровне сходства между анализируемыми видами [7].

Целью наших исследований было изучение состава запасных белков семян сорта эспарцета Алма-Атинский 2 (*Onobrychis viciifolia*), допущенного в производство в Алматинской области с 1980 г., а также коллекционных образцов эспарцета песчаного и закавказского и оценка степени их генетического разнообразия.

Материалы и методы исследований

Объектом исследований являлись: сорт эспарцета Алма-Атинский 2 урожая 2013 г. и коллекционные номера (9 — эспарцета песчаного и 8 — эспарцета закавказского), список и происхождение которых приведены в таблице.

Т а б л и ц а

Коллекционные образцы эспарцета, изученные по спектру запасных белков семян

№	№ каталога	Происхождение
1	42305	Эспарцет песчаный, Кыргызстан, ур. 2010 г.
2	38747	Эспарцет песчаный, Казахстан, ур. 2002 г.
3	40817	Эспарцет песчаный, улучшенный, Казахстан, ур. 2002 г.
4	17012	Эспарцет песчаный, дикорастущий, Казахстан, ур. 2002 г.
5	29651	Эспарцет песчаный, Красноярский, ур. 2009 г.
6	28312	Эспарцет песчаный, Башкирия, ур. 2008 г.
7	109(29192)	Эспарцет песчаный, Гибридный, Украина, ур. 2008 г.
8	40824	Эспарцет песчаный, Донецкий-21, Украина, ур. 2008 г.
9	42304	Эспарцет песчаный, Сазоновский, Украина, ур. 2008 г.
10	40930	Эспарцет закавказский, Грузия-1, ур. 2005 г.
11	40929	Эспарцет закавказский, Натехтерский, Грузия, ур. 2005 г.
12	38626	Эспарцет закавказский, местный, Нагорный Карабах, ур. 2005 г.
13	41619	Эспарцет закавказский, местный, Армения, ур. 2005 г.
14	37208	Эспарцет закавказский, местный, Азербайджан, ур. 2005 г.
15	30618	Эспарцет закавказский, Baltasist, Венгрия, ур. 2010 г.
16	30093	Эспарцет закавказский, Азербайджан, ур. 2005 г.
17	37212	Эспарцет закавказский, Крымский-89, Украина, ур. 2008 г.

Для подготовки белковых проб семена эспарцета отделяли от околоплодника, подсушивали и, измельчив в ступке каждое семя, помещали в отдельные эппендорф-пробирки. Экстракцию белков вели 0,0618 М трис-НСI буферным раствором, содержащим 3 % ДДС Na, 10 % глицерина, 4 % меркаптоэтанола и краситель бромфеноловый синий.

Экстракцию проводили в течение двух часов на качалке при комнатной температуре. Экстракт алкилировали, прогревали в течение двух минут на кипящей водяной бане и наносили в объеме 14 мкл в карманы 10 %-ного полиакриламидного геля. Подготовка гелей и электрофорез проводились методом Laemmli (1970), в модификации К.М.Булатовой (1985) [8]. В качестве маркера молекулярных масс использовали набор Thermo scientific (Литва) (170 кДа, 130 кДа, 100 кДа, 70 кДа, 55 кДа, 40 кДа, 35 кДа, 25 кДа, 15 кДа, 10 кДа). Обработку полученных результатов проводили с помощью кластерного анализа методом Ward.

Результаты исследований и обсуждение

Анализ спектра запасных белков сорта эспарцета Алма-Атинский 2 на уровне единичных семян (рис. 1) показал его чрезвычайное разнообразие как по подвижности в геле, так и по интенсивности проявления компонентов.

В целом в спектре белков насчитывалось от 25 до 37 компонентов, с молекулярной массой от 10 до 115 кДа. Наименее варибельной была зона компонентов с молекулярной массой от 10 до 20 кДа, по зоне медленно-подвижных компонентов (75–115 кДа) у большинства семян наблюдалось сходство, но, тем не менее, у отдельных семян (№ 3, 5, 10, 11, 13) имелись отличия по числу и подвижности компонентов в геле. Наиболее гетерогенной и специфичной для каждого семени была зона компонентов с молекулярной массой от 25 до 70 кДа.

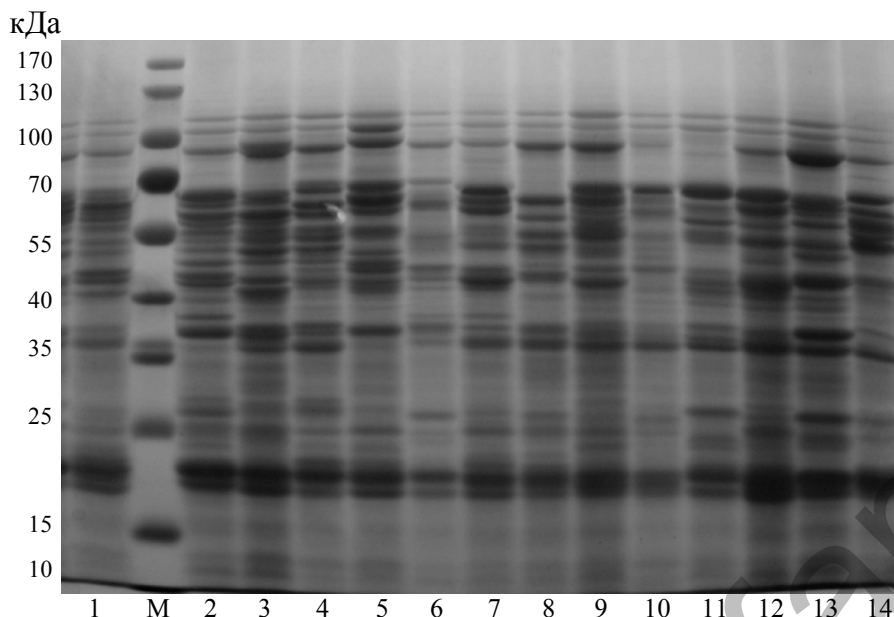


Рисунок 1. Спектр запасных белков единичных семян эспарцета Алма-Атинский 2

Известно значительное разнообразие видов эспарцета по морфологическим, анатомическим характеристикам, молекулярным маркерам [9]. Исследования изозимного состава фермента эстеразы также выявили высокий уровень межвидового разнообразия рода *Onobrychis Mill.* и генетического полиморфизма 3 популяций вида *Onobrychis viciifolia*, уникальность спектра изоформ для значительной части генотипов [10].

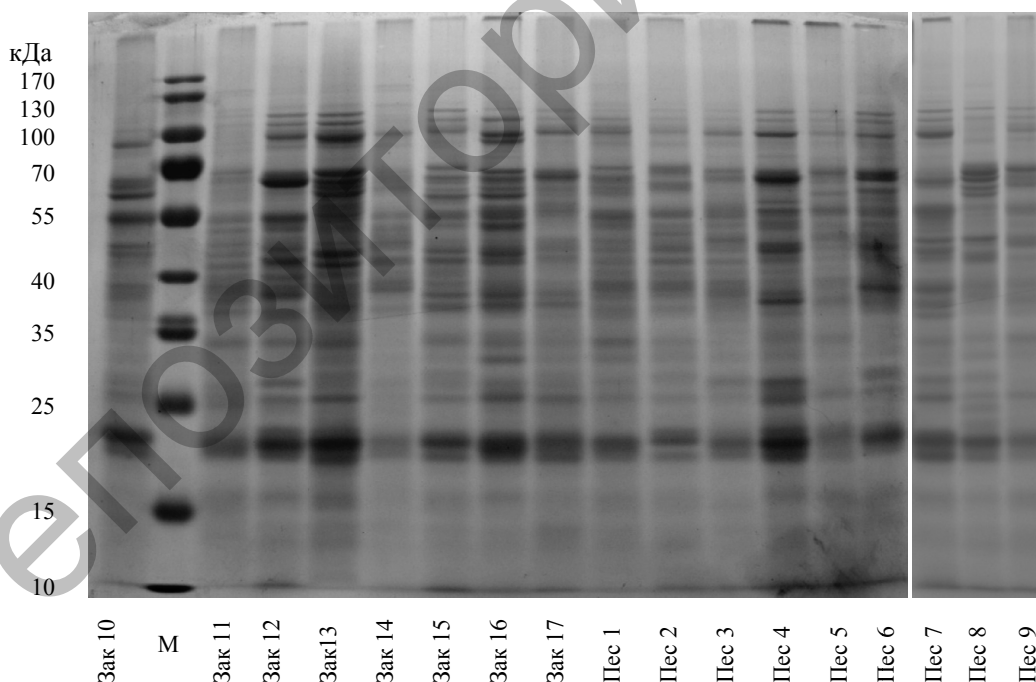


Рисунок 2. Спектр запасных белков единичных семян эспарцета закавказского и песчаного

Длительное возделывание сорта Алма-Атинский 2 могло отразиться на его внутривидовом разнообразии, однако уже в период его создания и передачи на Госсортоиспытание сорт состоял из растений, различающихся по целому комплексу морфобиологических и хозяйственно-ценных признаков. Растения эспарцета, входящие в состав популяции сорта, различались между собой по кормовой и семенной продуктивности, укусности, типу развития, темпам роста, дате наступления фенофаз, кустистости, облиственности, форме куста и розетки листьев, выживаемости и дру-

гим показателям и свойствам. Различие между растениями внутри популяции сорта Алма-Атинский 2 по основному показателю — продуктивности — достигало огромных размеров (превышение в 10–15 раз), а по содержанию протеина составляло 3,93 % [4].

На рисунке 2 приведен электрофоретический спектр 8-ми образцов эспарцета закавказского и 9-ти образцов эспарцета песчаного из географически отдаленных регионов. Внутривидовое разнообразие коллекционных образцов по составу запасных белков семян было также значительным.

Вместе с тем специфических, характерных только для конкретного вида эспарцета особенностей спектра нами не выявлено. Методом кластерного анализа данных компонентного состава запасных белков анализированные генотипы, идентифицированные по наличию–отсутствию определенных полос и их интенсивности в спектре, распределились на 3 основных кластера, включающих образцы как закавказского, так и песчаного видов соответственно (рис. 3).

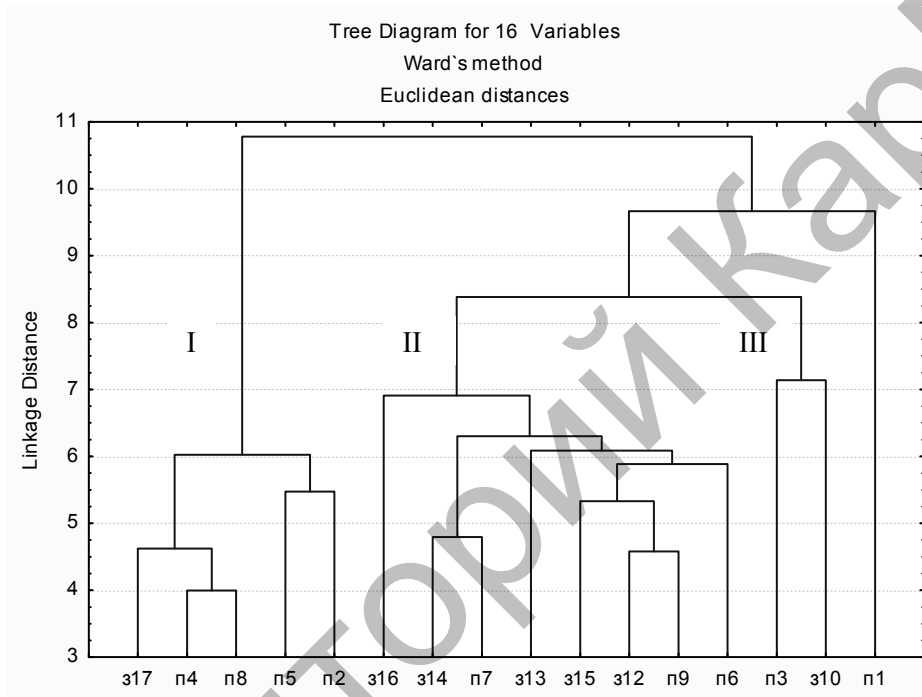
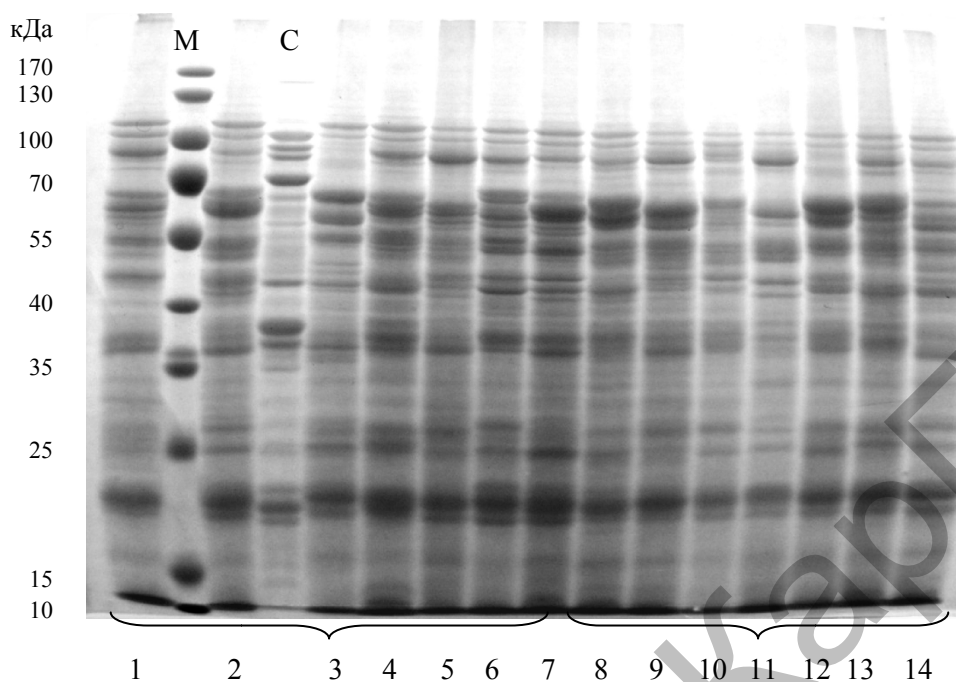


Рисунок 3. Дендрограмма распределения коллекционных образцов эспарцета по сходству-различию компонентного состава запасных белков семян

Ввиду того, что для анализа внутривидовой полиморфности коллекционных образцов эспарцета песчаного и закавказского использовались единичные семена, отдельные коллекционные номера (эспарцет закавказский, Натехтерский, Грузия и эспарцет песчаный, Донецкий-21, Украина) были оценены по составу белков на большем числе семян (рис. 4). На электрофореграмме, кроме маркера молекулярных масс (M), приведен для сравнения спектр глобулинов сои (C).

Высокий уровень разнообразия, выявленный нами в пределах сорта Алма-Атинский 2, коллекционных номерах, согласуется с результатами оценки генетической изменчивости различных популяций *Onobrychis viciifolia* RAPD маркерным анализом, который показал, что наибольшее разнообразие сосредоточено внутри популяции, нежели между ними [11, 12]. Авторы связывают высокий уровень межвидового и внутривидового полиморфизма эспарцета с перекрестным опылением вида, хотя не всегда вариабельность признаков в пределах вида и популяций связана с характером опыляемости растений. Так, люцерна (*Medicago sativa*) также является перекрестно-опыляемой культурой, в то же время меж- и внутрисортной полиморфизм по ДНК-маркерам и запасным белкам у нее незначителен [13–15]. Другой причиной высокой генетической вариабельности популяций могут являться стрессовые условия, при которых чаще всего произрастает эспарцет. Так, известны исследования, доказывающие, что популяции, испытывающие неблагоприятные природные условия, характеризуются высокой генетической вариабельностью [16–18].



1–7 — Эспарцет закавказский (Натехтерский, Грузия);
9–14 — Эспарцет песчаный (Донецкий-21, Украина)

Рисунок 4. Спектр запасных белков единичных семян эспарцета закавказского и песчаного

Следует отметить, что генетическое разнообразие, выявленное на основе морфофизиологических, анатомических, биохимических и других показателей растения, а также на уровне изоферментных и ДНК-маркеров, для которых задействованы вегетативные органы, характеризует состояние генома растений, реализующих на момент скрининга генетический потенциал, переданный через семенную фазу, тогда как внутривидовое и внутривидовое разнообразие, оцениваемое по спектру запасных белков семян, дает информацию о степени полиморфности и гетерозиготности будущих сортовых популяций.

Для решения качественно новых задач по селекции эспарцета необходимо учитывать огромное генетическое разнообразие видов и популяций по белковым и молекулярным маркерам, которое может быть связано с хозяйственно-ценными признаками растений, всесторонне и глубоко изучать биологические и хозяйственно-ценные признаки не только сортов и образцов, но и каждого растения, с использованием традиционных и современных, маркерных методов селекции.

Список литературы

- 1 Müller D.A., Hoveland C.S. Other temperate legumes // Barnes R.F., Miller D.A. and Nelson C.J. (eds) Forages. Vol. 1 An introduction to grassland agriculture, 5th edn, Ames., IA, USA: Iowa State University Press, 1995. — P. 273–281.
- 2 Frame J., Charlton J.F.L., Laidlaw A.S. Temperate forage legumes. — Wallington, UK: CAB International, 1998. — P. 279–287.
- 3 Люшинский В.В., Прижуков Ф.Б. Семеноводство многолетних трав. — М.: Колос, 1973. — С. 87–100.
- 4 Голубев А.М. Результат селекции эспарцета на юге Казахстана // Селекция и семеноводство кормовых трав на юге и юго-востоке Казахстана. Вып. 3. — Алма-Ата: Кайнар, 1979. — С. 60–69.
- 5 Фицев А.И. Проблемы и перспективы производства кормового белка в России // Кормопроизводство. — 2003. — № 10. — С. 25–29.
- 6 Emre I., Turgut-balik D., Sahin A., Kursat M. Total electrophoretic band patterns of some onobrychis species growing in turkey // American-Eurasian J. Agric and Environ Sci. — 2007. — Vol. 2(2). — P. 123–126.
- 7 Arslan E., Ertugrul K. Genetic relationships of the genera Onobrychis, Hedysarum, and Sartoria using seed storage proteins // Turk J. Biol. — 2010. — Vol. 34. — P. 67–73.
- 8 Булатова К.М. Изучение компонентного состава глютеина пшеницы // Вестн. с.-х. науки Казахстана. — 1985. — № 4. — С. 37–39.

- 9 Zarrabian M., Majidi M.M., Ehtemam. Genetic diversity in a worldwide collection of sainfoin using morphological, anatomical and molecular markers // Crop Science. — 2013.
- 10 Kidambi S.P., Mahan J.R., Matches A.G., Burke J.J., Nunna R.R. Genetic variability for esterase enzyme in *Onobrychis* species // Theor. Appl. Genet. — 1990. — Vol. 80. — P. 433–436.
- 11 Nosrati H., Fezi M.H., Tarrah S.S., Haghighi A.R. Population genetic variation in sainfoin (Fabaceae) revealed by rapid markers // Fascicula Biologie. — 2012. — Vol. XIX, Iss. 1. — P. 11–16.
- 12 Rasouli M., Jafari A.A., Tabaei-Aghdai S.R., Shanjani P.S., Darvish F. Assessment of genetic variability of 36 population of Sainfoin // International Journal of Biosciences. — 2013. — Vol. 3, № 10. — P. 15–26.
- 13 Crochemore M.L., Huyghe C., Kerlan M.C., Durand F., Jukier B. Partitioning and distribution of RAPD variation in a set of populations of the *Medicago sativa* complex // Agronomie. — 1996. — № 16. — P. 421–432.
- 14 Krochko J.E., Bewley J.D. Seed storage proteins in cultivars and subspecies of alfalfa // Seed Science Research. — 2000. — No. 10(4). — P. 423–434.
- 15 Habibi B., Farshadfar M., Safari H. Evaluation of genetic diversity among 18 Lucerne genotypes (*Medicago Sativa* L.) using SDS-PAGE Markers // Int. J. Agri. Crop Sci. — 2012. — Vol. 4(21). — P. 1623–1626.
- 16 Van Valen L. Morphological variation and width of ecological niche // American Naturalist. — 1965. — Vol. 99. — P. 377–390.
- 17 Brock J., Aboling S., Stelzer R., Esch E., Papenbrock. Genetic variation among different populations of *Aster tripolium* grown on naturally and anthropogenic salt-contaminated habitats. Implications for conservation strategies // Journal of Plant Research. — 2007. — Vol. 120. — P. 99–112.
- 18 Nevo E., Baum B., Beiles A., Johnson D.A. Ecological correlates of RAPD DNA diversity of wild barley, *Hordeum spontaneum*, in the Fertile Crescent // Genetic Resources and Crop Evolution. — 1998. — Vol. 45. — P. 151–159.

К.М.Булатова, Р.С.Масоничич-Шотунова, Г.Т.Мейрман, Ш.Мазкират, Р.Ж.Сапарбаев

Қор ақуызының спектрі бойынша сиыр жоңышқасының жинақ үлгілері мен сұрыптарының алуантүрлілігі

Авторлар сиыр жоңышқасының *Onobrychis viciifolia* (Алматылық 2) сұрып популяциясы және *Onobrychis arenaria*, *Onobrychis transcaucasica* жинақ үлгілерінің дәндерінің қор ақуызына электрофорез жүргізді. Ақуыз компоненттерінің белсенділігі, жылжымалылығы және сандық көрсеткіштері бойынша популяцияның жоғары деңгейде алуантүрлілігі анықталды. Алматылық 2 сұрыпының жоғары деңгейдегі гетерогенділігі бастапқы, үкіметтік сұрып сараптамасына берілген кезден біртекті емес болуымен және осы аймақта ұзақ уақыт өсірілгендігімен түсіндірілді. Ақуыз сипаттамасы дақылдарды генетикалық зерттеуге пайдалы және сұрыптардың тұқым шаруашылығы мен селекцияда маркер ретінде пайдалануға мүмкіндік береді.

K.M.Bulatova, R.S.Masonichich-Shotunova, G.T.Meyirman, Sh.Mazkirat, R.Zh.Saparbayev

Diversity of sainfoin cultivars and collection samples according to the spectra of storage proteins

Diversity of sainfoin varieties and collection samples on the seed storage proteins' spectra. Electrophoresis of seed storage proteins in varietal populations *Onobrychis viciifolia* (Alma-Atinskiy 2) and collection samples of *Onobrychis arenaria* and *Onobrychis transcaucasica* were conducted. Considerable diversity of populations by number, mobility and intensity of components was determined. High heterogeneity of variety Alma-Atinskiy 2 explained by the its initial dissimilarity during passing to state variety testing and long term cultivation in the region. Protein characteristics can be useful for genetic studies of culture and for their using as markers in plant breeding and seed growing.

Reference

- 1 Müller D.A., Hoveland C.S. *Forages. Vol. 1 An introduction to grassland agriculture*, Ed. by Barnes R.F., Miller D.A. and Nelson C.J., 5th edn, Ames., IA, USA: Iowa State University Press, 1995, p. 273–281.
- 2 Frame J., Charlton J.F.L., Laidlaw A.S. *Temperate forage legumes*, Wallington, UK: CAB International, 1998, p. 279–287.
- 3 Lyushinski V.V., Prizhukov F.B. *Semenovodstvo mnogoletnih trav*, Moscow: Kolos, 1973, p. 87–100.
- 4 Golubev A.M. *Selekciya i semenovodstvo kormovyh trav na uige i uigo-vostoka Kazahstana*, Iss. 3, Alma-ata: Kainar, 1979, p. 60–69.
- 5 Fitsev A.I. *Kormoproizvodstvo*, 2003, 10, p. 25–29.
- 6 Emre I., Turgut-balik D., Sahin A., Kursat M. *American-Eurasian J. Agric and Environ Sci.*, 2007, 2(2), p. 123–126.

- 7 Arslan E., Ertugrul K. *Turk J. Biol.*, 2010, 34, p. 67–73.
- 8 Bulatova K.M. *Bull. of Agricult. sci. of Kazakhstan*, 1985, 4, p. 37-39.
- 9 Zarrabian M., Majidi M.M., Ehtemam. *Crop Science*, 2013.
- 10 Kidambi S.P., Mahan J.R., Matches A.G., Burke J.J., Nunna R.R. *Theor. Appl. Genet.*, 1990, 80, p. 433–436.
- 11 Nosrati H., Fezi M.H., Tarrah S.S., Haghighi A.R. *Fascicula Biologie*, 2012, 19, 1, p. 11–16.
- 12 Rasouli M., Jafari A.A., Tabaei-Aghdai S.R., Shanjani P.S., Darvish F. *International Journal of Biosciences*, 2013, 3, 10, p. 15–26.
- 13 Crochemore M.L., Huyghe C., Kerlan M.C., Durand F., Jukier B. *Agronomie*, 1996, 16, p.421–432.
- 14 Krochko J.E.; Bewley J.D. *Seed Science Research*, 2000, 10(4), p. 423–434.
- 15 Habibi B., Farshadfar M., Safari H. *Int. J. Agri. Crop Sci.*, 2012, 4(21), p. 1623–1626.
- 16 Van Valen L. *American Naturalist*, 1965, 99, p. 377–390.
- 17 Brock, J., Aboling, S., Stelzer, R., Esch, E., Papenbrock. *Journal of Plant Research*, 2007, 120, p. 99–112.
- 18 Nevo E., Baum, B., Beiles A., Johnson D.A. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 1998, 45. p. 151–159.

Репозиторий КАРГУ