

УДК 633.1

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ БЕЛКОВ ГЛОБУЛИНОВ В ГЕНОТИПАХ НУТА (*CICER ARIETINUM L.*)

Салманова М.Р., Садыгов Г.Б., Керимов А.Я., Садыгова С.Б., Калбиева Е.Э.

*Институт генетических ресурсов НАНА, Баку,
e-mail: salmanovamahbuba@gmail.com*

В исследовательской работе проведен электрофоретический анализ запасных белков глобулинов в семенах 76 местных и интродуцированных образцов нута. Подсчитан индекс генетического разнообразия (H-) по частоте встречаемости паттернов по зонам (ω -, Υ - β - и α -) в электрофореграммах запасных белков глобулинов в зернах образцов нута. В образцах нута было обнаружено 22 спектра и 42 паттерна, в большинстве из которых наблюдался полиморфизм. В ω -зоне обнаружено 7 спектров и 11 паттернов, в Υ -зоне – 5 спектров и 16 паттернов. В β -зоне наблюдалось 6 спектров и 7 паттернов, а в α -зоне – 5 спектров и 8 паттернов. Подсчитан индекс генетического разнообразия для каждой из четырех зон (ω -, Υ - β - и α -) по формуле Ней. Согласно подсчетам больше всего генетического разнообразия наблюдалось в Υ -зоне (H = 0,786), чуть меньше – в ω -зоне (H = 0,757) и α -зоне (H = 0,761), а меньше всего – в β -зоне (H = 0,651). Наряду с этим для определения генетического расстояния между образцами, используя компьютерную программу UPGMA, была построена дендрограмма и посредством маркеров белков глобулинов была определена генетическая близость. Основываясь на результатах кластерного анализа, генотипы были поделены на 5 групп и подгрупп. На основании результатов, полученных с помощью электрофоретического анализа в полиакриламидном геле (A-PAGE) запасных белков глобулинов, впервые был обнаружен полиморфизм генотипов нута. Эти генетические маркеры белка глобулина могут быть использованы в гибридизации, являющейся основным этапом процесса научной селекции, выборе родительских форм и определении уникальности полученного поколения, оценке динамических изменений, происходящих в популяциях, и определении гомо- и гетерогенности сортов (биотипов).

Ключевые слова: нут, генотип, глобулин, запасной белок, ген, паттерн, электрофореграмма, кластер

STUDY OF THE GENETIC DIVERSITY OF GLOBULIN PROTEINS IN CHICKPEA (*CICER ARIETINUM L.*) GENOTYPES

Salmanova M.R., Sadygov G.B., Kerimov A.Ya., Sadygova S.B., Kalbieva E.E.

Institute of Genetic Resources of ANAS, Baku, e-mail: salmanovamahbuba@gmail.com

An electrophoretic analysis of globulins has been performed in the seeds of 76 local and introduced chickpea samples. The index of genetic diversity (H-) was calculated according to the frequency of occurrence of patterns by zones (ω -, Υ - β - and α -) in electropherograms of globulins in chickpea seeds. 22 spectra and 42 patterns were found, most of which showed polymorphism. In the ω -zone, 7 spectra and 11 patterns and in the Υ -zone, 5 spectra and 16 patterns were observed. In the β -zone, 6 spectra and 7 patterns and in the α -zone, 5 spectra and 8 patterns were found. The genetic diversity index was calculated for each zone according to Ney's formula. The most genetic diversity was observed in the Υ -zone (H = 0.786), slightly less – in the ω -zone (H = 0.757) and α -zone (H = 0.761), and the least – in the β -zone (H = 0.651). UPGMA computer program was used to determine the genetic distance between the samples. A dendrogram was constructed and genetic proximity was determined using globulin protein markers. Based on the results of cluster analysis, genotypes were divided into 5 groups and subgroups. For the first time, polyacrylamide gel electrophoresis of globulins revealed polymorphism of chickpea genotypes. These genetic markers of globulin can be used in hybridization, which is the main step in the process of scientific breeding, selection of parental forms and determination of the uniqueness of the resulting generation, assessment of dynamic changes occurring in populations, and determination of the homo- and heterogeneity of varieties (biotypes).

Keywords: chickpea, genotype, globulin, storage protein, gene, pattern, electropherogram, cluster

Электрофоретические компоненты запасных белков в семенах злаковых и бобовых культур передаются из поколения в поколение как генетически детерминированный признак, не изменяются и остаются стабильными в зависимости от почвенно-климатических и условий возделывания, используются как универсальные генетические маркеры и сохраняют свою научную актуальность в изучении генетического разнообразия и в ускорении процесса селекции [1].

Так, часть ДНК, связанная с областью какого-либо гена или генов в геноме, яв-

ляется маркером. Маркеры делятся на три типа: морфологические, биохимические и ДНК-маркеры. Молекулярные маркеры классифицируются на две группы: не связанные с полимеразной цепной реакцией (RFLP) и связанные (RAPD, AFLP, SSR) [2]. С помощью молекулярных маркеров можно обеспечить более четкое выявление генетического материала *in vitro*. С использованием различных маркеров были обнаружены генетические вариации в последовательностях ДНК [3]. Генетическая вариация и приспособляемость к условиям окружающей среды у сортов нута высока. Также большое

влияние на процессы, связанные с эволюцией сортов, оказала человеческая деятельность. К ней относятся одомашнивание, выращивание и иммиграция [4]. Несмотря на то, что это очень важно, в некоторых исследовательских работах признавалось, что содержание белка в зерне у различных сортов нута различно и генетически обусловлено. Накопление белка в зерне нута управляется 3–7 генами. Вдобавок генетически это может создать изменчивость в составе белка зерна в сортах нута [5]. Использование биохимических и молекулярных маркеров представляет преимущество перед использованием других маркеров, например фенотипических. Репродуктивность делает эти маркеры особенно привлекательными [6]. В составе зерен нута, выращенного на разных почвах, содержание альбуминов, глобулинов, глютенинов и проламинов в значительной мере различается. Гупта, используя электрофорез в SDS полиакриламидном геле, представил разницу в молекулярном весе полосок белка, различные варианты белков зерна, то есть глобулины, глютенины, альбумины и проламины наблюдались в различных вариантах. Метод электрофореза в полиакриламидном геле (SDS-PAGE) используется для разделения белков [7]. В оценке бобовых растений использовался SRAP [8, 9]. Для оценки генетического разнообразия маркеры SRAP применяются редко [10–12]. В исследовании генетической вариации нута впервые были использованы SRAP маркеры. Для оценки генетической изменчивости в нуте используются эти маркеры.

Используя SDS-PAGE, был определен полиморфизм глобулинов, проламинов и глютенинов в генотипах нута. Вообще, в зернах бобовых растений альбумины составляют 20–35%, глобулины – 43–55%, проламины – 0,73–2,70% и глютенины – 11,84–32,21% [13]. Из них альбумины растворяются в воде, глобулины – в солях, проламины – в спирте, а глютенины – в щелочи. Альбумин и глобулин вместе составляют 63–90% от общего белка зерна. Растворимая в солях фракция (глобулины) составляет 45–50,3% от общей массы. Среднее значение, составляющее 47,7% растворимой фракции, является основной белковой фракцией. Исследуемый белок нута считается водорастворимой фракцией. Альбумины со своим средним значением составляют 31,2–35,5% от общей растворимой фракции. Третьими са-

мыми распространенными белками зерна, содержание которых варьирует между 15,1 и 20,5%, являются глютенины [14].

В данной исследовательской работе преследовалась цель идентификации, паспортизации и изучения генетического разнообразия местных и интродуцированных генотипов нута.

Материалы и методы исследования

В исследовательской работе были использованы местные и интродуцированные из ICARDA образцы нута. В 2021 г. на Апшеронской опытной базе Института генетических ресурсов НАНА было посеяно 76 образцов, полевые испытания проводились во II–III-й декаде ноября.

Электрофоретический анализ белка глобулина проводился в отделе «Биохимическая генетика и технология» Института генетических ресурсов НАНА. Экстракцию и электрофоретический анализ в полиакриламидном геле (A-PAGE) запасных белков глобулинов из зерен образцов нута проводили с помощью нового метода, усовершенствованного на основе модифицированного метода Ф.Ф. Поперелян. Так, после измельчения образца нута и его экстракции дважды в 500 мкл 70%-ного спирта и центрифугирования каждый раз при 3500 об./мин, экстракт промывали дважды в 500 мкл растворе 0,03%-ного уксуса и ацетона и каждый раз после размешивания механической мешалкой его центрифугировали при скорости 3500 об./мин. После добавления к полученному в четвертый раз экстракту 500 мкл 9-молярного раствора уксус-мочевины, проводили анализ на аппарате вертикального электрофореза в глицин-ацетатном буфере (pH – 3,5).

После того, как паттерны пронумеровали, их сравнивали друг с другом в каждой зоне, а затем осуществляли нумерацию всех паттернов без учета повторов. Так, если какой-то определенный паттерн повторялся в образцах, этому паттерну новый номер не присваивался, и так проделывалось со всеми паттернами. Частота встречаемости каждого паттерна образцов нута по всем зонам вычислялась на основании индекса генетического разнообразия Нея по нижеприведенной формуле [15]:

$$H = 1 - \sum P_i^2,$$

где H – индекс генетического разнообразия; P_i – частота каждого паттерна в зонах.

Кластерный анализ был построен с применением метода UPGMA.

**Результаты исследования
и их обсуждение**

Одним из основных маркеров, используемых в генетической идентификации растений, являются белковые маркеры. Впервые в Азербайджане с помощью модифицированного метода, примененного для бобовых растений, был осуществлен анализ вертикального электрофореза в А-PAGE белков глобулинов, а полученные электро-

фореграммы условно поделили на 4 зоны: их назвали ω -, γ -, β - и α -глобулины. Белки с большим молекулярным весом локализованы в ω -зоне, а белки с малым молекулярным весом – в α -зоне. Белки глобулины зерен образцов нута по сравнению с белками фасоли и сои более полиморфны, и их спектры интенсивнее. Однако белки глобулины резко отличались от показателей запасных белков глиадина и глютена из зерен пшеницы (рис. 1 и 2).

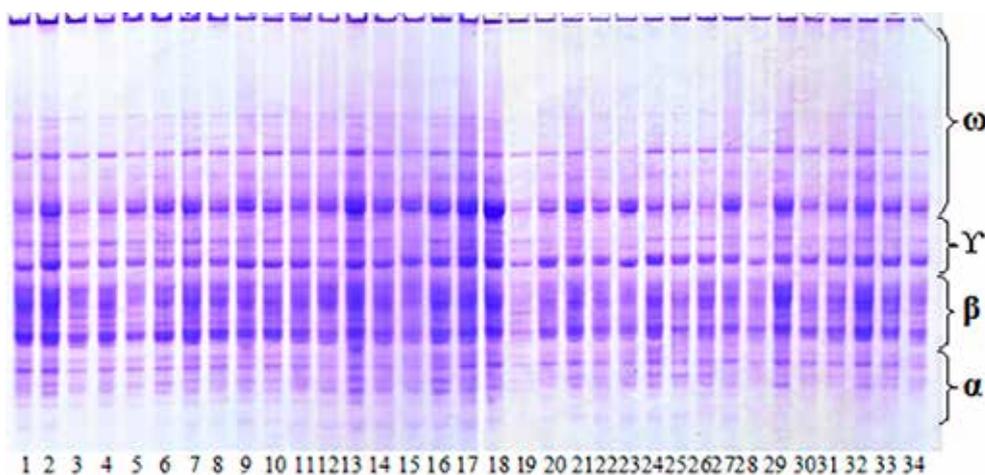


Рис. 1. Электрофореграммы белка глобулина из зерен образцов нута:

1 – *Flip 13-70c*; 2 – *Flip 13-151c*; 3 – *Flip 13-153c*; 4 – *Flip13-154c*; 5 – *Flip 13-194c*; 6 – *Flip13-227c*; 7 – *Flip13-234c*; 8 – *Flip13-240c*; 9 – *Flip13-247c*; 10 – *Flip13-250c*; 11 – *Flip13-251c*; 12 – *Flip13-253c*; 13 – *Flip13-258c*; 14 – *Flip13-261c*; 15 – *Flip13-277c*; 16 – *Flip13-278c*; 17 – *Flip13-282c*; 18 – *Flip13-308c*; 19 – *Flip13-314c*; 20 – *Flip13-320c*; 21 – *Flip13-330c*; 22 – *Flip13-335c*; 23 – *Flip13-336c*; 24 – *Flip13-338c*; 25 – *Flip13-340c*; 26 – *Flip13-343c*; 27 – *Flip13-356c*; 28 – *Flip13-358c*; 29 – *Flip13-364c*; 30 – *Flip13-369c*; 31 – *Flip13-376c*; 32 – *ILC-482c (st)*; 33 – *Flip 82-150c*; 34 – *Flip 88-85c*

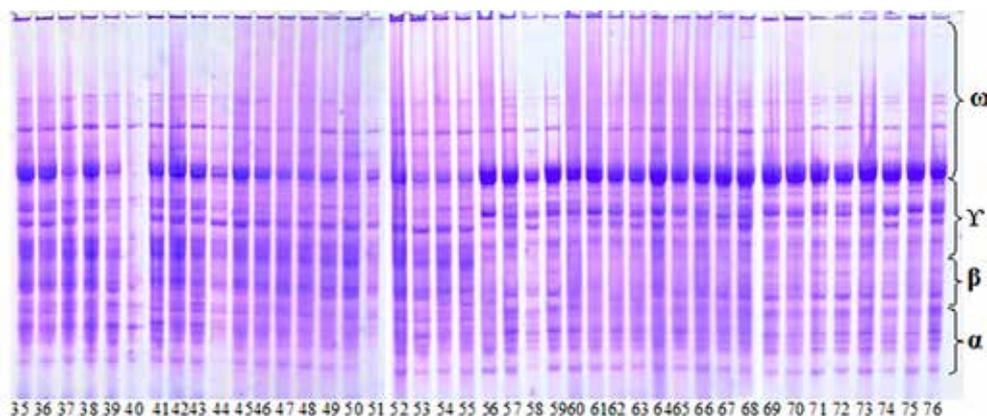


Рис. 2. Электрофореграммы белка глобулина, выделенного из зерен генотипов нута.

35 – *Flip93-93c*; 36 – *st.Nørmin*; 37 – *Flip11-12c*; 38 – *Flip11-104c*; 39 – *Flip11-21c*; 40 – *Flip10-338c*; 41 – *Flip11-167c*; 42 – *Flip11-76c*; 43 – *Flip11-175c*; 44 – *Flip11-70c*; 45 – *Flip10-332c*; 46 – *Flip11-125c*; 47 – *Flip11-05c*; 48 – *Flip11-208c*; 49 – *Flip 93-93c*; 50 – *Flip11-32c*; 51 – *Flip11-66c*; 52 – *Flip11-205c*; 53 – *Flip11-140c*; 54 – *Flip11-08c*; 55 – *Flip11-198c*; 56 – *Flip11-11c*; 57 – *Flip11-209c*; 58 – *Flip11-215c*; 59 – *Flip11-45c*; 60 – *Flip11-72c*; 61 – *Flip11-210c*; 62 – *Flip10-318c*; 63 – *Flip11-16c*; 64 – *Flip11-58c*; 65 – *Flip11-138c*; 66 – *Flip10-345c*; 67 – *Flip 88-85c*; 68 – *Flip11-105c*; 69 – *Flip11-01c*; 70 – *ILC-482c*; 71 – *Flip11-216c*; 72 – *Flip 82-150c*; 73 – *Flip11-214c*; 74 – *Sultan*; 75 – *Flip11-190c*; 76 – *Flip11-15c*

Среди исследованных образцов нута было обнаружено 23 спектра и 42 паттерна и, судя по частоте встречаемости паттернов, образуемых электрофоретическими спектрами, между ними обнаружен полиморфизм. В ω -зоне электрофореграмм запасных белков глобулина было обнаружено 7 спектров и 11 различных паттернов. В этой зоне ω -4 паттерн обнаружен в 43 образцах с частотой встречаемости 43,0%, ω -1 паттерн – в 33 образцах с частотой встречаемости 20,0% и ω -8 паттерн с частотой встречаемости 1,0%. ω_4 среди всех спектров составлял самую высокую частоту встречаемости 100%, ω_3 спектр – составлял среднюю – 60,0%, а ω_1 спектр – низкую частоту встречаемости – 5,0%.

В Υ -зоне электрофореграмм запасных белков глобулинов наблюдалось 5 спектров и 16 паттернов. Υ -3 паттерн обладал частотой встречаемости 43%, Υ -8 паттерн – 11%, а Υ -7 паттерн – 1%. Среди всех спектров Υ_{3s} обладал самой высокой частотой встречаемости – 91,0%, Υ_{4s} – средней частотой встречаемости – 71% и Υ_{2s} низкой – 33,0%. В β -зоне электрофореграмм обнаружено

6 спектров и 7 паттернов. β -2 паттерн составлял частоту встречаемости 53,0%, β -1 паттерн – 24,0% и β -6 паттерн – самую низкую частоту встречаемости, 1%. Была обнаружена самая высокая частота встречаемости 100% у β_{4s} , средняя – 87,0% – у β_{3s} и низкая – 28,0% – у β_{6s} . В α -зоне электрофореграмм было отмечено 5 спектров и 8 паттернов. α -3 паттерн составлял частоту встречаемости 36,0%, α -1 паттерн – 29,0%, а α -6 паттерн – 1,0%. α_{2s} обладал максимумом частоты встречаемости 100%, α_{4s} – средней частотой встречаемости 76,0%, а α_{5s} – низкой частотой встречаемости 45,0%. Применив формулу Нея, между генотипами был подсчитан индекс генетического разнообразия для каждой из четырех зон. В результате проведенных подсчетов было установлено, что Υ -зона обладала более высоким генетическим разнообразием ($H = 0,786$), ω -зоны ($H = 0,757$) и α -зоны ($H = 0,761$) – относительно низким генетическим разнообразием, а у β -зоны ($H = 0,651$) наблюдали самое низкое генетическое разнообразие (рис. 3).

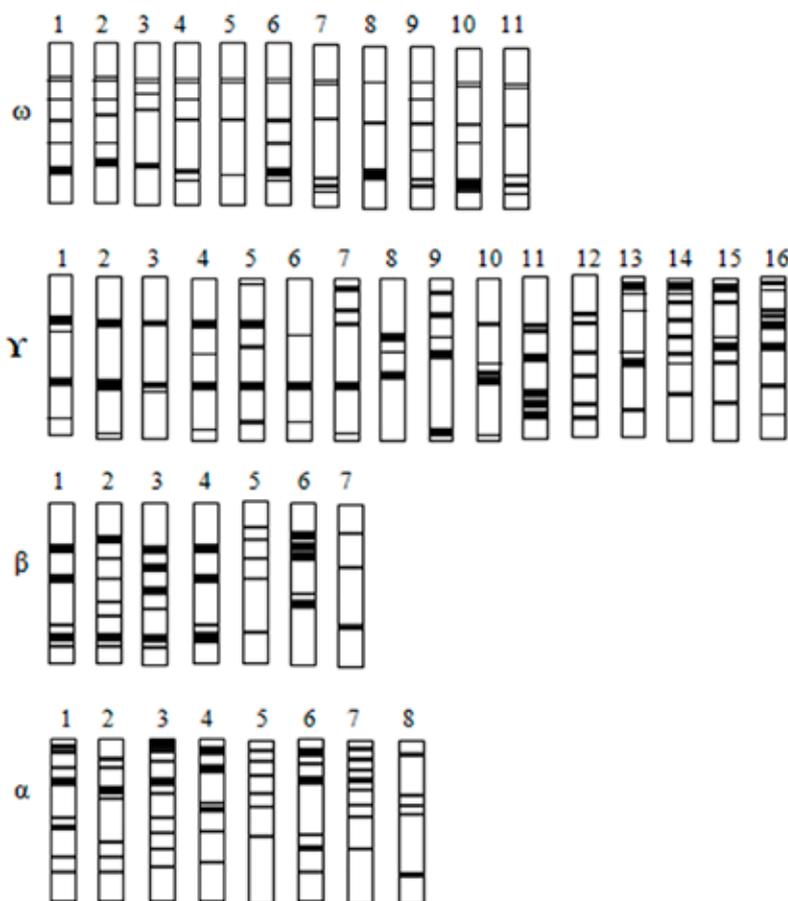


Рис. 3. Идиограмма различных паттернов ω -, Υ -, β - и α -зон, обнаруживаемых в образцах нута

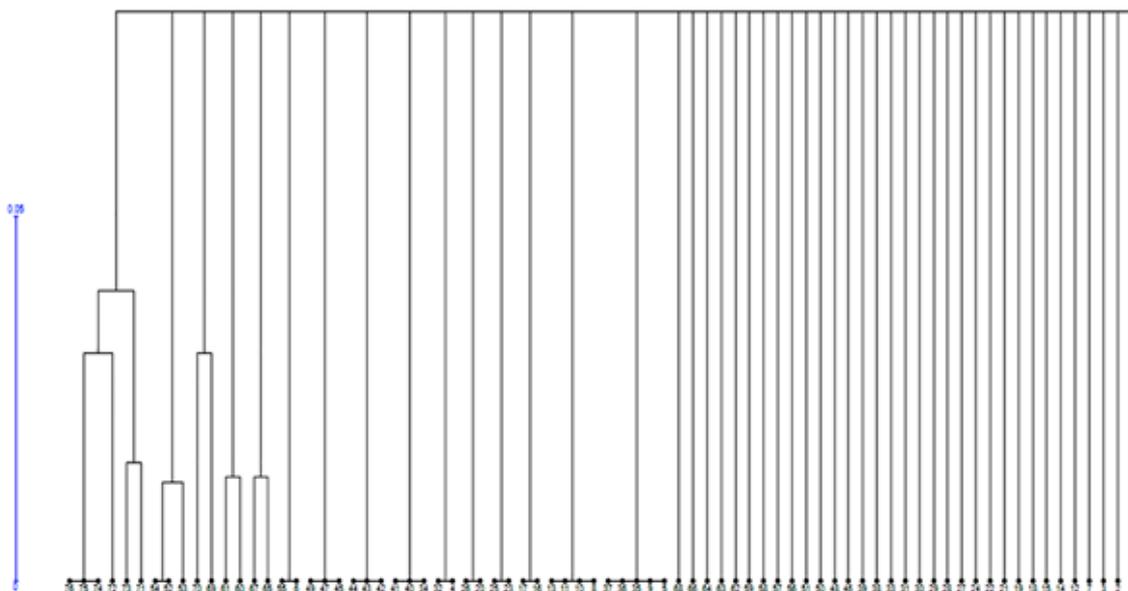


Рис. 4. Дендрограмма, отражающая генетическое расстояние между различными образцами нута на основе полиморфизма электрофореграмм белков глобулинов

После экстракции и проведенного электрофоретического анализа запасных белков глобулинов образцов нута полоски (электрофоретический спектр) между генотипами были пронумерованы на основании метода нумерации «1» и «0». Находящиеся в том же месте полоски пронумерованы на основании бинарной номенклатуры цифрой «1», а те места, где в соответствующей области полосок нет, пронумерованы цифрой «0». Используя компьютерную программу UPAGMA для определения генетической близости образцов, была построена дендрограмма, и посредством маркеров белков глобулинов изучена генетическая близость генотипов нута. Как видно из рис. 4, генотипы за номером 71, 72, 73, 74, 75 и 76 на дендрограмме классифицированы в первом кластере, образцы 52, 53, 54 – во втором, образцы за номером 69 и 70 – в третьем, номера 60 и 61 – в четвертом, а генотипы за номером 65 и 67 – в пятом кластере, и другие образцы классифицированы по два, по три, по четыре и остальные по одному кластеру. На основании полученных результатов можно прийти к заключению, что для выбора родительских форм и ускорения процесса селекции при проведении гибридизации между образцами нута, находящимися по генетическому расстоянию далеко друг от друга, целесообразно осуществление селекции с помощью маркеров.

Заключение

Проводился электрофоретический анализ в Acid-PAGE запасных белков глобулинов в зерне 76 местных и интродуцированных образцов нута *Cicer Arietinum*. Изучение генетического разнообразия на основе запасных белков глобулинов охарактеризовалось определением 23 спектров и 42 различных паттернов в местных и интродуцированных образцах нута. Наряду с этим были вычислены индексы генетического разнообразия электрофореграмм глобулинов (H-) образцов нута по зонам. Для определения генетической близости была использована компьютерная программа UPGMA, с помощью построения дендрограммы была определена генетическая близость генотипов нута на основе маркеров белков глобулинов.

Список литературы

1. Садыгов Г.Б. Белковый полиморфизм генотипов тетраплоидной пшеницы и связь качественных признаков с генетическими маркерами: автореф. дис. ... докт. биол. наук. Баку, 2021. 24 с.
2. Ханкишиева Э.М., Шихлинский Г.М. Использование молекулярных маркеров в селекции на устойчивость. Научно-исследовательский институт земледелия: сборник научных трудов. Т. XXVII. Баку, 2016. С. 160–167.
3. Jeina S.M., Al-Hadeithi and Saade Abdalkareem Jasmin. Study of Plant Genetic Variation through Molecular Markers: An Overview // Journal of pharmaceutical Research International. 2021. Vol. 33, Is. 45. P. 464–473.
4. Xiong H., Qin J., Shi A. et al. Genetic differentiation and diversity upon genotype and phenotype in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) // Euphytica. 2017. Vol. 214, Is. 1. P. 4–9.

5. Fernandes S., Antônio D., da Costa C., da Silva W.R., Boiteux L.S. Genetic analysis of total seed protein content in two cowpea crosses // *Crop Sci.* 2012. Vol. 52, Is. 6. P. 2501–2506.
6. Hayward A., Tollenaere R., Dalton-Morgan J., Batley J. Molecular Marker Applications in Plants. In Jacqueline Batley (ed.), *Plant Genotyping: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology. 2015. Vol. 1245. P. 13–27.
7. Gupta P., Singh R., Malhotra S., Boora K.S., Singal H.R. Cowpea seed proteins: heterogeneity in total proteins and protein fractions // *Legume Res. Int. J.* 2014. Vol. 37, Is. 1. P. 62–67.
8. Alghamdi S., Al-Faifi S., Migdadi H., Khan M., El-Harty E., Ammar M. Molecular diversity assessment using sequence related amplified polymorphism (SRAP) markers in *Vicia faba* L. // *Int. J. Mol. Sci.* 2012. Vol. 13. P. 16457–16471.
9. Alghamdi S.S., Al-Shameri A.M., Migdadi H.M., Ammar H.M., El-Harty E.H., Khan M.A., Farooq M. Physiological and molecular characterization of faba bean (*Vicia faba* L.) genotypes for adaptation to drought stress // *J. Agro. Crop Sci.* 2014. Vol. 201, Is. 6. P. 401–409.
10. Ammar M.H., Migdadi H.M., Khan M.A., El-Harty E.H., Al-Faifi S.A., Alghamdi S.S. Assessment of genetic diversity among faba bean genotypes using agromorphological and molecular markers // *Saudi J. Biol. Sci.* 2015. Vol. 22, Is. 3. P. 340–350.
11. Guindon M.F., Martin E., Zayas A., Cointry E., Cravero V. Evaluation of SRAP markers for mapping of *Pisum sativum* L. *Crop Breed // Appl. Biotechnol.* 2016. Vol. 16. P. 182–188.
12. Khan M.A., Ammar M.H., Migdadi H.M., El-Harty E.H., Alfaifi S.A., Farooq M., Alghamdi S.S. Field performance and genetic diversity of chickpea genotypes // *Int. J. Agric. Biol.* 2016. Vol. 18. P. 683–688.
13. Tchiagam J.B.N., Bell J.M., Nassourou A.M., Njintang N.Y., Youmbi E. Genetic analysis of seed proteins contents in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) // *Afr. J. Biotechnol.* 2011. Vol. 10, Is.16. P. 3077–3086.
14. Salem S. Alghamdi, Muhammed A. Khan, Hussein M. Migdadi, Ehab H. El-Harty, Muhammed Afzal, Muhammad Farooq. Biochemical and molecular characterization of cowpea landraces using seed storage proteins and SRAP marker patterns // *Saudi Journal of Biological Sciences.* January 2019. Vol. 26, Is. 1. P. 74–82.
15. Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided population // *Proce. Nat. Acad. Sci. USA.* 1979. Vol. 70. P. 3321–3323.