

59.0 g depending on the fraction. The maximum share of seeds (45.5%) was localized on the sieves with the hole diameter of 3.0-3.2 mm. The increase of germination energy from 72.7% (fractions <2.0 mm) to 82.4% (fraction 3.0 mm) and the reduction of that indicator (to 72.4%) with further increase of seed size were observed. The fraction isolated on the sieves with the hole diameter of 2.8-3.0 mm had the highest seed germination (93.4%).

УДК 633.367.1:631.527.5:581.14

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СЕЛЕКЦИИ ЛЮПИНА ПО ПРИЗНАКУ «СОДЕРЖАНИЕ АЛКАЛОИДОВ В ЗЕРНЕ»

М.Н. Крицкий¹, Е.Л. Долгова¹, кандидаты с.-х. наук, Н.В. Анисимова², канд. биол. наук, А.А. Козловский¹, И.В. Юшкевич¹

¹РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию»

²Институт генетики и цитологии НАН Беларуси

(Дата поступления статьи в редакцию 17.04.2025)

Рецензент: Урбан Э.П., доктор с.-х. наук

Аннотация. В статье приводятся результаты селекции люпина узколистного, желтого и белого по признаку содержания алкалоидов в зерне. Показано, что одним из важных контролируемых показателей при создании сортов люпина является низкое содержание алкалоидов. Исследованиями установлено, что в зерне у селекционных и коллекционных образцов видов люпина сумма 3 алкалоидов (люпанина, спартеина, люпинина) колебалась от 0,016 до 0,055 % при среднем значении 0,027 %, в том числе у образцов узколистного люпина от 0,016 до 0,037 %, белого – от 0,03 до 0,055 %, желтого – от 0,045 до 0,05 %. Совершенствование традиционных селекционных методик отбора люпина по низкой алкалоидности путем привлечения маркерного анализа генов, контролирующего проявление признака «алкалоидность семян», позволило выделить перспективные образцы люпина узколистного.

Введение. Одним из важных контролируемых биохимических показателей, который необходимо учитывать при использовании люпина, является низкое содержание алкалоидов в зерне.

По литературным данным известно в общей сложности около 170 алкалоидов люпина, среди них токсичные и нетоксичные. К токсичным относят хинолизидиновые алкалоиды. Сумма наиболее часто встречающихся хинолизидиновых алкалоидов важна для анализа на содержание алкалоидов в собранном люпине. Алкалоиды люпина имеют горький вкус, поэтому при высоких концентрациях собранный продукт может стать несъедобным и даже привести к отравлению. Сорты люпина с низким содержанием алкалоидов также известны как сладкие люпины, в то время как люпины с высоким содержанием алкалоидов известны как горькие люпины [1].

По своей химической природе алкалоиды представляют собой азотистые комбинации и относятся к числу наиболее токсичных растительных ингредиентов. Люпин содержит смесь различных алкалоидов. Каждый вид люпина имеет уникальный алкалоидный профиль.

Алкалоидный профиль обычно состоит из 4–5 основных и нескольких второстепенных алкалоидов, которые различаются по своей токсичности. Например, люпанин, содержащийся в узколистом и белом видах люпина, является наиболее ядовитым алкалоидом, оксилупанин примерно в 10 раз менее ядовит. Кроме люпанина (50–80 %) в белом люпине еще содержатся мультифлорин (3–10 %), 13-гидроксилупанин (5–15 %), альбин (5–15 %) и др. В зерне узколистного люпина преобладающими алкалоидами являются люпанин (65–80 %), ангустифолин (5–20 %), 13-гидроксилупанин (10–20 %), в желтом виде люпина – люпинин (40–70 %), спартеин (30–50 %) [2].

Токсичность не всех алкалоидов достаточно хорошо известна. Правовые нормы по допустимому содержанию алкалоидов в люпине в разных странах отличаются. Например, в Швейцарии законодательно не установлены максимальные уровни содержания алкалоидов. Здесь применяется принцип саморегулирования. Это означает, что компании должны обеспечивать поступление только безопасных пищевых и кормовых продуктов.

Немецкий федеральный институт оценки рисков установил, что при общем содержании алкалоидов менее 200 мг/кг (0,02 % от сухого вещества) сырье относится к пищевым продуктам. Рекомендуемое значение относится к конечному продукту, который следует употреблять в пищу. Общее содержание алкалоидов составляет менее 500 мг/кг (0,05 % от сухого вещества).

Сладкий люпин разрешен в качестве корма в Швейцарии и странах ЕС. Австралия является крупнейшим в мире производителем люпина. В этой стране стандарты на импорт и экспорт промышленной организации Pulse Australia предусматривают максимальное содержание алкалоидов в 0,02 % [1].

По международным нормам в ряде стран за рубежом содержание алкалоидов в люпиновом сырье может составлять не более 0,02 % к массе семян, в России – не более 0,04 % [3], поэтому в перерабатывающей промышленности при применении люпинового сырья используют низкоалкалоидные сорта люпина. В XX веке селекция позволила снизить содержание алкалоидов в люпине до такой степени, что был получен так называемый «сладкий люпин», который можно использовать без предварительной обработки. Созданные в последние годы новые сорта люпина расширяют возможности его использования, поскольку являются низкоалкалоидными, богаты белком и незаменимыми аминокислотами [3]. Селекция люпина по признаку «низкое содержание алкалоидов» стала неотъемлемой частью его селекционных программ по всему миру.

Создание низкоалкалоидных сортов люпина является одной из актуальных проблем современной селекции. Применение методов ДНК-маркирования позволяет совершенствовать селекцию люпина, эффективно выявлять источники целевых аллелей и использовать их в селекционной работе.

Целью работы явилось исследование селекционного материала люпина узколистного с применением ДНК-маркеров к основным генам содержания алкалоидов, а также определение видовых особенностей содержания алкалоидов в зерне люпина и выявление перспективных образцов.

Материалы и методика исследований. Изучение селекционного и коллекционного материала люпина в полевых условиях проводилось в 2017–2024 гг. на опытных участках РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию». Почва опытного участка дерново-подзолистая, развивающаяся на водно-ледниковой супеси, подстилаемой с глубины 0,5 м мореным суглинком, связно-супесчаная: pH_{KCl} – 6,2–6,4, содержание P_2O_5 – 200–280 мг/кг, K_2O – 220–290 мг/кг почвы, гумуса – 2,1–2,5 %. Полевые опыты проводили по общепринятым методикам. Предшественник – озимые зерновые. Площадь делянки – 1–10 м².

Лабораторные анализы выполняли в отделе биохимии и биотехнологии РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию». Количественное определение общего содержания алкалоидов хинолизинового ряда проводили спектрофотометрически (спектрофотометр Solar 2020), фиксируя изменение оптической плотности экстракта алкалоидов зерна люпина при комплексообразовании с раствором иодат-иодистого реагента. Оптическая плотность раствора (экстракта) алкалоидов, содержащего этот комплекс, прямо пропорционально зависит от концентрации алкалоидов. Для построения градуировочного графика в качестве стандартного использовали основной раствор главного алкалоида исследуемого вида люпина с концентрацией 300 мкг/см³, из которого последовательным разведением 8 %-ной трихлоруксусной кислотой получали рабочие градуировочные растворы с концентрацией алкалоида 7,5; 15; 30; 45; 60; 75 мкг/см³. Навеску 0,5–1,0 г воздушно сухого образца, размолотого на мельнице для сухого помола Kinematica POLYMIX® с калиброванным ситом 0,8 мм, заливали раствором 8 %-ной трихлоруксусной кислоты, перемешивали, закрывали и оставляли на 16–18 часов в термостате при температуре 22 °С. После этого содержимое встряхивали и фильтровали, полученный фильтрат использовали для измерения оптической плотности.

Групповой состав алкалоидов определяли хроматографически (жидкостной хроматограф Agilent 1290 с диодно-матричным детектором) по абсолютной калибровке с использованием внешних стандартов.

Молекулярно-генетические исследования проводили в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси с использованием соответствующих методик.

Выделение ДНК осуществляли из тканей молодых верхушечных листьев. Навеску для выделения формировали, используя листья с пяти растений. 200 мг растительного материала помещали в 2,0 мл пробирки, клетки разрушали с добавлением лизирующего раствора (0,1M Tris, 0,5M NaCl, 0,05M ЭДТА, 1,25 % SDS, 0,03M Na₂HSO₃) на автоматическом гомогенизаторе TissueLyser II (Qiagen). Выделение ДНК проводили методом экстракции смесью фенола и хлороформа. ДНК из водной фазы извлекали спиртовым осаждением.

Анализ состояния гена *lucundus* проводили с использованием маркера *lucLi* (F: CCAGGATAAATTAGTTGTGTC, R: TCTTAGATGTATGATGAGTATGG) [4], разработанного на основе полученной последовательности ДНК. ПЦР выполняли по схеме: плавление ДНК при 94°C в течение 5 мин., затем 35 циклов: 94°C – 30 с, 52°C – 30 с, 72°C – 1 мин. Завершали реакцию финальной элонгацией при 72°C в течении 5 мин. и охлаждением смеси до 15°C в течение 5 мин. Реакционная смесь для ПЦР объемом 15 мкл содержала следующие компоненты: 1,5 ед. Taq-полимеразы (Dialat), 1x ПЦР-буфер, 2 mM MgCl₂, 200 мкМ каждого dNTP, 250 пмоль/мкл прямого и обратного праймера, 2,5 мкл тотальной геномной ДНК. Продукты амплификации, меченые флуоресцентной меткой, детектировали с помощью генетического анализатора ABI 3500 (Applied Biosystems, США).

Результаты исследований. Нашими исследованиями установлено, что в зерне у селекционных и коллекционных образцов видов люпина сумма 3 алкалоидов (люпанина, спартеина, люпинина) колебалась от 0,016 до 0,055 % при среднем значении 0,027 %, в том числе у образцов узколистного люпина от 0,016 до 0,037 %, белого – от 0,03 до 0,055 %, желтого – от 0,045 до 0,05 % (таблица 1).

Таблица 1. Содержание алкалоидов в зерне у образцов люпина, %

Образец	Вид	Содержание алкалоидов в зерне, %			
		люпанин	спартеин	люпинин	сумма
КСИ д.3	люпин узколистный	0,009	0,012	0,001	0,021
КСИ д.4	люпин узколистный	0,011	0,013	0,002	0,023
КСИ д.5	люпин узколистный	0,009	0,013	0,001	0,022
КСИ д.6	люпин узколистный	0,011	0,013	0,002	0,023
КСИ д.7	люпин узколистный	0,021	0,011	0,001	0,032
КСИ д.8	люпин узколистный	0,010	0,013	0,001	0,023
КСИ д.9	люпин узколистный	0,010	0,011	0,001	0,022
КСИ д.11	люпин узколистный	0,011	0,015	0,001	0,026
КСИ д.13	люпин узколистный	0,010	0,013	0,002	0,022
КСИ д.14	люпин узколистный	0,007	0,013	0,001	0,020
КСИ д.15	люпин узколистный	0,011	0,012	0,001	0,024
КСИ д.16	люпин узколистный	0,011	0,013	0,001	0,025
КСИ д.17	люпин узколистный	0,013	0,012	0,001	0,026
КСИ д.18	люпин узколистный	0,014	0,013	0,002	0,027
КСИ д.19	люпин узколистный	0,010	0,012	0,001	0,023
КСИ д.20	люпин узколистный	0,015	0,014	0,001	0,029
КСИ д.21	люпин узколистный	0,015	0,014	0,001	0,029
КСИ д.22	люпин узколистный	0,015	0,012	0,001	0,028
КСИ д.23	люпин узколистный	0,014	0,013	0,002	0,027
КСИ д.24	люпин узколистный	0,013	0,014	0,001	0,026
КП д.46-49	люпин узколистный	0,013	0,024	0,001	0,037
КП д.51-54	люпин узколистный	0,009	0,016	0,001	0,025

Образец	Вид	Содержание алкалоидов в зерне, %			
		люпинин	спартеин	люпинин	сумма
КП д.56-59	люпин узколистный	0,013	0,013	0,001	0,025
ПР д.1	люпин узколистный	0,004	0,012	0,001	0,016
ПР д.2	люпин узколистный	0,010	0,010	0,001	0,020
ПР д.3	люпин узколистный	0,012	0,011	0,001	0,023
ПР д.4	люпин узколистный	0,012	0,011	0,001	0,022
КСИ д.1	люпин белый	0,014	0,016	0,001	0,030
КСИ д.10	люпин белый	0,030	0,025	0,001	0,055
КСИ д.12	люпин желтый	0,024	0,021	0,001	0,045
КСИ д.2	люпин желтый	0,026	0,024	0,001	0,050
\bar{x}		0,013	0,014	0,001	0,027
<i>Lim</i> min...max		0,004-0,030	0,010-0,025	0,001-0,002	0,016-0,055

Содержание люпинина составляло 0,013 %, при варьировании от 0,004 % до 0,03 %, в том числе у образцов узколистного люпина от 0,004 до 0,015 %, белого – от 0,014 до 0,03 %, желтого – от 0,024 до 0,026 %.

Среднее количество спартеина было сопоставимым с содержанием люпинина и составляло 0,014 %, при варьировании от 0,010 % до 0,025 %, в том числе у образцов узколистного люпина от 0,010 до 0,024 %, белого – от 0,021 до 0,025 %, желтого – от 0,021 до 0,024 %.

Люпинина в среднем было меньше, чем люпинина и спартеина. Среднее его количество в исследуемых образцах составляло 0,001 %. При этом в образцах люпина и белого и желтого его количество составляло 0,001 %, а в узколистном колебалось от 0,001 % до 0,002 %.

Немаловажным фактором поддержания низкого содержания алкалоидов в создаваемых сортах видов люпина является вовлечение новых генетических методик и их кооперация с традиционными, что ускоряет селекцию и делает результат более предсказуемым.

Исследованиями выявлено, что некоторые мутации вызывают низкие уровни содержания алкалоидов. Такие мутации используются для селекции сладких сортов для различных возделываемых видов люпина [5, 6, 7]. Маркер-ассоциированная селекция люпина по признаку «низкое содержание алкалоидов» основывается на использовании, главным образом, генов *iucundus* (*L. angustifolius*) и *pauper* (*L. albus*). Значительные усилия были направлены на разработку маркера рецессивного мутанта в *iucundus* locus узколистного люпина, который преобразует алкалоиды «горького» дикого люпина в «сладких» сортах [8, 9, 10]. Все сорта люпина в Австралии гомозиготны по этому рецессивному аллелю.

Для совершенствования селекции люпина были привлечены новые методики. На основании оценки образцов люпина узколистного по наличию аллеля пониженного содержания алкалоидов $IucLi^d$ (291 п.н.) установлено, что большинство изучаемых селекционных номеров несут в своих геномах аллель пониженного содержания алкалоидов $IucLi^d$ (291 п.н.).

Однако известно, что признак низкой алкалоидности у люпина является полигенным, а *IucLi* – единственный разработанный на сегодняшний день ДНК-маркер к гену *iucundus*, поэтому селекцию на пониженное содержание алкалоидов необходимо продолжать с постоянным лабораторным контролем из-за возможного восстановления алкалоидности в результате рекомбинации или неаллельного взаимодействия генов при контролируемом или спонтанном перекрестном опылении с генотипами, несущими гены высокой алкалоидности.

С целью предотвращения попадания генов повышенной алкалоидности при создании нового генофонда люпина узколистного проведен скрининг содержания алкалоидов в растительном материале в экспериментальных образцах разных этапов селекции (92 образца), с целью предотвращения спонтанного возникновения горьких форм. В селекционных программах по люпину выявление горьких генотипов на первом этапе селекции и последующее их исключение из селекционного процесса по созданию «сладких» форм, используемых на кормовые цели, является одним из наиболее эффективных и важных методов получения доноров ценных признаков – форм с низким и очень низким содержанием алкалоидов.

Анализ показал, что большинство селекционных образцов люпина (85 %) являются низкоалкалоидными с содержанием алкалоидов в семенах 0,025–0,099 % (рисунок 1).

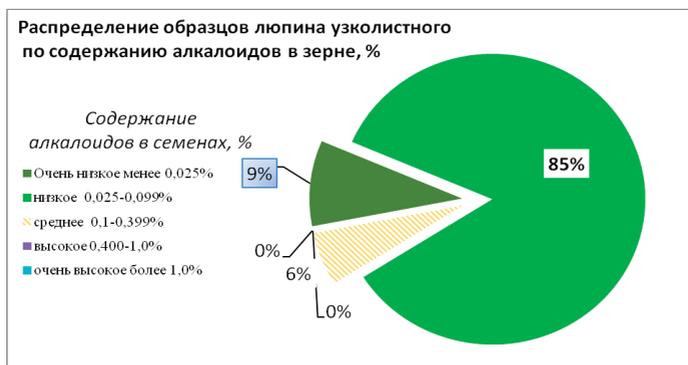


Рисунок 1. Распределение образцов люпина узколистного по содержанию алкалоидов в семенах

Образцы с содержанием алкалоидов менее 0,025 % составляют 9 %. Полученные селекционные образцы в перспективе могут быть использованы для получения сортов люпина пищевого назначения. Как правило, образцы с более высоким содержанием алкалоидов (свыше 0,06 %) не включаются в селекционный процесс.

Образцов люпина узколистного со средним (0,1–0,399 %) содержанием алкалоидов было около 6 %. Данные образцы могут быть использованы только для создания сортов люпина сидерального назначения. В создании сортов кор-

мового и пищевого направления использования такие образцы, как правило, бракуются, в отдельных случаях при наличии другого ценного признака могут перестраиваться на слабоалкалоидную основу. Образцов с высоким (0,4–1,0 %) и очень высоким (более 1,0 %) содержанием алкалоидов в семенах не выявлено. Постоянный и периодический контроль, мониторинг содержания алкалоидов в семенах люпина в сочетании с ДНК-контролем целевых генов необходимо проводить на всех этапах селекционного процесса для недопущения попадания алкалоидных форм в селекционный и семенной материал люпина.

Заключение

Лабораторными исследованиями установлено, что в зерне у образцов разных видов люпина сумма 3 алкалоидов (люпанина, спартеина, люпинина) колебалась от 0,016 до 0,055 %, при среднем значении 0,027 %, в том числе у образцов узколистного люпина от 0,016 до 0,037 %, белого – от 0,03 до 0,055 %, желтого – от 0,045 до 0,05 %.

Для совершенствования селекции люпина были привлечены новые методики. Был использован маркерный анализ образцов люпина узколистного по наличию гена *iucundus*, ассоциируемого с признаком пониженного содержания алкалоидов. При этом у всех исследуемых образцов выявлены культурные алели.

Последующая лабораторная проверка исследуемых образцов люпина узколистного показала преобладание (85 % от исследуемого количества) образцов с низким содержанием алкалоидов в семенах 0,025...0,099%. С высоким (0,4–1,0 %) и очень высоким (более 1,0 %) содержанием алкалоидов в семенах образцов не выявлено, что свидетельствует о правильно подобранном исходном материале и эффективной системе браковки форм с высоким содержанием алкалоидов. Полученные селекционные образцы в перспективе могут быть использованы для получения сортов люпина пищевого назначения.

Литература

1. Alkaloid-analysis-in-lupins FiBL 2024 [Electronic resource]: https://www.legumehub.eu/wp-content/uploads/2024/02/Alkaloid-analysis-in-lupins_FiBL_2024.pdf – Date of access: 14.02.2025.
2. Wink M. A summary of 30 years of research in lupins and lupin alkaloids. Lupin crops: an opportunity for today a promise for the future // Proc. 13th Int. Lupin Conf. Poznan, 2011. Pp. 225–228.
3. Руцкая, В. И., Тимошенко Е. С. Алкалоиды люпина и способы снижения их содержания. (Обзор). Известия НВ АУК. 2023. 3(71), 573–584. DOI: 10.32786/2071-9485-2023-03-56.
4. Li X., Yang H., Buirchell B., Yan G. Development of a DNA marker tightly linked to low-alkaloid gene *iucundus* in narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.). // Crop Past Sci, – 2011. – N 62. – P. 218–224.
5. Frick, K.M.; Foley, R.C.; Kamphuis, L.G.; Siddique, K.H.M.; Garg, G.; Singh, K.B. Characterization of the genetic factors affecting quinolizidine alkaloid biosynthesis and its response to abiotic stress in narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Plant Cell Environ.* 2018, 41, 2155–2168.

6. Cowling, W.A.; Huyghe, C.; Swiecicki, W. Lupin breeding. In *Lupins as Crop Plants: Biology, Production and Utilization*; Gladstones, J., Atkins, C.A., Hamblin, J., Eds.; CAB International: London, UK, 1998; pp. 93–120.

7. Abraham E. M. The Use of Lupin as a Source of Protein in Animal Feeding: Genomic Tools and Breeding Approaches [Electronic resource] / Eleni M. Abraham, I. Ganopoulos, P. Madesis, A. Mavromatis [and others.] <https://www.mdpi>.

8. Bunsupa, S.; Yamazaki, M.; Saito, K. Quinolizidine alkaloid biosynthesis: Recent advances and future prospects. *Front. Plant Sci.* 2012, 3, 239.

9. Hane, J.K.; Ming, Y.; Kamphuis, L.G.; Nelson, M.N.; Garg, G.; Atkins, C.A.; Bayer, P.E.; Bravo, A.; Bringans, S.; Cannon, S.; et al. A comprehensive draft genome sequence for lupin (*Lupinus angustifolius*), an emerging health food: Insights into plant-microbe interactions and legume evolution. *Plant Biotechnol. J.* 2017, 15, 318–330.

10. Nelson, M.N.; Moolhuijzen, P.M.; Boersma, J.G.; Chudy, M.; Lesniewska, K.; Bellgard, M.; Oliver, R.P.; Swiecicki, W.; Wolko, B.; Cowling, W.A.; et al. Aligning a new reference genetic map of *Lupinus angustifolius* with the genome sequence of the model legume, lotus japonicus. *DNA Res.* 2010, 17, 73–83.

IMPROVEMENT OF LUPINE BREEDING FOR ALKALOID CONTENT IN GRAIN

M.N. Kritsky, E.L. Dolgova, N.V. Anisimova, A.A. Kozlovsky, I.V. Yushkevich

The paper presents the results of breeding of narrow-leaved, yellow and white lupine for alkaloid content in grain. It is shown that, when creating lupine varieties, one of the important monitored indicators is low alkaloid content. Due to the research it was established that the sum of 3 alkaloids (lupanine, sparteine, lupinine) fluctuated from 0.016 to 0.055% with an average value of 0.027% in the grain of breeding and collection samples of lupine species, including narrow-leaved lupine samples from 0.016 to 0.037%, white - from 0.03 to 0.055%, yellow - from 0.045 to 0.05%. Improvement of traditional breeding methods for selecting lupine on low alkaloid content by using the marker analysis of genes, controlling the manifestation of the “seed alkaloid content” trait, made it possible to identify promising samples of narrow-leaved lupine.

УДК 633.321:631.559

КОРМОВАЯ И СЕМЕННАЯ ПРОДУКТИВНОСТЬ НОВОГО РАННЕСПЕЛОГО СОРТА КЛЕВЕРА ЛУГОВОГО ЯТВЯГ

Е. И. Чекель, Л. В. Володькина, А. А. Боровик, И. А. Черепок,
кандидаты с.-х. наук

РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию»
(Дата поступления статьи в редакцию 08.04.2025)

Рецензент: Лужинский Д.В., кандидат с.-х. наук

Аннотация. В статье приведены трехлетние результаты изучения конкурсного сортоиспытания клевера лугового по хозяйственно ценным признакам, высокой продуктивности сухого вещества и семян. Выделен перспектив-