

УДК: 633.521: 631.527.8

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ГЕНОТИПОВ ЛЬНА МАСЛИЧНОГО ПО КРИТЕРИЯМ ВНУТРЕННЕЙ ПОЛИМОРФНОСТИ

С. В. ЕГОРОВ, О. А. ПОРХУНЦОВА

УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия»,
г. Горки, Республика Беларусь, 213407, e-mail: esv-grk@mail.ru; botanika_bgsha@mail.ru

(Поступила в редакцию 27.06.2019)

В статье представлены результаты, полученные на основе изучения внутренней гетерогенности сортов льна масличного, идентифицированной на основе метода специфичности белковых маркерных признаков семян. Проанализированный генофонд льна масличного обладает высоким потенциалом генетической изменчивости и определенным уровнем полиморфности, что подтверждено наличием биотипического разнообразия в структуре популяции сорта. По уровню гетерогенности селекционный материал льна масличного был разделен на слабополиморфные (в пределах одного биотипа), среднеполиморфные (двух биотипов) и высокополиморфные (свыше двух биотипов) генотипы.

Проведена оценка динамики ранее установленной внутренней гетерогенности селекционных образцов льна масличного, анализ степени сохранения их аутентичного генетического свойства в условиях репродукции северо-восточной части Республики Беларусь. Детально проанализированы поколения генотипов льна масличного разных лет репродукции и различного эколого-географического происхождения. Градация внутренней гетерогенности, выраженная разным числом биотипов в генотипе, критериями выраженности белковых компонентов по зонам электрофоретического спектра, не являются константной величиной по уровню, соответствующему аутентичному значению. Вариации подтверждены частотой встречаемости отдельных биотипов, составляющих структуру генотипов льна. Результаты исследований могут быть использованы в процедурах оценки и контроля внутренней структуры сортов льна масличного в ходе селекционных алгоритмов и семеноводства данной сельскохозяйственной культуры.

Ключевые слова: лен масличный, биотип, белковые маркеры, гетерогенность, электрофорез.

The article presents the results obtained by studying the internal heterogeneity of varieties of oil flax, identified on the basis of the method of specificity of protein marker traits of seeds. The analyzed gene pool of oil flax has a high potential for genetic variation and a certain level of polymorphism, which is confirmed by the presence of biotypic diversity in the structure of the variety's population. In terms of heterogeneity, the selection material of oil flax was divided into weakly polymorphic (within the same biotype), medium polymorphic (two biotypes) and highly polymorphic (more than two biotypes) genotypes.

We have estimated the dynamics of the previously established internal heterogeneity of selection samples of oil flax, analyzed the degree of preservation of their authentic genetic properties in the conditions of reproduction of the north-eastern part of the republic of belarus. We have analyzed in detail generations of oil flax genotypes of different years of reproduction and various ecological and geographical origin. The gradation of internal heterogeneity, expressed by a different number of biotypes in the genotype, by the criteria for the expression of protein components in the zones of electrophoretic spectrum, is not a constant value in terms of the level corresponding to the authentic value. Variations are affected by the frequency of occurrence of individual biotypes that make up the structure of flax genotypes. The research results can be used in the assessment and control of the internal structure of varieties of oil flax in the course of breeding algorithms and seed production of this crop.

Key words: oil flax, biotype, protein markers, heterogeneity, electrophoresis.

Введение

Процесс создания новых сортов растений, отвечающих актуальным требованиям сельскохозяйственного производства, на сегодняшний день основывается на использовании новых селекционных алгоритмов, методов оценки и многообразия генетических ресурсов сельскохозяйственной культуры. Важность сохранения, объективной оценки и использования генетических ресурсов при создании новых сортов сельскохозяйственных растений напрямую связана с обеспечением продовольственной и экономической безопасности. В этой связи особенно актуальным является применение методов, имеющих селекционно-генетическую интерпретацию, получаемых на их основе результатов и оптимизирующих селекционные алгоритмы в целом.

С использованием методов специфичности белковых маркерных признаков стало возможным проведение скрининга генофонда сельскохозяйственной культуры и оценок степени ее популятивности. Также появилась возможность описания критериев

внутренней структуры и детерминированных свойств растительных популяций, выявления их генетической структуры для последующего применения в ходе селекционного процесса, при семеноводстве и репродуцирование в производственных условиях различных экологических зон. Исследования в области применения белковых маркеров семян для оценки генофонда селекционных форм льна масличного уже проводились [1–3]. Однако необходимо расширение спектра оцениваемых генотипов для охвата максимального разнообразия селекционно-ценных форм.

Несмотря на то, что для льна масличного, как типичного представителя самоопылителей, уровень генетического полиморфизма находится на низком уровне, оценка и контроль скрытой изменчивости, фенотипически не выявляемой, являются необходимыми этапами современного селекционного процесса [3, 4]. Одним из наиболее важных элементов, который следует учитывать при проведении идентификации генотипов льна и мониторинге его селекционных форм, является генетическая гетерогенность сортов, идентифицируемая на уровне запасных белков в виде отсутствия единообразия белковых спектров в исследуемом образце того или иного генотипа [5, 6].

Наличие и соотношение биотипов в растительной популяции обусловлено конкретной реализацией генетической природы в определенном ареале возделывания, что может быть выражено в отношении всех биотипов составляющих структуру сорта [7].

В результате нескольких исследований было установлено, что биотипы в процессе репродукции сорта могут менять структурное соотношение в нем и даже элиминировать из-за влияния антропогенного фактора и проявления естественного отбора в процессе формирования сортовой популяции [1–4, 6–9]. Кроме этого, достоверно установлено, что в процессе репродуцирования изменяется генетическая конституция семян, определяемая числом и содержанием белковых биотипов в сравнении с этими же параметрами у оригинальных семян, что ведет к переориентации структуры сорта [9–11].

Наличие разнородной внутренней структуры растительных популяций создает предпосылки к результативному использованию в селекционных алгоритмах резерва популяционной изменчивости льна масличного, что неоднократно было использовано на подсолнечнике, зерновых и других культурах [12–14].

С использованием методов анализа белковых маркерных признаков семян существует возможность точного выделения биотипов, которые являются генетически различными и могут быть идентифицированы на морфологическом уровне. Такие биотипы могут составлять запасы генетической изменчивости, контролируемые рецессивностью генов, эпистатическим их взаимодействием, плейотропией и др. [15].

Проблема поиска оптимальных маркирующих систем для селекционных целей, объективной идентификации генотипов и оценки межсортовых различий новых сортов сельскохозяйственных культур имеет в настоящее время особую актуальность [16]. Традиционно используемые методы оценки структуры популяции, основанные на анализе комплекса селекционных и морфологических признаков, несомненно, являются информативными и надежными в плане идентификации сортов [17]. Однако в ряде случаев для точной оценки структуры генотипа, скрининга коллекционных форм и оценки гибридного потомства, начиная с поколений F_1 , требуется использование дополнительных идентифицирующих критериев и методов, имеющих точную генетическую интерпретацию [18].

Основная часть

Исследования проводились в 2017–2018 гг. с включением для анализа селекционных образцов льна масличного, характеризующихся различным эколого-географическим происхождением. Лабораторные исследования с применением метода белковых маркеров проводились на базе испытательной лаборатории качества семян УО БГСХА.

Для оценки внутренней гетерогенности сортов льна, анализа ее динамики по годам репродуцирования использовалась унифицированная методика анализа запасных белков семян льна масличного с фракционированием последних методом электрофореза на полиакриламидном гелевом носителе (ПААГ) [2, 3].

Каждый сортовой образец анализировался в выборке из 50 семян, индивидуально по каждому генотипу. Семена освобождались от оболочки и зародыша, размолотый субстрат

обезжиривался кратным раствором охлажденного до -20,0 °С ацетона при постоянном перемешивании с осаждением солей раствором трихлоруксусной кислоты.

Для экстракции глобулинов применялся 5,0 М раствор NaCl в смеси со стабилизирующим агентом для нанесения белков, включающим лидирующий краситель. Для полной диссоциации молекул 11S и 12S глобулинов использовался SDS-электрофорез в присутствии меркаптоэтанола. Электрофоретическое фракционирование белковых фракций проводилось по типу SDS-PAGE по Лэммли с переменными параметрами. В качестве маркеров молекулярных масс для точной оценки величин R_f белковых компонентов использовались стандартные маркер-растворы белков «Thermo Scientific».

В результате полученных данных, основанных на детальном изучении генотипов льна масличного, был проведен анализ характера и направленности изменчивости внутренней структуры генотипов, которые были установлены в ранее проведенных исследованиях [1, 4]. Анализу были подвергнуты целый ряд оценочных качественных и количественных характеристик белковых спектров, имеющих отношение к данным исследованиям: число компонентов, относительная подвижность компонентов, характер выраженности компонентов (доза гена), идентичность сочетаний компонентов.

Полученные электрофоретические спектры индивидуальных семян генотипов льна масличного были разделены на группы, имеющие одинаковый компонентный состав, т. е. на биотипы с оценкой частот их встречаемости в суммарной сортовой выборке. Поскольку исследовались генотипы разных лет репродукции и уровней внутренней полиморфности, было предположено, что направленность сдвигов в отношении числа и частот биотипов будут иметь разнонаправленный характер.

Результаты проведенной оценки свидетельствуют о том, что практически весь проанализированный набор генотипов льна масличного имеет запас скрытой генетической изменчивости и характеризуется определенным уровнем полиморфности, выраженной через представленность биотипов (типов) в структуре сортовой популяции.

При анализе индивидуальных генотипов льна было выделено несколько категорий относительно уровня гетерогенности – слабополиморфные, среднеполиморфные и высокополиморфные. Степень гетерогенности оценивалась в зависимости от числа идентифицируемых белковых биотипов: для слабополиморфных – в пределах одного биотипа, среднеполиморфных – двух биотипов, высокополиморфные имели в своем составе более двух биотипов.

Как правило, первый биотип является основным и составляет основную долю в сорте на уровне 60–75 %. В группе высокополиморфных сортов, соотношение неосновных биотипов чаще всего находится в равных долях и составляет 10–20 %.

Для оценки динамики внутренней структуры генотипов и анализа направленности ее сдвигов, были рассчитаны величины отклонений (в % отношении) от исходного, аутентичного уровня, характерного для оригинальной сортовой популяции. Сдвиг уровня гетерогенности оценивался в разрезе изменчивости суммарного числа биотипов популяции в сравнении с исходным уровнем. Данные критерии так же были использованы для характеристики сохранения генетической конституции форм в ходе естественного репродуцирования (таблица).

Динамика внутренней полиморфности сортов льна масличного

№ п.п	Сорт	Год репродуцирования	Содержание идентифицированных биотипов, %			Максимальное отклонение по биотипам, %
			I	II	III	
1	Салют	2017	78	22	–	-13/+13
		2018	65	35	–	
2	Визирь	2017	85	15	–	-2/+2
		2018	83	17	–	
3	Илим	2017	71	29	–	+17/-17
		2018	88	12	–	
4	Опус	2017	100	–	–	0/0
		2018	100	–	–	
5	Айсберг	2017	84	16	–	-24/+24
		2018	60	40	–	
6	Амон	2017	74	26	–	-4/+4
		2018	70	30	–	
7	Сонечны	2017	48	39	13	+12/-13
		2018	60	40	–	
8	Balladi Toll	2017	87	13	–	-27/+27

		2018	60	40	–	
9	Barbara	2017	72	28	–	-2/+2
		2018	70	30	–	
10	Bilstar	2017	100	–	–	0/0
		2018	100	–	–	
11	Bilton	2017	56	24	20	-2/+2
		2018	54	26	20	
12	Hazeldeum	2017	67	33	–	+3/-3
		2018	70	30	–	
13	Kaolin	2017	74	26	–	-14/+14
		2018	60	40	–	
14	L-26	2017	100	–	–	0/0
		2018	100	–	–	
15	LM-97	2017	85	15	–	-20/+20
		2018	65	35	–	
16	Mc. Duff	2017	60	35	5	0/-13
		2018	60	22	18	
17	Prairie Blue	2017	65	21	14	-3/+3
		2018	62	21	17	
18	Redwing	2017	100	–	–	0/0
		2018	100	–	–	
19	Victory	2017	52	35	13	+8/+2
		2018	60	25	15	

Примечание. «-13/+13» – в числителе сдвиг по основному биотипу, в знаменателе сдвиг по вторичным биотипам.

Количество и содержание биотипов в сорте зависит от года репродукции и экологических условий выращивания. В качестве основных причин изменения числа и соотношения биотипов в сорте в процессе репродуцирования является искусственный сдвиг популяции в сторону преобладания тех или иных биотипов и проявление естественного отбора.

Наличие и соотношение биотипов сорта обусловлено конкретной реализацией генетической природы сорта в определенном ареале возделывания, поэтому варьирование в соотношении биотипов может распространяться и как типичный случай, что сопряжено с переориентацией сортовых формул [9].

Как свидетельствуют данные таблицы, внутренняя структура сорта не является величиной постоянной и подвержена вариабельности в разрезе периодов репродуцирования. Направленность сдвигов частот биотипов сорта, имеет неоднозначный и разнонаправленный характер, как в разрезе анализируемого набора сортов, так и периодов возделывания. В большей степени это относится к биотипам основной группы, которые обладают преобладающими частотами встречаемости у оригинального генотипа.

Характеристика сдвигов структуры биотипов, структуры внутренней гетерогенности складывается преимущественно из следующих показателей: изменения частот основных и вторичных биотипов в суммарной популяции, общего сдвига внутренней гетерогенности.

Оценка характера и направленности сдвигов по биотипам показала, что в свыше половины определений частоты проявления биотипов основной группы обладают тенденцией к уменьшению. Размах величин отрицательных сдвигов по данной группе биотипов составил от -2 % (Визирь, Barbara, Bilton) до -20–27 % (Айсберг, Balladi Toll, LM-97).

Свыше 20 % проанализированных форм характеризовались увеличением частот содержания основного биотипа в разрезе лет репродуцирования с размахом изменчивости от +3 % (Hazeldeum) до +17 % (Илим).

Следует отметить, что наибольшие величины сдвигов частот основного биотипа были определены по среднеполиморфным генотипам, включающим в структуру сортовой популяции до двух белковых типов. Тогда как по генотипам, обладающим наличием трех белковых биотипов, величины сдвигов от уровня оригинальных форм оказались минимальными.

По сортам с идентифицированной внутренней мономорфной структурой, состоящей из одного белкового типа, была установлена константность в проявлении как частот встречаемости биотипов, так и их общего количества – базового критерия внутренней

полиморфности. Идентичная особенность была определена у основного биотипа полиморфного сорта *Ms. Duff*, сохранившего константность в уровне содержания и общей полиморфности популяции сорта.

Результаты оценки динамики вторичных биотипов показали, что в большинстве определений направленность сдвигов характеризовалась увеличением их частот в суммарной популяции сорта в разрезе лет испытаний. Диапазон варьирования в данном случае, находился в пределах от +2 % (Визирь, *Barbara*, *Victory*) до +24–27 % (Айсберг, *Balladi Toll*). Установлено, что увеличение доли данных биотипов в структуре сортовой популяции происходит в тех случаях, когда идентифицируются сдвиги в частотах основных биотипов сорта. В данном случае растительная популяция ведет себя как сбалансированная и регулируемая система с сохранением присущей ей внутренней структуры и реакцией отдельных структурных элементов (биотипов) на условия среды.

В качестве факторов, дестабилизирующих внутреннюю структуру популяции сорта в условиях естественного репродуцирования, чаще всего выступают условия вегетации, которые не определяются по фенотипу и не связаны с понижением продуктивности биотипа на уровне его отдельных растений, сохраненных в посеве.

Отрицательные сдвиги в частотах встречаемости вторичных биотипов установлены в 26 % определений с размахом в пределах от -3 % (*Hazeldeum*) до -17 % (Илим).

Следует отметить, что выявленная особенность по оцениваемым критериям внутренней структуры генотипов характерна для высокополиморфных форм. В данном случае установлены либо незначительные сдвиги частот биотипов третьей группы, либо полная их элиминация из состава сортовой популяции (Сонечны).

В целом несмотря на выявленные разнонаправленные сдвиги частот встречаемости белковых биотипов в рамках представленного сортового потенциала и периодов репродуцирования, общие критерии гетерогенности показали высокую степень константности (в 95 % определений), что может свидетельствовать о сбалансированной и стабильной внутренней структуре генотипов льна масличного. В качестве критерия, характеризующего генетическую конституцию анализируемых генотипов льна масличного, были использованы показатели количества и частоты встречаемости базовых биотипов в оригинальной популяции сорта. Поскольку оцениваемый показатель внутренней структуры генотипа определяется в большей степени присутствием первого (основного) биотипа, величину сохранности генетической конституции к исходному уровню определяли именно по данному биотипу (рисунок; нумерация образцов соответствует нумерации в таблице).

Оценка соответствия генетической конституции, как дополнительного критерия стабильности внутренней структуры сортовой популяции, выявила довольно высокий уровень константности по большинству оцененных генотипов. Отклонения от аутентичного уровня в данном случае не превышали 20 %, что является свидетельством высокой сохранности внутренней генетической конституции [1, 2, 9, 16]. Исключением являлся сорт Сонечны, обладающий определенным сдвигом внутренней полиморфности в сравнении с оригинальным уровнем.

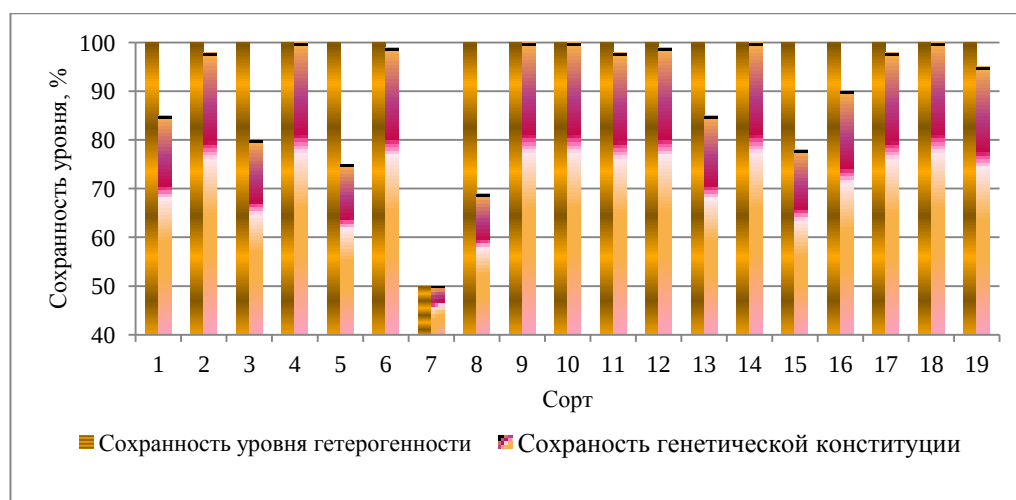


Рис. Сохранность критериев внутренней структуры генотипов льна масличного (2017–2018 гг.)

Таким образом, при репродуцировании полиморфных сортов льна масличного может изменяться соотношение и частоты биотипов, составляющих структуру популяции, вплоть до элиминации отдельных биотипов. Причем характер этих изменений может носить неравнозначный характер: однонаправленное увеличение или уменьшение доли основного биотипа, или незначительные колебания в пределах, характеризующих сохранность генетической конституции.

Закключение

По результатам исследований установлено, что внутренняя структура сортов, представленная разной частотой и числом белковых биотипов, не является величиной постоянной и подвержена динамике в разрезе периодов репродуцирования. Частота содержания белковых биотипов может изменяться как в отрицательную, так и положительную сторону, что может привести к варьированию генетической конституции сортовой популяции в сравнении с аутентичным уровнем. Установленный факт элиминации отдельных биотипов является предпосылкой к сдвигу внутренней гетерогенности сорта, переопределению сортовых формул. Оценка и мониторинг внутренней генетической гетерогенности самоопыляемых культур особенно важны в случаях воздействия на сортовую популяцию стрессовых или нетипичных внешних условий. Установлена возможность использования белковых молекулярных маркеров в качестве дополнительного метода оценки селекционно-ценных форм льна масличного.

ЛИТЕРАТУРА

- Егоров, С. В. Оценка внутренней структуры генотипов льна масличного на основе белковых маркеров семян / С. В. Егоров, Н. А. Дуктова // Вестник Белорусской государственной сельскохозяйственной академии. – 2015. – № 4. – С. 48–53.
- Использование белковых маркеров семян в селекции и семеноводстве льна масличного: рекомендации / Н. А. Дуктова [и др.]. – Горки: БГСХА, 2015. – 58 с.
- Н. А. Семена льна. Идентификация и оценка качества на основе белковых маркеров: методика определения и краткий каталог белковых формул / Н. А. Дуктова [и др.]. – Горки: БГСХА, 2015. – 54 с.
- Егоров, С. В. Критерии дифференциации и внутренней гетерогенности генотипов льна масличного на основе оценки методом молекулярно-биохимических маркеров / С. В. Егоров, Н. А. Дуктова // Вестник Белорусской государственной сельскохозяйственной академии. – 2014. – №4. – С. 125–131.
- Молчан, И. М. Структура и изменчивость сорта пшеницы по признаку остистости / И. М. Молчан, Т. В. Лезжова // Проблемная селекции сортов мягкой яровой пшеницы интенсивного типа. – Новосибирск, 1980. – С. 32–36.
- Созинов, А. А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции / А. А. Созинов. – М.: Наука, 1985. – С. 256–285.
- Булатова, К. М. Электрофоретический спектр глютенина, как биохимический показатель внутрисортного полиморфизма пшеницы по запасным белкам / К. М. Булатова // Биохим. показатели в селекции зерновых культур. – Алма-Ата, 1986. – С. 14–23.
- Конарев, В. Г. Белки пшеницы / В. Г. Конарев. – М.: Колос, 1980. – С. 325–350.
- Абугалиева, А. И. Количество зерновых биотипов пшеницы / А. И. Абугалиева // Вестник сельскохозяйственной науки. Казахстан. – 1984. – № 5. – С. 29–33.
- Демкин, П. П. Сортная идентификация семян / П. П. Демкин // Семеноводство зерновых культур: агроэкология, организация, технология. – М., 1988. – С. 168–173.
- Поморцев, А. А. Идентификация и оценка сортовой чистоты семян ячменя методом электрофоретического анализа запасных белков зерна (теория вопроса, методика электрофореза, каталог электрофореграмм современных сортов

ячменя, допущенных к использованию в Российской Федерации) / А. А. Поморцев, Е. В. Лямина. – М.: МСХА, 2003. – С. 75–85.

12. Гундаев, А. И. Применение в селекции методов выделения морфобиологических групп и вредных рецессивных признаков из сортовых популяций подсолнечника / А. И. Гундаев // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции, 1964. – Т. 36. – Вып. 2. – С. 208–228.

13. Лапина, Л. Г. Изучение состава популяции озимой пшеницы сорта Дюрабль с целью разработки методики улучшения этого сорта: автореф. дисс... канд. с.-х. н. / Л. Г. Лапина. – Л., 1953. – 21 с.

14. Умаров, Х. Т. О внутрисортных скрещиваниях кукурузы при использовании родительских форм, растущих на орошении и на богаре / Х. Т. Умаров, М. У. Алимбеков // Сб. тр. аспирантов и молодых сотруд. ВИР. – 1966. – № 7. – С. 109–114.

15. Изучение исходного материала озимой мягкой пшеницы с использованием электрофоретического анализа белков / С. В. Егоров [и др.] // Биологическая продуктивность растений и пути её повышения: сб. науч. тр. БГСХА – Горки: БГСХА, 1999. – С. 41–46.

16. Долгова, Е. Л. Оценка межсортной однородности и отличий у новых сортов озимой пшеницы с использованием различных маркирующих систем / Е. Л. Долгова, И. К. Коптик // Земляробства і ахова раслін. – 2010. – № 2. – С. 23–26.

17. Методика по испытанию сортов растений на отличимость, однородность и стабильность. – Минск, 2004. – 44 с.

18. Конарев, А. В. Использование молекулярных маркеров в работе с генетическими ресурсами растений / А. В. Конарев // Аграрная Россия. – № 6. – 2002. – С. 4–23.