

УДК: 633.521:631.52

ОЦЕНКА ГЕНОТИПОВ ЛЬНА МАСЛИЧНОГО ПО КРИТЕРИЯМ ВНУТРЕННЕЙ СТРУКТУРЫ НА ОСНОВЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ СЕМЯН

С. В. ЕГОРОВ, О. А. ПОРХУНЦОВА

УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия»,
г. Горки, Республика Беларусь, 213407

(Поступила в редакцию 22.10.2019)

Современная селекционная работа со льном масличным в полной мере ориентирована на использование новейших достижений в области генетических, биохимических и физиологических исследований, что позволяет проводить качественный скрининг исходного селекционного материала, новых созданных генотипов данной культуры, необходимый для создания адаптированных, высокопродуктивных сортов. Однако, актуальными, нерешенными являются вопросы маркирования ценных генотипов льна, оценки внутренней структуры и выравнивания его коллекционных и гибридных форм на основе методов, обеспечивающих достаточно высокую точность и возможность селекционно-генетической интерпретации получаемых результатов.

В статье представлены результаты, полученные на основе практического использования метода электрофоретического анализа белков семян льна масличного. Установлены критерии дифференциации сортов и выделения биотипов в их структуре. Образцы льна масличного различаются уровнем общей компонентной представленности спектра белка, числом компонентов, определяющих сортоспецифичность и внутрисортную дифференциацию, а также степенью подвижности белковых компонентов в спектре. Определена группа редких с единичной представленностью белковых компонентов (25, 31, 45, 62, 70, 79, 80, 85, 90, 95), которые в дальнейшем будут использованы в качестве маркеров. Среди генотипов льна масличного уникальные маркерные белковые компоненты составляют 8–10 %. Сортоспецифичность может быть определена отсутствием определенного белкового компонента, обладающего высокой встречаемостью в других генотипах льна масличного. Таким признаком обладают сорта Сонечны, Prairie Blue, Салют, Илим, Айсберг и Bilstar.

Ключевые слова: лен масличный, генотип, биотипы, сортоспецифичность, молекулярные белковые маркеры.

Modern breeding work with oil flax is fully focused on the use of the latest achievements in the field of genetic, biochemical and physiological studies, which allows high-quality screening of the original breeding material, new created genotypes of this crop, necessary to create adapted, highly productive varieties. However, the issues of labeling valuable flax genotypes, assessing the internal structure and alignment of its collection and hybrid forms based on methods that ensure sufficiently high accuracy and the possibility of selection and genetic interpretation of the obtained results are unresolved.

The article presents results obtained on the basis of practical use of the method of electrophoretic analysis of proteins of oil flax seeds. We have established criteria for the differentiation of varieties and allocation of biotypes in their structure. Oil flax samples differ in the level of the total component representation of the protein spectrum, the number of components determining the variety specificity and intra-variety differentiation, as well as the degree of mobility of protein components in the spectrum. A group of rare protein components with a single representation (25, 31, 45, 62, 70, 79, 80, 85, 90, 95) was determined, which will be used as markers in the future. Among oil flax genotypes, unique marker protein components make up 8–10%. The variety specificity can be determined by the absence of a certain protein component, which has a high occurrence in other genotypes of oil flax. Such signs are possessed by the varieties sonechny, prairie blue, salut, ilim, iceberg and bilstar.

Key words: oil flax, genotype, biotypes, variety specificity, molecular protein markers.

Введение

Наиболее приемлемыми формами маркирующих систем, позволяющих оценить скрытую, внутреннюю структуру генотипов растений и его особенности, являются молекулярно-генетические и биохимические методы, сочетающие в себе необходимые алгоритмы и критерии для точной и достоверной оценки. Поэтому оценка внутренней структуры генотипов льна масличного на основе молекулярных белковых маркеров, проводимая с использованием метода белковых маркеров семян, является важным и необходимым звеном в современной успешной селекционной работе с любой сельскохозяйственной культурой.

Любая растительная популяция неоднородна по своему составу и включает фенотипические сходные компоненты, объединяемые в биотипы. Для идентификации биотипов в растительных популяциях активно используются методы молекулярных белковых маркеров, имеющих строгую генетическую детерминированность и интерпретацию.

Широко признание имеет метод оценки внутренней структуры популяции и идентификации генотипов растений по электрофоретическим спектрам запасных белков семян [2, 3]. Данный метод многократно апробирован, успешно используется для определения сортовой специфичности и идентификации по белковым проламинавым профилям у злаковых [1–2, 7, 11, 13], бобовых растений [6], кукурузы [12] и сахарной свеклы [10, 15–16].

Лен масличный в данном направлении изучен недостаточно. Выявлена сортовая специфичность белковых спектров. Установлено, что сорта, неустойчивые к грибковым заболеваниям, имеют наименьшее количество специфических фракций [5]. Успешно определена связь между биологическими свойствами сортов льна и конкретными белковыми компонентами на электрофореграммах [8, 9]. В области исследований белковых фракций семян льна культурного, полученных с применением различных методов экстракции, гель-фильтрации и электрофореза, имеются единичные сведения. По белковому составу у льна культурного определено наличие трех основных групп полипептидов во всех фракциях [9]. В научной литературе отсутствуют сведения о применении метода электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях с целью идентификации сортов льна, изучение электрофоретических спектров запасных белков, определения сортовой специфичности.

В настоящее время методы дифференциации и идентификации сортов сельскохозяйственных растений базируются на оценке соответствующего набора морфологических признаков. По мере создания все большего сортового разнообразия, существующей их общности на генетической основе, расширения спектра коллекционных форм, морфологических признаков для оценки внутренней структуры и идентификации генотипов становится крайне недостаточно.

Поэтому наряду с традиционными методами оценки на уровне морфологических признаков растений разрабатываются молекулярные методы, обеспечивающие тестирование внутренней структуры и определяющие подлинность семян. Точность постановки и воспроизводимости данных методик являются главными требованиями, которыми всегда руководствуются в селекции и семенном контроле [11, 13].

С появлением этих методов стало возможным найти более точные и константные критерии оценки на уровне семян. По белковому спектру надежно устанавливаются показатели внутренней полиморфности, генетической конституции и сортовой чистоты, которые являются предпосылкой для формирования и реализации качественного потенциала сорта [1, 6, 12].

Запасные белки семян обусловлены контролем множественных аллелей и поэтому являются ценными для установления различий между генотипами и, соответственно, определению сопряженности спектра с хозяйственно ценными признаками [6].

В Республике Беларусь метод электрофоретического анализа успешно применяется в сортовом контроле зерновых, зернобобовых культур, сахарной свеклы, кукурузы [11, 13]. На сегодня отработана и активно используется отечественная методика молекулярного анализа белков семян льна-долгунца и масличного льна [5]. Белки льна представлены преимущественно альбуминами и глобулинами, характеризующимися полноценным аминокислотным составом. Преобладающим компонентом белкового комплекса семян льна-долгунца являются водорастворимые белки (альбумины), относительное содержание которых составляет примерно половину других групп белков. Доля щелочерастворимых белков (глутелинов) составляет до 13,3 % от общей суммы.

Известно, что сортовая специфичность белков льна растет со специализацией клеток эндосперма семядолей на момент окончательного созревания, что характерно для класса двудольных. В созревших сформированных семенах льна при использовании электрофоретическом разделении их белка на уровне состава полипептидов отражены признаки видовых и сортовых различий, выраженных разными белковыми позициями [4, 9].

Основная часть

В качестве метода исследований использовался электрофоретический анализ запасных белков семян льна масличного с использованием полиакриламидного геля (ПААГ).

Каждый сортовой образец анализировался в выборке семян, индивидуально по каждому генотипу. Семена освобождались от оболочки и зародыша, обезжиривались кратным раствором охлажденного до $-20,0^{\circ}\text{C}$ ацетона при постоянном перемешивании с осаждением солей раствором три-хлор-уксусной кислоты.

Для полной диссоциации молекул глобулинов использовался SDS-электрофорез в присутствии редуцирующего агента – меркаптоэтанола, поскольку полипептиды в субъединицах скреплены S-S связями. В качестве маркеров молекулярных масс для точной оценки белковых компонентов использовались стандартные наборы белков-маркеров (диапазон 10–110 кДа, число идентифицируемых белков – 5). Оценка величин относительной электрофоретической подвижности белковых компонентов (Rf), определяли по отношению к лидирующему красителю.

Селекционный материал для исследования был представлен набором сортов льна масличного различного эколого-географического происхождения (табл. 1).

Для масличного льна спектр дифференцирующих морфологических признаков в ряде случаев является недостаточным, что затрудняет процедуры определения и маркирования генофонда популяций, идентификации селекционно-ценных форм, оценки уровня изменчивости и генетического разнообразия коллекционных генотипов. Проявление фенотипических признаков, несмотря на то, что они являются генетически закрепленными, часто существенно зависит от условий выращивания.

Именно в таких случаях, наряду с традиционными методами дифференциации популяций, идентификации и маркирования, оправдано использование оценок, наиболее приближенных к уровню генотипа, не имеющих зависимости от внешних факторов и обладающих повышенной разрешающей способностью по признакам.

В рамках выполнения данных исследований, была проведена оценка внутренней структуры сортов льна масличного, представляющих контрастные по эколого-географическим условиям регионы селекции и репродукции. Это предусматривает наличие у анализируемых образцов генетически обусловленных различий как по селекционным признакам, так и по сформировавшемуся адаптивному комплексу, имеющему выражение через белковые маркеры.

Базовым результатом анализа генотипов льна масличного на начальном этапе являлся белковый электрофоретический спектр, содержащий уникальную индивидуальную характеристику каждого проанализированного семени в виде белковых компонентов разной подвижности и степени интенсивности.

Спектральный состав белков льна можно разграничить по позициям, которые связаны с дифференцирующими или идентификационными критериями. К числу таких позиций относятся:

- частота встречаемости отдельных компонентов белкового спектра;
- общая представленность белкового спектра сорта;
- общие и уникальные позиции белкового спектра.

Таблица 1. Характеристика отличительных позиций при межсортовом сравнении сортов льна масличного

№ п/п	Сорт	Страна (оригинатор)	Число компонентов по критериям, ед.			Общее количество компонентов	Rf маркеров
			уникальные	отсутствующие	различия интенсивности		
1	Салют	РБ	2	2	1	21	0,51; 0,74;
2	Визирь	РБ	2	1	2	18	0,40; 0,74
3	Илим	РБ	2	2	3	26	0,22; 0,68
4	Опус	РБ	1	1	2	20	0,35
5	Айсберг	Украина	3	2	2	21	0,32; 0,44; 0,75
6	Амон	Чехия	2	1	1	19	0,63; 0,68
7	Сонечны	РБ	2	2	2	23	0,25; 0,45;
8	Ball Toll	Канада	2	1	2	23	0,24; 0,64
9	Barbara	Нидерланды	2	1	3	24	0,26; 0,56
10	Bilstar	Нидерланды	1	3	2	22	0,52
11	Bilton	Нидерланды	1	1	3	19	0,43
12	Hazeldeum	Австралия	2	-	-	26	0,40; 0,64;
13	Kaolin	Франция	2	1	3	19	0,46; 0,65
14	L-26	Германия	2	1	3	19	0,5; 0,45
15	L-43	Германия	1	1	3	20	0,51
16	LM-97	Россия	2	1	2	21	0,55; 0,75
17	Mc Duff	Канада	2	1	2	24	0,34; 0,47
18	Prainie Blue	Канада	3	3	2	22	0,14; 0,23; 0,92
19	Redwing	США	2	1	2	20	0,62; 0,78;
20	Victory	США	1	1	-	25	0,55;

В спектре проанализированных сортов льна выявляется четкая дифференциация по целому ряду критериев белкового спектра, характеризующих особенности внутренней структуры генотипа (табл. 1). Исследуемые сорта и образцы имеют разный уровень общей компонентой представленности спектра белка, различаются числом сортоспецифичных компонентов, компонентов внутрисортовой дифференциации, а также размахом величин их относительной подвижности в спектре.

Общее число компонентов белка на спектре находилось в границах от 19 до 26 единиц с группировкой по трем зонам спектра – «А», «В» и «С», что зависит от частоты встречаемости компонентов и их информативности. К зоне «А» относят компоненты спектра с порядковыми номерами от 1 до 19. Зона «В» включает компоненты с порядковыми номерами в пределах от 19 до 80. Зона «С» представлена порядковые номера компонентов от 81 до 95. По результатам исследований установлено, что наибольший уровень различий между сортами и биотипами определяется в зоне «В» спектра в сочетании с высокой информативностью идентифицируемых компонентов данной зоны.

Выявленная грация генотипов по суммарному числу белковых компонентов спектра, может служить дополнительным критерием оценки разных адаптивных способностей форм в условиях региона.

Наибольший интерес для селекционных целей представляет группа белковых компонентов, характеризующихся как уникальные, имеющие единичную представленность по определенным генотипам. Как правило, данные компоненты имеют четкие отличительные характеристики (величины относительной подвижности, степени интенсивности), благодаря чему могут быть использованы в качестве сортовых маркеров. В результате анализа белков семян льна масличного, были выделены редкие, обладающие наибольшей информативностью позиции белковых компонентов – 25, 31, 45, 62, 70, 79, 80, 85, 90, 95.

В среднем частоты проявления маркерных сортовых компонентов находились в диапазоне от 4,0 до 12,5 %, что объясняется наличием четких сортовых маркеров в количестве от 1 до 3.

Наибольшее число таких белковых компонентов идентифицируется по сортам Prainie Blue (13,6 % от общего числа компонентов спектра), Айсберг (14,3 % от общего числа компонентов спектра). В основной выборке генотипов, частоты встречаемости маркерных, уникальных компонентов составляли от 8,0 до 10,0 %. Установлено, что идентифицированные маркеры любого сорта льна характеризуются четкими отличиями,

как по величинам относительной подвижности, что позволяет их однозначно выявлять, так и по степени интенсивности.

Межсортовые отличия сортов и образцов Bilton, Victory, L-43, Bilstar обусловлены наличием только одного сортоспецифичного маркера, расположенного в зоне быстрых белковых фракций с показателем $R_f = 0,30-0,55$.

В ряде случаев критерий межсортовой дифференциации может быть обусловлен отсутствием определенного белкового компонента, имеющего высокую частоту встречаемости по большинству других проанализированных генотипов льна масличного. Данный критерий также может быть использован в качестве дополнительного оценочного элемента при идентификации сортовых отличий, оценке исходного материала в селекции. Высокие частоты встречаемости (9,0–14,0 %) такого критерия имеют сорта Сонечны, Prairie Blue, Салют, Илим, Айсберг и Bilstar. Использование таких форм с «нулевой» представленностью компонентов, кроме непосредственной идентификации генотипа, может быть использовано для оценки полноценности проведенной гибридизации с донором-носителем интересующих признаков и свойств на основе использования принципа кодминирования, присущего характеру наследования запасных белков семян, при котором оба аллеля в полной мере проявляют свое действие.

Часть генотипов льна характеризовались наличием межсортовой дифференциации в зависимости от степени интенсивности белковых компонентов спектра (доза гена). Частоты встречаемости таких компонентов находятся в пределах от 3,7 до 11,5 % от суммарного числа белковых фракций идентифицированных на спектре сорта. Самые высокие частоты встречаемости компонентов (на уровне 11,0–16,0 %) отмечены по сортам Bilton, Илим, Barbara, L-43, Kaolin и L-26.

Полученные электрофоретические спектры индивидуальных семян генотипов льна масличного, были разделены на группы, имеющие одинаковый компонентный состав, т.е. на биотипы. Существующая генетическая гетерогенность популяций сортов растений, в том числе и льна масличного, является важным компонентом биоразнообразия вида и имеет широкое применение в области практической селекции.

Характерной особенностью биотипов является специфичность компонентного состава белков, что может быть использовано как признак идентификации в селекции и семеноводстве льна масличного.

Практически весь проанализированный сортимент льна обладает запасом скрытой генетической изменчивости и характеризуется определенным уровнем полиморфности, которая выражается степенью представленности биотипов в структуре сортовой популяции (табл. 2).

Таблица 2. Критерии внутренней гетерогенности сортов льна масличного

№ п/п	Сорт	Число биотипов, ед.	R_f маркеров биотипов	Число маркеров биотипа, ед.	Содержание основного биотипа, %
1	Салют	2	0,30–0,45	2	78
2	Визирь	2	0,40–0,75	2	85
3	Илим	2	0,30–0,45	2	71
4	Опус	1	0,35	1	100
5	Сонечны	3	0,25–0,40	3	48
6	Айсберг	2	0,30–0,85	3	84
7	Amon	2	0,60–0,70	2	74
8	Ball Toll	2	0,25–0,50	2	87
9	Barbara	2	0,21–0,60	3	72
10	Bilstar	1	0,52	1	100
11	Bilton	3	0,55	4	56
12	Hazeldeum	2	0,26–0,47	2	67
13	Kaolin	2	0,46–0,70	2	74
14	L-26	1	0,50	1	100
15	L-43	1	0,51	1	100
16	LM-97	2	0,50–0,80	3	85
17	Mc Duff	3	0,34–0,50	4	60
18	Prairie Blue	3	0,24–0,54	5	65
19	Redwing	1	0,62	1	100
20	Victory	3	0,65	4	52

Характер представленности типов спектра характеризуется следующими признаками: числом идентифицированных биотипов в структуре сорта и частотой встречаемости в совокупной сортовой популяции. По числу идентифицированных внутрисортовых

биотипов все сорта льна масличного можно разделить на мономорфные, которые содержат только один биотип, и полиморфные, представленные несколькими биотипами.

Группа мономорфных включает незначительное количество сортов (25 % от общей выборки проанализированных образцов). Такими являются сорта Redwing, Опус, L-43, Bilstar, L-26. Группа полиморфных сортов более многочисленна (75 %). Среди полиморфных образцов необходимо выделить высокополиморфные сорта, которыми являются Сонечны, Bilton, Prairie Blue, Victory, Mc Duff. Эти сорта в составе сортовой популяции имеют по три типа белкового спектра.

В результате анализа полученных данных установлено, что внутрисортовая дифференциация генотипов льна масличного обусловлена различиями в идентифицированных белковых компонентах биотипов (по величинам Rf и степени интенсивности) и частотами встречаемости биотипов в выборке. Многие изученные генотипы, за исключением мономорфных, характеризовались в 80 % определений внутрисортовой дифференциацией, которая определена различиями в степени подвижности белковых компонентов. Выявленная особенность льна масличного в проявлении идентифицированных маркеров биотипов объясняется его большей константностью, так как компоненты-маркеры могут быть точно идентифицированы при помощи эталонных маркерных белковых компонентов с известной молекулярной массой.

Заключение

Установлены критерии оценки межсортовых различий проанализированного сорта на основе использования белкового спектра семян льна. Определены критерии оценки внутренней структуры сортовых популяций льна масличного с применением молекулярных маркеров семян.

На основе оценки характера внутренней полиморфности сортов льна масличного идентифицированы биотипы с дифференцирующими параметрами разной категории точности для целей практической селекции.

Выявленные различия сортов и биотипов льна масличного по типам электрофоретического анализа белков семян и частотам их встречаемости являются основой для проведения их надежной дифференциации и идентификации, что определяет существенный вклад в развитие селекционных методов оценки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абугалиева, А. И. Компоненты глиаина и субъединицы глютеина в селекции пшеницы на качество зерна: автореф. дис. ... докт. наук / А. И. Абугалиева. – Алматы, 1994. – 52 с.
2. Бояринова, С. И. Электрофоретические спектры глиаинов ржи / С. И. Бояринова // Весті АН БССР: Сер. Біял. навук. – 1984. – №6. – С.106–108.
3. Gunzell, G. Die Sortendiagnose am Gerstenm. Lechnik und Zuverlässigkeit eines Electrophoreseverfahrens für die praktische Anwendung / G. Gunzell. – Brauwissenschaft. – 1979. – №8. – P. 226–232.
4. Deu, P. Isolation and partial characterization of flax seed (*Linum usitatissimum* L.) proteins / P. Deu, T. Sienkiewicz. – Nahrung, 1986. – № 3/4. – P. 391–393.
5. 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.
6. Белки семян как маркеры в решении проблем генетических ресурсов растений, селекции и семеноводства / А. В. Конарев [и др.] // Цитология и генетика. – 2000, Т. 34. – № 2. – С. 91–104.
7. Конарев, В. Г. Биохимические и молекулярно-генетические аспекты селекции зерновых на белок / В. Г. Конарев // Проблемы белка в сельском хозяйстве. – Москва: Колос, 1975. – С. 131.
8. Kruličková, K. Identifion flax linseed cultivars by isozyme markers / K. Kruličková, Z. Pošvec, M. Griga. – Biologia plantarum, 2002Ю № 45 (3). – S. 327–336.
9. Лапина, Г. П. Электрофоретические спектры семян разных сортов льна / Г. П. Лапина. – Физиология и биохимия культурных растений. – 1989. – Т. 21, № 5. – С. 494–500.
10. Применение белковых маркеров для идентификации селекционных материалов сахарной свеклы. Методические указания / Л. А. Лесневич [и др.]. – СПб., 1991. – 18 с.
11. Петрова, Н. Н. Семена Бобовых. Определение сортовой принадлежности, сортовой чистоты и генетического качества методом электрофоретического анализа запасных белков. Методика определения / Н. Н. Петрова, С. В. Егоров. – Горки: УО БГСХА, 2009. – 24 с.
12. Петрова, Н. Н. Семена кукурузы. Определение уровня гибридности семян гибридов первого поколения и оценка однородности и маркирование инбредных линий. Методика определения / Н. Н. Петрова, С. В. Егоров. – Горки: УО БГСХА, 2009. – 16 с.
13. Петрова, Н. Н. Семена пшеницы и тритикале. Определение сортовой принадлежности, сортовой чистоты и генетического качества методом электрофоретического анализа запасных белков. Методика определения и краткий каталог спектров глиаина / Н. Н. Петрова, С. В. Егоров. – Горки: УО БГСХА, 2009. – 40 с.

14. Sammour, R. H. Proteins of linseed (*Linum usitatissimum* L.), extraction and characterization by electrophoresis / R. H. Sammour. – Botanical Bulletin of Academia Sinica, Vol. 40, 1999. – P. 121–126.
15. СТБ 1759-2007 Семена сахарной свеклы. Определение подлинности гибрида и сортовой принадлежности методом электрофоретического анализа запасных белков 11 S-глобулинов (введен в действие 2007-12-01).
16. Федулова, Т. П. Теоретические и практические аспекты молекулярно-генетического маркирования в селекции сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.): дис. ... д-ра биол. наук: 06.01.05 / Т. П. Федулова. – Рамонь, 2005. – 326 с.