УДК 633.854:577.112.083

ВСТАНОВЛЕННЯ РІВНЯ ПОЛІМОРФІЗМУ КОМПОНЕНТНОГО СКЛАДУ ЗАПАСНИХ БІЛКІВ НАСІННЯ ЛЬОНУ ОЛІЙНОГО В ПОКОЛІННЯХ F_2 та F_3

Ю.О. Махно, І.О. Полякова*

Інститут олійних культур НААН
**Запорізький національний університет*

В статті представлені дані електрофоретичного розподілення запасних білків насіння льону у гібридів F_2 та F_3. Виявлено посилення ступеня гетерогенності за білковим спектром в ряду поколінь. Встановлено значний поліморфізм у прояві білкових компонентів у варіабельних Ia, III, IV, V зонах електрофоретичних спектрів гібридних насінин F_2 та F_3 реципрокних схрещувань комбінації Айсберг × № 20034. Додаткові білкові компоненти на електрофореграмах гібридного насіння даної комбінації були згруповані у 8 та 9 фенотипових класів за принципом присутності-відсутності у варіабельних зонах.

Ключові слова: льон олійний, гібрид F_2, гібрид F_3, насіння, електрофорез, поліморфізм білкових компонентів, успадкування.

Вступ.

Льон олійний є однією з перспективних сільськогосподарських культур, яка застосовується в багатьох галузях промисловості, медицини та продовольства.

Виходячи з основних напрямів використання насіння льону олійного (технічного та харчового), напрями селекційної роботи повинні бути орієнтовані на створення сортів з оптимальним комплексом врожайних і якісних характеристик як для харчового, так і для виробничого використання. Досягнення цих цілей найбільш ймовірно за умови використання в області практичних селекційних програм методів, що дозволяють розкривати внутрішню структуру сортів, ідентифікувати і відстежувати цінні поєднання ознак і властивостей з метою конструювання генотипів із заданими параметрами і властивостями. Одним із сучасних методів, що відповідають даним вимогам, є метод, заснований на використанні запасних білків насіння як молекулярно-біохімічних маркерів генотипів. Роботи з використанням методу білкових маркерів на льоні олійному проводилися у малому обсязі, в зв'язку з чим проблематика відпрацювання, адаптації та практичного впровадження методу біохімічних маркерів насіння є актуальною і затребуваною.

Дослідження з генетики ознак мають інтерес як для теоретичних узагальнень, так і для рішення практичних задач селекції, оскільки результати селекційної роботи в значній мірі визначаються повнотою інформації про генетичний контроль ознак.

Вирішенню цієї задачі сприяє відстеження прояву алельних варіантів запасних білків, які контролюють ці ознаки та встановлення закономірностей їх успадкування при гібридизації. У самозапильників, до яких відноситься льон олійний, популяція доволі швидко досягає рекомбінаційного насичення і блоки

© Ю.О. Махно, І.О. Полякова

білків можуть бути ефективними генетичними маркерами при підборі пар для гібридизації або оцінці незнайомих генотипів [1].

За допомогою гібридологічного аналізу в першому і другому поколіннях гібридів можна встановити закономірності успадкування необхідних ознак, що дозволяє планувати і прогнозувати результати роботи з гібридними поколіннями, керувати генетичними процесами, що відбуваються в гібридних популяціях, розрахувати кількість і частку вищеплення можливих фенотипів та їх різноманітність за генотипом. Підібравши, таким чином, певні пари для схрещування можна передбачити кінцевий результат і вести цілеспрямовану науково-обгрунтовану роботу, домагатися успіху в більш короткий період часу [2].

Ціллю проведених досліджень є виявлення рівня поліморфізму за компонентним складом запасних білків гібридного насіння льону олійного другого та третього покоління та встановлення закономірності успадкування білкових компонентів.

Матеріали та методи досліджень

Визначення поліморфізму окремих білкових компонентів льону олійного проводили на гібридному насінні F_2, F_3.

Айсберг (М-12) (*Linum humile* Mill.) – Україна, ІОК. Сорт створено методом індукованого мутагенезу шляхом опромінення гамма-променями насіння сорту Циан. Висота рослин – 54-57 см, тривалість вегетаційного періоду – 86-88 діб. Має характерну зірчасту квітку, край пелюсток зубчастий, забарвлення пелюсток біле, забарвлення пиляків кремове; коробочка куляста, слабо ребриста, насіння – темно-коричневе, яйцеподібної форми. Маса 1000 насінин – 7,7-7,8 г. Вміст олії в насінні 47,0-49,0 %. Урожайність – 1,8-2,1 т/га. Відрізняється високим йодним числом олії та стійкістю проти фузаріозного в'янення. Стійкий проти вилягання рослин.

№ 20034 (*Linum humile* Mill.) – Україна, ІОК. Висота рослин 58-67 см. Тривалість вегетаційного періоду 101-103 доби. Квітка відкрита. Забарвлення пелюсток фіолетове, поверхня пелюсток гладка; забарвлення пиляків блакитне. Насіння коричневе. Маса 1000 насінин – 7,7-7,9 г. Олійність – 48,0-49,0 %. Урожайність – 1,6-1,8 т/га. Селекційний зразок 20034, який ми вивчали − це нащадок елітної рослини, відібраної для виведення нового сорту, оцінений в селекційних розсадних різного віку протягом 5-6 років, має високі показники однорідності і вирівняності.

Гібридизацію проводили за загальноприйнятою методикою, запилення здійснювали відразу ж після кастрації, враховуючи властивість протерогінії [3].

Електрофорез запасних білків льону олійного у поліакриламідному гелі виконували в лабораторії генетики та електрофорезу Інституту олійних культур НААН за розробленим способом для цієї культури. Для розподілення запасних білків використовували поліакриламідний гель з концентрацією 11,8 % [4]. Джерело струму 0,08 А, напруга 400 V. Електрофорез проводили в однакових умовах. Аналізу підпадали білки з індивідуальних насінин.

Результати дослідження окремих білкових компонентів за електрофоретичним спектром обробляли згідно методу дисперсійного аналізу за Г.Ф. Лакіним [5].

Результати досліджень та їхнє обговорення

Електрофоретичний спектр білків гібридів являє собою суму всіх білків,

© Ю.О. Махно, І.О. Полякова

властивих батьківським формам та гібридність насіння за спектром компонентів може бути виявлена лише в тому випадку, якщо в спектрі батьківської лінії є хоча б один компонент, за яким він відрізняється від спектра материнської лінії. Гібридність насіння не виявляється, якщо спектри батьківських ліній ідентичні або спектр батьківської лінії повністю укладається в спектр материнської лінії. У цьому випадку білкова система, що маркує, повинна бути замінена.

В запасних білках гібридного насіння F_2 і в наступних поколіннях спостерігається перекомбінування окремих або цілих груп фракцій, зникнення деяких з них або поява нових, що дозволяє вести селекцію на створення форм з бажаним електрофоретичним складом.

В результаті подальшого вивчення електрофоретичних спектрів гібридного насіння F_2 від комбінації Айсберг × № 20034 та № 20034 × Айсберг, нами були відмічено, що білкові спектри вміщували компоненти обох батьків. Однак в III та IV варіабельній зоні у гібридів як в прямому, так і зворотному напряму проявляється додаткова смуга, але, як видно з рисунку 1, смуги розташовані близько одна від одної, що можливо це прояв одного компоненту.

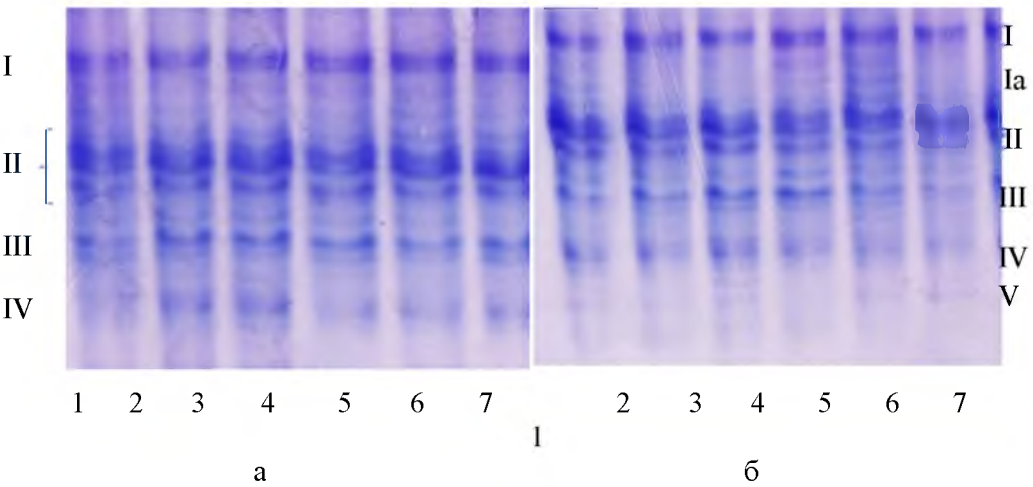

Рис. 1. Електрофоретичні спектри запасних білків гібридних насінин льону олійного гібридної комбінації Айсберг × № 20034 та № 20034 × Айсберг.

а) Айсберг × № 20034 б) № 20034 × Айсберг.

1-7 – білкові спектри окремих насінин; I, Ia, II, III, IV, V – зони білкових компонентів.

Всі спектри запасних білків насіння гібридів F_2 були подібні, таким чином, підтверджуючи прояв одноманітності у даному поколінні.

Саме в даному поколінні зазвичай спостерігається кодомінантний тип спадкування, тобто в гетерозиготі присутні обидві алельні субодиниці білку. Це дозволяє швидко в F_2 ідентифікувати гетерозиготи, що практично неможливо зробити, вивчаючи морфологічні ознаки.

Розподілення білкових компонентів у третьому поколінні гібридної комбінації Айсберг × № 20034 як в прямому, так і зворотному напрямі мало особливий характер.

© Ю.О. Махно, І.О. Полякова

У білкових спектрах гібридного насіння третього покоління, яке було отримано від схрещування сорту Айсберг × № 20034, спостерігається відсутність компонентів у V зоні. Саме цей білковий компонент проявляється у батьківської форми № 20034, але відсутній у гібрида. Дуже добре проглядається гетерогенність за Іа, IIIа і IV білковими зонами (рис.2).

В варіабельних зонах III білкового спектру спостерігається розщеплення по присутності одного і двох білкових компонентів, які відмічені як білкові компоненти IIIа, IIIб. Відсутність досить чітких градацій у фенотиповому прояву цього компонента дозволяє припустити як одне з можливих допущень, що дана зона включає кілька білкових фракцій із близькою електрофоретичною рухливістю й може проявлятися у вигляді двох білкових компонентів. Хоча не виключається ймовірність появи нового білкового компоненту (рис. 2).

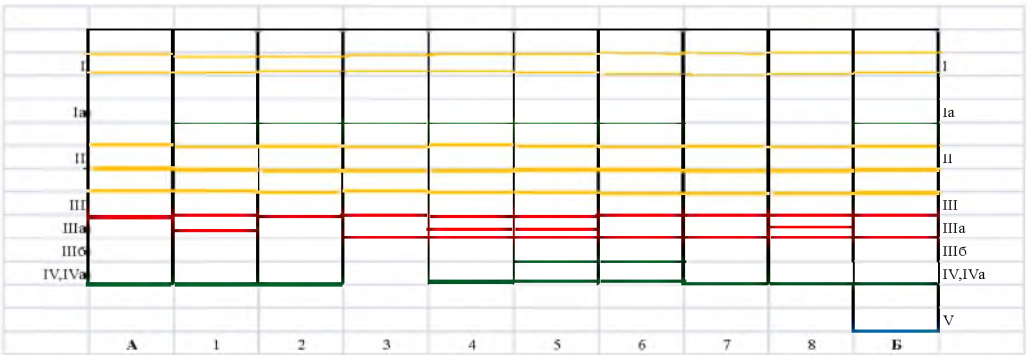

Рис. 2. Схеми спектрів запасних білків льону олійного окремих гібридних насінин F_3 комбінації схрещування Айсберг × № 20034: А − спектр сорту Айсберг (♀); Б – спектр № 20034 зразку (♂); 1-8 – фенотипові варіанти окремих білкових компонентів гібридів F_2; I, Іа, II, III, IIIа, IIIб, IV, IVа, V – білкові зони.

Відмінності по IV зоні компонентів у окремих насінин проявлялися в присутності одного, двох і відсутності білкових компонентів. Раніше в даній зоні ми відзначали тільки присутність – відсутність певного компонента, але з проявом нових компонентів стала потреба у визначенні додаткових компонентів IV та IVа для зручності вивчення успадковування (рис. 2).

Білковий спектр гібридного насіння третього покоління комбінації схрещування № 20034 × Айсберг (зворотній напрям) мав значні відмінності від батьківських форм. Спектри гібридів третього покоління на відміну від спектрів батьківських форм та білкових спектрів другого покоління більш гетерогенні. Також розщеплення стосувалося Іа, IIа, IIIа, IV та V варіабельних зон.

У зворотному напрямку схрещування № 20034 × Айсберг спектри гібридних насінин відрізнялися присутністю – відсутністю одного білкового компоненту у зоні Іа та IIа. В зоні IIIа присутні два білкових компонента, тоді як у батьківських форм у № 20034 в даній зоні одна білкова смуга, у сорта Айсберг представлена зона – відсутня. Щодо III, IV та V варіабельних зон в спектрах гібридних насінин спостерігається розщеплення на 2 та в деяких спектрах 3 білкових компонентна. Додаткові смуги, які з'являлися у варіабельних зонах для зручності ми відповідно відзначали як IIIа, IIIб, IVа, IVб, Vа (рис.3).

© Ю.О. Махно, І.О. Полякова

Отримані білкові спектри гібридів третього покоління від комбінації схрещування Айсберг × № 20034 в результаті були згруповані у вісім фенотипових класів за таким принципом присутності-відсітності варіабельних зон: **1)** Іа, IIIа, IV; **2)** Іа, IV; **3)** Іа, IIIа, IIIб; **4)** Іа, IIIа, IIIб, IV; **5)** Іа, IIIа, IIIб, IVа, IVб; **6)** Іа, IIIа, IVа, IVб; **7)** IIIа, IV; **8)** IIIа, IIIб, IV.

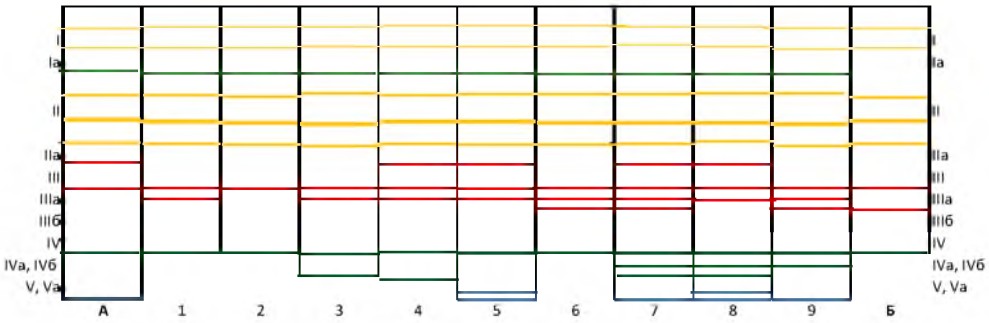

Рис. 3. Схеми спектрів запасних білків льону олійного окремих гібридних насінин F_3 комбінації № 20034 × Айсберг (2010 р.): А - спектр селекційного зразку № 20034 (♀); Б – спектр сорту Айсберг (♂); 1-9 – фенотипові варіанти окремих білкових компонентів гібридів F_3; I, Іа, II, III, IIIа, IV, V – білкові зони.

Тоді як у напрямку схрещування № 20034 × Айсберг кількість фенотипових класів склала – 9. Об'єднання у класи також проводили шляхом порівняння по присутності-відсутності варіабельних та додаткових варіабельних зон: **1)** Іа, IIIа, IV; **2)** Іа, IV; **3)** Іа, IIIа, IV, IVа; **4)** Іа, IIа, IIIа, IV, IVа; **5)** Іа, IIа, IIIа, IV, V, Va; **6)** Іа, IIIа, IIIб, IV; **7)** Іа, IIа, IIIа, IIIб, IV, IVа, IVб, V; **8)** Іа, IIа, IIIа, IV, IVа, IVб, V, Va; **9)** Іа, IIIа, IIIб, IV, IVа, V.

У відсотковому співвідношенні, як показано на рисунку 4 а, найбільший відсоток займав 1 клас білкового спектру гібридних насінин третього покоління Айсберг × № 20034 як в прямому, так і зворотному напряму.

Тоді як гібридні насінини в своїх спектрах мали прояв додаткових білкових смуг у зонах IIIб, IVб, та Va, які не проявляються у батьківських форм. Представлені білкові комплекси гібридів досить поліморфні, що дає можливість їх використання у подальшому детальному вивченні.

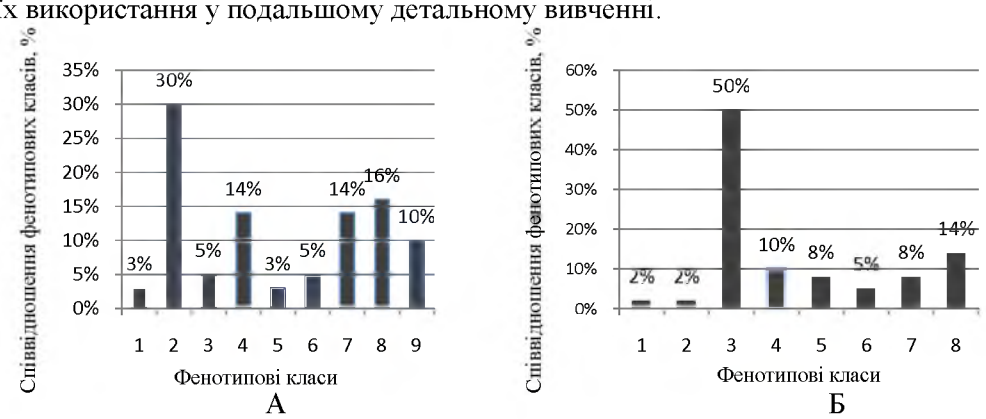

Рис. 4. Діаграма відсоткового співвідношення фенотипових класів електрофоретичних спектрів гібридів F_3:

© Ю.О. Махно, І.О. Полякова

А. Комбінація схрещування Айсберг × № 20034: **1)** Іа, ІІІа, IV; **2)** Іа, IV; **3)** Іа, ІІІа, ІІІб; **4)** Іа, ІІІа, ІІІб, IV; **5)** Іа, ІІІа, ІІІб, IVа, IVб; **6)** Іа, ІІІа, IVа, IVб; **7)** ІІІа, IV; **8)** ІІІа, ІІІб, IV.

Б. Комбінація схрещування № 20034 × Айсберг: **1)** Іа, ІІІа, IV; **2)** Іа, IV; **3)** Іа, ІІІа, IV, IVа; **4)** Іа, ІІа, ІІІа, IV, IVа; **5)** Іа, ІІа, ІІІа, IV, V, Vа; **6)** Іа, ІІІа, ІІІб, IV; **7)** Іа, ІІа, ІІІа, ІІІб, IV, IVа, IVб, V; **8)** Іа, ІІа, ІІІа, IV, IVа, IVб, V, Vа; **9)** Іа, ІІІа, ІІІб, IV, IVа, V.

Примітка: Іа, ІІа, ІІІа, ІІІб, IV, IVб, V, Vа – варіабельні білкові зони.

На нашу думку, це говорить про значне розщеплення як за морфологією, так і білковим фенотипом. Причому спостерігається посилення ступеня гетерогенності за білковим спектром в ряду поколінь.

Встановлено також перевагу материнської форми в спектрах гібридів першого, другого та третього поколінь.

Висновки

В результаті проведених досліджень встановлено, що в електрофоретичних спектрах гібридних насінин F_2 та F_3 реципрокних схрещувань комбінації Айсберг × № 20034 відмічений значний поліморфізм у прояві білкових компонентів у варіабельних Іа, ІІІ, IV, V зонах. Спостерігається посилення ступеня гетерогенності за білковим спектром в ряду поколінь.

Виявлені на електрофореграмах білкові смуги гібридного насіння реципрокних схрещувань комбінації Айсберг × № 20034 були згруповані у 8 та 9 фенотипових класів за принципом присутності-відсітності варіабельних зон.

Література

1. Молекулярно-биологические аспекты прикладной ботаники, генетики и селекции / [Конарев В.Г., Гаврилюк И.Г., Губарев Н.К. и др.]. – М. : Колос, 1993. – 447 с.

2. Созинов А.А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции. – М.: Наука,1985.– 272 с.

3. Селекція льону олійного. Методичні рекомендації / В.О. Лях, І.О. Полякова – Запоріжжя: Запорізький національний університет, 2008. – 40 с.

4. А.с. 27671 Україна, Спосіб електрофоретичного розподілення запасних білків насіння льону / В.О. Лях, О.М. Войтович, І.О. Полякова, Ю.О. Махно, І.В. Аксьонов. – № U 2007 072 99 ; заявл. 02.07.2007; опубл. 12.11.2007 бюл. № 18.

5. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. – М. : Высшая школа, 1990. – 351 с.

УСТАНОВЛЕНИЕ УРОВНЯ ПОЛИМОРФИЗМА КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА ЗАПАСНЫХ БЕЛКОВ СЕМЯН ЛЬНА МАСЛИЧНОГО В ПОКОЛЕНИЯХ F_2 И F_3

Ю.А. Махно, И.А. Полякова

В статье представлены данные электрофоретического разделения запасных белков семян льна у гибридов F_2 и F_3. Выявлено усиление степени гетерогенности по белковому спектру в ряду поколений. Установлен значительный полиморфизм в проявлении белковых

© Ю.О. Махно, І.О. Полякова

компонентов в вариабельных зонах Ia, III, IV, V электрофоретических спектров гибридных семян F_2 и F_3 реципрокных скрещиваний комбинации Айсберг × № 20034. Дополнительные белковые компоненты на электрофореграммах гибридных семян реципрокных скрещиваний представленной комбинации были сгруппированы в 8 и 9 фенотипических классов по принципу присутствия- отсутствия в вариабельных зонах.

Ключевые слова: лен масличный, гибрид F_2, гибрид F_3, семена, электрофорез, полиморфизм белковых компонентов, наследование.

ESTABLISHING OF POLYMORPHISM LEVEL IN COMPONENT COMPOSITION OF STORAGE PROTEINS IN F_2 AND F_3 GENERATIONS OF LINSEED

Yu.A. Makhno, I.A. Polyakova

Hybridological analysis of the second and third generation of linseed hybrids allows to set the inheritance patterns for the necessary traits. This makes it possible to plan and predict the results of the work with hybrid generations, to manage genetic processes in hybrid populations, to calculate the amount and proportion for segregation of possible phenotypes and their genotype diversity After selecting a certain partner for crossing it is possible to predict the final result and conduct targeted science-based work to achieve success in a short period of time.

The aim of the research was to establish the level of polymorphism for the component composition of seed storage protein in hybrids of the second and third generation of linseed to track patterns of inheritance of specific individual protein components.

The material research using hybrid seed F_2, F_3, varieties of linseed Iceberg, breeding sample № 20034. The hybridization was performed by the usual method, pollination was carried out immediately after castration, taking into account property proterogyny.

Polyacrylamide gel electrophoresis of linseed storage proteins was performed in the Laboratory of Genetics and Electrophoresis in the Institute of Oilseed Crops NAAS on the developed method adapted to this crop. To distribute the storage proteins using polyacrylamide gel at a concentration of 11.8%. 0.08 A current source, a voltage of 400 V. The electrophoresis was carried out under the same conditions. Proteins was analyzed from individual seeds.

A study of electrophoretic spectrum of hybrid seed F_2 on the combination of Iceberg × number 20034 and number 20034 × Iceberg, we have observed that the protein components of the spectra are placed both parents. However, in the III and IV of the variable region of hybrids in both forward and reverse direction is shown additional band, but, the bands are close to each other that maybe it is a manifestation of one component.

The protein spectra of hybrid seeds of the third generation, which was obtained by crossing varieties of Iceberg × 20034, the absence of the components observed in the V zone. It is this protein component is shown in the parent form 20034, but is absent in hybrid. Very well looked heterogeneity in Ia, IIIa and IV protein zones. Cleavage of the variability in the third zone into two components suggests that the area includes several protein fractions with a similar electrophoretic mobility. Although not ruled out the probability of a new protein component. Differences in zone IV components in individual seeds were manifested in the presence of one, two or no protein components. Previously in this area we have noted only the presence - absence of a specific component, but with the appearance of

© Ю.О. Махно, І.О. Полякова

new components was the need to identify additional components IV and IVa for the convenience of inheritance.

In the opposite direction crossing 20034 × Iceberg spectra of hybrid seeds was characterized by the presence - absence of the protein component in zone Ia and IIa. In zone IIIa two protein components are present, whereas in parental forms 20034 in this zone one protein band in Iceberg variety zones represented - is absent. By III, IV and V of the variable regions in the spectrum of hybrid seeds on a splitting 2 and 3 in some cases, the protein component. Additional bands, which appeared in the variable zones, respectively, for convenience, we have noted how IIIa, IIIb, IVa, IVb, Va.

The resulting protein spectra of the third-generation hybrids from the crossing combination of Iceberg × 20034 as a result have been grouped into eight phenotypic classes on this principle, the presence or absence of the variable zones: 1) Ia, IIIa, IV; 2) Ia, IV; 3) Ia, IIIa, IIIb; 4) Ia, IIIa, IIIb, IV; 5) Ia, IIIa, IIIb, IVa, IVb; 6) Ia, IIIa, IVa, IVb; 7) IIIa, IV; 8) IIIa, IIIb, IV. Whereas in the direction crossing 20034 × Iceberg is the number of phenotypic classes were 9. Association in classes are also conducted by comparing on the presence-absence of additional variable and variable zones: 1) Ia, IIIa, IV; 2) Ia, IV; 3) Ia, IIIa, IV, IVa; 4) Ia, IIa, IIIa, IV, IVa; 5) Ia, IIa, IIIa, IV, V, Va; 6) Ia, IIIa, IIIb, IV; 7) Ia, IIa, IIIa, IIIb, IV, IVa, IVb, V; 8) Ia, IIa, IIIa, IV, IVa, IVb, V, Va; 9) Ia, IIIa, IIIb, IV, IVa, V.

The studies found that the electrophoresis spectra of hybrid seed F2 and F3 of reciprocal crosses combination Iceberg × 20034 marked polymorphism significant in the manifestation of protein components in the variable Ia, III, IV, V zones. There is an increasing degree of heterogeneity in protein spectrum in a number of generations.

Discovered on electrophoresis protein bands hybrid seeds reciprocal crosses combination Iceberg × 20034 were grouped into 8 and 9 of phenotypic classes on the basis of the presence-absence of protein bands in the variable zones.

Keywords: linseed, F_3 hybrid, F_2 hybrid, seed, electrophoresis, polymorphism of protein components, inheritance.

Рецензент: Н.П. Лашко, канд. хім. наук, доцент кафедри хімії Запорізького національного університету.

© Ю.О. Махно, І.О. Полякова