

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ДУ «ІНСТИТУТ СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА СТЕПОВОЇ ЗОНИ»**

МАХНО Юлія Олександрівна

УДК 633.854.54:577.112

**ІДЕНТИФІКАЦІЯ СЕЛЕКЦІЙНОГО ТА КОЛЕКЦІЙНОГО
МАТЕРІАЛУ ЛЬОНУ ОЛІЙНОГО З ВИКОРИСТАННЯМ
ЕЛЕКТРОФОРЕЗУ ЗАПАСНИХ БІЛКІВ НАСІННЯ**

06.01.05 – селекція і насінництво

**Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата сільськогосподарських наук**

Дніпропетровськ – 2013

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Інституті олійних культур Національної академії аграрних наук України

Науковий керівник кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник
Полякова Ірина Олексіївна,
Запорізький національний університет Міністерства освіти і науки України, доцент кафедри садово-паркового господарства та генетики рослин

Офіційні опоненти доктор сільськогосподарських наук, професор,
Сатарова Тетяна Миколаївна,
Державна установа “Інститут сільського господарства степової зони” НААН України, завідувач лабораторії біотехнології, фізіології та методів селекції

кандидат сільськогосподарських наук, старший науковий співробітник,

Динник Василь Полікарпович,
ННЦ “Інститут землеробства” НААН України, провідний науковий співробітник відділу селекції і насінництва льону і ріпаку

Захист дисертації відбудеться «8» лютого 2013 року о 10 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 08.353.01 при ДУ «Інститут сільського господарства степової зони» НААН України за адресою: 49600, м. Дніпропетровськ, вул. Дзержинського, 14.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці ДУ «Інститут сільського господарства степової зони» НААН України за адресою: 49600, м. Дніпропетровськ, вул. Дзержинського, 14.

Автореферат розісланий

« 2 » січня 2013 р.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради



А. Д. Гирка

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Підвищення ефективності створення нових сортів льону олійного, які повною мірою відповідали б вимогам виробництва, повинне базуватися на вдосконаленні теоретичних і методичних аспектів селекційної роботи. Одним із важливих напрямів таких досліджень є удосконалення методів використання поліморфізму запасних білків як генетично обумовлених і стабільно відтворюваних маркерів господарсько цінних ознак.

Дослідження білкових маркерів льону олійного знаходяться на початковому рівні, існує лише ряд робіт, в яких представлені уривчасті та розрізнені дані, і головне, відсутня як методика електрофоретичного розподілення білків, так й ідентифікація отриманих спектрів. Тому необхідне детальне дослідження інформаційної цінності алельних варіантів запасних білків насіння льону, характеру їхнього успадковування при внутрішньовидовій та міжвидовій гібридизації.

Розроблення способу електрофореzu запасних білків та використання його в селекційній роботі забезпечить виявлення генетичної мінливості та чітку ідентифікацію генотипів, що дозволить поглибити теоретичні основи селекції і насінництва льону та розширити різноманіття вихідного матеріалу. Це визначає актуальність досліджень виконання даної дисертаційної роботи.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження за темою дисертаційної роботи проводилися в Інституті олійних культур НААН упродовж 2003-2011 рр. згідно з державними науково-технічними програмами: «Зернові і олійні культури» за завданням «Створити та передати на державне сортовипробування сорти льону олійного» (номер державної реєстрації 0101U003980); «Олійні культури» за завданням «Розробити теоретичні основи та створити сорти льону олійного з урожайністю 2,0-2,5 т/га, олійністю 46-48 %, вмістом ліноленової кислоти понад 70 %» (номер державної реєстрації 0101U003980); «Олійні культури» за завданням «Розробити нові та адаптувати існуючі методи створення скоростиглих зразків льону олійного для прискореної селекції сортів зі зменшеною тривалістю вегетаційного періоду» (номер державної реєстрації 0111U006014).

Мета і задачі дослідження. Метою роботи є розроблення способу електрофоретичного аналізу компонентів запасних білків насіння вихідного матеріалу льону олійного для використання в селекційному процесі при створенні нових і оригінальних сортів. Виходячи з головної мети, були поставлені такі задачі:

- розробити спосіб проведення електрофоретичного розподілення компонентів запасних білків насіння вихідного матеріалу льону олійного;
- розробити спосіб ідентифікації селекційного та колекційного матеріалів льону олійного за електрофоретичними спектрами запасних білків насіння;
- охарактеризувати селекційний матеріал за розподіленням білкових компонентів;

- проаналізувати електрофоретичні спектри мутантних зразків та можливість їхньої ідентифікації за білковими маркерами для встановлення оригінальності;

- встановити перспективи застосування електрофореzu запасних білків насіння для дослідження диких видів льону;

- дослідити рівень поліморфізму та характер успадковування окремих білкових компонентів у гібридних поколіннях F_1 , F_2 , F_3 ;

- сформувати каталог білкових формул досліджених генотипів льону для створення системи паспортизації за білковим фенотипом.

Об'єкт дослідження: спосіб електрофоретичного розподілення запасних білків насіння та ідентифікація селекційного матеріалу льону олійного на основі білкового поліморфізму.

Предмет дослідження: електрофоретичні спектри запасних білків насіння сортів льону олійного, колекційних зразків, диких однорічних видів льону, міжвидових гібридів, гібридних рослин.

Методи дослідження. Електрофорез запасних білків насіння – для ідентифікації генотипів льону; лабораторні досліди – для визначення вмісту жиру та жирнокислотного складу олії; польовий – для випробування та розмноження сортів, гібридів, ліній; гібридизація – для отримання експериментальних гібридів; математично-статистичний – для оцінки достовірності одержаних результатів досліджень.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше для культури льону олійного розроблено ефективний спосіб електрофоретичного розподілення запасних білків насіння в кислому поліакриламідному гелі і на його основі запропоновано спосіб ідентифікації сортів льону за білковими компонентами для їхньої генетично-селекційної оцінки. Проведена ідентифікація отриманих електрофоретичних спектрів, виявлений характер прояву окремих білкових зон, визначена кількість білкових компонентів та їхнє розподілення у різних селекційних та колекційних зразків льону олійного. Встановлено, що електрофоретичні спектри запасних білків насіння можуть розглядатися як маркерна ознака при ідентифікації видів та сортів льону. Вперше проведено детальне дослідження запасних білків насіння льону олійного при індивідуальному аналізі різноманітного вихідного матеріалу із застосуванням методу електрофореzu.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблено спосіб електрофоретичного розподілення запасних білків насіння льону олійного в кислому поліакриламідному гелі. Створено каталог білкових формул 11 сортів, 3 однорічних диких видів, 4 селекційних ліній та 4 мутантних форм, що є основою для біохімічної паспортизації та оцінки селекційної бази льону олійного.

Особистий внесок здобувача. Автор безпосередньо брав участь у плануванні і проведенні досліджень, спостережень, обліків і аналізі результатів досліджень. Спільно з науковим керівником були сплановані дослідження, складена програма роботи та розроблена методика електрофорезу запасних білків льону в кислому поліакриламідному гелі і створена концепція способу їхньої ідентифікації. Підведені і узагальнені результати, які пов'язані з проведенням польових і лабораторних досліджень, та сформульовані висновки й пропозиції для селекційної практики.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації представлено та обговорено на засіданнях вченої ради Інституту олійних культур НААН в 2003-2011 рр., науковій конференції молодих вчених «Сучасні проблеми екології» (Запоріжжя, 2005), міжнародній науковій конференції «Інноваційні напрямки наукової діяльності молодих вчених в галузі рослинництва», (Харків, 2006), Всеукраїнській науково-практичній конференції «Проблеми та перспективні напрями розвитку олійних культур в Україні» (Запоріжжя, 2007), Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Актуальні проблеми та перспективи розвитку природничих наук» (Запоріжжя, 2010), науково-практичній конференції молодих вчених і спеціалістів «Високоєфективні технології – шлях до стабілізації аграрного виробництва» (Київ, 2011), науково-практичній конференції, присвяченій 25-річчю біологічного факультету ЗНУ «Сучасні проблеми біології, екології та хімії» (Запоріжжя, 2012).

Публікації. Результати досліджень за темою дисертаційної роботи висвітлено у 11 публікаціях, серед яких 1 патент на корисну модель, 5 статей у фахових виданнях та 5 тез доповідей у збірниках конференцій.

Структура та обсяг роботи. Дисертаційна робота викладена на 153 аркушах комп'ютерного набору і складається з переліку умовних скорочень, вступу, 6 розділів, висновків та рекомендацій для селекційної практики, списку використаної літератури, який налічує 219 джерел, з яких 50 іноземні. Робота містить 18 таблиць, 24 рисунки, 5 додатків.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Біологічні та біохімічні особливості культури льону олійного та методи ідентифікації його генотипів (огляд літератури)

У розділі висвітлені результати опрацювання наукової літератури стосовно білкових маркерів у генетичному та філогенетичному аналізі рослин, вивчення запасних білків насіння та інтерпретації даних відносно різних культур, а також узагальнена інформація щодо біологічних та біохімічних особливостей культури льону олійного та способів ідентифікації його генотипів. Останніми роками значно зріс інтерес до культури льону, про що свідчить збільшення посівних площ. Дослідження запасних білків насіння льону методом електрофорезу є актуальними у скринінгу селекційного матеріалу на різних етапах селекційного процесу від оцінювання гібридної

комбінації до перевірки однорідності матеріалу в ланках первинного насінництва. З огляду на це виконана робота є важливою й своєчасною.

Умови та методика проведення досліджень

Полеві досліді за темою дисертаційної роботи закладалися впродовж 2003-2011 рр. на полях селекційної сівозміни Інституту олійних культур НААН, який знаходиться на території Запорізького району у північно-західній частині Запорізької області. Висівали селекційний матеріал у трьох повтореннях на однорядкових ділянках площею 0,25 м², рендомізовано.

Гібридизацію проводили за загальноприйнятою методикою, запилення здійснювали відразу ж після кастрації, враховуючи властивість протерогинії.

У дослідях використовували вихідний матеріал з колекції лабораторії селекції та генетики льону олійного Інституту олійних культур. Обрані генотипи відрізнялися походженням, господарсько біологічними і морфологічними особливостями.

Були досліджені: сорти льону олійного (*Linum humile* Mill.) Південна ніч (ІОК НААН України), Айсберг (ІОК НААН України), Золотистий (ІОК НААН України), Ціан (ВНДІОК, Росія), Авангард (ВНДІОК, Росія), Лірина (Німеччина), Ручійок (ВНДІОК, Росія), Байкал (Франція), Славний (ІОК НААН України); селекційні зразки ІЗ-11, ІЗ-5, ІЗ-6, ЛС-14/04; мутантні лінії М-24, М-79, М-80, М-81, М-28; дикі однорічні види льону *Linum angustifolium*, *Linum bienne*, *Linum hispanicum*; лінії від міжвидових схрещувань № 20047, № 30132; гібридні рослини F₁, F₂, F₃.

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 %. Джерело струму 0,08 А, напруга 400 V. Електрофорез проводили в однакових умовах. Для вивчення відбирали по 100 насінин від кожного зразка (на спосіб отримано авторське свідоцтво № 27671 UA від 12.11.2007). Аналізу підпадали білки з індивідуальних насінин.

Електрофореграми визначали у трьох повтореннях для кожного варіанту досліді. Отримані білкові фракції, виявлені на електрофореграмах, характеризувалися величиною відносної електрофоретичної рухливості, розрахованої стосовно рухливості розчину обважнювача. Порівняння електрофоретичних спектрів проводили з сортом-стандартом і між собою.

Олійність насіння визначали на лабораторному ЯМР-аналізаторі АМВ-1006. Визначення жирнокислотного складу насіння проводили методом газорідинної хроматографії (ГРХ) у лабораторії біохімії та масових аналізів ІОК НААН. Статистичну обробку даних проводили на комп'ютері за програмою MSTAT – С, яка була розроблена в Мічиганському університеті (США).

Результати дослідження окремих білкових компонентів за електрофоретичним спектром обробляли згідно методу дисперсійного аналізу за Г. Ф. Лакінім (1990).

Проведення електрофорезу та ідентифікація запасних білків насіння льону олійного

При вивченні запасних білків льону олійного для кращої розподільчої здатності виникла необхідність розробки способу електрофорезу, який би надав можливості розрізняти генотипи за білковими компонентами та визначати генетичну однорідність насіннєвого матеріалу льону олійного. Тому був розроблений спосіб електрофоретичного розподілення запасних білків насіння льону в кислому поліакриламідному гелі. За прототип було обрано методику електрофорезу геліантинів соняшнику (Селекційно-генетичний інститут, м. Одеса).

Безпосередньо процес визначення електрофоретичного спектру запасних білків насіння льону включає певні етапи: підготовки (знежирення і екстракції) та розподілу (обважнення, розподілення та фарбування).

Розроблення способу електрофоретичного розподілення запасних білків льону олійного здійснювали дотримуючись перелічених вище етапів. Запропонований спосіб стосувався, насамперед, етапу знежирення: кожену подрібнену насінину заливали $0,5 \text{ мл} \pm 0,1$ знежирювального розчину, при цьому використовували меншу кількість ацетону, через те що лляне насіння має невеликий розмір, а також тому, що в процесі знежирення ацетон частково руйнує білки.

Суттєвою ознакою, відмінною від прототипу, є те, що на етапі екстрагування поступово підбирався необхідний об'єм екстрагенту, починаючи з 0,05; 0,06; 0,07; 0,08; 0,09; 0,1 мл. Було встановлено, що більш повна екстракція досягається з використанням об'єму 0,08 мл $\pm 0,01$ на кожену пробірку. Етап обважнення вихідного білкового препарату включає додавання в нього барвника-обважнювача.

В дослідженнях використовували три концентрації поліакриламідного гелю: 10,5; 11,8; 12,5%. Було встановлено, що краще розподілення було коли застосовували гель з концентрацією 11,8%.

Виявлення та локалізацію білкових зон після їхнього розподілення електрофорезом у ПААГ у більшості випадків здійснюють шляхом їх фарбування в гелі. Зони проявляються як пофарбовані смужки або плями різної інтенсивності (рис.1).

Ідентифікація видів, сортів та зразків льону олійного за білковими маркерами необхідна для точного та об'єктивного визначення видової та сортової приналежності, а також створення досконалої номенклатури видів, сортів та ліній.

Створення системи ідентифікації електрофоретичних спектрів запасних білків насіння сортів льону надасть можливість оформляти документацію у вигляді білкових формул, що значно полегшить процес визначення їхньої генотипної приналежності.

У своїй роботі на електрофоретичних спектрах ідентифікували розподілені пептиди як білкові компоненти, а їх позиції відносно рухливості розглядали як білкові зони.

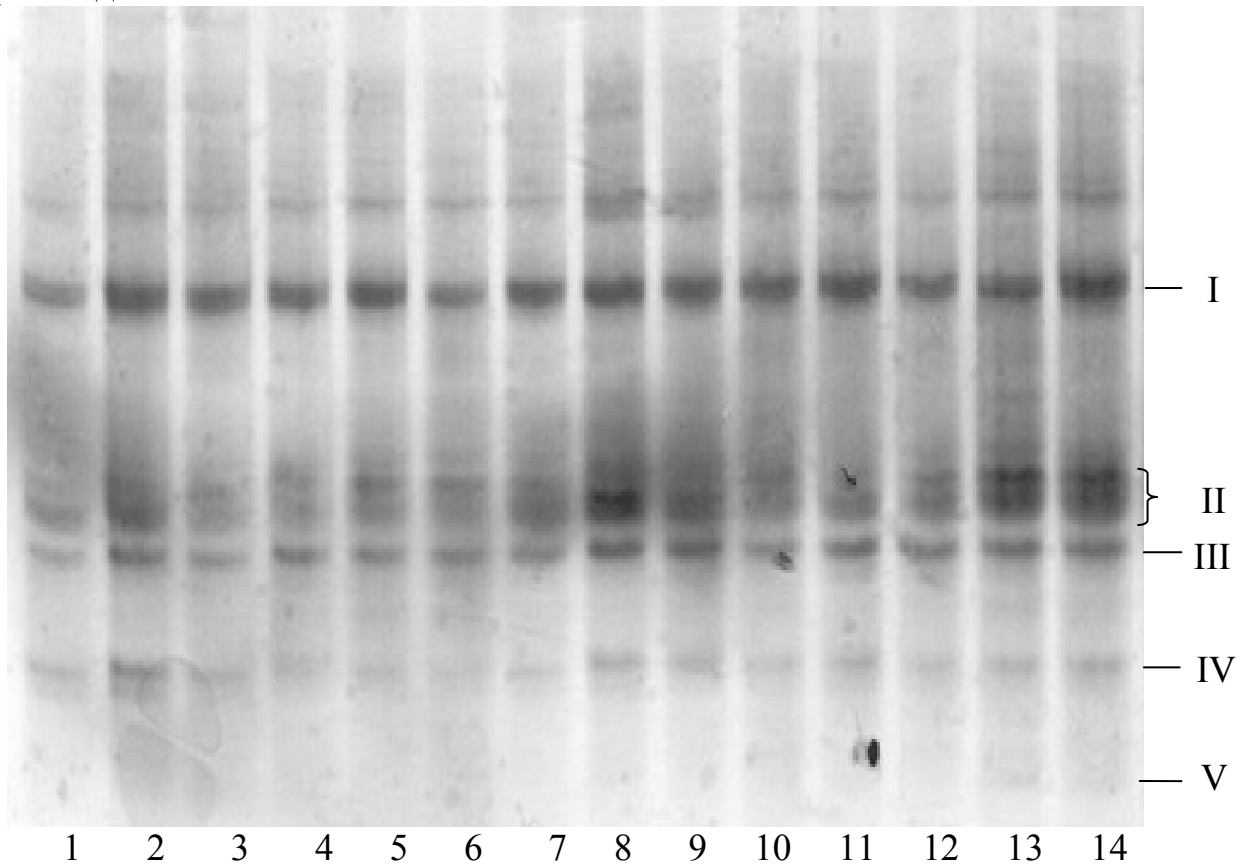


Рис. 1. Спектр запасних білків насіння льону олійного сорту Південна ніч (2003 р.): 1-14 – білкові спектри окремих насінин; I, II, III, IV, V – білкові зони.

У результаті досліджень було встановлено стабільний прояв білкових компонентів у перших трьох зонах: I, II, III, які названі реперними (головними) за характером прояву. До варіабельних білкових зон IV, V були віднесені компоненти, які мали різний прояв за інтенсивністю, рухливістю, а також були відсутні або присутні у деяких генотипів. Додаткові варіабельні зони, які з'являлися при подальшому вивченні білкових спектрів насіння льону олійного, відзначали і нумерували позицією зони, біля якої даний компонент з'являвся, але з додаванням літери «а». Таким чином, були визначені ще додаткові зони – Ia, IIa, IIIa. Для зручності ідентифікації характеру розподілення білкових компонентів льону також використовували наскрізну нумерацію білкових смуг у порядку збільшення електрофоретичної рухливості компонентів: 1, 2, 3 – 13 (рис. 2).

Таким чином, в результаті проведення досліджень було розроблено систему ідентифікації електрофоретичних спектрів запасних білків льону, яка базується на їхній детальній характеристиці за наявністю, положенням, інтенсивністю прояву та кількістю білкових компонентів у окремих генотипів льону олійного.

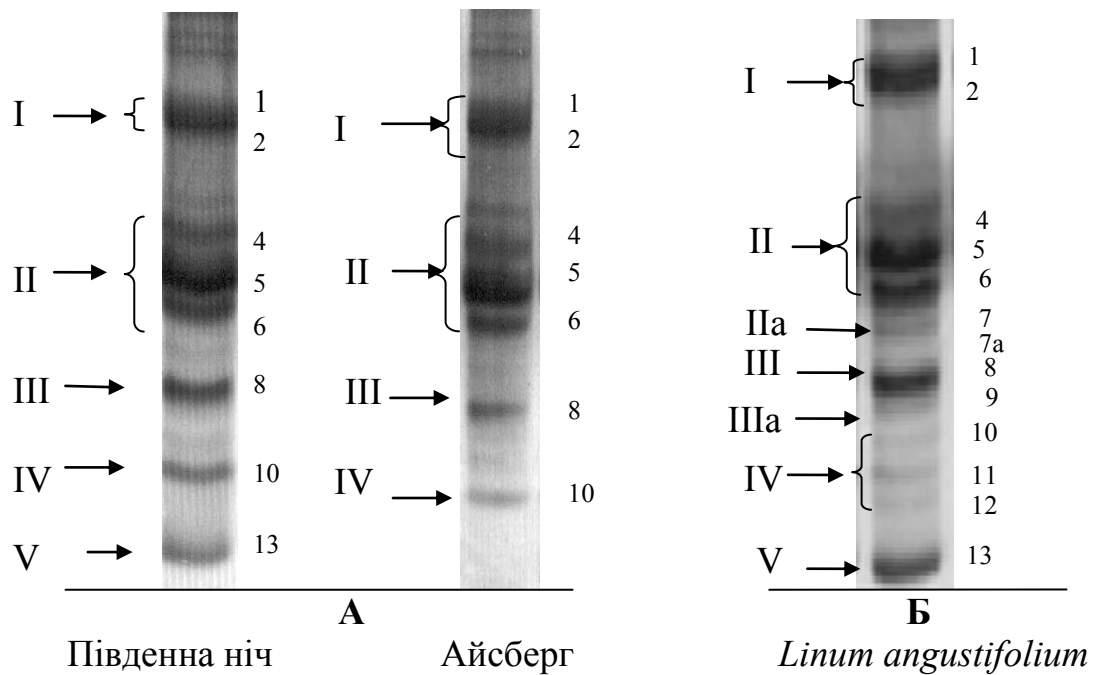


Рис.2. Розподілення білкових компонентів генотипів льону контрастних за білковими спектрами (2003-2008 рр.): I, II, IIa, III, IIIa, IV, V – білкові зони; 1-13 – білкові компоненти; А – культурний льон (*Linum humile*), Б – дикий однорічний вид.

Дослідження селекційного та колекційного матеріалу льону олійного та однорічних диких видів льону з використанням електрофорезу запасних білків насіння

Вивчення білкових спектрів сортів та селекційних зразків. Порівняльний аналіз досліджуваних генотипів проводили з використанням сорту-стандарту Південна ніч, який за попереднім аналізом двох вибірок був визначений як монотипний, без розщеплень у спектрі білка (рис.1). В результаті проведеного понасіньового аналізу електрофорезу поліморфного білку у сортів льону олійного було визначено розташування реперних компонентів у зонах I, II та III на електрофоретичних спектрах, які були відмічені при вивченні білкових спектрів сортів створених в різних селекційних центрах. Представлені зони відзначені нами як зони зі стабільним проявом білкових компонентів, тобто присутність білкових компонентів, притаманна для роду *Linum L.* Білки у даних зонах за проявом визначені як інтенсивні, незалежно від генотипу. До варіабельних ділянок можна віднести зони IV та V. Досліджуваний матеріал стосовно даних зон характеризувався за присутністю або відсутністю білкових компонентів у спектрах, рухливістю та інтенсивністю прояву. Також до варіабельних можна віднести додаткові зони Ia, IIa та IIIa. Завдяки відсутності або присутності та інтенсивності білкових компонентів у представлених варіабельних зонах дані генотипи відрізняються один від одного. У цілому за електрофоретичними спектрами досліджувані генотипи різняться, хоча деякі з них мають близькі електрофореграми (рис. 3).

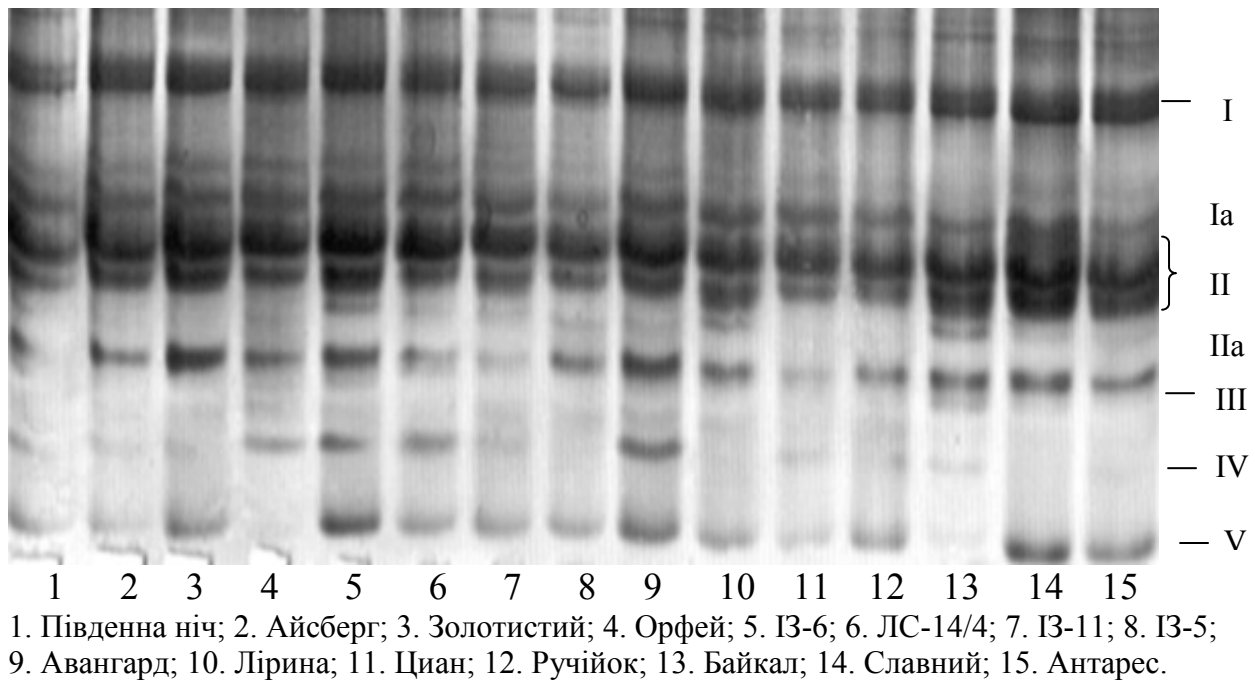


Рис. 3. Електрофореграми запасних білків різних генотипів льону олійного (2003-2006 рр.): 1-15 – білкові спектри окремих насінин льону; I, II, III, IV, V – білкові зони.

Так, при порівнянні із сортом-стандартом можна відзначити, що сорт Золотистий характеризується відсутністю IV зони, а сорти Айсберг і Орфей – V зони. Імовірно, дана особливість відображає рівень і характер міжсортового поліморфізму. Білкові компоненти у досліджених генотипів мали різний прояв за інтенсивністю, причому білкові смуги у стабільних білкових зонах I та II мали однакову інтенсивність прояву на відміну від варіабельних білкових зон (табл.1).

Таблиця 1

Рухливість та інтенсивність компонентів запасних білків насіння сортів льону олійного вітчизняної селекції (2004 р.)

Білкові зони	№ з/п	Сорти (<i>Linum humile</i> Mill.)					
		Південна ніч		Айсберг		Золотистий	
		Рухливість	Інтенсивність	Рухливість	Інтенсивність	Рухливість	Інтенсивність
I	1	0,22±0,005	+	0,21±0,002	+	0,25±0,02	+
	2	0,23±0,005	+	0,22±0,002	+	0,26±0,03	+
Ia	3	-	-	-	-	-	-
II	4	0,28±0,003	+	0,27±0,004	+	0,32±0,03	+
	5	0,30±0,003	++	0,30±0,002	++	0,33±0,02	++
	6	0,33±0,005	+	0,32±0,004	+	0,36±0,02	+
IIa	7	-	-	-	-	-	-
III	8	0,36±0,003	+	0,36±0,002	+	0,40±0,03	+
IIIa	9	-	-	-	-	-	-
IV	10	0,41±0,006	+	0,41±0,0	+	-	-
	11	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-
V	13	0,45±0,01	+	-	-	0,50±0,03	+

У сортів закордонної селекції електрофоретичні спектри різняться як за варіабельними IV та V, так і за додатковими Ia і IIa зонами (табл. 2). Поряд з відмінностями у білкових спектрах за присутністю або відсутністю та інтенсивністю прояву деяких білкових компонентів, відмінності між досліджуваними зразками стосувалися також за їхньої відносної рухливості або положенню на електрофореграмі.

Таблиця 2

Рухливість та інтенсивність компонентів запасних білків насіння сортів льону олійного закордонної селекції (2003-2011 р.)

Білкові зони	№ з/п	Сорти (<i>Linum humile</i> Mill.)					
		Циан		Антарес		Байкал	
		Рухливість	Інтенсивність	Рухливість	Інтенсивність	Рухливість	Інтенсивність
I	1	0,22±0,004	+	0,21±0,0	+	0,21±0,0	+
	2	0,23±0,004	+	0,22±0,0	+	0,22±0,0	+
Ia	3	0,27±0,009	±	-	-	-	-
II	4	0,29±0,02	+	0,27±0,02	+	0,27±0,02	+
	5	0,31±0,01	++	0,29±0,01	++	0,29±0,01	++
	6	0,33±0,01	+	0,31±0,02	+	0,31±0,02	+
IIa	7	-	-	0,34±0,01	±	0,34±0,01	±
III	8	0,37±0,008	±	0,35±0,01	+	0,35±0,01	+
IIIa	9	-	-	0,37±0,02	-	0,37±0,02	±
IV	10	0,41±0,009	±	0,39±0,01	-	0,39±0,01	±
	11	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-
V	13	0,43±0,02	±	-	+	-	-

На відміну від білкових спектрів сортів вітчизняної селекції спектри селекційних ліній вміщують окрім варіабельних IV та V ще й додаткові Ia, IIa, IIIa зони, що робить такий прояв білкових компонентів подібним до спектру в групі сортів закордонної селекції.

Селекційні лінії ІЗ-6, ІЗ-5, ЛС-14/04, ІЗ-11 мають більш поліморфні спектри. Вони характеризуються вищим ступенем гетерогенності білків у зонах, що відрізняє їх від досліджених сортів. На наш погляд, це пов'язане із впливом добору певних генних комплексів у процесі селекції.

Дослідження спектрів мутантних ліній льону олійного. Для ідентифікації генотипів льону за електрофоретичними спектрами запасних білків було проаналізовано шість мутантних зразків: п'ять (М-12, М-24, М-79, М-80, М-81), вихідною лінією яких є сорт льону олійного Циан (ВНДІОК, Росія) та один зразок М-28, для якого вихідною лінією є Л-3 (Чехія). Зазначені форми були отримані внаслідок обробки γ-променями насіння льону (400 і 700 Гр) у 1997 та 1999 рр. в Інституті фізіології рослин та генетики (м. Київ) на установці "Дослідник". Порівняння електрофоретичних спектрів окремих насінин вивчених мутантних ліній показало, що всі досліджені зразки мали властивий даній лінії тип спектра.

Зразки М-80 та М-81 характеризуються відсутністю одного білкового

компоненту у зоні I. Кількісно дані спектри мають 7 білкових компонентів, але вони відрізняються за інтенсивністю прояву білкових смуг у зонах. Електрофоретичні спектри даних мутантних зразків відрізняються як між собою, так і від вихідної лінії, причому відмінності за спектром представлених генотипів стосуються відсутності варіабельної V зони. Між собою мутантні зразки різняться за числом компонентів, їхньою електрофоретичною рухливістю та інтенсивністю. У всіх досліджуваних мутантних ліній присутні стабільні і варіабельні зони. Число компонентів варіює від 6 до 9.

За спектром білка зразки Л-3 та М-28 значно відрізняються від інших генотипів як за положенням і кількістю, так і за інтенсивністю компонентів. Білковий спектр Л-3 має більшу кількість компонентів. У стабільній зоні даного зразка проявляється додаткова друга смуга у зоні IIIa. Мутантна лінія М-28 помітно відрізняється за спектром білків від вихідної лінії відсутністю IV зони і меншою кількістю білкових компонентів у спектрі.

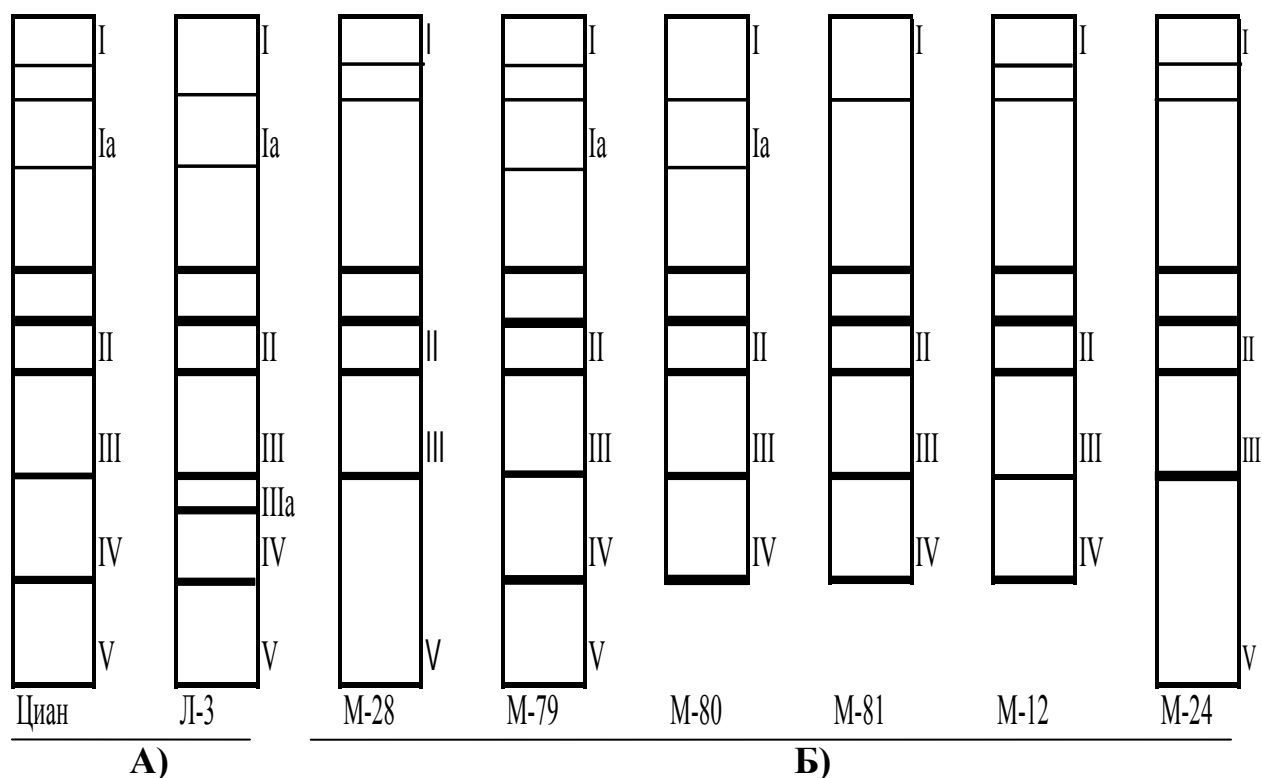


Рис. 4. Схеми електрофореграм розподілення запасного білка у вихідних та мутантних ліній льону олійного (2006- 2007 рр.): **А)** – вихідні лінії; **Б)** – мутантні лінії; I, Ia, II, III, IIIa, IV, V – білкові зони.

Отримані білкові спектри мутантних ліній характеризуються високим ступенем однорідності.

Таким чином, спектри мутантних зразків помітно відрізняються від білкових спектрів вихідних ліній, тому їх можна вважати новими лініями з оригінальним генотипом, включати в дослідження з генетики ознак і задіювати в селекційних програмах.

Білкові спектри диких однорічних видів льону та їхніх гібридів. Розробка принципів маркування за допомогою електрофоретичних компонентів білків

поліморфних систем диких видів льону практично відсутня. Завданням нашого дослідження було визначення можливостей використання електрофорезу запасних білків деяких видів льону для ідентифікації, маркування геномів і визначення перспектив застосування молекулярних маркерів для вивчення генетичного різноманіття видів роду *Linum L.* За морфологічними ознаками *Linum angustifolium*, *Linum bienne* та *Linum hispanicum* різняться не дуже сильно. Вони мають світло-блакитний, або блідо-бузковий колір пелюсток віночка. Всі вони входять до групи $2n=30$, як і льон олійний *Linum humile* Mill.

Порівняння спектрів диких однорічних видів льону з культурним льоном сорту Південна ніч показало, що вони мають більшу кількість білкових компонентів у спектрі, ніж у культурного виду. Їхня кількість у кожного вивченого виду варіює від 8 до 10.

Встановлений стабільний прояв реперних компонентів I, II та III зон, що свідчить про приналежність до роду *Linum L.* Визначено варіабельний прояв білкових компонентів в спектрах диких генотипів льону у IIa, IIIa, IV та V зонах.

Селекційні лінії № 20047 і № 30132, які є міжвидовими гібридами комбінації M-24×*Linum angustifolium*, за спектрами ближче до спектрів культурного льону, тому що мають меншу кількість білкових смуг, ніж дикі форми. Імовірно, що це є наслідком добору за господарсько цінними ознаками і досліджувані міжвидові гібриди мають добре відселектовані генні комплекси.

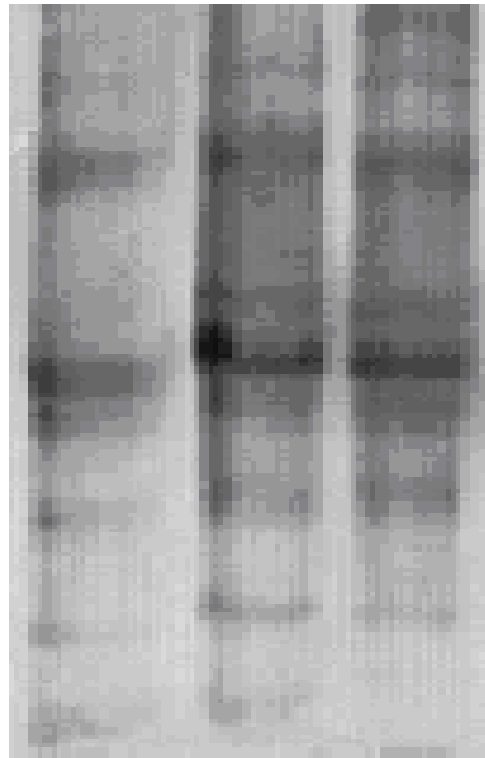
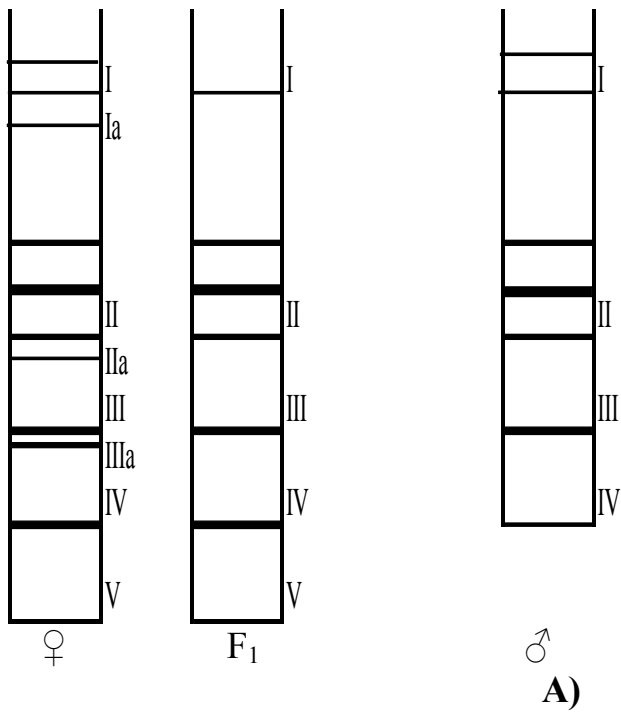
Поліморфізм білкових спектрів гібридних насінин льону олійного

Ефективність селекції льону олійного залежить від залучення в селекційний процес джерел з високим рівнем прояву цінних ознак, які генетично контролюються. Вирішенню цієї задачі сприяє відстеження прояву алельних варіантів запасних білків, які контролюють ці ознаки та встановлення закономірностей їхнього успадковування при гібридизації. Вивчення особливостей успадковування деяких білкових компонентів льону ми проводили на гібридному насінні F_1 , F_2 та F_3 . Для цього було відібрано зразки гібридного насіння F_1 , батьківські форми яких відрізнялись за електрофоретичними спектрами.

Електрофореграма зразка материнської форми ЛС-14/04 (I, Ia, II, IIa, III, IIIa, IV, V) була більш поліморфна, на відміну від спектра чоловічої форми сорту Айсберг (I, II, III, IV) (рис. 5 А). Прояв I, II, III зон мав стабільний характер як в спектрі батьківських форм, так і в спектрі гібрида F_1 . Електрофоретичний спектр гібрида вміщував варіабельну зону V, так само як і зразок ЛС-14/04. В результаті нами відмічено, що в спектрі насінин F_1 спостерігається більша присутність плазми від материнської лінії ЛС-14/04.

В іншій комбінації схрещування при залученні зразку ІЗ-11 (I, Ia, II, IIa, III, IV, V) та сорту Айсберг (I, II, III, IV), коли Айсберг виступає у ролі материнської форми, у спектрі гібрида F_1 також відмічено більше материнської плазми, подібно до спектра сорту Айсберг (рис. 5 Б).

ЛС – 14/04 ЛС – 14/04×Айсберг Айсберг



Айсберг Айсберг×ІЗ-11 ІЗ-11

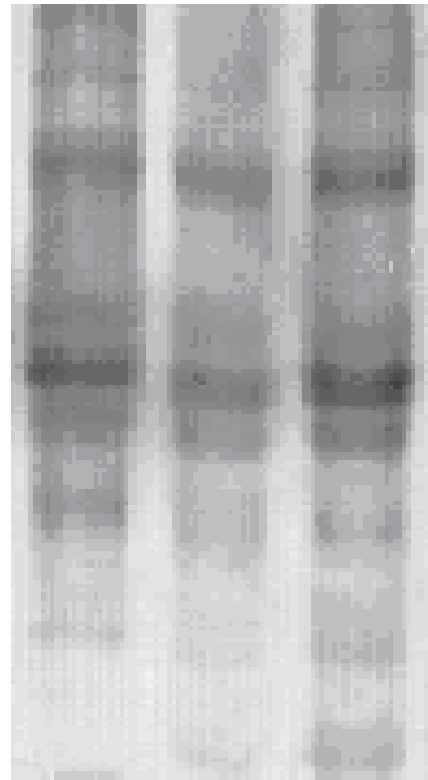
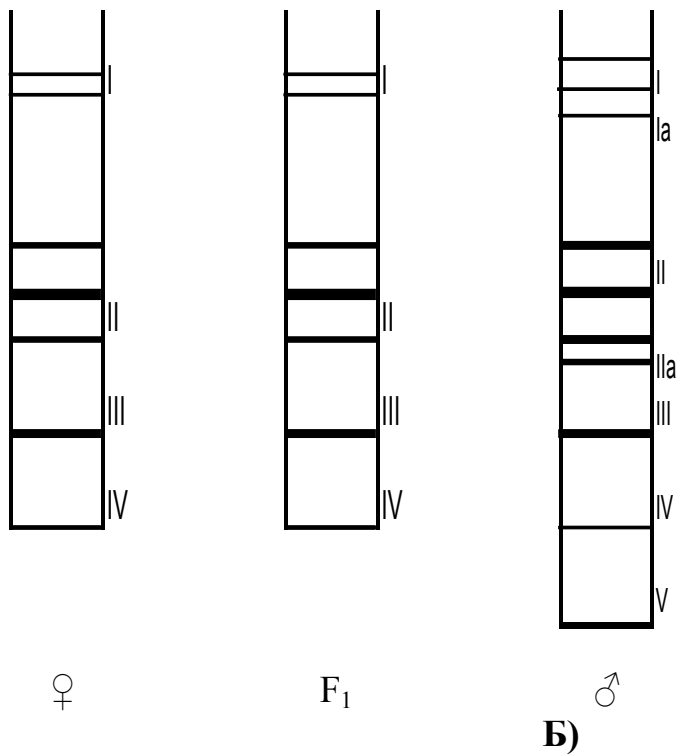


Рис. 5. Электрофоретичні спектри запасних білків гібридних насінин F₁ та їхніх батьківських форм льону олійного (2010 р.): **А)** ЛС-14/04 × Айсберг, **Б)** Айсберг × ІЗ-11.

В спектрах гібридних насінин F_2 та F_3 реципрокних схрещувань сорту Айсберг з зразком ІЗ-11 відмічений значний поліморфізм за проявом білкових компонентів у варіабельних зонах. У другому поколінні даної комбінації зустрічаються білкові спектри за типом ІЗ-11 з присутністю варіабельних зон Іа і ІІа у спектрі гібридних насінин, та за типом спектру Айсберг, але іноді з проявом Іа зони.

Також в спектрах гібридів F_2 та F_3 відмічено різний характер успадковування певних білкових зон. Отримані результати вказують на ядерне успадковування в зонах Іа та ІІа, та на цитоплазматичне успадковування білкових компонентів у зонах ІІа та V.

Спостерігається посилення ступеня гетерогенності за білковим спектром в ряду поколінь.

Каталог білкових компонентів селекційного та колекційного матеріалу льону

Отримання і вивчення генотипних формул досліджуваних сортів дозволяє виділити групи генів, які можуть використовуватися в селекції.

Використання спектрів білкових маркерів льону олійного дозволить встановити попередню інформацію про найбільш ймовірне походження матеріалу.

Також для підтримки колекції і цілеспрямованого її використання в селекційному процесі дуже важливо вміти швидко ідентифікувати алельні варіанти блоків білків.

Результати досліджень компонентного складу селекційного матеріалу та сортів льону олійного дозволили скласти каталог розподілення білкових компонентів льону олійного з використанням електрофорезу в кислому поліакриламідному гелі.

За результатами багаторічних досліджень при понасіннєвому аналізі отримано електрофоретичні спектри сортів, селекційних зразків, мутантних ліній і диких форм льону та ідентифіковано розподіл білкових компонентів на окремі зони, які, в свою чергу, вміщують білкові компоненти, згідно з їхньою відносною рухливістю.

Електрофоретичний спектр кожного вивченого зразка у каталозі детально описаний за присутності або відсутності стабільних і варіабельних зон та поданий у вигляді білкової формули:

Linum humile Mill. сорт Південна ніч I(1,2) Ia(-) II(4,5,6) IIa(-) III(8) IIIa(-) IV(10) V(13); сорт Айсберг I(1,2) Ia(-) II(4,5,6) IIa(-) III(8) IIIa(-) IV(10) V(-); сорт Авангард I(1,2) Ia(-) II(4,5,6) IIa(-) III(8) IIIa(9) IV(10) V(13); селекційний зразок ЛС-14/04 I(1,2) Ia(3) II(4,5,6) IIa(7) III(8) IIIa(9) IV(10) V(13); мутантна лінія М-80 I(1) Ia(3) II(4,5,6) IIa(-) III(8), IIIa(-) IV(10) V(-); дикий однорічний вид *Linum angustifolium* I(1,2) Ia(-) II(4,5,6) IIa(7,7a) III(8) IIIa(9) IV(10,11,12) V(13).

Графічно каталог білкових компонентів представлено на рисунку 6.

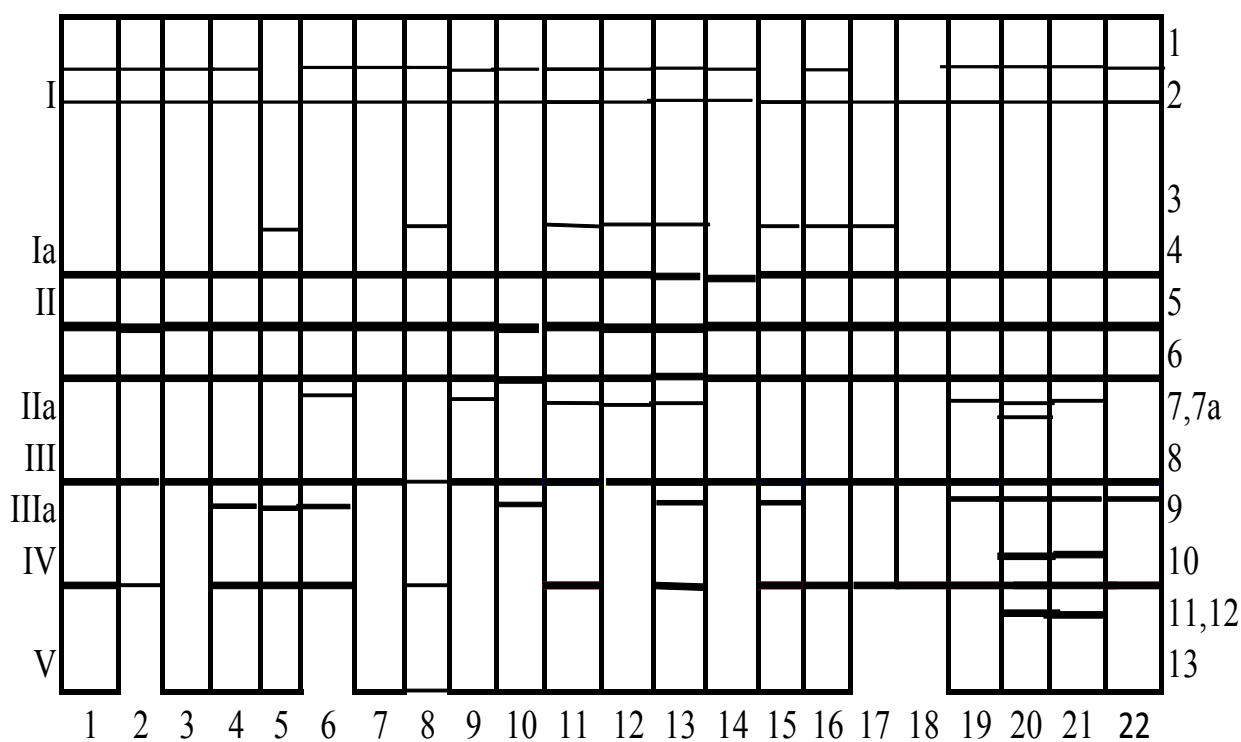


Рис. 6. Каталог основних білкових компонентів електрофоретичних спектрів зразків льону (2003-2011 рр.) : I-V – білкові зони.

Представлений матеріал може слугувати основою для скринінгу селекційного матеріалу, визначення оригінальності і типовості зразків, контролю константності і чистоти комерційних сортів на різних етапах насінництва та створення системи паспортизації генотипів льону.

ВИСНОВКИ

У дисертації подається теоретичне узагальнення і нове вирішення завдання ідентифікації селекційного і колекційного матеріалу та визначення поліморфізму і характеру успадковування окремих білкових компонентів у гібридних поколіннях F_1 , F_2 , F_3 на основі розробленого способу електрофоретичного розподілу запасних білків насіння. В результаті сформований каталог білкових формул досліджених генотипів, що має практичне значення для селекції культури льону.

1. Розроблено ефективний спосіб електрофоретичного розподілення запасних білків насіння для культури льону олійного шляхом модифікації методики-прототипу. Отримано спектри запасних білків льону з високим ступенем типовості та однорідності.

2. Розроблено спосіб ідентифікації отриманих електрофоретичних спектрів запасних білків льону за наявністю, положенням, інтенсивністю прояву та кількістю білкових компонентів у окремих генотипів льону.

Встановлено наявність стабільних (реперних) зон I, II, III, варіабельних білкових зон – IV, V та додаткових зон – Ia, IIa, IIIa у електрофоретичних спектрах вивчених зразків.

3. Отримано та ідентифіковано чіткі та інформативні електрофоретичні спектри 11 сортів льону олійного різного походження. У сортів вітчизняної селекції відмічено поліморфізм за проявом білкових компонентів у варіабельних зонах IIIa, IV та V, сорти закордонної селекції різняться як за варіабельними IV та V, так і за додатковими Ia і IIa зонами. Встановлено більш високий ступінь гетерогенності білків у спектрах селекційних зразків.

4. Показано, що мутантні зразки відрізняються від вихідних ліній як за морфологічними ознаками, так і за білковими компонентами. Вивчені мутантні лінії льону мають характерний для кожної з них електрофоретичний спектр, з високими рівнем типовості. Число компонентів у вивчених мутантних генотипів варіює від 6 до 9. Відмічено варіабельність білкових компонентів за зонами Ia, IV та V.

5. Отримано і вивчено електрофоретичні спектри однорічних диких видів льону *Linum angustifolium*, *Linum hispanicum* і *Linum bienne* та визначено стабільний прояв реперних компонентів у I, II та III зонах, що свідчить про їхню приналежність до роду *Linum* L. Встановлено більшу кількість білкових компонентів у зонах, ніж у культурного льону. Виявлено варіабельний прояв білкових смуг в спектрах диких видів у зонах IIa, IIIa, IV та V. Доведено, що міжвидові гібриди мають кількість білкових компонентів на електрофореграмі, подібну до спектра культурної материнської форми, відмічено різницю тільки за однією білковою зоною.

6. Встановлено домінування материнської форми в спектрах гібридів першого покоління. Визначено певні відмінності в залежності від батьківських форм за компонентним складом в спектрах гібридних насінин першого покоління. У комбінаціях схрещування Південна ніч×ІЗ-6, ЛС-14/04×Південна ніч та ІЗ-11×Південна ніч спостерігалось зникнення білкових компонентів присутніх у обох батьків у IV зоні.

7. Проаналізовано успадковування окремих компонентів у комбінації Айсберг × ІЗ-11 гібридних насінин F_2 і F_3 та встановлено як ядерне успадковування в зонах Ia та IIIa, так і цитоплазматичне успадковування білкових компонентів у зонах IIa та V. Відмічено високий ступінь гетерогенності за спектром запасного білка насіння в поколінні F_2 та F_3 , а саме прояв нових додаткових білкових смуг у зонах IIIб, IVб та Va, що дає змогу підвищити ефективність добору батьківських пар та прогнозувати ефективність схрещування за їхніми електрофоретичними спектрами.

8. Створено каталог досліджених 11 сортів льону олійного, 3 однорічних диких видів, 4 селекційних ліній та 4 мутантних форм. Надано детальний опис по кожній білковій зоні та проведено запис у вигляді білкової формули. Запропоновано базу для створення системи паспортизації генотипів льону олійного за білковим фенотипом.

9. До Національного центру генетичних ресурсів рослин України передано 22 зразки льону (довідка № 226 від 2 серпня 2012 р.) з детальним описом електрофоретичних спектрів за компонентним складом, 22 зразки

передано до сектора селекції льону Інституту олійних культур НААН для залучення у селекційні програми.

РЕКОМЕНДАЦІЇ ДЛЯ СЕЛЕКЦІЙНОЇ ПРАКТИКИ

1. Для ідентифікації вихідного матеріалу льону олійного рекомендується використовувати спосіб електрофорезу запасних білків насіння шляхом екстрагування білків з індивідуальних насінин та розподіленням в поліакриламідному гелі з концентрацією 11,8 %. Завдяки його високій розподільчій здатності та простоті рекомендувати даний метод для проведення масового аналізу, а також застосування у практичній селекційній роботі та насінництві культури льону.

2. Електронний каталог білкових формул льону олійного рекомендується використовувати як основу для скринінгу селекційного матеріалу, визначення оригінальності і типовості зразків, контролю константності і чистоти комерційних сортів на різних етапах насінництва та створення системи паспортизації генотипів льону.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Махно Ю. А. Электрофоретические спектры семян льна масличного / Ю. А. Махно, И. А. Полякова, И. В. Аксенов, Е. Н. Войтович // Научно-технический бюллетень ИОК УААН. – 2005. – Вып. 10. – С. 7-11.
2. Махно Ю. О. Оцінка оригінальності мутантних форм льону за електрофоретичними спектрами / Ю. О. Махно // Вісник аграрної науки. – 2008. – № 4. – С. 75-76.
3. Махно Ю. А. Определение полиморфизма запасных белков семян льна масличного методом электрофореза / Ю. А. Махно, И. А. Полякова, В. А. Лях // Фактори експериментальної еволюції організмів : Зб. наук. пр. НАН України, АМН України, Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова; редкол.: В. А. Кунах (голов. ред.). – К.: Логос, 2003-2010 – С. 397-401.
4. Махно Ю. А. Сравнительное изучение спектров запасных белков семян диких видов льна / Ю. А. Махно, И. А. Полякова // Научно-технический бюллетень ИОК УААН. – 2007. – Вып. 12. – С. 45-49.
5. А.с. 27671 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. 12.11.2007 ; бюл. № 12.
6. Кизяковская Ю. А. (Махно Ю. О.) Перспективность изучения белковых маркеров льна масличного / Ю. А. Кизяковская, И. А. Полякова, В. А. Лях // «Сучасні проблеми екології» Збірка матеріалів першої міжнародної конференції молодих вчених (28-30 вересня). – Запоріжжя, 2005. – С. 123-124.
7. Махно Ю. А. Электрофоретическое разделение белков семян льна масличного / Ю. А. Махно, И. А. Полякова, Е. Н. Войтович, В. А. Лях // Вісник ЗНУ. – 2006. – № 1. – С. 124-127.

8. Махно Ю. А. Изучение запасных белков семян льна масличного методом электрофореза в полиакриламидном геле / Ю. А. Махно, И. А. Полякова // Збірник тез. III-ої Міжнародної конференції молодих вчених «Інноваційні напрямки наукової діяльності молодих вчених в галузі рослинництва». – Харків: Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва. – 2006. – С. 106-107.
9. Махно Ю. О. Можливості ідентифікації зразків льону олійного методом електрофорезу / Ю. О. Махно // Актуальні проблеми та перспективи розвитку природничих наук : збірка тез Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених (28 травня). – Запоріжжя, 2010. – С. 18-20.
10. Махно Ю. О. Вивчення мутантних форм льону олійного методом електрофорезу / Ю. О. Махно // «Високоєфективні технології – шлях до стабілізації аграрного виробництва» Збірка тез науково-практичної конференції молодих учених і спеціалістів (28-30 листопада). – Київ – Чабани, 2011. – С. 45-46.
11. Махно Ю. О. Ідентифікація електрофоретичних спектрів запасного білка льону олійного / Ю. О. Махно // Сучасні проблеми біології, екології та хімії : збірка матеріалів III Міжнародної науково-практичної конференції, присвяченої 25-річчю біологічного факультету ЗНУ (11-13 травня). – Запоріжжя, 2012. – С. 34-35.

АНОТАЦІЯ

Махно Ю. О. Ідентифікація селекційного та колекційного матеріалу льону олійного з використанням електрофорезу запасних білків насіння. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата сільськогосподарських наук за спеціальністю 06.01.05 – селекція і насінництво. – ДУ «Інститут сільського господарства степової зони» НААН України, м. Дніпропетровськ, 2013.

Дисертація присвячена вивченню запасних білків насіння льону олійного методом електрофорезу для використання в селекційній практиці. Для вирішення поставленої задачі був розроблений спосіб електрофорезу запасних білків насіння льону олійного у кислому поліакриламідному гелі. Ідентифіковано розподіл запасних білків на стабільні (реперні) зони I, II, III, варіабельні білкові зони – IV, V та додаткові зони – Ia, IIa, IIIa у електрофоретичних спектрах вивчених зразків.

Отримано та ідентифіковано чіткі та інформативні електрофоретичні спектри сортів вітчизняної та закордонної селекції та виявлено різницю між генотипами. Показано поліморфізм електрофоретичних спектрів колекційного та селекційного матеріалів льону олійного за положенням, інтенсивністю, присутністю або відсутністю білкових компонентів. Визначено високий ступінь гетерогенності у гібридів першого, другого та третього поколінь гібридного насіння при внутрішньовидовій гібридизації.

Створено каталог білкових компонентів та надано детальний опис 22 генотипів льону у вигляді білкових формул та графічного зображення позицій білкових компонентів з метою паспортизації генофонду.

Ключові слова: льон олійний, насіння, запасні білки, кислий поліакриламідний гель, електрофоретичні спектри, білкові компоненти, ідентифікація, поліморфізм.

АННОТАЦІЯ

Махно Ю. А. Идентификация селекционного и коллекционного материала льна масличного с использованием электрофореза запасных белков семян. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук по специальности 06.01.05 – селекция и семеноводство. – ГУ «Институт сельского хозяйства степной зоны» НААН Украины, г. Днепропетровск, 2013.

Диссертационная работа посвящена разработке метода использования полиморфизма запасных белков семян льна масличного с целью паспортизации генофонда и внедрения в практическую селекционную работу.

Для решения поставленной задачи был создан способ электрофореза запасных белков семян льна масличного в кислом полиакриламидном геле и разработана идентификация полученных электрофоретических спектров с четким определением позиции и интенсивности белкового компонента. Идентифицированы спектры сортов, селекционных образцов, мутантных линий и диких однолетних видов льна. Определено проявление стабильных (реперных) зон I, II, III, переменных – IV, V и дополнительных белковых зон – Ia, IIa, IIIa. Установлена высокая степень гетерогенности белков в электрофоретических спектрах коллекционного и селекционного материалов льна масличного по положению, интенсивности, присутствию или отсутствию белковых компонентов. Получены четкие и информативные электрофоретические спектры сортов отечественной и зарубежной селекции.

Установлено значительно большее количество белковых компонентов в спектре диких однолетних видов в отличие от культурного льна. Показаны отличия в спектрах мутантных линий от их исходных форм.

Установлено доминирование материнской формы в спектрах гибридов первого поколения. Определены некоторые отличия от родительских форм по компонентному составу спектров гибридных семян первого поколения. Выявлен высокий уровень полиморфизма белков в спектрах гибридов первого, второго и третьего поколений гибридных семян при внутривидовой гибридизации. В электрофоретических спектрах гибридных семян комбинации скрещивания Айсберг × ИЗ-11 установлено ядерное (Ia и IIIa) и цитоплазматическое (IIa и V) наследования белковых компонентов в зонах.

Создан каталог коллекционного и селекционного материала льна масличного в виде белковых формул и графического отображения позиций белковых компонентов, который может служить основой для паспортизации генофонда льна.

Ключевые слова: лен масличный, семена, запасные белки, кислый полиакриламидный гель, электрофоретические спектры, белковые компоненты, идентификация, полиморфизм.

SUMMARY

Makhno Yu. O. Identification of oil flax collection and breeding material using electrophoresis of seed storage proteins. – Manuscript copyright.

Thesis is submitted for obtaining a scientific degree of candidate of agricultural sciences in specialty 06.01.05 – breeding and seed production. SI «Institute of Agriculture of a Steppe zone» of Ukraine NAAS, Dnipropetrovsk, 2013.

Dissertation is devoted to studying flax storage proteins with electrophoresis. To solve this task methodology of flax storage proteins' electrophoresis in acid polyacrylamide gel was developed. Distribution of storage proteins was identified in I, II, III stable zones, IV, V variable protein zones and Ia, IIa, IIIa additional zones in the electrophoretic spectrum of the studied samples. Polymorphism of flax collection and breeding materials' electrophoretic spectrum is shown in position, intensity, presence or absence of protein components. High level of polymorphism is described in first, second and third generation of hybrids. Inheritance type of certain protein components is determined during intraspecific hybridization of oil flax. A catalogue of protein components as protein formulas of flax was developed.

Key words: oil flax, seed, reserve proteins, acid polyacrylamide gel, electrophoretic spectrum, protein components, interpretation, polymorphism.