

ВОЗМОЖНОСТИ СОЗДАНИЯ ИСХОДНОГО МАТЕРИАЛА ПОДСОЛНЕЧНИКА ПО ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИМ СПЕКТРАМ ЗАПАСНЫХ БЕЛКОВ СЕМЯН

И.В. Аксёнов, Л.Ю. Мищенко

Институт масличных культур НААН

Исследованиями изучены и установлены электрофоретические спектры запасных белков семян подсолнечника HEL1, HEL2, HEL3, HEL4, HEL5, HEL6, HEL7, HEL9. Аллельные варианты гелиантининкодирующих локусов HEL1, HEL4, HEL6, наличие-отсутствие компонентов локусов HEL5, HEL7, HEL9 позволяет провести на молекулярном уровне индивидуальные отборы растений, расширить генетическое разнообразие, создать новый исходный материал. Установленные серии аллельных вариантов электрофоретических спектров запасных белков семян являются основой записи по белковым формулам идентифицированных образцов, линий, гибридов подсолнечника.

Ключевые слова: подсолнечник, электрофоретический спектр, белковая формула, исходный материал.

Введение. Динамическое развитие производства масличных культур в мире обуславливается тенденцией роста пищевого и промышленного потребления растительных масел. Среди масличных культур подсолнечник является наиболее распространённой культурой не только в Украине, но и в мире. Его доля в мировом объёме производства масличных культур составляет 7,0 %, а в общем объёме производства растительных масел - 8,0 %. При производстве в мире товарных семян подсолнечника свыше 32,0 млн. т, производство подсолнечного масла в мире за последние годы достигло 14,0-15,0 млн. т. За последние 20 лет мировое производство подсолнечника увеличилось на 34,0 %.

Обеспечение сельскохозяйственного производства гибридами и сортами подсолнечника, которые характеризуются устойчивостью к неблагоприятным факторам физической среды выращивания и способны формировать стабильный уровень урожайности, является основной задачей селекционной работы.

Получение и внедрение в производство высокопродуктивных гибридов и сортов, имеющих высокий уровень адаптационных способностей и отвечающих требованиям производства основывается на использовании в селекционной работе нового исходного материала [1].

Решение этого вопроса невозможно без создания значительного расширения генетически разнообразного исходного материала, который является важнейшим компонентом биологического разнообразия и обеспечивает потенциальную ценность селекционного процесса [2]. В процессе проведения отборов растений, создания нового исходного материала важно добиться его генетической чистоты. Весь процесс создания исходного материала, в целях

повышения эффективности селекционной работы, необходимо контролировать на всех этапах проведения оценок и отборов. В то же время, наблюдаемая фенотипичность хозяйственно ценных признаков, сложность их генетического контроля, наличие различных форм скрытой генетической изменчивости – не всегда позволяет добиться эффективности в создании исходного материала, применяя отборы только по морфологическим признакам. Отбор растений, проводимый по морфологическим признакам, не выявляет многие формы скрытой генетической изменчивости, что приводит к генетическому засорению самого исходного материала, его генетической неоднородности [3].

Одним из способов, применяемых при оценке и отборе генотипов, является метод белковых маркеров, который основывается на биологической специфичности белков. Анализ спектров запасных белков позволяет использовать данный метод для изучения происхождения структуры генофонда, предоставляет возможность решать ряд вопросов от классификации коллекционных образцов до контроля генетической чистоты генотипов [4, 5, 6]. Применение белковых маркеров, наряду с морфологическими признаками растений, позволяет осуществлять контроль за генетической целостностью генотипов, избежать дублетов и ошибок при отборах и репродукции [7, 8].

Получаемы на молекулярном уровне матрицы генетических расстояний и построенные на их основе дендрограммы дают возможность лучше определить родословные связи создаваемого исходного материала, выявить генетические различия и изменчивость. Дифференциация исходного материала по белковым спектрам расширяет возможности обоснования подбора родительских пар для комбинаций скрещивания [9]. Установленный полиморфизм макромолекул белков, знания разнообразия и закономерностей наследования компонентов белковых спектров расширяют возможности идентификации генотипов. Полиморфизм по белковым локусам показывает, что уровень генетической изменчивости является такой же видовой характеристикой растений, как к примеру и морфологические признаки [10, 11].

Таким образом, актуальной целью исследований является изучение возможности использования электрофоретических спектров белков при оценке и отборах растений в процессе создания нового исходного материала подсолнечника.

Материалы и методы. Исследования выполнялись в лаборатории генетики Института масличных культур. В исследованиях изучались вновь создаваемые самоопыленные образцы подсолнечника.

Оценка и отбор растений по морфологическим признакам проводились в полевых условиях на делянках с однократной повторностью.

Полевые исследования проводились в следующих условиях. Опыты закладывались в 9-ти польном севообороте Института масличных культур НААН. Почва опытных участков – чернозём обычный среднемощный малогумусный тяжелосуглинистый с содержанием гумуса 3,0-3,5% и нейтральной реакцией почвенного раствора – рН 7,0. Опыты размещали по предшественнику – озимая пшеница.

В период роста и развития растений проводили фенологические наблюдения, описание растений по морфологическим признакам.

Индивидуальная оценка и отбор растений подсолнечника по электрофоретическим спектрам запасных белков выполнялись в лабораторных условиях. Электрофорез запасных белков семян проводили по методике

Ф.А. Попереля. Перед проведением электрофореза семена образцов подсолнечника индивидуально облущивали, извлекали ядро семени. Ядро каждого из семян измельчали до гомогенного состояния и обезжиривали. Ядра семян обезжиривали в растворе ледяной уксусной кислоты (ЛУК) с ацетоном с последующим центрифугированием при оборотах 5000 об/мин в течении 10 мин. Запасные белки ядра (гелиантинины) выделяли в кислой среде в присутствии мочевины и ЛУК. Электрофорез проводили в кислом полиакриламидном геле (ПААГ), который готовили с использованием акриламида, ЛУК, метилен-бис-акриламида, мочевины. Электродный буфер (рН 3,1) содержал глицин и ЛУК. Электрофорез проходил при напряжении 500V и начальной силе тока на каждую пластину электрофоретической камеры 50Ma. Время электрофореза 2,5-3,0 час. Полосы белков на гелевых пластинах фиксировали и окрашивали в растворе, который содержал ЛУК, трихлоруксусную кислоту (ТХУ), ацетон, порошок краску Coomassie brilliant blue R-250.

Все растворы для проведения электрофореза готовили на дистиллированной воде с использованием чистых химических реактивов (категорий х.ч. или ч.д.а.).

После окрашивания гелиевые пластины отмывали водопроводной водой и этиловым спиртом.

Описание электрофоретических спектров белков производили на основании локализации и интенсивности белковых компонентов в электрофоретических спектрах на электрофореграмме.

Результаты исследований и их обсуждение. Исходный материал подсолнечника создавался посредством проведения самоопыления и последующих отборов. Объектами самоопыления, оценок и отборов были сорта, гибридные комбинации, межвидовые гибриды, гибриды отечественной и зарубежной селекции.

Изучение наследования и изменчивости электрофоретических спектров запасных белков семян образцов подсолнечника показало, что внутривидовой полиморфизм белков обуславливается гелиантининкодирующими локусами. Генетический контроль гелиантининов, как показывает анализ электрофоретических спектров белков на электрофореграмме, осуществляется как минимум 5- 6 локусами: HEL 1, HEL 2, HEL 3, HEL 4, HEL 5, HEL 6 (рис. 1).

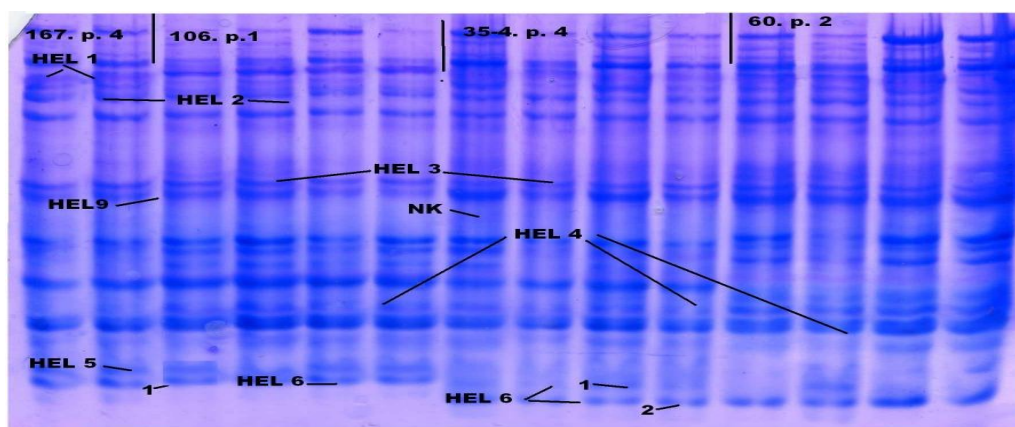


Рис. 1. Аллельные варианты электрофоретических спектров запасных белков семян подсолнечника самоопылённых образцов

© И.В. Аксёнов, Л.Ю. Мищенко

У всех отбираемых и создаваемых образцах подсолнечника по белковым спектрам всегда отмечается наличие гелиантининкодирующих локусов HEL 1, HEL 2, HEL 3, HEL 4, HEL 6. Локус HEL 5 установлен только у отдельных образцах, выделенных из сортов селекции Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур, гибридов иностранной селекции, межвидовых гибридов. Одним отдельным локусом контролируется от одного до несколько сцеплено наследуемых компонентов полипептидов электрофоретического спектра – блоков электрофоретических компонентов гелиантинина.

В локусах HEL 2, HEL 3 при проведении самоопыления, гибридизации не отмечено никаких генетических изменений в их аллельных вариантах. Локус HEL 2 всегда представлен на электрофореграммах двумя компонентами, локус HEL 3 – одним компонентом одинаковой интенсивности и подвижности.

Локус HEL 4 контролирует синтез серии компонентов с разной электрофоретической подвижностью и разной молекулярной массой, что обуславливает разные аллельные варианты данного локуса. Локус может быть представлен от 7 до 14 компонентов разной интенсивности и подвижности, что позволяет идентифицировать создаваемые образцы по разным аллельным вариантам локуса.

В данном локусе только 10 и 11 компоненты не подвержены генетическим изменениям. За счёт разных аллельных вариантах установлена значительная изменчивость только именно по локусу HEL 4. Отбор растений по белковым спектрам из полученных межвидовых гибридов позволил создать образцы с новыми локусами и расширить генетическое разнообразие. Отбор по электрофоретическим спектрам запасных белков позволил выделить и создать образцы с новыми специфическими белковыми спектрами - HEL 7, HEL 9, новым компонентом **nk**, разными аллельными вариантами локуса HEL 4.

Созданные самоопылённые образцы 167 (методом индивидуального отбора из гибрида Сержан), 106 (методом индивидуального отбора из сорта Флагман), характеризуются наличием и интенсивным проявлением пятого локуса HEL 5. При использовании этих образцов в комбинациях скрещиваний в качестве отцовских форм наблюдается доминантное наследование пятого локуса.

На электрофореграмме (см. рис. 1) у представленных образцах 167, 106, 36, 60 отмечается проявление вновь установленного и представленного одним компонентом локуса HEL 9. В зависимости от образца компонент имеет разную степень проявления интенсивности. Наибольшая интенсивность локуса, в сравнении с другим образцами, наблюдается у самоопылённого образца 60, созданного при индивидуальном отборе растений из межвидового гибрида *H.petiolaris*×*H.praesox*.

В результате индивидуального отбора по электрофоретическим спектрам белков из гибрида подсолнечника Еврофлор выделен и создан самоопылённый образец 35-4 с новым локусом **nk**, который на электрофореграммах представлен одним компонентом слабой интенсивности.

Образцы 167, 106, 60, 35-4 гомозиготны и выровнены по морфологическим признакам и отличаются проявлением, интенсивностью компонентов электрофоретических спектров, аллельными вариантами четвёртого локуса HEL 4. Образец 35-4 характеризуется разной интенсивностью отдельных компонентов локусов HEL 4, HEL 9, слабой интенсивностью локуса HEL 5, проявлением нового компонента **nk**.

Анализом изменения аллельных вариантов электрофоретических спектров белков при проведения самоопыления, гибридизации полученных образцов установлено, что блок электрофоретических компонентов является фенотипическим маркером соответствующего полигенного локуса на уровне белковых молекул и приравнивается к понятию «аллель» для кластерного локуса. По каждому из локусов были идентифицированы серии аллельных вариантов, каждый из которых контролирует группу четко наследуемых электрофоретических компонентов, различающихся по их числу, подвижности и интенсивности. Это дало возможность разработать принципы записи белковых формул вновь создаваемых самоопыленных образцов. В основу белковых формул положено то, что в электрофоретических спектрах аллели генов, отвечающие за синтез того или иного полипептида представлены полосами, так называемым компонентами. Белковые формулы отражают проявление и присутствие пронумерованных по порядковым номерам компонентов в каждом электрофоретическом спектре белков. В таблице 1 приведены установленные и идентифицированные белковые формулы новых созданных по белковым спектрам самоопыленных образцов подсолнечника с уровнем генетической чистоты по белковым спектрам 99,0-100,0%.

Таблица 1

**Белковые формулы самоопыленных образцов подсолнечника
(2006-2013 гг.)**

Обра- зец	Электрофоретические спектры запасных белков семян							
	HEL 1	HEL 2	HEL 3	HEL 4	HEL 5	HEL 6	HEL 7	HEL 9
42	1	1,2	1	<u>1, 5*</u> , 6, 8, 9, 10, 11	1	2	0	0
31	1	1,2	1	2, 3,4, 5, <u>6</u> , 7, 8, 9, 10, 11,	1	1	0	0
113	2	1,2	1	<u>2,3,4,5</u> , 6, 8, 9, 10, 12	0	2	0	0
97-3	1	1,2	1	<u>2,3,4,6</u> , 8,9,10,11	0	1	0	0
109	2	1,2	1	<u>1,2</u> , 5, 6, 8 9,10,11	1	1	1	0
100	1	1,2	1	<u>1,2, 5, 6</u> , <u>7,8,9,10,11,12</u>	0	1	0	1

Прим. 1, 5* - сильная интенсивность компонента.

Каждый компонент электрофоретического спектра имеет свой порядковый номер. Использование белковых формул при анализе электрофоретических спектров белков отдельно каждого анализируемого образца, линии, гибрида решает вопрос поддержания генетической чистоты при их репродукции.

Во всех проанализированных и вновь созданных образцах и родительских линиях подсолнечника частота встречаемости без изменения аллельных вариантов локусов HEL 2, HEL 3 составляет 100,0% (рис. 2).

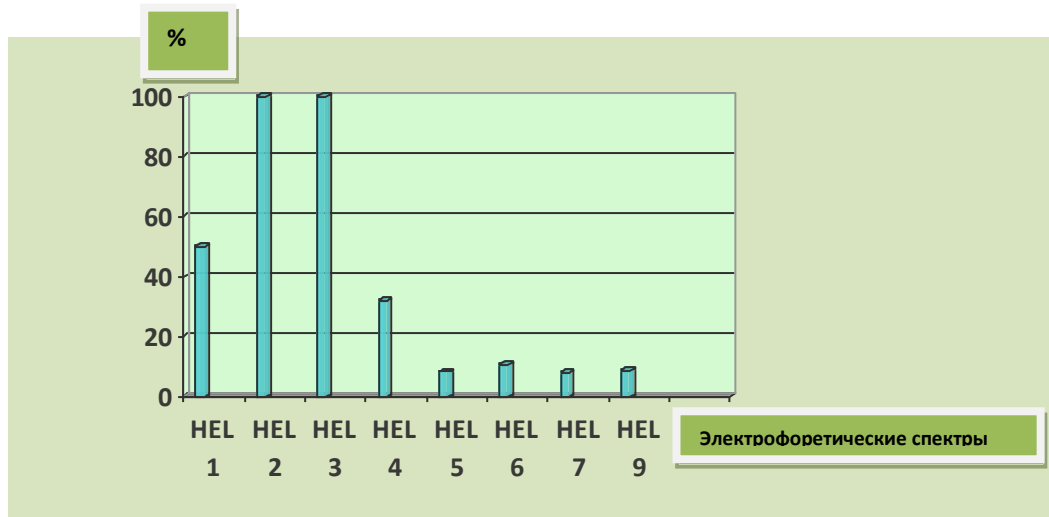


Рис. 2. Процент зустрічності електрофоретических спектрів запасних білків насіння на електрофореграмах самоопиленних зразків, батьківських ліній, гібридів підсонячника, %

Локуси HEL 5, HEL 7, HEL 9 завжди представлені однією аллеллю, однак частота їх проявлення на електрофореграмах білків дуже низька і знаходиться на рівні 8,0-9,5%. Локус HEL 6 може бути представлений двома компонентами: першим і другим, а також тільки першим або другим компонентом. Ідентифікування аллельних варіантів білкових спектрів, аналіз білкових формул, зразків, батьківських ліній і гібридів підсонячника показують найбільший поліморфізм по електрофоретическому спектру HEL 4. Даний білковий спектр спостерігається у всіх проаналізованих зразках. Однак спектр може бути представлений різними аллельними варіантами (рис. 3).

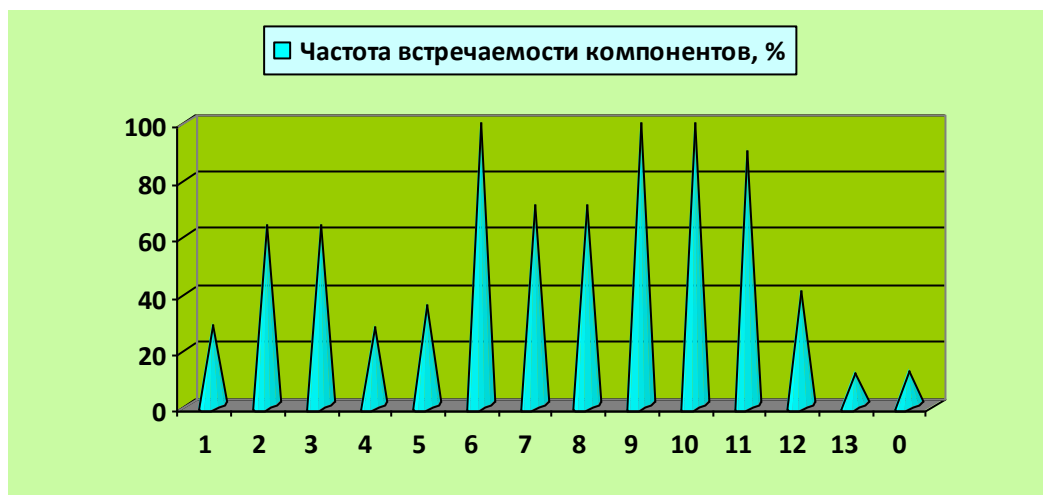


Рис. 3. Частота зустрічності компонентів четвертого електрофоретического спектра HEL 4

Среди компонентов четвёртого электрофоретического спектра HEL 4 во всех образцах подсолнечника встречаются без генетических изменений 9 и 10 компоненты с одинаковым уровнем интенсивности. 100,0% уровень встречаемости при разном уровне интенсивности наблюдается по 6 компоненту этого локуса. Процент частоты проявления остальных компонентов составляет от 10,0 до 90,0%.

Компоненты электрофоретического спектра HEL 4 с учётом разного процента проявления, сочетания составляют различные аллельные варианты локуса, которые могут использоваться для идентификации селекционно-семеноводческого материала, использоваться в качестве белковых маркеров в процессе оценки, отбора и создания родительских линий подсолнечника, поддержания их генетической чистоты. Разница в аллельных вариантах образцов 31 и 42 представлена на рис. 4.

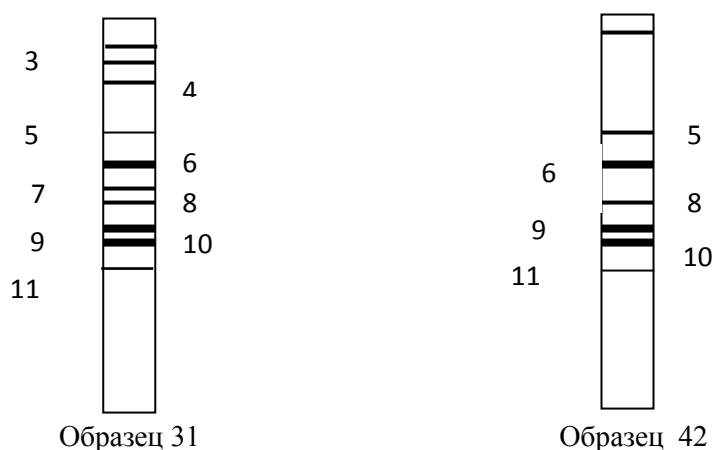


Рис. 4. Аллельные варианты компонентов четвёртого электрофоретического спектра HEL 4

В белковом спектре HEL 4 самоопылённого образца 42, в отличие от образца 31, отсутствуют 2, 3, 4, 7 компоненты, наблюдается проявление 1 компонента.

Проявление на электрофореграммах аллельных вариантов обуславливается разной локализацией полипептидов в период проведения электрофореза, в зависимости от их молекулярной массы и подвижности, наличием-отсутствием компонентов в спектре образцов. Установленные различия в аллельных вариантах позволяют на молекулярном уровне выделить, а в дальнейшем проводимыми индивидуальными отборами расширить генетическое разнообразие подсолнечника, создать новый исходный материал в селекции подсолнечника.

Выводы. Оценка и отбор растений подсолнечника по электрофоретическим спектрам запасных белков семян решает вопросы расширения генетического разнообразия и создания нового исходного материала. Анализ электрофореграмм позволяет установить и идентифицировать аллельные варианты электрофоретических спектров. Основным отличием аллельных вариантов белковых спектров является наличие-отсутствие

компонентов в белковом спектре, локализация компонентов полипептидов, разная интенсивность их проявления. Наибольший полиморфизм белков при наибольшем количестве аллельных вариантов, отмечается по четвёртому электрофоретическому спектру NEL 4. Установленные аллельные варианты позволяют записать белковые формулы созданных самоопылённых образцов, линий, гибридов подсолнечника, контролировать генетическую чистоту.

Литература

1. Аксёнов И.В. Особенности проявления отдельных хозяйственно ценных признаков родительских линий подсолнечника при оценке на адаптивность / И.В. Аксёнов, В.Н. Никонова, Е.В. Максюк, В.И. Левченко // Науково-технічний бюлетень Інституту олійних культур НААН. – 2012. – Вип. 17. – С. 34-41.
2. Дзюбенко Н.И. Вавиловская стратегия пополнения, сохранения и рационального использования генетических ресурсов культурных растений / Н.И. Дзюбенко // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – СПб.: ВИР, 2012. – Т.169. – С. 4-40.
3. Аксёнов И.В. Отбор растений по электрофоретическим спектрам запасных белков семян в повышении генетической однородности инбредной линии подсолнечника ЗЛ-95А / И.В. Аксёнов, В.Н. Никонова, О.В. Логвиненко // Науково-технічний бюлетень Інституту олійних культур НААН. – 2008. – Вип. 13. – С. 53-59.
4. Богачёва Н.Н. Молекулярно- генетические исследования гибридов сахарной свеклы с разным уровнем продуктивности / Н.Н. Богачёва, Т.П. Федулова, Д.Н. Федорин // Биотехнология в растениеводстве, животноводстве, Материалы 11-ой молодёжной научной конференции. – М.: 2011. – С.13-14.
5. Федулова Т.П. Молекулярно-генетическое изучение родительских форм и гибридов сахарной свеклы / Т.П. Федулова, Н.Н. Богачева, Д.Н. Федорин, М.А. Богомолов, В.П. Ошевнев // Сахарная свекла. - 2010. - № 8. - С. 8-10.
6. Якупова И.А. Использование полиморфизма запасных белков семян для выявления спонтанных внутри- и межвидовых гибридов у салата / Анисимова И.Н., Шашилова Л.И. // Доклады РАСХН. – М. 2006. – № 3 – С. 15-17.
7. Губарева Н.К. Перспективы использования электрофореза белков зерна для контроля генетической целостности, уточнения паспортных данных и выявления дуплетов в коллекции яровой мягкой пшеницы / Н.К. Губарева, Н.М. Мартыненко, Е.В. Зуев, А.Н. Брыкова // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – СПб.: ВИР, 2002. – Т. 120. – С. 158-165.
8. Перчук И.Н. Выявление дублетных образцов в коллекции овса с использованием электрофореза авенин / И.Н. Перчук, И.Г. Лоскутов, Е.В. Блинова // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – СПб.: ВИР, 2009. – Т. 165. – С. 182-185.
9. Богачева Н.Н. Электрофоретический анализ белков семян, полученных при межвидовой гибридизации (*Beta vulgaris* L. x *Beta corolliflora* Zoss.) / Н.Н. Богачева, Р.В. Усачева // Селекция и семеноводство полевых культур: Юбилейный сборник научных трудов. – Воронеж, ВГАУ, 2007. – С. 34-35.

10. Романова Е.В. О биохимическом полиморфизме белков сельскохозяйственных растений / Е.В. Романова, О.Л. Мартынов, А.Ф. Туманян // Вестник РАСХН. – 2003. – № 6. – С. 39-40.

11. Иваченко Л.Е. Ферменты сои: монография / Л.Е. Иваченко. – Благовещенск: Издательство БГПУ, 2010. – 214 с.

МОЖЛИВОСТІ СТВОРЕННЯ ВИХІДНОГО МАТЕРІАЛУ СОНЯШНИКУ ЗА ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНИМИ СПЕКТРАМИ ЗАПАСНИХ БІЛКІВ НАСІННЯ

І.В. Аксьонов, Л.Ю. Міщенко

Дослідженнями вивчено та встановлено електрофоретичні спектри запасних білків насіння соняшнику HEL1, HEL2, HEL3, HEL4, HEL5, HEL6, HEL7, HEL9. Алельні варіанти геліантинінкодуєчих локусів HEL1, HEL4, HEL6, наявність-відсутність компонентів локусів HEL5, HEL7, HEL9 дозволяє виконати на молекулярному рівні індивідуальні добори рослин, розширити генетичне різноманіття, створити новий вихідний матеріал. Встановлені серії алельних варіантів електрофоретичних спектрів запасних білків семя є основою запису за білковими формулами ідентифікованих зразків, ліній, гібридів соняшнику.

Ключові слова: соняшник, електрофоретичний спектр, білкова формула, вихідний матеріал.

POSSIBILITIES OF CREATION OF SUNFLOWER INITIAL MATERIAL FOR ELECTROPHORETIC SPECTRA OF SEED STORAGE PROTEINS

I.V. Aksyonov, L.Yu. Mishchinko

Researches studied and established the electrophoretic spectra of storage proteins of seed of sunflower of HEL1, HEL2, HEL3, HEL4, HEL5, HEL6, HEL7, HEL9. Allelic variants of locuses HEL1, HEL4, HEL6, that encode helianthin, presence-absence of components of locuses of HEL5, HEL7, HEL9 allows to conduct the individual selections of plants at molecular level, extend a genetic variety, create a new initial materials. The set series of allelic variants of electrophoretic spectra of storage proteins of seed are basis of record by protein formulas of the identified samples, lines, hybrids of sunflower.

Keywords: sunflower, electrophoretic spectrum, proteined formula, initial material.

Рецензент: Ю.И. Ткалич, доктор с.-х. наук, заведующий лабораторией защиты растений Института сельского хозяйства Степной зоны НААН.