

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИХ СПЕКТРОВ ЗАПАСНЫХ БЕЛКОВ СЕМЯН В СОЗДАНИИ РОДИТЕЛЬСКИХ ЛИНИЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА

И.В. Аксёнов, Л.Ю. Мищенко

Институт масличных культур НААН

Изучены и установлены аллельные варианты электрофоретических спектров запасных белков семян подсолнечника HEL1, HEL2, HEL3, HEL4, HEL5, HEL6, HEL7, HEL9. Произведён отбор растений по белковым спектрам. Методом отбора по белковым спектрам созданы самоопылённые образцы подсолнечника 3-38 и 106, которые не отличаются по морфологическим признакам, но имеют отличия на молекулярном уровне при разном проявлении количественных признаков. Отобранный из образца 3-38 и созданный по белковым маркерам образец 106 имеет меньшую продолжительность периода вегетации на 14 суток и меньший уровень урожайности на 0,19 т/га без изменения содержания жира в семенах.

Ключевые слова: подсолнечник, образец, электрофоретический спектр, отбор.

Введение. Гетерозисная селекция подсолнечника основывается на создании генетически чистых родительских линий и их дальнейшем применении в комбинациях скрещивания в целях получения гибридов. Эффективность создания гетерозисных гибридов определяется созданием и использованием генетически разнообразного исходного материала, правильным подбором родительских компонентов для гибридных комбинаций. Максимальное проявление эффекта гетерозиса зависит не только от комбинационной способности родительских форм. Значительно в большей степени эффект гетерозиса определяется генетической чистотой каждого из родительских компонентов и одновременно их генетическими различиями между собой [1]. Проведение селекционной работы по созданию гибридов подсолнечника нового поколения требует нового подхода по созданию исходного материала, более детального анализа его генетической структуры. Традиционно отбор и создание исходного материала в селекции основывается на оценке растений по морфологическим признакам [2]. Однако, оценка и отбор растений только на основании их морфологических признаков не всегда эффективно раскрывает в полной мере генетическую структуру создаваемых родительских компонентов и гибридных комбинаций, не обеспечивает получение селекционно-семенного материала с высокой генетической чистотой по причине ограниченности количества информативных морфологических маркеров, имеющих нейтральное действие на формирование продуктивности растений. К тому же, фенотипические признаки могут иметь сложный характер наследования, и морфологические признаки не выявляют формы скрытой генетической изменчивости [3].

С введением молекулярно-генетических методов в селекционный процесс открываются новые возможности изучения генетического разнообразия, анализа генетической структуры исходного материала, идентификации и контроля за генетической чистотой генотипов [4, 5]. Одним из способов оценки

генотипов на молекулярном уровне является метод белковых маркеров, основанный на биологической специфичности белков, выявляемой при электрофорезе. Применение электрофоретического анализа запасных белков позволяет оценивать генотипы по их генетической чистоте. По компонентному составу электрофоретических спектров становится возможным выделить и идентифицировать образцы растений, создать принципиально новый исходный материал, определить степень его генетического родства [6].

Цель исследований: изучить и установить электрофоретические спектры белков самоопылённых образцов подсолнечника, возможности отбора растений по белковым маркерам в создании нового исходного материала.

Материалы и методы. Исследования выполнялись в лаборатории генетики Института масличных культур. Материалом для исследований были образцы подсолнечника, полученные после проведения самоопыления, их оценки и отбора.

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. 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 за растениями, их описание 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 облучивали, 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.

Результаты исследований и их обсуждение. В период проведения и отбора растений подсолнечника на молекулярном уровне в качестве систематизирующего признака использовались электрофоретические спектры

запасных белков семян, где основными компонентами белковой фракции являются 11S глобулины. Проведённым анализом полученных электрофореграмм самоопылённых растений установлена разница в электрофоретических спектрах белков. Компонентный состав анализируемых образцов подсолнечника отличался наличием-отсутствием компонентов и их интенсивности в составе установленных и идентифицированных белковых спектров: Hel 1, Hel 2, Hel 3, Hel 4, Hel 5, Hel 6 (рис. 1).

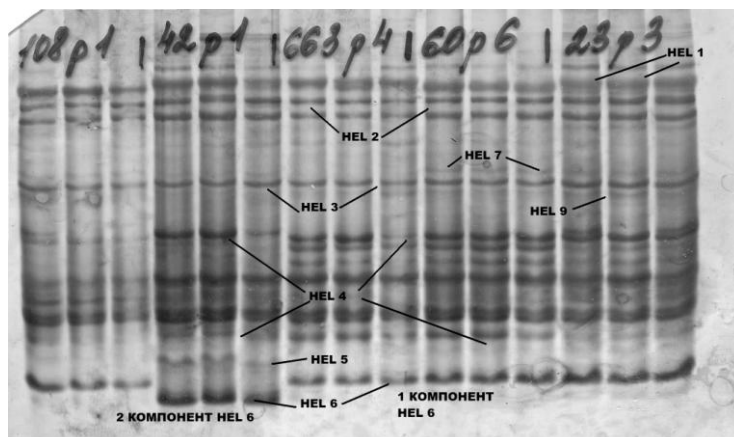


Рис.1. Установленные электрофоретические спектры запасных белков самоопылённых образцов подсолнечника

При анализе электрофоретических спектров запасных белков семян подсолнечника, установлено, что выделенные самоопыленные образцы отличаются по аллельным вариантам следующих гелиантининкодирующих локусов: Hel 1, Hel 4, Hel 6. Не отмечаются генетических изменений при проведении самоопыления, гибридизации образцов, родительских линий подсолнечника по локусам Hel 2 и Hel 3. Локусы Hel 7, Hel 9, Hel 5, которые представлены на электрофореграммах одним компонентом, характеризуются наличием или отсутствием, проявлением разной интенсивности.

При этом характерной особенностью для всех образцов и линий является наличие пяти белковых спектров: Hel 1, Hel 2, Hel 3, Hel 4, Hel 6; наличие-отсутствие трёх белковых спектров: Hel 7, Hel 9, Hel 5; изменение аллельных вариантов у трёх электрофоретических спектров: Hel 1, Hel 4, Hel 6; наличие от 7 до 14 компонентов в четвёртом белковом спектре Hel 4, имеющие различную интенсивность. За счёт разных аллельных вариантов установлена значительная изменчивость только по локусу Hel 4. Наибольший полиморфизм при идентификации электрофоретических спектров отмечено среди низкомолекулярных белков.

Разница в аллельных вариантах локусов установлена как и в первые годы проведения самоопыления, так и между самими самоопылёнными образцами подсолнечника в более поздние сроки самоопыления.

Установление компонентов белковых спектров по месту локализации на электрофореграммах и их интенсивности решает проблему отбора и идентификации на молекулярном уровне вновь создаваемых образцов подсолнечника.

Проведённый индивидуальный отбор растений по белковым спектрам в процессе создания инбредных линий подсолнечника, позволил выделить новые

самоопылённые образцы, которые отличаются аллельными вариантами локусов, и довести их до гомозиготного состояния на молекулярном уровне. Так, при создании самоопылённого образца подсолнечника 3-38, после проведения идентификации электрофоретических спектров, установленная разница в аллельных вариантах белковых спектров позволила выделить и создать самоопылённый образец 106. В период проведения отборов по морфологическим признакам растения образцов подсолнечника 3-38 и 106 описывались и идентифицировались как один образец. В то же время, индивидуальный анализ этих же растений по электрофоретическим спектрам показал разницу по белковым спектрам.

Разница отмечалась по следующим электрофоретическим спектрам HEL 1, HEL 9, HEL 4, HEL 5 (рис.1, рис. 2).

У образца 106 наблюдается отличительное проявление аллельных вариантов компонентов и их интенсивности в электрофоретических спектрах.

Образец 3-38 характеризуется меньшим проявлением интенсивности полипептида и его меньшей подвижностью в первом электрофоретическом спектре HEL 1.

Для образца 106 характерно наличие локусов HEL 9 и HEL 5, которые представлены одним компонентом. Эти локусы не отмечаются на электрофореграммах образца 3-38. Анализируемые растения двух образцов отличаются по аллельным вариантам четвёртого электрофоретического спектра HEL 4. Разница в аллельных вариантах проявляется в присутствии-отсутствии компонентов 0, 1, 8, 11, 12 в этом белковом спектре.

Электрофоретический спектр HEL 4 растений образца 3-38 имеет проявление 0 (нулевого) компонента и отсутствие 1,8, 11, 12 компонентов.

Напротив, электрофоретический спектр HEL 4 растений образца 106 характеризуется отсутствием 0 (нулевого) компонента и присутствием с проявлением сильной интенсивности 1, 8, 11, 12 компонентов. Отличительной особенностью электрофоретических спектров представленных образцов является большая степень интенсивности компонентов (кроме шестого локуса HEL 6) образца подсолнечника 106 по сравнению с самоопылённым образцом 3-38.

При этом на электрофореграммах образцов 3-38 и 106 не установлено отличительных особенностей по электрофоретическим спектрам запасных белков семян HEL 2, HEL 3.

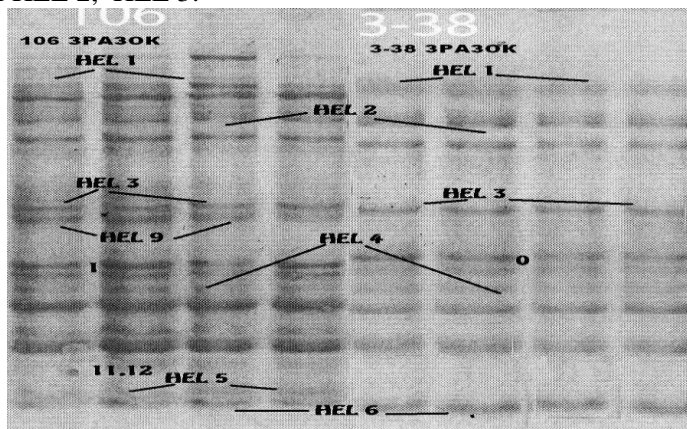


Рис. 2. Компоненты электрофоретических спектров запасных белков семян самоопылённых образцов подсолнечника 3-38 и 106 с описанием локусов, 2010-2013 гг.

Индивидуальная оценка растений на молекулярном уровне позволила выделить и отобрать растения, которые не отличаются по морфологическим признакам, но имеют отличия в аллельных вариантах белковых спектров.

Сравнительная оценка растений по электрофоретическим спектрам решила вопрос повышения генетической чистоты на молекулярном уровне вновь создаваемого образца подсолнечника 3-38, при одновременном отборе и создании ещё одного нового образца 106.

Выделенные образцы растений по молекулярным маркерам были оценены по проявлению количественных признаков в периоды вегетации.

Самоопылённые образцы подсолнечника 3-38 и 106 отличались по отдельным количественным признакам. Выделенный образец подсолнечника 106 из образца 3-38 характеризуется меньшей продолжительностью вегетационного периода. По продолжительности периода вегетации образец 106 относится к третьей ранней группе спелости. Продолжительность периода вегетации растений этого образца составляет 99 суток, что на 15 суток меньше, чем у образца 3-38 (табл.).

Таблица

Отдельные количественные признаки созданных самоопылённых образцов подсолнечника (среднее за 2010-2013 гг.)

Самоопылённый образец	Продолжительность периода вегетации, сут.	Урожайность, т/га	Масса 1000 семян, г	Масличность, %
3-38	114	0,78	24,2	43,2
106	99	0,59	27,4	43,0
НСР ₀₀₅	2,4	0,012	1,9	0,8

Самоопылённый образец 3-38 относится к 5-ой среднеспелой группе и имеет продолжительность вегетационного периода 114 суток и характеризуется более высоким уровнем формирования урожайности. Образец 3-38, имея более продолжительный период вегетации, формировал урожайность на 0,19 т/га больше, чем раннеспелый образец 106.

В тоже время, масса 1000 семян у образца 3-38, по сравнению образцом 106, была меньше на 3,2 г. Созданные и отличающиеся по аллельным вариантам электрофоретических спектров, образцы 3-38 и 106 имели одинаковый уровень масличности, который находился в пределах 43,0-43,2%.

Выводы. При создании самоопылённых линий подсолнечника анализ аллельных вариантов электрофоретических спектров запасных белков семян показывает необходимость и эффективность оценки и отбора растений по белковым спектрам для повышения генетической чистоты и доведения вновь создаваемого селекционного материала до гомозиготного состояния на молекулярном уровне. Индивидуальный отбор растений подсолнечника на молекулярном уровне в процессе создания инбредных линий позволяет оценить и выделить новые образцы, которые не отличаются по морфологическим признакам, но имеют отличия в аллельных вариантах электрофоретических спектрах и характеризуются разным проявлением хозяйственно ценных признаков.

Литература

1. Югенхеймер Р.У. Кукуруза. Улучшение сортов, производство семян, использование /Р.У. Югенхеймер. – М.: Колос, 1979. – С. 103.
2. Константинова, Е.А. Использование маркерных признаков в селекции подсолнечника / Е.А. Константинова // Сборник тезисов 2-й Международной конференции молодых ученых. Харьков, 2003. – С. 162-163.
3. Буренин В.И. Применение белковых маркеров для идентификации генетических ресурсов свеклы / В.И. Буренин, И.П. Гаврилюк // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. – 1994. – №3. – С. 14-16.
4. Тихонова М.А. Молекулярно-генетические маркеры в селекции подсолнечника / М.А. Тихонова // Сборник материалов 6-й Международной конференции молодых учёных и специалистов «Инновационные направления исследований в селекции и технологии возделывания масличных культур, посвящённой 125-летию со дня рождения В.С. Пустовойта. 24-25 февраля 2011 г., г. Краснодар (Россия). – Краснодар: ООО «МС-Центр», 2011. – С. 307-310.
5. Черчель В.Ю. Оцінка різних типів гібридів кукурудзи за генетичними дистанціями та ступенем гетерозису / В.Ю. Черчель, Б.В. Дзюбецький // Вісник аграрної науки. – 2013. – № 8. – С. 33-37. .
6. Сидорова В.В. Возможности использования зеиновых маркеров в повышении эффективности гетерозисной селекции кукурузы / В.В. Сидорова, Г.В. Матвеева, Ю.В. Корв, А.В. Конарев // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – СПб: ВИР, 2012. – Т. 170. – С. 147-157.

ВИКОРИСТАННЯ ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНИХ СПЕКТРІВ ЗАПАСНИХ БІЛКІВ НАСІННЯ У СТВОРЕННІ БАТЬКІВСЬКИХ ЛІНІЙ СОНЯШНИКУ

І.В. Аксьонов, Л.Ю. Міщенко

Вивчено та встановлено алельні варіанти електрофоретичних спектрів запасних білків насіння соняшнику HEL1, HEL2, HEL3, HEL4, HEL5, HEL6, HEL7, HEL9. Виконано добір рослин за білковими спектрами. Методом добору за білковими спектрами створено самозапилені зразки соняшнику 3-38 та 106, які не відрізняються за морфологічними ознаками рослин, но мають відмінність на молекулярному рівні при різному прояву кількісних ознак. Створений зразок 106, що відібрано із зразку 3-38 за білковими маркерами, має меншу тривалість періоду вегетації на 14 діб, менший рівень врожайності на 0,19 т/га без зміни вмісту жиру в насінні.

Ключові слова: соняшник, зразок, електрофоретичний спектр, добір.

USE OF ELECTROPHORETIC SPECTRA OF SEED STORAGE PROTEINS FOR DEVELOPMENT THE PARENTAL LINES OF SUNFLOWER

I.V. Aksyonov, L.Yu. Mishchinko

The allelic options of electrophoretic spectra of storage proteins of sunflower seeds of HEL1, HEL2, HEL3, HEL4, HEL5, HEL6, HEL7, HEL9 are studied and set. The selection of plants is produced on proteins spectra. The selection method on protein spectra is created the self-pollinated samples of sunflower 3-38 and 106 which don't differ on morphological signs of plants, but have differences at molecular level by different showing

© И.В. Аксёнов, Л.Ю. Мищенко

of quantitative signs. Selected from a sample 3-38 and created on protein markers of new sample 106 has the smaller duration of the period of vegetation on 14 days and smaller level of productivity on 0,19 t/hectare without change of the content of fat in seeds.

Key words: sunflower, sample, electrophoretic spectrum, selection.

Рецензент: И.Д. Ткалич, доктор с.-х. наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории технологии выращивания яровых зерновых и масличных культур Института сельского хозяйства Степной зоны НААН.