

ЛЕМЕШ В.А.¹, БОГДАНОВА М.В.^{1✉}, АНДРОНИК Е.Л.², ГОЛУБ И.А.²

¹ ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»,

Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27, e-mail: m.bogdanova@igc.by

² РУП «Институт льна»,

Беларусь, 211003, Витебская обл., Оршанский р-н, а/г Устье, ул. Центральная, 27,

e-mail: institut_len@tut.by

✉ m.bogdanova@igc.by, +375172840413, +375297706871

ГЕНОМНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ ОЦЕНКИ И ОТБОРА СЕЛЕКЦИОННОГО МАТЕРИАЛА ЛЬНА МАСЛИЧНОГО

Постоянно растущий спрос на производство высококачественных масел требует ускорения темпов создания новых улучшенных и конкурентоспособных на мировом рынке сортов льна масличного. Современная селекция подразумевает использование прикладных методов, значительно ускоряющих получение растений с заданными хозяйственно-ценными признаками.

Специфические молекулярные маркеры могут использоваться для генотипирования при оценке имеющегося и получении нового селекционного материала. Анализ на наличие целевого гена, определяющего хозяйственно-ценный признак, проводится на любом этапе развития растения, в то время как биохимический метод оценки жирнокислотного состава масла осуществим только после обмолота. Преимущество ДНК-маркеров к конкретным генам заключается в том, что они выявляют искомые гены в родительских растениях до опыления, что позволяет на ранних этапах развития растений различать гомо- и гетерозиготы, выбраковывать нежелательный материал и сокращать до минимума высев следующих поколений для выравнивания признака. В связи с этим можно утверждать, что использование технологии ДНК-маркирования в селекционных программах значительно сократит объем прорабатываемого селекционного материала, упростит процесс отбора родительских форм для скрещивания, сократит сроки создания новых сортов льна.

Масличный лен является ценной технической культурой многостороннего использования. Традиционные сорта масличного льна содержат 45–50 % масла. В состав льняного масла входит пять основных жирных кислот – пальмитиновая (C16:0, ~6 %), стеариновая (C18:0, ~2,5 %), олеиновая (C18:1 цис-Δ9; ~19 %), ли-

нолевая (C18:2 цис-Δ9, 12; ω-6 жирные кислоты; ~24 %) и α-линоленовая (C18:3 цис-Δ9, 12, 15; ω-3 жирные кислоты; ~55–57 %) кислоты [1]. Высокая доля α-линоленовой кислоты приводит к окислительной нестабильности льняного масла. По этой причине льняное масло относится к быстровысыхающим маслам, так как легко полимеризуется в присутствии кислорода воздуха («высыхает»), в результате чего образуется относительно мягкая и гибкая пленка, что позволяет применять льняное масло в промышленности, для производства, красок, линолеумов, чернил, мыла и лаков [2]. Краски, изготовленные на льняной олифе, не подвергаются разрушениям в течение столетий.

Использование льняного масла обычных масличных сортов в пищу ограничено из-за его высокой нестабильности. Создание линий льна с низким содержанием α-линоленовой кислоты [3, 4], известных как Solin или Linola™, расширило потенциальные рынки для льняного масла. По сравнению с маслом традиционных сортов льна, масло с низким содержанием линоленовой кислоты затвердевает при более высоких температурах, что делает его пригодным для производства высококачественного маргарина [5, 6].

Таким образом, для различных отраслей промышленности необходимы сорта льна масличного с разным содержанием α-линоленовой кислоты и соотношением жирных кислот. Для пищевых целей необходимо низкое содержание в семенах α-линоленовой кислоты (до 5 %), что способствует уменьшению окисления масла и сохранению его качества. С другой стороны, для использования семян льна в медицине необходимо более сбалансированное соотношение жирных кислот: линоленовой (ω-3) – 57 %, линолевой – 16 % и олеиновой – 18 % [1] или ли-

ноленовой – 25–30 %, линолевой – 25–35 % и олеиновой – 35–45 % [2].

Ускорить селекционный процесс возможно путем разработки эффективных молекулярных маркеров, позволяющих подтверждать низкое содержание α -линоленовой кислоты в семенах растений, используемых для создания сортов и гибридов льна масличного.

Целью работы была разработка геномной биотехнологии оценки и отбора селекционного материала льна масличного по комплексу генов, контролирующим соотношение жирных кислот в масле семян, и создание нового сорта масличного льна с применением данной биотехнологии.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили сортообразцы масличного льна (*L. usitatissimum* L., convar. *humile* Mill.), характеризующиеся различным составом жирных кислот.

Реакционная смесь объемом 50 мкл содержала 2,5 мкл MgCl₂ (50 ммоль), 5 мкл ПЦР буфера (200 ммоль Tris-HCl, 500 ммоль KCl), 1 мкл Taq DNA-полимеразы (5 ед/мкл), 1 мкл dNTP (каждого по 10 ммоль), 50 пикомоль каждого праймера, 100 нг геномной ДНК льна.

Параметры ПЦР для детекции *fad3A* и *fad3b* генов: денатурация – 94°C 4 мин; 25 циклов 94°C 45 с, 61°C 30 с, 72°C 2 мин; заключительная элонгация – 72°C 10 мин.

Результаты и обсуждения

α -Линоленовая кислота является одной из основных жирных кислот в составе льняного масла и образуется путем десатурации линолевой кислоты ω -3/ δ -15 десатуразами жирных кислот (FAD3). У *L. usitatissimum* L. со-

держание линоленовой кислоты в семенах контролируется аддитивным действием двух генов (*fad3A* и *fad3B*) [7]. Совмещение мутаций по двум локусам в генотипе одного растения приводит к резкому повышению уровня содержания линолевой кислоты, а количество линоленовой кислоты снижается до 2 %. Масло с высоким содержанием линолевой кислоты подвержено окислению в меньшей степени, и его можно использовать в пищевой промышленности. Анализ сортов на наличие *fad3A* и *fad3B* генов позволяет вести селекцию масличного льна по двум направлениям – на высокое и низкое содержание линоленовой кислоты.

Нами проводилась идентификация мутантных аллелей *fad3A* и *fad3B* генов методом ПЦР со специфическими праймерами и последующей обработкой продуктов амплификации рестриктазой, специфичной к диким аллелям соответствующего гена.

Для детекции в экспериментальном материале мутантного аллеля *fad3A* гена использовалась следующая пара праймеров:

MutAF2: 5'-CAGTGACCTGTTTCGCACCG-3'
MutAR2: 5'-CCCGGCTAGGGTGTATCATG-3'

Для рестрикции использовалась рестриктаза PvuI. Рестрикционную смесь инкубировали при 37°C в течение 3 час. Продукты рестрикции разделяли электрофорезом в 0,8 % агарозном геле.

В результате амплификации со специфическими праймерами и последующей рестрикции у низколиноленовых образцов, несущих мутантный аллель *fad3A*, образуется продукт размером около 637 п.о. (рис. 1 А) и два продукта размером 451 и 186 п.о. у высоколиноленовых образцов дикого типа (рис. 1 Б).

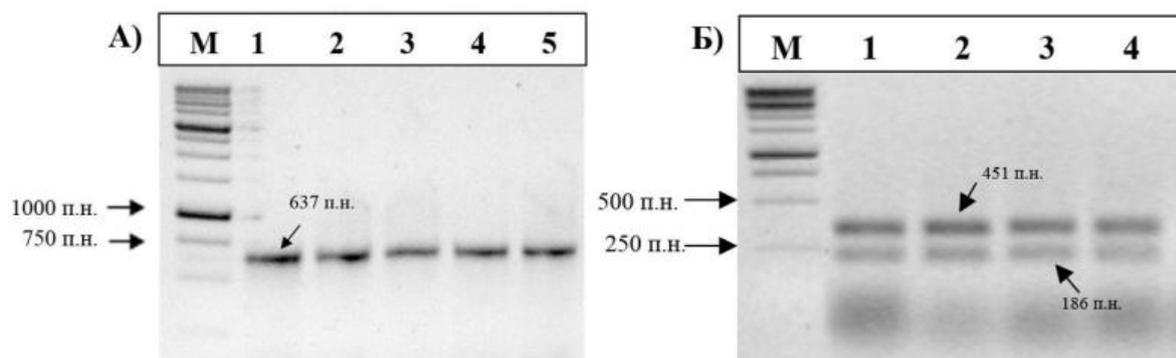


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов рестрикции PvuI после амплификации ДНК низколиноленовых (А) и высоколиноленовых (Б) сортов льна с праймерами MutAF2-MutAR2: 1–5 – сорта льна; М – ДНК-маркер молекулярного веса 1Кб (ОДО «Праймтех», Беларусь).

Для детекции в экспериментальном материале мутантного аллеля *fad3B* гена использовалась следующая пара праймеров:

MutFad3B_F:

5'- АСТСААТГАГТСССАССАСС -3'

MutFad3B_R:

5'- TGCCGTGATTCTGGTGATGG -3'

В результате амплификации со специфическими праймерами и последующей рестрик-

ции образуется два продукта размером 385 и 215 п.н. у образцов, несущих аллель *fad3B* дикого типа, и один продукт размером 600 п.н. у образцов, несущих мутантный аллель *fad3B*. У генотипов, гетерозиготных по *fad3B* гену, образуется три продукта, один из которых соответствует неразрезанному амплифицированному фрагменту, а два – продуктам рестрикции (рис. 2).

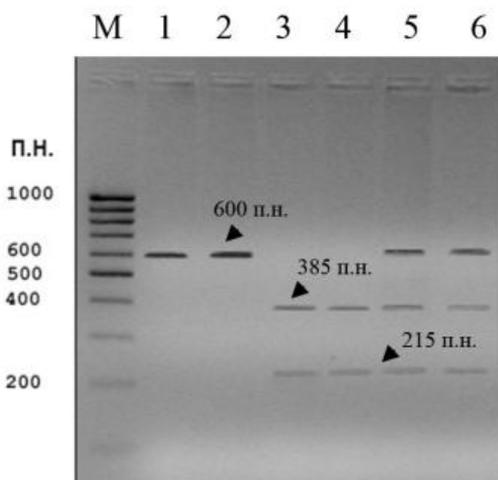


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов рестрикции *BalI* после амплификации ДНК сортов льна с различным содержанием α -линоленовой кислоты в масле семян с праймерами MutFad3: 1, 2 – генотип aa (низкое содержание линоленовой кислоты), 3, 4 – генотип AA (высокое содержание линоленовой кислоты); 5, 6 – генотип Aa (среднее содержание линоленовой кислоты); М – ДНК-маркер молекулярного веса М100 (ОДО «Прайм-тех», Беларусь).

С помощью разработанной геномной биотехнологии оценки и отбора селекционного материала льна масличного по комплексу генов, контролирующим соотношение жирных кислот в масле семян, по результатам молекулярно-генетических и селекционных исследований создан сорт «Дар». Сорт среднеспелый, голубоцветковый. Семена коричневые, крупные. Устойчив к полеганию. Проявил высокую устойчивость к расам *Fusarium oxysporum f. lini* (фузариозное увядание), внесенным в инфекционно-провокационный питомник. Урожайность семян за 2014–2016 гг. составила 23,2 ц/га, что на 4,5 % выше, чем у стандарта: содержание масла 42,4 %. Сбор масла составил 8,7 ц/га, что на 3,6 % выше, чем у стандарта. Содержание α -линоленовой кислоты составило 40,1 %, у стандарта – 59,3 %. Масло образца подходит для ис-

пользования в медицине и парфюмерии. Оптимальная норма высева семян – 8 млн. шт./га при дозе удобрений – N50-60P70K90 на полях со средним уровнем плодородия и содержания элементов питания. Сорт передан в государственное сортоиспытание с 2017 года.

Выводы

Разработанная геномная биотехнология оценки и отбора селекционного материала льна масличного по комплексу генов, контролирующим соотношение жирных кислот в масле семян, позволяет эффективно отбирать линии и сортообразцы, гомозиготные по генам, контролирующим синтез основных жирных кислот, определяющих качество льняного масла, для создания сортов с заранее спрогнозированным жирнокислотным составом.

Литература

1. Westcott N.D., Muir N.D. Chemical studies on the constituents of *Linum* spp. // Flax, the genus *Linum*. – New York, 2003. – P. 55–73.
2. Cullis C.A. Flax // Genome mapping and molecular breeding in plants / C. Kole. – V. 2. Springer. – Berlin, 2007. – P. 275–295.
3. Green A.G. A mutant genotype of flax (*Linum usitatissimum* L.) containing very low levels of linolenic acid in its seed oil // Can. J. Plant Sci. – 1986. – V. 66, N 3. – P. 499–503.
4. Rowland G.G. An EMS-induced low-linolenic-acid mutant in McGregor flax (*Linum usitatissimum* L.) // J. Plant Sci. – 1991. – V. 71, N 2. – P. 393–396.

5. Dribnenki J.C.P., McEachern S.F., Chen Y., Green A.G., Rashid K.Y. 2149 Solin (low linolenic flax) // *Can. J. Plant Sci.* – 2007. – V. 87, N 2. – P. 297–299.
6. Dribnenki J.C.P., Green A.G. Linola '947' low linolenic acid flax // *Can. J. Plant Sci.* – 1995. – V. 75, N 1. – P.201–202.
7. Vrinten P., Hu Z., Munchinsky M.-A., Rowland G., Qiu X. Two *fad3* desaturase genes control the level of linolenic acid in flax seed // *Plant Physiol.* – 2005. – V. 139, N 1. – P. 79–87.

LEMESH V.A.¹, BOGDANOVA M.V.¹, ANDRONIK E.L.², GOLUB I.A.²

¹*Institute of Genetics and Cytology of National Academy of Sciences of Belarus, Belarus, 220072, Minsk, Akademicheskaya str., 27, e-mail: mw.bogdanova@gmail.com*

²*Republican Unitary Enterprise "Institute of flax", Belarus, BY-211003, Orsha District, Vitebsk Oblast, Ustie, e-mail: institut_len@tut.by*

GENOMIC BIOTECHNOLOGY OF ASSESSMENT AND SELECTION OF LINSEED BREEDING MATERIAL

Aim. The aim of this study was to develop of genomic biotechnology for the assessment and selection of the linseed breeding material by a complex of genes controlling the ratio of fatty acids in seeds oil to the creation of a new linseed variety. **Methods.** Breeding studies were combined with molecular-genetic studies. **Results.** We developed the genomic biotechnology to detect the mutant alleles of linseed *fad3A* and *fad3B* genes responsible for reduced α -linolenic acid levels in linseed oil. Using this biotechnology, it was possible to classify plants as homozygous mutant, homozygous wild type, or heterozygous at *fad3A* and *fad3B* loci, that can be used to breed new linseed varieties of food or industrial quality. **Conclusions.** By results of 3-year molecular-genetic and breeding studies the variety "Dar" was created with using the developed genomic biotechnology of an assessment and selection of linseed breeding material by a complex of the genes controlling the ratio of fatty acids in seeds oil.

Keywords: linseed (*Linum usitatissimum* L.), α -linolenic acid, fatty acid desaturase, *fad3* genes.