

С.І. Корнієнко, кандидат с.-г. наук, директор  
Н.О. Баштан, науковий співробітник,  
Т.К. Горова, академік, доктор с.-г. наук, професор, головний науковий співробітник  
С.І. Кондратенко, кандидат с.-г. наук, с.н.с.,  
завідуючий відділом  
Інститут овочівництва і баштанництва НААН

### **ОСОБЛИВОСТІ ГЕНЕТИЧНОЇ ІДЕНТИФІКАЦІЇ СОРТОВИХ ГЕНОТИПІВ РЕДИСКИ І БУРЯКУ СТОЛОВОГО НА ОСНОВІ ВИВЧЕННЯ ПОЛІМОРФІЗМУ ЗАПАСНИХ БІЛКІВ**

*Для оптимізації досліджень з вивчення молекулярно-генетичного поліморфізму генофонду сортів редиски і буряку столового висвітлено окремі етапи удосконалення методики проведення електрофорезу запасних білків – альбумінів і глобулінів. Роботу проведено з сортовими генотипами редиски – Базис, Ксенія, Рубін, Льодяна бурулька та буряку столового – Бордо харківський і Дій.*

**Ключові слова:** селекція, генофонд, електрофорез, глобуліни, альбуміни, генетична ідентифікація.

**Вступ.** Паспортизація вітчизняних генотипів – одне з актуальних наукових завдань у зв'язку з насиченням ринку іноземними зразками для захисту авторських прав українських селекціонерів та маркування селекційно-цінних генотипів. Аналіз літературних джерел свідчить, що останнім часом великого значення набуває ідентифікація біотипового складу сортів популяцій, ліній і гібридів F<sub>1</sub> на основі молекулярно-генетичних маркерів [1]. Причому найбільш ефективним для генетичної ідентифікації є визначення поліпептидного складу запасних білків насіння шляхом електрофорезу [2,3].

**Мета досліджень** В задачу наших досліджень входило  
© Корнієнко С.І., Баштан Н.О., Горова Т.К., Кондратенко С.І., 2013.

проведення генетичної паспортизації селекційно-цінних генотипів, адаптованих тестерів на основі визначення сумарного електрофоретичного спектра глобулінів, виділених зі 100 рендомізовано відібраних зразків насіння сортових генотипів редиски Ксенія, Рубін, Базис, Сора, Льодяна бурулька та буряку столового Дій і Бордо Харківський. Для визначення складу запасних білків редиски і буряку столового авторами використано модифіковану методику електрофорезу запасних білків капусти [4] з удосконаленням певних етапів, які описано в роботі.

**Методика досліджень.** З метою збереження генотипів для подальшої селекційної роботи перед процедурою виділення запасного білка для проведення електрофорезу насіння вводили в стерильну культуру *in vitro* для отримання стерильних етіолованих проростків. Частку тканин з них використовували для виділення запасного білка, інша частина призначалася для наступного вирощування і розмноження в культурі *in vitro*.

Для одержання ювенільних етіолованих рослин досліджуваних сортів використовували насіння, поверхню якого спочатку стерилізували послідовним зануренням у 70 % розчин етанолу на 1 хв., а потім у розчин (1:3) промислового відбілювача «Білізна» на 15-20 хв., що вміщував 0,1 % Tween 20. Потім насіння тричі відмивали у стерильній дистильованій воді протягом 10-20 хв. і висаджували в банки на безгормональне агаризоване поживне середовище МС (Мурасіге, Скуга, 1962) і розміщували у темряві для пророщування (при 25°C). Протягом 7-9 діб культивування з насіння проростали стерильні рослини з надмірно подовженими етіолованими гіпокотиллями, які розрізали на частки в залежності від умов проведення експерименту. Зокрема, для екстрагування білків використовували тканини котиледонів, сегментів гіпокотилів і коренів. Після відокремлення окремих органів або сегментів тканин гіпокотилів від рослин, останні висаджували на регенераційні живильні середовища *in vitro* для відновлення їх повної структури згідно методиці [5].

Запасні білки з різних типів тканин та насіння редиски виділяли в епандорфах об'ємом 1мл. Для цього насіння або відокремлені органи рослин, маса яких варіювала в інтервалі 3-6 мг, розташовували в лунках і заливали 0,06-0,09 мкл екстрагента, відповідно. У якості екстрагента використовували 0,0625 М тріс-НСІ буфер (рН -6,8). Через 30 хв. після додавання екстрагента набряклу насінневу оболонку за допомогою мікропінцета

відокремлювали від насінневих зародків і вилучали, потім усі типи тканин обережно роздавлювали без змішування розчину.

Екстрагування відбувалося протягом 16-18 год. за температури 4°C. Отриманий білковий препарат був сумішшю білків насіння (альбумінів і глобулінів).

Для подальшого електрофорезу проводили дисоціацію білків додаванням до екстракту суміші з SDS-Na і  $\beta$ -меркаптоетанолу (в рівних об'ємах з екстрактом) і залишали на 30 хв. при кімнатній температурі. Суміш, що дисоціює, або буфер для нанесення білків складалася з наступних компонентів: 0,5 М тріс-НCl – 2,5 мл (рН 6,8); SDS-Na – 0,8 г; сахарози – 2,0 г; 1%-вого розчину бромфенолового синього – 1,0 мл;  $\beta$ -меркаптоетанолу – 2,0 мл.

Вертикальний електрофорез у пластині ПААГ здійснювали за допомогою реактивів: акриламід, N,N-метиленабісакриламід, SDS-Na, TEMED (тетраметилетилендіаміну), персульфату амонію, крижаної оцтової кислоти, трісу, гліцину та HCl згідно раніше наведеної методики.

**Результати досліджень.** У представників виду *Raphanus sativus* L. наявні два типи запасних білків – глобулінів з коефіцієнтами седиментації 12S і 1,7S, які у зрілому насінні складають відповідно 60 і 20 % від загальної кількості білка. Структуру 12S-глобуліну, головного запасного білка насіння, вивчена краще, ніж структуру 1,7S-глобуліну. Встановлено, що 12-S глобулін – це олігомер, що складається з шести структурно ідентичних субодиниць, кожна з них представлена двома типами поліпептидів, які, у свою чергу, зв'язані між собою дисульфідними містками і мають молекулярну масу, яка варіює в інтервалі 20-40 кДа [1].

Дослідження свідчать, що електрофоретичні спектри запасних білків редиски представлені комплексом поліпептидів, розташованих у діапазоні молекулярних мас 14,4-66,2 кДа. Виділяли запасні білки з нативних тканин без процедури кріопреципітації для відокремлення фракції глобулінів від альбумінів. Тому одержані нами продукти електрофорезу мали змішані спектри поліпептидів цих двох видів запасних білків, які на електрофоретичних спектрах локалізувалися в різних зонах рухомості. Таким чином, глобуліни належали до найбільш рухомих компонентів і локалізувалися в зоні лужних поліпептидів з молекулярною масою до 21,5 кДа. Менш рухомі компоненти спектра формувалися переважно з альбумінів, молекулярна маса яких пере-

вищувала 21,5 кДа (зона кислих поліпептидів). Слід відмітити, що одержані сумарні спектри альбумінів і глобулінів відзначалися також інтенсивністю фарбування компонентів у застосованому нами барвнику “Кумассі”. Найкращу інтенсивність мали електрофоретичні компоненти зони лужних поліпептидів.

Під час електрофорезу в SDS-системі виявлено цілу групу поліпептидів 12S-глобулінів редиски, які різнилися за молекулярною масою. Відносні молекулярні маси визначали за допомогою стандартних маркерних білків: *Lysozyme* (14,4 кД), *Trypsin inhibitor* (21,5 кД), *Carbonic anhydrase* (31 кД), овальбумін (45 кД), волячий сироватковий альбумін (66,2 кД), *Cellulase* (94,6 кД). Під час електрофорезу в окрему лунку вносили по 5-8 мкл суміші білків-стандартів. Увесь електрофоретичний спектр за рухомістю активних компонент запасних білків розділяли на чотири зони за ступенем електрофоретичної рухомості:  $\alpha$  – найбільш рухомі компоненти;  $\beta$  і  $\gamma$  – основні компоненти з середньою рухомістю;  $\omega$  – окремі компоненти з найменшою рухомістю. Аналогічно, запасним глобулінам насіння бобових та інших видів рослин [1,2] поліпептиди з молекулярною масою до 21,5 кД ми розглядали як лужні і, відповідно на спектрі позначалися Л1, Л2 і т. д., у порядку зменшення їх молекулярної маси. Поліпептиди, з більш високою молекулярною масою ми позначали, як кислі (на спектрі ці локуси нумерували, відповідно К1, К2 і т. д., у порядку зменшення їх молекулярної маси).

Встановлено, що сумарний спектр редиски складався з 38 головних і мінорних компонент, з яких до зони “кислих” поліпептидів увійшли 12. Інтенсивність локусів сумарного спектра запасних білків – альбумінів і глобулінів визначали за трьохбальною шкалою, згідно якій 1 бал надавався слабим компонентам, 2 бали – компонентам середньої інтенсивності і 3 бали – найбільш інтенсивним компонентам.

Для аналізу розподілу біотипів запасного білка у сортових популяціях використовували статистичні показники. Так, електрофоретичну рухомість ( $Rf$ ) розраховували за формулою:

$$Rf = \frac{Lx}{L} \quad (1)$$

де-  $Lx$  – дистанція, яку пройшов поліпептид, см;  
 $L$  – дистанція, яку пройшла індикаторна фарба – бромфеноловий синій, см;  
 $f$  – частота з'явлення однотипного спектра у порівнюваних вибірках.

Наш досвід засвідчив, що процедура ідентифікації потребує удосконалення, оскільки під час її виконання у разі присутності складних спектрів, насичених компонентами з різними молекулярними масами виникла висока вірогідність з'явлення суб'єктивних помилок, які вносили при статистичних обрахунках. Для подолання цієї проблеми у наших дослідженнях для реєстрації типів спектра запасного білка користувалися комп'ютерною програмою Excel, за допомогою якої проводили реконструкцію сумарних електрофоретичних спектрів альбумінів і глобулінів у вигляді стовпчикових гістограм. Для визначення біотипового складу сортових популяцій проведено розрахунок середнього арифметичного ( $Rf_{cep}$ ) і стандартного відхилення ( $m_{Rf}$ ) для суми статистичних показників ( $Rf$ ) всіх компонентів, з яких склалися певні електрофоретичні спектри. При цьому використовували пакет статистичних функцій програми Excel. Порівняльний візуальний аналіз розподілу електрофоретичних компонент у спектрах та розрахунків значень  $Rf_{cep} \pm m_{Rf}$  показав, що кожному виявленому білковому біотипу відповідає своє значення середнього арифметичного ( $Rf_{cep}$ ) і стандартного відхилення ( $m_{Rf}$ ). Встановлено, що всі досліджені сорти за своєю генетичною структурою є високополіморфні сортові популяції, які мають високу кількість біотипів двох білків. Для генетичної паспортизації найбільш прийнятною є зона розподілу кислих поліпептидів, до складу якої входять генетичні локуси глобуліну та частка локусів альбуміну з 2 і 3 бальною інтенсивністю прояву (14,4-25 кДа – відповідно  $\alpha$  і  $\beta$ -зони рухомості). У зонах рухомості  $\omega$  і  $\gamma$ , що відповідала зоні розподілу альбумінових поліпептидів виявлено найбільшу кількість компонент електрофоретичного спектра з найменшою інтенсивністю прояву. Деякі з цих компонент візуально можна було лише чітко ідентифікувати на профарбованих у розчині «Кумасі» гелевих пластинках тільки в умовах затемненої фотокімнати у яскравому промені світла фотопроектора. За результатами форецу, у рендомізовано відібраних 100 насінин редиски сорту Рубін було виявлено 69 гло-

булінових біотипів, у сорту Ксенія аналогічний статистичний показник дорівнював – 10, у сорту Базис – 21, у сортів Сора і Льодяна бурулька знайдено однакову кількість біотипів даного білка – 17. Під час ідентифікації білкових біотипів за сумарним складом запасних білків (альбумінів і глобулінів), усі сортові популяції були представлені наборами виключно мінорних типів спектра, без виявлених повторів. Це свідчить, що при експериментальному підході, коли випробовується вибірка зі 100 насінин, аналіз сумарного електрофоретичного спектра альбумінів і глобулінів редиски є недостатнім для ідентифікації типів спектра і тому вибірку насіння потрібно збільшувати. За результатами електрофорезу за збільшеною вибіркою у рендомізовано відібраних 180 насінин сорту редиски Рубін виявлено 23 біотипи, у сорту Ксенія – 12, у сорту Базис – 21, у сорту Льодяна бурулька – 18.

Для всіх досліджених сортів редиски реперними виявилися компоненти спектра Л21 і К2 (табл. 1). У цій зоні рухомості сорт Сора мав 4 відсутні компоненти – К6, К7, К10 і К12. Відповідно у сорту Базис були відсутні 2 компоненти – Л19 і Л20, у сорту Льодяна бурулька компонент – К4 і у сорту Ксенія – К10.

Для оптимізації селекційного процесу актуальним завданням є розробка і удосконалення методів генетичного маркування селекційно-цінних форм за електрофоретичними компонентами білкових систем з подальшим збереженням промаркованого генотипу для селекційної роботи.

1. – Частота з'явлення електрофоретичних компонентів запасного білка у насінні редиски в  $\alpha$  і  $\beta$  зонах рухомості, %

Сорт	Л19	Л20	Л21	Л22	Л23	Л24	Л25	Л26	К1	К2	К3	К4	К5	К6	К7	К8	К9	К10	К11	К12	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
2006 р.																					
Ксеція	91	52	100	70	33	69	42	30	72	100	71	40	91	25	51	59	32	0	63	45	
Базис	0	0	100	100	81	40	76	18	6	100	20	44	15	15	20	57	61	42	26	31	
Льодяна бурулька	53	12	100	35	18	18	18	71	41	100	12	0	12	88	47	41	6	59	18	94	
Сора	35	65	100	35	12	6	53	47	82	100	6	29	18	0	0	30	6	0	24	0	
Рубін	40	41	100	31	31	34	22	28	24	100	34	37	46	37	41	34	44	37	22	21	
2008, 2013 рр.																					
Ксеція	98	51	100	70	33	69	42	30	71	100	71	37	90	28	49	59	32	0	63	48	
Базис	0	0	100	97	81	40	76	18	7	100	18	44	21	17	20	57	61	40	26	31	
Льодяна бурулька	53	12	100	36	18	19	23	71	41	100	10	0	13	81	46	41	6	61	18	95	
Рубін	37	41	100	31	28	34	22	28	24	100	34	37	45	37	41	32	44	38	25	19	

Враховуючи функціональні особливості запасних білків у рослинному організмі, згідно з якими вони зберігають свою структурну цілісність до переходу рослин на автотрофний спосіб живлення, нами вивчено компонентний склад альбумінів і глобулінів, які містяться не тільки у насінневному зародку до його проростання, а й у різних органах ювенільних етіолованих рослин редиски. Джерелом білкових препаратів слугували проростки, одержані в асептичних умовах після пророщування насіння на агаризованих безгормональних живильних середовищах з оптимальним набором мінеральних і органічних компонентів. При цьому із задіяних у досліді з електрофорезу рослин редиски 100 % відновлення досягали за рахунок культивування виділених експлантів та органів на регенераційних живильних середовищах з оптимальним вмістом регуляторів росту, які здатні індукувати органогенез *in vitro* і, таким чином, повністю відновлювати структуру рослин.

Аналіз електрофорезу запасних білків досліджених сортів генотипів редиски підтвердив, що серед усіх випробуваних типів тканин ювенільних етіолованих рослин найбільшу інформативність для вивчення молекулярно-генетичного поліморфізму мають тканини котиледонів. Під час їхнього застосування нами виявлено найкращу інтенсивність фарбування поліпептидів як з групи глобулінів, так і альбумінів, яка за своїм ступенем прояву була на однаковому рівні із аналогічним фарбуванням електрофоретичних фрагментів запасних білків, виділених з насіння (контрольний варіант електрофорезу).

Для одержання оптимально інформативних електрофоретичних спектрів розподілу запасних білків, виділених з насіння або котиледонів, достатньо було застосовувати по 3-6 мг тканин рослин на 0,06-0,09 мкл екстрагента (0,0625 М тріс-НСІ буфер).

Поряд з аналізом запасних білків редиски проведено біохімічні дослідження щодо вивчення рівня поліморфізму білкових систем, які, згідно відомим нам літературним джерелам [6-10], придатні для генетичної паспортизації сортового матеріалу буряку столового. Зокрема, виділено запасний білок буряку столового – 11S-глобулін з насіння сорту Дій і Бордо Харківський та проведено його електрофоретичне фракціонування. Всього отримано по 50 електрофоретичних спектрів індивідуальних насінин, які розділили на групи з однаковим складом за типом спектра. В ході проведеного електрофорезу підібрано умови ви-



ділення очищеного 11S-глобуліна, здійснено вдале електрофоретичне фракціювання глобулінів, а також гістохімічне фарбування білкових компонент у гелі, що у кінцевому підсумку дало можливість їх ідентифікувати і застосувати для подальшого аналізу і розробки відповідної методики [11].

**Висновки.** Удосконалено методику визначення запасних білків на основі методу електрофорезу у генотипів редиски і буряку столового. Встановлено, що сумарний електрофоретичний спектр альбумінів і глобулінів редиски складається з 38 рухомих компонент, з яких 20 компонент (поліпептидів) чітко розрізняються за молекулярною масою та інтенсивністю прояву на електрофоретичних спектрах. Визначено, що всі досліджені сорти за своєю генетичною структурою є високополіморфними сортовими популяціями, які мають високу кількість біотипів сумарного спектра двох білків. Для генетичної ідентифікації найбільш прийнятною є зона розподілу поліпептидів глобуліну і альбуміну в діапазоні молекулярних мас 14,4-25 кДа.

За результатами електрофорезу запасних білків, екстрагованих з насіння, складено білкові паспорти сортів редиски Рубін, Базис, Ксенія, Льодяна бурулька селекції ІОБ НААН та розроблено методику генетичної ідентифікації генотипів редиски.

### ***Бібліографія.***

1. Идентификация сортов и регистрация генофонда культурных растений по белкам семян / Под ред. В.Г. Конарева. – СПб. : ВИР, 2000. – 186 с.

2. Рекомендации по использованию белковых маркеров в сортоиспытании, семеноводстве и семенном контроле / Гаврилюк И.П., Федин М.А., Губарева Н.К. и др. – ВИР, Госкомиссия по сортоиспытаниям. М.; Л., 1989. – 22 с.

3. Молекулярно-биологические аспекты прикладной ботаники, генетики и селекции / Конарев В.Г., Гаврилюк И.П., Губарева Н.К. и др. – М. : Колос, 1993. – 447 с.

4. Идентификация, регистрация и оценка чистоты сортов, линий и гибридов капусты методами электрофоретического анализа изоферментов и запасных белков (Методические рекомендации) – Л. : ВИР, 1991. – 27 с.

5. Идентифікація і реєстрація генотипів м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.), ячменю (*Hordeum vulgare* L.), кукурудзи (*Zea mays* L.), соняшника (*Helianthus annuus* L.) за допомогою аналізу мікросателітних локусів. Методичні рекомендації / Си-волап Ю.М., Волкодав В.В., Бальвінська М.С. та ін. – Одеса : Зовнішрекламсервіс, 2004. – 16 с.

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

7. Идентификация сортов и регистрация генофонда культурных растений по белкам семян / Конарев В.Г., Гаврилюк И.П., Губарева Н.К., Алпатьева Н.В., Хакимова А.Г., Пенева Т.И. и др. – Санкт-Петербург : ВИР, 2000. – 187 с.

8. Болелова З.А., Лесневич Л.А. Идентификация геномов рода *Beta L.* по компонентам глобулина // Геном растений: Тез. науч. конф. – Черновцы: Черновиц. гос. ун-т, 1983. – С. 10-11.

9. Болелова З.А., Лесневич Л.А. Биохимические маркеры при изучении гетерозиса и ЦМС у сахарной свеклы // Гетрозис. Теория и практика. – Харьков : УкрНИИ РСГ, 1988. – С. 19.

10. Конарев В.Г. Белки растений как генетические маркеры. – М.: Колос, 1983. – 323 с.

11. Баштан Н. О. Виділення запасних білків з етіюльованих проростків капусти / Н. О. Баштан, С. І. Кондратенко // Екологізація сталого розвитку і ноосферна перспектива інформаційного суспільства: Матеріали Між нар. наук. конф. студентів, аспірантів і молодих учених. – Харків, 2008. – С. 14.

С.И. Корниенко, Н.А. Баштан, Т.К. Гороя, С.И. Кондратенко

Особенности генетической идентификации сортовых генотипов редиса и свеклы столовой на основе изучения полиморфизма запасных белков.

**Резюме.** Для оптимизации исследований по изучению молекулярно-генетического полиморфизма генофонда сортов редиса и свеклы столовой освещены отдельные этапы совершенствования методики проведения электрофореза запасных белков – альбуминов и глобулинов сортовых генотипов редиса – Базис,

Ксения, Рубин, Льюдяна бурулька и свеклы столовой – Бордо харьковский и Дий.

S.I. Kornienko, N.A. Bashtan, T.K. Gorovay.  
S.I. Kondratenko

The features of genetic authentication of high quality genotypes of garden radish and beet on the basis of study of polymorphism of spare proteins.

**Summary.** For optimization of researches on the study of molecular-genetic polymorphism of gene pool sorts of garden radish and beet the separate stages of perfection methodology of realization electrophoresis of spare proteins were lighted up – albumens and globulins of high quality genotypes of garden radish is Bazis, Ksenia, Rubin, Ljodana burulka and beet Bordo Kharkov and Dij.