

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ НИЗКОЕ СОДЕРЖАНИЕ ЛИНОЛЕНОВОЙ КИСЛОТЫ, У ЛИНИЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОЛЛЕКЦИИ ЛЬНА ВИР

© Е.А. Пороховинова¹, Т.В.Шеленга¹, Т.В. Матвеева², А.В.Павлов¹, Е.А. Григорьева¹, Н.Б. Броч¹

¹Федеральный исследовательский центр «Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР)», Санкт-Петербург;

²ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург

Для цитирования: Пороховинова Е.А., Шеленга Т.В., Матвеева Т.В., и др. Полиморфизм генов, контролирующих низкое содержание линоленовой кислоты, у линий генетической коллекции льна ВИР // Экологическая генетика. — 2019. — Т. 17. — № 2. — С. 5–19. <https://doi.org/10.17816/ecogen1725-19>.

Поступила: 30.11.2018

Одобрена: 15.02.2019

Принята: 17.06.2019

С использованием шести поколений инцухта из 26 гетерогенных образцов льна получены 40 линий, среди которых 19 высоко- (ВЛ), 7 средне- (СЛ) и 14 низколиноленовых (НЛ). Эти линии оценены по содержанию пяти основных жирных кислот (ЖК): пальмитиновой (PAL), стеариновой, олеиновой (OLE), линолевой (LIO), линоленовой (LIN); соотношению LIO/LIN, йодному числу масла (IOD), фазам вегетационного периода (ВП) и размерам растения. Дисперсионный анализ показал достоверные отличия ВЛ-, СЛ-, НЛ-групп по PAL, OLE, LIO, LIN, LIO/LIN, IOD. Резкое снижение LIN вызывает несимметричные изменения в соотношении ЖК, коррелирующих между ними и остальными признаками. Благодаря факторному анализу было обнаружено влияние двух факторов: первый — разделит линии по уровню LIN и связанных с ним признаков, второй — по ВП и OLE. Образование LIN контролируют два комплементарных гена *LuFAD3A* и *LuFAD3B*. Секвенирование первого экзона гена *LuFAD3A* у шести линий выявило мутацию ($G_{255} \rightarrow A_{255}$), приводящую к образованию стоп-кодона. Разработанный CAPS-маркер подтвердил гомозиготность потомков гибридов от скрещивания НЛ- (гк-391) и ВЛ-линий (гк-65, -109, -121). Показано, что потомки гибридов с линией гк-109 созревали на 8–10 дней раньше родительской НЛ-линии гк-391. С помощью CAPS-маркеров гена *LuFAD3B* удалось установить различия между ВЛ-, СЛ- и НЛ-линиями. В результате секвенирования первого и начала второго экзона этого гена у трех линий (1 ВЛ, 2 НЛ) была выявлена мутация во втором сайте рестрикции, находящаяся во втором экзоне ($C_6 \rightarrow T_6$) и приводящая к замене Hys \rightarrow Tyr.

Ключевые слова: CAPS-маркеры; *Linum usitatissimum*; solin; биологическое разнообразие; генетическая коллекция; гены *LuFAD3A* и *LuFAD3B*; жирнокислотный состав масла семян; морфологические признаки.

POLYMORPHISM OF GENES CONTROLLING LOW LEVEL OF LINOLENIC ACID IN LINES FROM VIR FLAX GENETIC COLLECTION

© Е.А. Porokhovinova¹, T.V. Shelenga¹, T.V. Matveeva², A.V. Pavlov¹, E.A. Grigorieva¹, N.B. Brutch¹

¹Federal Research Centre N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), Saint Petersburg, Russia;

²Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

For citation: Porokhovinova EA, Shelenga TV, Matveeva TV, et al.

Polymorphism of genes controlling low level of linolenic acid in lines from VIR flax genetic collection.

Ecological genetics. 2019;17(2):5-19. <https://doi.org/10.17816/ecogen1725-19>.

Received: 30.11.2018

Revised: 15.02.2019

Accepted: 17.06.2019

Background. Linseed solin varieties were created for nutrition, but the effect of oil fatty acid (FA) composition on other characters is not clear. **Materials and methods.** Using 6 inbreeding generations from 26 heterogeneous flax accessions were generated 19 high (HL), 7 medium (ML) and 14 low linolenic (LL) lines. For each lines contents of 5 basic FA: palmitic, stearic, oleic (OLE), linoleic (LIO) and linolenic (LIN); the ratio LIO/LIN, oil iodine number, vegetative period (VP) phases and plants size were evaluated. Development of CAPS marker for *LuFAD3A* gene was performed using idtdna.com. Sequencing of LIN genes sites was done in the Centre MCT SPBGU and Eurogen. **Results.** ANOVA showed significant differences HL, ML and LL groups for PAL, OLE, LIO, LIN, LIO/LIN, IOD. Considerable decrease of LIN, causes asymmetric changes in FA ratio and correlations between them and other traits. Factor analysis revealed the influence of two factors. The first one divided lines according to their LIN level and characters associated with it, the second one — according to the VP and OLE. LIN synthesis is controlled by two complementary genes *LuFAD3A* and *LuFAD3B*. Sequencing of *LuFAD3A* gene 1 exon of 6 lines revealed a mutation ($G_{255} \rightarrow A_{255}$), resulting in formation of stop codon. Developed developed CAPS-marker confirmed the homozygosity of hybrids between LL (gc-391) and HL lines (gc-65,

109, 121). Descendants of hybrid between gc-109 and gc-391 ripened 8-10 days earlier than gc-391. CAPS markers of *LuFAD3B* gene revealed differences between HL, ML, LL lines. Sequencing of this gene first exon and the beginning of the second one in 3 lines (1HL, 2LL) showed that this method reveals a mutation in the second restriction site, located in the 2 exon ($C_6 \rightarrow T_6$), and causing the replacement Hys \rightarrow Tyr. **Conclusion.** Lines from GC have wide variability of FA and other agronomic characters, combination of which will expand the cultivation of solin.

✿ **Keywords:** biological diversity; CAPS markers; genetic collection; *Linum usitatissimum*; solin; *LuFAD3A* and *LuFAD3B* genes; morphological characteristics; seed oil fatty acid composition.

ВВЕДЕНИЕ

Площади масличного льна в мире составляют 2,8 млн га. Сейчас РФ является основным производителем этой культуры (709 тыс. га в 2016 г.), так как Евросоюз, Бразилия и Япония запретили ввоз трансгенного льна, возделываемого в Канаде [1]. Однако по продуктивности льна Россия уступает Канаде, США и Франции [2]. В РФ лен занимает четвертое место по доходности среди масличных культур после подсолнечника, сои и рапса и может служить резервной культурой для восполнения дефицита сырья в случае неурожая подсолнечника и сои не только на Юге, но и в других регионах РФ [3].

Масло льна содержит пять основных жирных кислот (ЖК): две насыщенные — пальмитиновую (PAL, 16 : 0) и стеариновую (STE, 18 : 0) и три ненасыщенные — олеиновую (OLE, 18 : 1), линолевою (LIO, 18 : 2) и линоленовую (LIN, 18 : 3). По положению последней двойной связи LIO относится к $\omega 6$ -, а LIN — к $\omega 3$ -кислотам. Льняное масло обычно содержит около 50 % LIN, благодаря чему его применяют во многих отраслях, но оно быстро прогоркает, что затрудняет его пищевое использование [4].

Сорта льна по своему назначению делятся на высоколиноленовые (ВЛ) и низколиноленовые (НЛ). В РФ районировано 33 сорта, из них четыре НЛ [5].

Высоколиноленовое льняное масло незаменимо в фармацевтической, парфюмерной, косметической, мыловаренной, лакокрасочной промышленности [6]. Для производства олиф и красок необходимо, чтобы масло быстро высыхало, что связано с его ненасыщенностью, которую оценивают по йодному числу. В норме оно колеблется от 180 до 190 [7].

При использовании льна как основного продукта питания при целиакии и других алиментарных заболеваниях для замещения муки злаков рекомендуют соблюдать соотношение $\omega 6/\omega 3$ -кислот 5–10/1 для обычного питания и 3–5/1 — для лечебного. Большинство сортов имеют соотношение $\sim 0,25/1$ [8], поэтому для производства полножирной муки надо уменьшать содержание LIN.

Первые НЛ-сорта Linola™ были созданы в 1970-х гг. в Канаде [9]. Они содержат около 2 % линоленовой кислоты и являются двойными рецессивными гомозиготами по комплементарным генам *ln1* и *ln2*. Другие сорта — потомки сорта Linola или получены незави-

симо от него. Все они запатентованы и недоступны для научных исследований.

Содержание разных ЖК взаимосвязано. На их соотношение оказывают влияние как генотип растения, так и условия окружающей среды [10]. У льна биосинтез ЖК хорошо изучен. Гены стеароил-АСР-десатуразы (18 : 0 \rightarrow 18 : 1) *sad1* и *sad2* секвенированы в 1994 г. (Singh et al., 1994, цит. по [11]), гены десатуразы-2 *fad2a* и *fad2a* — в 2007 г. (18 : 1 \rightarrow 18 : 2) (Khadake et al., 2009, цит. по [11]; [12]), гены десатуразы-3 *fad3a* и *fad3b* (18 : 2 \rightarrow 18 : 3) — в 2005 г. [13]. Гены начала биосинтеза жирных кислот — кетоацил-CoA-синтазы (*KAS*) секвенированы в 2004 г. [14], но их функция определена в 2014 г. — *KASIII* (Acetyl-CoA+Malonil-CoA \rightarrow 4 : 0), *KASI* (4 : 0 \rightarrow 16 : 0), *KASII* (16 : 0 \rightarrow 18 : 0) [15].

Ценными для селекции льна считают гены *fad3a* и *fad3b* (они же *ln1* и *ln2*), так как они кодируют десатуразы, превращающие линолевою кислоту в линоленовую, необходимую для технического масла, но нежелательную для пищевого [15].

Гены *fad3a* и *fad3b* имеют размер 3280 и 3002 п. н. соответственно и содержат по 6 экзонов и 5 интронов, кодируя белки длиной 391 и 392 аминокислоты. Сходство генов на уровне ДНК составляет 85 %, сходство аминокислотных последовательностей — 94 %. По размеру гены различаются из-за инделей от 1 до 29 п. н., локализованных в интронах. Для *Fad3a* известно шесть изоформ, четыре из которых не приводят к инактивации фермента. Первая, А (8 аллелей с синонимичными заменами) — самая распространенная, изоформы В, С, Е (по 1–2 аллели) встречаются редко. Изоформы D и E потеряли функциональность из-за нонсенс-мутации. Для *Fad3b* известно семь изоформ, пять из которых не приводят к инактивации фермента. Это изоформы А (4 аллели), D (8 аллелей), G (7 аллелей), Е, F (по 2 аллели). Только две изоформы не дают полноценного продукта: В — из-за нонсенс-мутации в первом экзоне и С — в связи с заменой гистидина на тирозин в первом His-box активного центра десатуразы [11].

Таким образом, селекционное изменение жирнокислотного состава (ЖКС) масла льна должно основываться на поиске спонтанных или индуцированных мутаций в генах *fad3a* и *fad3b*, оценке различных комбинаций аллелей и генов и обязательном биохимическом подтверждении изменения состава масла.

Желтосемянность важна для производства льна пищевого назначения. Ее контролируют несколько генов: *s1* — ингибитор антоциановой окраски, помимо желтой окраски пыльников и семян обуславливает белый деформированный цветок, *pf-ad* — помимо желтого цвета семян контролирует розовую окраску венчика, *f^c* — определяет светло-голубой венчик и пятнистые семена, *ora1* — определяет крапчатые семена и оранжевые пыльники. Три органоспецифичных гена отвечают только за светлую окраску семян — *YSED1* и *used2* (желтую), *rs1* (светло-желто-коричневую) [16].

В мире создано большое количество НЛ-сортов, но не ясно, как изменение ЖКС масла повлияло на другие признаки. Авторы большинства сортов не акцентируют внимание на донорах генов НЛ, а также способах их отбора и проверки сортовой чистоты, поэтому в задачи работы входило: 1) выявление полиморфизма ЖКС масла среди линий и сортов льна; 2) изучение систем связей между ЖКС, высотой растения и скороспелостью групп льна, контрастных и по уровню LIN; 3) разработка CAPS-маркеров на аллели генов НЛ; 4) проверка гомозиготности НЛ-линий, созданных вслепую.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для выявления полиморфизма по ЖКС было изучено 19 ВЛ-, 8 СЛ- и 16 НЛ-линий (табл. 1). В качестве

«дикого типа» использовали линию гк-2 из образца стародавней селекции (л-1 из к-48) с красно-коричневыми семенами (рис. 1).

По несколько линий получено от каждого из двух НЛ-сортов — Linola и Еуге, они имеют различный габитус и отличаются по уровню линоленовой кислоты и соотношению ЖК. Часть линий получена в результате гибридизации НЛ-линии гк-391 (л-2-1 из и-601679, Еуге, Австралия), также гомозиготной по генам *YSED1*, *sfb1* (ингибирование синтеза антоцианов в гипокотиле и цветке) с ВЛ-линиями, несущими другие гены светлой окраски семян или гены хозяйственных признаков, и последующего отбора стабильных форм, но без контроля ЖКС. Среди ВЛ-родителей гк-65 (л-3 из к-3178, Тверская губерния) гомозиготна по гену *ora1*, скороспела, с ней созданы две линии (ВЛ и СЛ); гк-109 (л-3-2 из к-6099, Аргентина) гомозиготна по гену *wf1* (белые лепестки), связанному с ранним цветением [17], с ней созданы пять линий (1 ВЛ, 2 СЛ, 2 НЛ); гк-121 (л-1-1 из к-6272, Северная Ирландия) гомозиготна по гену *rs1*, задействована в создании двух линий (ВЛ и СЛ); гк-173 гомозиготна по гену *used2*, с ее участием созданы две ВЛ-линии; гк-392 (гк-132 × гк-103) гомозиготна по генам *s1* и *sfb1*, из гибрида с ней отобрана НЛ-линия.

В 1995–2016 гг. на базе Пушкинских лабораторий ВИР линии оценивали по продолжительности фаз ве-

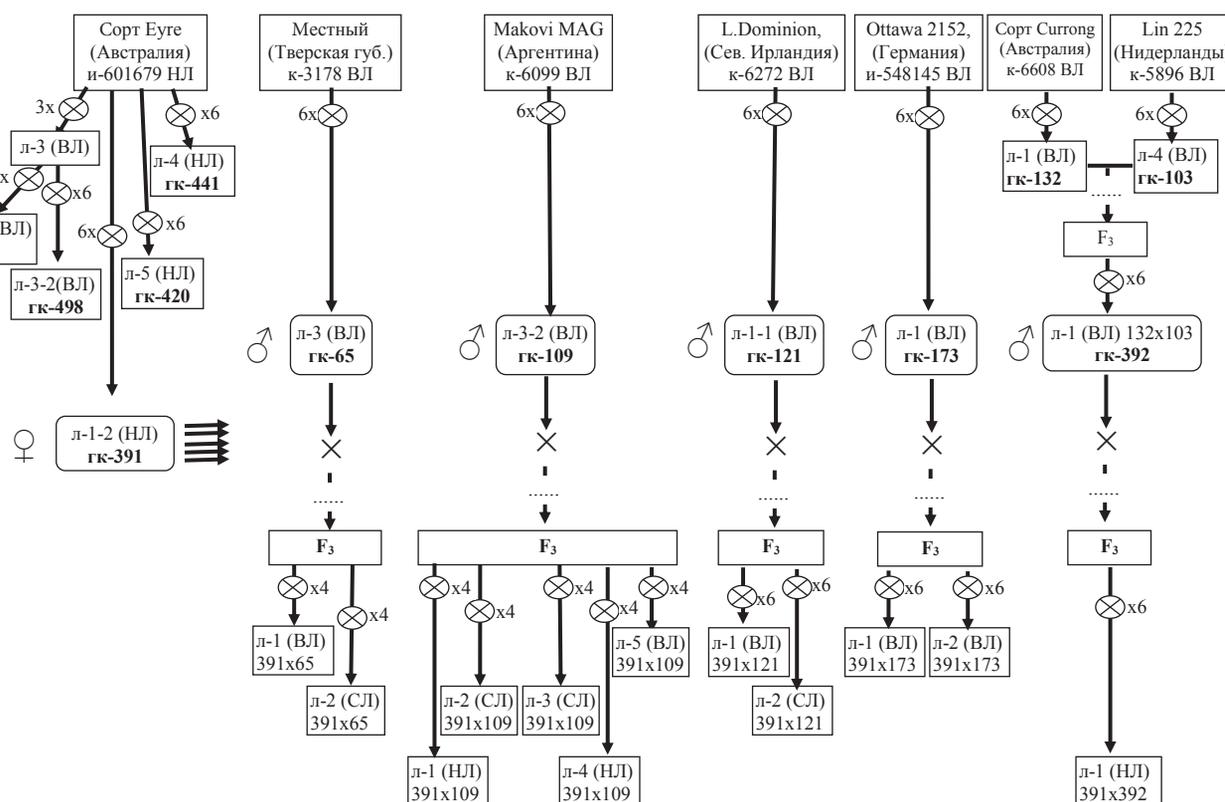


Рис. 1. Родословная линий гибридного происхождения, участвующих в исследовании

Таблица 1

Характеристика линий генетической коллекции льна ВИР и сортов, использованных в исследовании

Номер по каталогу ВИР или родословная	Поколение инцухта, линия	Название и происхождение родителя(ей)		LIN	Окраска семян	Идентифицированные гены
гк-2	л-1	к-48 (сел. Альтгаузена, Россия)		ВЛ	красно-коричневая	«дикий тип»
гк-483	л-1	к-3713 (Китай, к северу от Кашагара)		ВЛ	желтая	<i>pf-ad?</i>
гк-448	л-1	к-3730 (Западный Китай)		ВЛ	желтая	<i>s1</i>
гк-136	л-1	к-6634 (Mermiloid, Чехословакия)		ВЛ	желтая	<i>s1</i>
гк-210	л-1	и-588294 (Б-125, Литва, ЛитНИИЗ)		ВЛ	красно-коричневая	—
гк-163 ¹	л-2-1	к-726 (Солецкий кряж, Псковская губ.)		СЛ	красно-коричневая	—
гк-119	л-2-3	к-6210 (NP (RR) 38, Индия)		СЛ	красно-коричневая	—
гк-395	л-1	и-601680 (Walaga, Австралия)		НЛ	желтая	<i>YSED1</i>
гк-474	л-1	и-612949 (Аноп, Чехия, Agritec)		НЛ	желтая	<i>YSED1?2</i>
гк-512	л-1	и-620803 (N852, неизвестно)		НЛ	желтая	<i>sfbs1?, YSED1?</i>
гк-513	л-2	и-620804 (N853, неизвестно)		НЛ	желтая	<i>sfbs1?, YSED1?</i>
гк-514	л-3	и-620805 (N854, неизвестно)		НЛ	желтая	<i>sfbs1?, YSED1?</i>
гк-515	л-4	и-620806 (N858, неизвестно)		НЛ	желтая	<i>pf-ad?</i>
гк-516	л-5	и-620807 (N864, неизвестно)		НЛ	желтая	<i>sfbs1?, YSED1?</i>
к-8677 ¹	сорт	Исток, Россия, Пензенский НИИСХ		НЛ	желтая	<i>YSED1?</i>
к-8871 ¹	сорт	ЛМ98, Россия, ВНИИЛ		НЛ	желтая	<i>YSED1?</i>
гк-390	л-1	и-595808 (Linola, Канада); НЛ		СЛ	желтая	<i>YSED1</i>
гк-393	л-2			ВЛ	красно-коричневая	
гк-394	л-3			СЛ	красно-коричневая	
гк-523	л-8-1			НЛ	желтая	<i>YSED1</i>
гк-391	л-1-2			и-601679 (Еуге, Австралия); НЛ	НЛ	желтая
гк-472	л-3-1	ВЛ	желтая		<i>YSED1</i>	
гк-498	л-3-2	ВЛ	желтая		<i>YSED1</i>	
гк-441	л-4	НЛ	желтая		<i>sfbs1, YSED1</i>	
гк-420	л-5	НЛ	желтая		<i>sfbs1, YSED1</i>	
ВЛ-линии, присутствующие в родословной гибридов, использованных в исследовании						
гк-65	л-3	к-3178 (местный, Тверская губ.)		ВЛ	крапчатая	<i>ora1</i>
гк-103	л-4	к-5896 (Lin 225, Нидерланды)		ВЛ	желтая	<i>s1</i>
гк-109	л-3-2	к-6099 (Makovi M.A.G., Аргентина)		ВЛ	красно-коричневая	<i>wf1</i>
гк-121	л-1-1	к-6272 (L. Dominion, Северная Ирландия)		ВЛ	светло-желто-коричневая	<i>rs1</i>
гк-173	л-1	и-548145 (48254, Ottawa 2152, Германия)		ВЛ	желтая	<i>ysed2</i>
гк-392	л-1	гк-132 (л-1 из к-6608, Сиггонг, Австралия)	гк-103	ВЛ	желтая	

Окончание табл. 1

Номер по каталогу ВИР или родословная	Поколение инцукта, линия	Название и происхождение родителя(ей)	LIN	Окраска семян	Идентифицированные гены	
Линии из гибридов от скрещивания линий, контрастных по уровню LIN						
391 × 65-1	I ₄ ³ л-1	гк-391	гк-65	ВЛ	желтая	<i>ora1, sfs1, YSED1</i>
391 × 65-2	I ₄ л-2			СЛ	желтая	<i>ora1, sfs1, YSED1</i>
391 × 109-1	I ₄ л-1		гк-109	НЛ	желтая	<i>wf1, YSED1</i>
391 × 109-2	I ₄ л-2				СЛ	желтая
391 × 109-3	I ₄ л-3			СЛ	желтая	<i>sfs1, wf1, YSED1</i>
391 × 109-4	I ₄ л-4			НЛ	желтая	<i>sfs1, wf1, YSED1</i>
391 × 109-5	I ₄ л-5			ВЛ	желтая	<i>sfs1, wf1, YSED1</i>
391 × 121-1	л-1		гк-121	ВЛ	светло-желто-коричневая	<i>sfs1, sfc1, rs1</i>
391 × 121-2	л-2				СЛ	светло-желто-коричневая
391 × 173-1	л-1		гк-173	ВЛ	желтая	<i>sfs1, sfc3-2, ysed2</i>
391 × 173-2	л-2				ВЛ	желтая
391 × 392-1	л-1		гк-392	НЛ	желтая	<i>s1, sfs1, YSED1</i>

Примечание. ¹Образцы не участвуют в статистическом анализе; ²исходя из фенотипа линии, тест на аллелизм не проводили; ³поколение инбридинга для создающихся линий, где не отмечено 6 и более. LIN — линоленовая кислота. ВЛ — высоколиноленовый, СЛ — среднелиноленовый, НЛ — низколиноленовый.

гетационного периода (ВП): всходы — цветение первого цветка (Т1), цветение первого цветка — созревание первой коробочки (Т2); всходы — созревание первой коробочки (Т3), учитывали также общую (Но) и техническую (Нт) высоту и длину соцветия (Inf). Так как погодные условия в годы изучения различались, данные выравнивали методом приведенного среднего [18] к раннеспелому стандарту. Затем для каждой линии вычисляли среднее значение за все время изучения.

ЖКС масла оценивали с помощью газожидкостной хроматографии с масспектрометрией метиловых эфиров ЖК на хроматографе Agilent 6850. Определяли процентный состав пяти ЖК в масле: PAL, STE, OLE, LIO, LIN, а также соотношение LIO/LIN.

Основной характеристикой технического масла является его йодное число (IOD). Это показатель ненасыщенности масла ЖК, чем он выше, тем быстрее масло высыхает.

IOD вычисляли по формуле (AOCS Method Cd 1c-85, цит. по [11]):

$$IOD = 0,86 \cdot OLE + 1,732 \cdot LIO + 2,616 \cdot LIN,$$

где IOD — йодное число масла; OLE, LIO, LIN — доля олеиновой, линолевой и линоленовой кислот в масле соответственно.

Данные анализировали с помощью программ Statistica 7.0 for Windows и пакета анализа Excel 2007 for Windows [19, 20].

Интервал для минимального и максимального значений для каждого признака рассчитывали как $\min \pm \text{НСР}$ (наименьшая существенная разница, по Фишеру) [21].

Для определения влияния группы льна по LIN (ВЛ, СЛ, НЛ) на высоту растения, скороспелость и ЖКС масла использовали однофакторный дисперсионный анализ (Analysis of Variation, ANOVA). Долю влияния фактора (η^2 , %) вычисляли по Фишеру [21].

Различия между группами льна по уровню LIN оценивали по критерию достоверной значимой разницы Тьюки (ДЗР, HSD — Honestly significant difference Tukey) для неравных выборок с апостериорным попарным сравнением средних после отклонения гипотезы H_0 об отсутствии различий по результатам ANOVA [19, 20].

Для каждой группы льна проводили анализ систем корреляций между признаками (по Пирсону) с построением корреляционных плеяд. Для оценки сходства систем связей вычисляли коэффициенты корреляции между z-преобразованными матрицами корреляций для каждой из трех групп. Эти показатели отображают сходство матриц по структуре [22].

Для каждой линии выделяли ДНК из 10 двухдневных корешков проростков льна по стандартной методике [23].

ПЦР проводили в объеме 20 мкл. В состав смеси входили: DreamTaq™ Green Master Mix (2X) (ThermoScientific), по 5 пикомолей каждого праймера и 1 мкл препарата ДНК. Праймеры синтезированы компанией «Евроген» [24]. Праймеры, флан-

кирующие участок с предположительной мутацией в гене *LuFAD3A*, подбирали с использованием программы *idtdna.com* [25]. Для выявления мутаций в гене *LuFAD3B* использовали опубликованные ранее праймеры и протокол [13].

Секвенировали ДНК на базе РЦ СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий» и компании «Евроген». В работе использовали референсные последовательности для гена *LuFAD3A*: NM991829.1, NM991830.1, NM991831.1, JQ963128.1.

Последовательности генов выравнивали с помощью программы *tcoffee* [26]. Нуклеотидные последовательности анализировали при помощи программ *MEGA* 7.0.21 [27] и *UGENE* 1.290 [28].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С использованием шести поколений инцухта из 26 гетерогенных образцов льна получены 40 линий,

среди которых 19 высоко-, 7 средне- и 14 низколиноленовых.

Признаки изученных линий варьировали слабо ($CV < 10\%$, T1, T3) или умеренно ($CV < 26\%$, Ho, Ht, Inf, T2, PAL, STE, OLE, IOD), и только те из них, которые были связаны с синтезом линоленовой кислоты ($CV = 26–146\%$, LIO, LIN, LIO/LIN), были сильно варьирующими (табл. 2).

Общая высота растения была от 52 см у некоторых НЛ-линий (гк-391, -512, -514, -516) до 95 см у гк-2 (стандарта), техническая длина — от 33 см (ВЛ гк-483; СЛ гк-119; НЛ гк-391) до 75 см (гк-2). ANOVA показал достоверные различия групп льна по всем трем признакам. Различия в 10 см по ним между ВЛ и НЛ по критерию Тьюки были достоверны. Длина соцветия колебалась от 13 см (ВЛ гк-103, -121, -136) до 26 см (ВЛ гк-483, -109, -173; НЛ гк-523) и практически не различалась между группами льна (см. табл. 2, рис. 2).

Таблица 2

Параметры высоты растения, продолжительность фаз вегетационного периода и жирнокислотного состава масла семян у образцов льна, различающихся по уровню синтеза линоленовой кислоты

Номер каталога ВИР	Ho	Ht	Inf	T1	T2	T3	PAL	STE	OLE	LIO	LIN	LIO/LIN	IOD
Линии с высоким содержанием линоленовой кислоты													
гк-2	93	75	18	40	25	64	4	3	19	15	60	0,25	198
гк-65	70	52	17	39	26	65	4	3	21	17	55	0,30	192
гк-483	59	33	25	47	38	85	6	3	13	11	67	0,17	205
гк-448	64	42	22	40	41	81	6	2	14	12	67	0,17	209
гк-103	75	62	13	49	36	85	5	4	14	12	65	0,19	203
гк-109	75	49	26	43	40	82	4	3	23	15	55	0,27	190
гк-121	62	48	14	43	33	76	5	3	16	18	59	0,30	198
гк-136	72	59	14	47	36	84	5	5	15	14	62	0,22	198
гк-173	78	52	26	45	38	83	5	5	18	20	53	0,37	187
гк-210	84	63	20	43	32	75	5	5	23	19	48	0,40	180
гк-393	79	60	19	55	48	103	6	3	21	13	57	0,22	189
гк-472	57	38	20	45	41	85	7	5	15	20	52	0,39	185
гк-498	56	37	19	45	41	86	3	2	13	20	61	0,33	206
гк-392	63	41	22	42	38	80	5	5	20	15	54	0,28	186
391 × 65-1	74	57	17	53	28	81	6	3	23	16	51	0,31	183
391 109-5	64	47	18	41	34	75	5	3	27	17	49	0,34	179
391 121-1	68	53	15	46	36	82	5	4	25	21	46	0,45	177
391 173-1	64	44	20	46	40	86	4	2	9	18	66	0,27	212
391 173-2	72	50	22	48	40	88	6	5	17	19	53	0,35	187
Среднее	70 ± 2	51 ± 2	19 ± 1	45 ± 1	36 ± 1	81 ± 2	5 ± 0	4 ± 0	18 ± 1	16 ± 1	57 ± 1	0,29 ± 0,02	193 ± 2
CV	14	21	21	10	16	10	19	29	26	19	11	27	6

Окончание табл. 2

Номер каталога ВИР	Но	Ht	Inf	T1	T2	T3	PAL	STE	OLE	LIO	LIN	LIO/LIN	IOD
Линии с пониженным содержанием линоленовой кислоты													
ГК-163							7	3	28	19	43	<i>0,44</i>	169
ГК-119	59	36	22	41	36	77	5	4	34	17	39	<i>0,44</i>	161
ГК-390	74	55	19	47	31	78	5	3	17	32	44	<i>0,72</i>	184
ГК-394	80	59	21	48	32	80	5	4	20	37	34	<i>1,08</i>	170
391 65-2	76	60	16	54	27	81	6	4	19	35	36	<i>0,96</i>	171
391 109-2	64	46	17	41	34	75	5	4	29	48	14	<i>3,46</i>	144
391 109-3	60	45	15	45	34	78	5	4	25	29	37	<i>0,78</i>	168
391 121-2	67	46	20	45	38	83	5	5	29	21	41	<i>0,51</i>	167
Среднее	68 ± 3	50 ± 3	19 ± 1	46 ± 2	33 ± 1	79 ± 1	5 ± 0	4 ± 0	25 ± 2	31 ± 4	35 ± 4	1,14 ± 0,40	166 ± 5
CV	12	18	15	10	10	3	8	15	26	33	28	92	7
Низколиноленовые линии и сорта													
ГК-523	74	48	25	49	32	81	6	4	17	67	6	12,00	146
ГК-391	<i>53</i>	<i>35</i>	18	42	42	85	6	4	23	60	7	9,07	142
ГК-441	59	42	17	41	44	85	7	3	27	62	2	29,27	135
ГК-420	56	37	19	42	41	83	7	4	18	69	3	22,78	142
ГК-395	58	38	20	45	40	85	7	3	19	69	2	31,26	141
ГК-474	74	52	22	53	41	94	7	4	16	72	<i>1</i>	49,33	142
ГК-512	<i>52</i>	37	15	43	41	84	7	5	24	61	3	23,51	134
ГК-513	57	38	18	43	40	82	7	6	27	58	2	31,99	129
ГК-514	<i>55</i>	38	17	43	40	84	7	4	19	69	2	34,74	140
ГК-515	62	40	22	48	38	86	6	4	18	68	3	26,07	141
ГК-516	<i>52</i>	37	15	43	39	82	6	4	22	66	2	37,31	138
391 109-1	58	42	16	41	33	74	6	4	26	62	<i>1</i>	42,66	135
391 109-4	64	45	19	42	34	76	4	4	24	62	6	10,18	145
391 392-1	61	40	21	43	39	82	3	2	16	75	4	19,60	154
К-8677							6	4	13	75	2	47,18	145
К-8871							7	3	19	69	2	33,84	141
Среднее	60 ± 2	41 ± 1	19 ± 1	44 ± 1	39 ± 1	83 ± 1	6 ± 0	4 ± 0	21 ± 1	66 ± 1	3 ± 0	27 ± 3	140 ± 2
CV	12	12	16	8	9	6	19	24	20	8	57	44	4
Все среднее	66 ± 2	47 ± 2	19 ± 1	45 ± 1	37 ± 1	82 ± 1	5 ± 0	4 ± 0	20 ± 1	36 ± 4	34 ± 4	10 ± 2	170 ± 4
НСР	3	3	1	1	2	2	0,3	0,3	2	7	8	5	8
CV	15	20	18	9	14	8	20	25	26	64	74	149	15

Примечание. Но — общая высота соцветия; Ht — техническая высота соцветия; Inf — длина соцветия; T1 — продолжительность фазы всходы — цветение первого цветка; T2 — продолжительность фазы цветение первого цветка — созревание первой коробочки; T3 — продолжительность фазы всходы — созревание первой коробочки; PAL — пальмитиновая кислота; STE — стеариновая кислота; OLE — олеиновая кислота; LIO — линолевая кислота; LIN — линоленовая кислота; IOD — йодное число. Курсивом обозначены минимальные, а полужирным шрифтом — максимальные значения выделенные по критерию Тьюки для всей выборки. Гк-390 не участвует в дисперсионном анализе высоколиноленовых образцов.

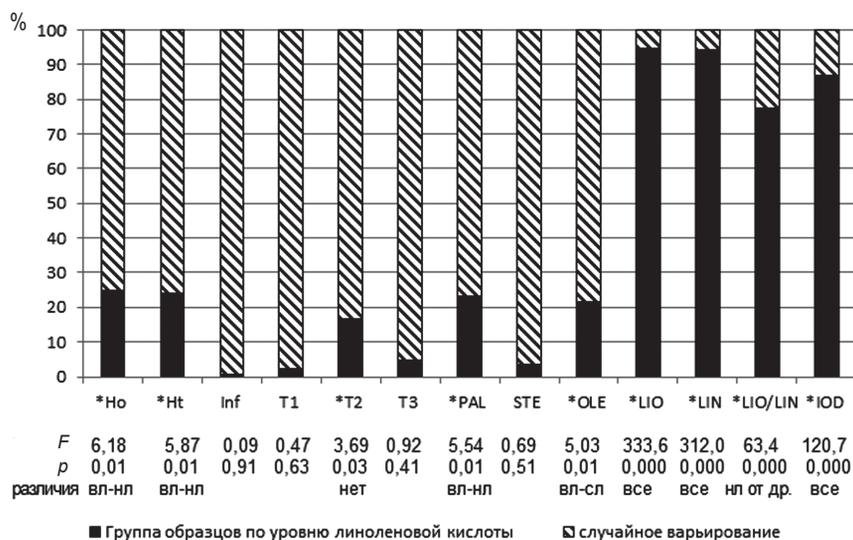


Рис. 2. Доля влияния (η^2) степени линоленовости (ВЛ — высоколиноленовый, СЛ — среднелиноленовый, НЛ — низколиноленовый) и случайного варьирования по результатам однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). *различия между группами достоверны; Но — общая высота соцветия; Ht — техническая высота соцветия; Inf — длина соцветия; T1 — продолжительность фазы всходы—цветение первого цветка; T2 — продолжительность фазы цветение первого цветка—созревание первой коробочки; T3 — продолжительность фазы всходы—созревание первой коробочки; PAL — пальмитиновая кислота; STE — стеариновая кислота; OLE — олеиновая кислота; LIO — линолевая кислота; LIN — линоленовая кислота; IOD — йодное число; F — значение критерия Фишера; p — вероятность сходства классов (ВЛ, СЛ, НЛ); различия — достоверные различия этих классов по результатам апостериорного сравнения по критерию Тьюки для неравных выборок

Самые скороспелые ВЛ-линии гк-2 и гк-65, у которых все три периода вегетации были короткими (T1 = 39, T2 = 25, T3 = 64 сут), а позднеспелая — ВЛ гк-393, мутант из НЛ-линий сорта Linola (T1 = 55, T2 = 48, T3 = 103 сут). Только по продолжительности периода всходы — цветение выделялись ВЛ гк-448 (40 сут) и СЛ л-2 из гк-391 × гк-65 (54 сут). По результатам ANOVA не было выявлено различий между группами льна по T1 и T3, но обнаружены достоверные отличия по T2. Однако максимальные различия в 6 сут между группами льна для T2 по критерию Тьюки были недостоверны (см. табл. 2, рис. 2).

Содержание PAL в масле колебалось от 3 % (ВЛ гк-2, -65, -498, л-1 из гк-391 × гк-173; НЛ л-1 из гк-391 × гк-392) до 7 % (ВЛ гк-472; СЛ гк-163; НЛ гк-441, -420, -395, -474, -512, -513, -514, к-8871). ANOVA показал достоверные различия для групп льна по этому признаку. Различия в 1 % между ВЛ и НЛ по критерию Тьюки были достоверны, а из-за небольшой выборки те же различия между ВЛ и СЛ выявлены не были (см. табл. 2, рис. 2).

Содержание STE в масле колебалось от 2 % (ВЛ гк-498, л-1 из гк-391 × гк-173; НЛ л-1 из гк-391 × гк-392) до 6 % (НЛ гк-513) и достоверно не различалось у групп льна (см. табл. 2, рис. 2).

Содержание OLE в масле колебалось от 9 % (ВЛ л-1 из гк-391 × гк-173) до 34 % (СЛ гк-119). ANOVA продемонстрировал достоверные различия для групп льна по этому признаку, обусловленные разницей

в 7 % между СЛ и ВЛ, достоверной по критерию Тьюки (см. табл. 2, рис. 2).

Доля влияния группы льна (η^2) на описанные выше признаки при достоверных различиях составляла от 17 до 25 %. Для групп льна по всем признакам, связанным с уровнем LIN, ANOVA показал достоверные различия, доля влияния составляла от 77 до 95 %, что было вызвано принципом разделения на группы (см. рис. 2).

Содержание LIO в масле колебалось от 11 до 75 % (у ВЛ 11–21 %, у СЛ 17–48 %, у НЛ 58–75 %). Наименьший процент LIO имели почти все ВЛ-линии (гк-483, -448, -103 и др.), а наибольший — почти все НЛ (л-1 из гк-391 × гк-392, к-8677, гк-474 и др.) (см. табл. 2). Критерий Тьюки показал достоверные различия для всех трех групп льна.

Содержание LIN в масле колебалось от 1 до 67 % (у ВЛ 46–67 %, у СЛ 14–44 %, у НЛ 1–7 %). Наименьший процент LIN имели все НЛ-образцы, а наибольший — ВЛ гк-483, -448 и др. (см. табл. 2). Критерий Тьюки указывал на достоверные различия для всех трех групп льна (см. рис. 2).

Соотношение LIO/LIN колебалось от 0,17 до 49,33 (у ВЛ 0,17–0,45, у СЛ 0,44–3,46, у НЛ 9,07–49,33). Минимальные значения имели все ВЛ-льны, а максимальное — НЛ. LIO/LIN — очень сильно варьирующий признак (CV = 149). Однако у ВЛ-форм он был более постоянен (CV = 27 %), чем у СЛ (CV = 92 %) и НЛ (CV = 44 %).

ANOVA продемонстрировал достоверные различия для групп льна по этому признаку (см. табл. 2), но по критерию Тьюки достоверно отличались только НЛ- от ВЛ- и СЛ-форм (см. рис. 2).

Из всех изученных образцов «в чистом виде» для лечебного питания может быть использовано масло лишь л-2 из гк-391 × гк-109, а при диетическом — двух линий из коммерческих сортов гк-391 и гк-523, а также линии гибридного происхождения л-4 из гк-391 × гк-109. Остальным маслам необходим купаж.

Йодное число масла колебалось от 129 до 212 (у ВЛ 177–212, у СЛ 161–184, у НЛ 129–154). Наименьшим оно было у НЛ гк-441, -512, -513, л-1 из гк-391 × гк-109, наибольшим — у ВЛ гк-483, -448, -472, л-1 из гк-391 × гк-121 (см. табл. 2). Критерий Тьюки показал достоверные различия для всех трех групп льна (см. табл. 2, рис. 2).

Содержание ЖК в семенах иногда коррелируют с фазами ВП и высотами. Как мы и предполагали ранее [10], изменения, происходящие в семенах при снижении синтеза LIN, вызывают несимметричные изменения в соотношении ЖК, что сказывается на корреляциях между ними. Во всех трех группах льна было выявлено две плеяды скоррелированных признаков. И только несколько корреляций совпало в каждой

из них: в первой — высоты тесно связаны друг с другом, так как Нт составляет около 90 % от Но; в центре второй — содержание LIN в масле, отрицательно коррелирующее с соотношением LIO/LIN и положительно с IOD. Как и в первом случае, это следствие арифметических закономерностей вычисления последних двух признаков (рис. 3).

У ВЛ-линий первую плеяду образуют длительность вегетационного периода (Т3), тесно положительно связанная с ее фазами — Т1 и Т2, а также умеренно положительно — с PAL, образующейся в начале биосинтеза ЖК. Т2 отрицательно коррелирует с Нт, которая в свою очередь очень сильно положительно связана с Но. Вторую плеяду, помимо очень сильной положительной корреляции LIN с IOD и сильной отрицательной с LIO/LIN, а также сильной отрицательной между последними, дополняет сильная отрицательная корреляция OLE с LIN и IOD, а также умеренная отрицательная последних со STE. LIO очень сильно положительно связана с LIO/LIN и умеренно отрицательно с LIN. Негативно коррелирующие с LIN ЖК являются ее предшественниками. Inf независима от других признаков (см. рис. 3).

Группа СЛ-линий малочисленна, корреляции между ее признаками достоверны при $r > 0,75$, и многие силь-

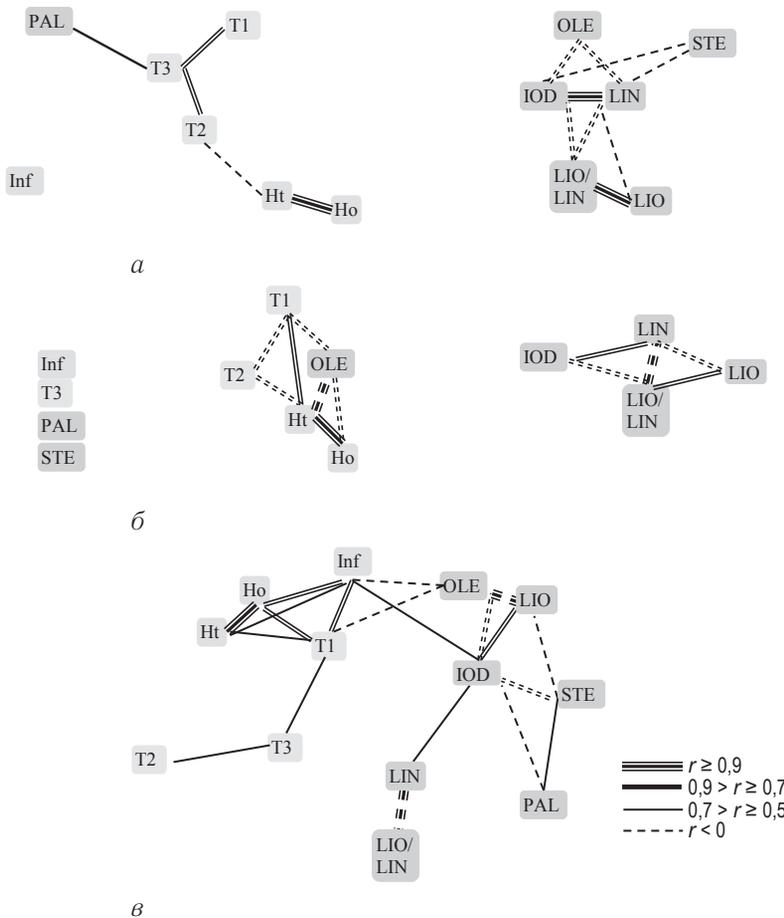


Рис. 3. Корреляционные плеяды признаков высоты растения, продолжительности фаз вегетационного периода и жирнокислотного состава масла семян у образцов льна, различающихся по уровню синтеза линоленовой кислоты: а — высоколиноленовые; б — среднелиноленовые; в — низколиноленовые. Но — общая высота соцветия; Нт — техническая высота соцветия; Inf — длина соцветия; Т1 — продолжительность фазы всходы–цветение первого цветка; Т2 — продолжительность фазы цветение первого цветка–созревание первой коробочки; Т3 — продолжительность фазы всходы–созревание первой коробочки; PAL — пальмитиновая кислота; STE — стеариновая кислота; OLE — олеиновая кислота; LIO — линолевая кислота; LIN — линоленовая кислота; IOD — йодное число

ные и все умеренные корреляции не могут быть приняты во внимание. Здесь первую плеяду помимо высот образует T1, сильно положительно связанная с Ht, и обе они отрицательно коррелируют с T2. С первыми двумя признаками сильно отрицательно коррелирует содержание OLE. Вторую плеяду образуют попарно положительно сильно коррелирующие между собой LIO и IOD, а также LIO и соотношение LIO/LIN. Эти две группы отрицательно коррелируют друг с другом. Inf, T3, содержание насыщенных кислот не зависят от других признаков (см. рис. 3).

У НЛ-линий первую плеяду вместе с высотами образуют T1 и Inf, положительно связанные друг с другом. С T1 положительно коррелирует T3, а с ней положительно связана T2. Центр второй плеяды смещается на IOD, которое положительно связано с LIO (сильно) и LIN (умеренно) и отрицательно с OLE, STE и PAL. LIO также очень сильно отрицательно коррелирует с OLE и умеренно со STE, последняя в свою очередь положительно связана с PAL. LIN очень сильно отрицательно коррелирует с LIO/LIN, так как именно изменчивостью LIN в основном определяется варьирование этого соотношения. Плеяды связаны между собой умеренными отрицательными корреляциями OLE с T1 и Inf, а также положительной корреляцией последней с IOD (см. рис. 3).

Корреляции между z-преобразованными матрицами корреляций для групп льна показали их умеренное сходство ($r_{ВЛ-СЛ} = 0,50$, $r_{ВЛ-НЛ} = 0,42$, $r_{СЛ-НЛ} = 0,54$), которое в основном обусловлено арифметическими закономерностями измерения/вычисления признаков.

При помощи факторного анализа (метод главных компонент) было выявлено два основных фактора, влияющих на исследуемые признаки (рис. 4).

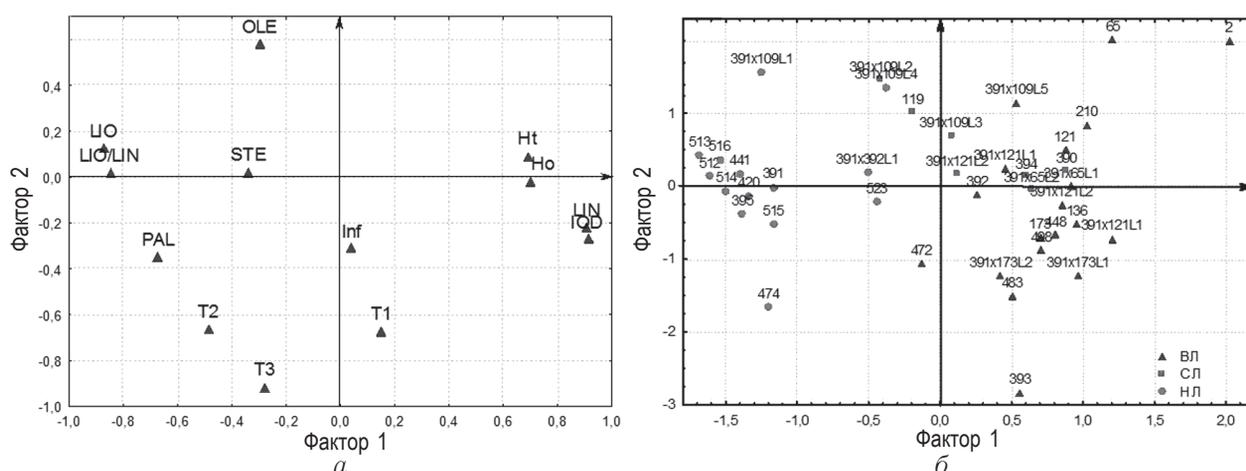


Рис. 4. Распределение 13 изученных признаков (а) и 40 линий льна (б) в системе двух факторов. Но — общая высота соцветия; Ht — техническая высота соцветия; Inf — длина соцветия; T1 — продолжительность фазы всходы—цветение первого цветка; T2 — продолжительность фазы цветение первого цветка—созревание первой коробочки; T3 — продолжительность фазы всходы—созревание первой коробочки; PAL — пальмитиновая кислота; STE — стеариновая кислота; OLE — олеиновая кислота; LIO — линолевая кислота; LIN — линоленовая кислота; IOD — йодное число

Первый фактор определяет соотношение LIO и LIN. Он указывает на антагонизм LIN, IOD и высот растения (Ho, Ht), с одной стороны, и LIO, PAL, LIO/LIN — с другой, и характеризует около 40 % общей изменчивости.

Этот фактор с небольшим захождением отделил НЛ-линии от ВЛ. СЛ-линии заняли промежуточное положение. Интересно, что «захождение» в сторону НЛ вызвано наличием СЛ-гетерозиготы в выборке (л-2 из гк-391 × гк-109), а также ревертанта к ВЛ из НЛ-сорта (гк-472).

Второй фактор определяет скороспелость и показывает антагонизм длительности всех трех фаз ВП, с одной стороны, и OLE — с другой. Он объясняет около 20 % общей изменчивости.

Этот фактор выделил раннеспелые, как правило, высокоолеиновые гк-2, -65 и л-1, -2, -4, -5 из гк-391 × гк-109, и экстремально позднеспелую гк-393, а также позднеспелые низкоолеиновые -483, -472, л-1 и -2 из гк-391 × 173.

В системе двух факторов выделяют три группы линий: 1) НЛ гк-391, -441, -420, -395, -512, -513, -514, -515, -516 — с наименьшим количеством LIN и наибольшим LIO; 2) наиболее скороспелые и высоколиноленовые гк-2 и -65; 3) родственные НЛ л-2 и СЛ л-4 из гк-391 × гк-109 как скороспелые. Отдельно от других находятся экстремально позднеспелая ВЛ гк-393 и позднеспелая гк-474 — НЛ и низкоолеиновая.

Таким образом, факторный анализ позволил сгруппировать линии по скоррелированным признакам и комплексно охарактеризовать их.

Для поиска различий линий НЛ и СЛ по генам биосинтеза линоленовой кислоты разработан новый метод идентификации аллели гена *LuFAD3A*, контр-

олирующего ее образование. Анализ имеющихся в базе данных NCBI-последовательностей аллелей гена *LuFAD3A* показал, что в большинстве НЛ-сортов мутация, ингибирующая синтез LIN, находится в первом экзоне этого гена. Были сконструированы праймеры FAD3Ae1F (acttgcatctgcattactt) и FAD3Ae1R (ccagaagaataatgtgaattacc), фланкирующие этот участок. Продукт амплификации имеет длину 526 п. н. При его секвенировании у каждой из мутантных аллелей *LuFAD3A* линий гк-391 и гк-515 обнаружены одинаковые замены в положениях 28 (G → A), 255 (G → A) и 309 (A → G) первого экзона, что говорит об идентичности аллелей между собой и полном сходстве с последовательностью из NCBI для генотипа SP2047

(HM881831). Замена в положении 255 (G → A) приводит к образованию стоп-кодона.

Использование рестриктазы *HaeIII* позволяет идентифицировать мутантную аллель, содержащую замену G₂₅₅ → A₂₅₅. В пределах амплифицированного фрагмента аллели дикого типа присутствует два сайта рестрикции (рис. 5). При его расщеплении образуются фрагменты 85, 90 и 351 п. н. Указанная выше мутация находится в положении 442 продукта амплификации и затрагивает один из двух сайтов рестрикции, в результате чего образуются фрагменты 90 и 436 (351 + 85) п. н. Таким образом, нами предложен новый вариант CAPS-маркера. С его помощью установлено, что сорта ЛМ98 и Исток, а так-

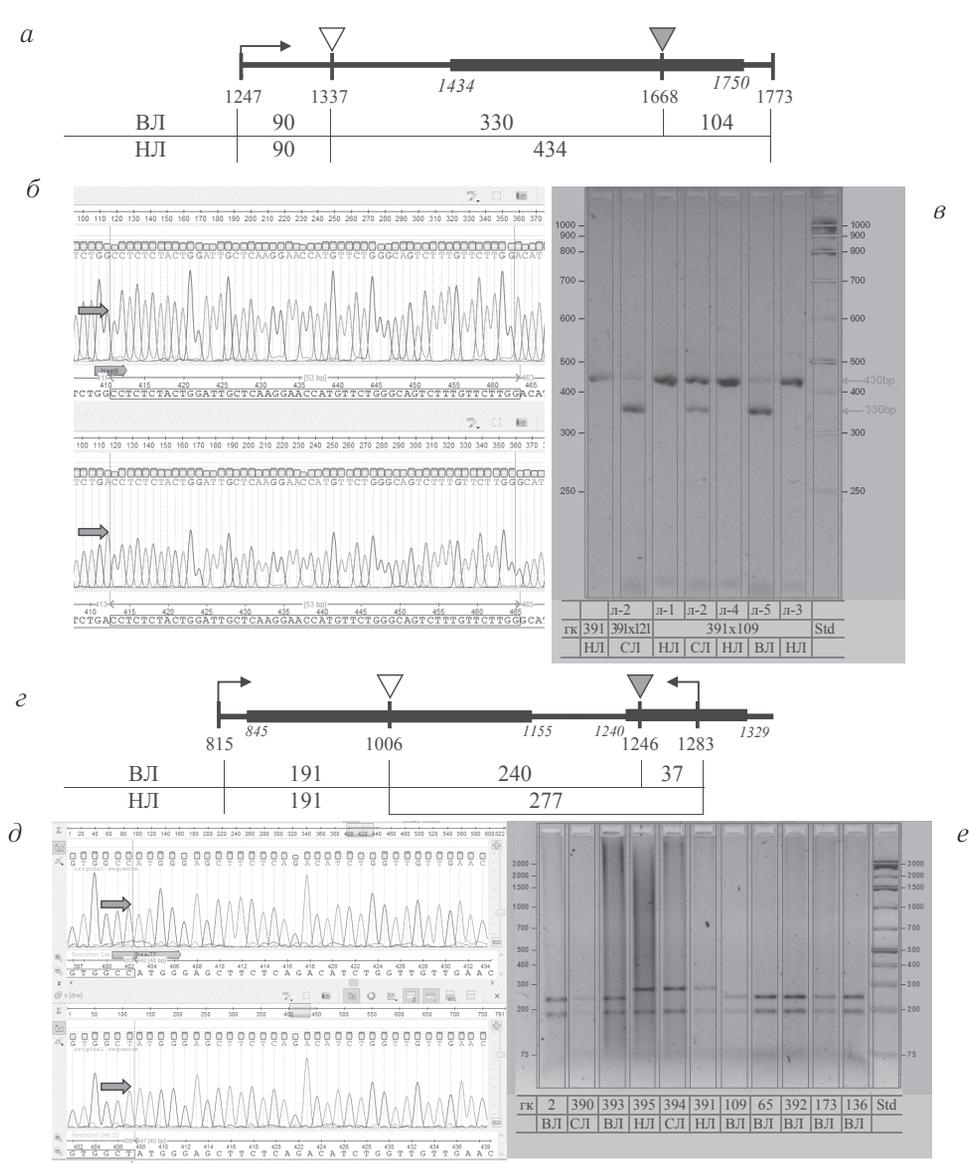


Рис. 5. Молекулярное маркирование генов *LuFAD3A* (а-в) и *LuFAD3B* (с-е): а, с — рестрикционная карта фрагмента гена; в, д — хроматограммы дикого типа (гк-2) и мутанта (гк-391), SNP отмечены стрелками; е, е — электрофореграмма продуктов рестрикции ПЦР-фрагментов. ВЛ — высоколиноленовый, СЛ — среднелиноленовый, НЛ — низколиноленовый

же линии из НЛ-сортов Linola (гк-390, -523), Еуге (гк-391, -441, -420), Walaga (гк-395), Атоп (гк-474) и образцов 852, 853, 854, 858, 864 (гк-512–гк-516) гомозиготны по мутации в этом участке гена (табл. 3).

Для второго гена *LuFAD3B* был использован опубликованный ранее протокол для обнаружения мутации в первом экзоне [13]. Продукт амплификации имеет длину 468 п. н. При его секвенировании у мутантных аллелей линий гк-391 и гк-515 обнаружена замена в положении 6 (С → Т) второго экзона, приводящая к замене Нус → Туг. Показано, что использование рестриктазы *BsaI* позволяет идентифицировать мутантную аллель. В пределах амплифицированного фрагмента аллели дикого типа присутствует два сайта для рестриктазы (рис. 5). При его расщеплении образуются фрагменты длиной 191, 240 и 37 п. н. Указанная выше мутация находится

в положении 431 продукта амплификации и затрагивает один из трех сайтов рестрикции, в результате чего образуются фрагменты длиной 191 и 277 (240 + 37) п. н. Так как продукт рестрикции 37 п. н. ВЛ-форм сливается с низкомолекулярными неспецифическими продуктами амплификации, создается ложное впечатление о различии ВЛ- и НЛ-форм по размеру большего продукта амплификации. Таким образом, CAPS-маркер, предложенный ранее для генотипа 593–708, может быть использован и для гк-391. С его помощью выяснено, что линии из НЛ-сортов Linola (гк-394), Еуге (гк-391, 420), Walaga (гк-395) и образца 858 (гк-515) гомозиготны по мутации в этом участке гена (табл. 4). На основе имеющихся в базе данных NCBI-последовательностей аллели гена *LuFAD3B* (KF026416) установлено, что сорт Атоп имеет ту же точковую мутацию, что и гк-391.

Таблица 3

Полиморфизм линий льна по длине рестрикционных фрагментов (CAPS-маркеров) для гена *LuFAD3A*

Номер каталога ВИР	LIN, %	Длина фрагмента (п. н.)		Аллель	Номер каталога ВИР	LIN, %	Длина фрагмента (п. н.)		Аллель
		1	2				1	2	
Высоколиноленовые линии					Среднелиноленовые линии				
гк-2	58	330	100	д. т.	гк-163	43	330	100	д. т.
гк-65	50	330	100	д. т.	гк-119	33	330	100	д. т.
гк-483	66	330	100	д. т.	гк-390	41	430	100	мут.
гк-448	67	330	100	д. т.	гк-394	34	330	100	д. т.
гк-103	61	330	100	д. т.	391 × 65-2	36	430	100	мут.
гк-109	46	330	100	д. т.	391 × 109-2	14	430+330	100	д. т. + мут.
гк-121	58	330	100	д. т.	391 × 109-3	37	430	100	мут.
гк-136	61	330	100	д. т.	391 × 121-2	41	330	100	д. т.
гк-173	55	330	100	д. т.	Низколиноленовые линии				
гк-210	48	330	100	д. т.	гк-523	6	430	100	мут.
гк-393	57	330	100	д. т.	гк-391	5	430	100	мут.
гк-472	52	330	100	д. т.	гк-441	2	430	100	мут.
гк-498	61	330	100	д. т.	гк-420	3	430	100	мут.
гк-392	54	330	100	д. т.	гк-395	2	430	100	мут.
391 × 65-1	51	330	100	д. т.	гк-474	2	430	100	мут.
391 × 109-5	49	330	100	д. т.	гк-512	3	430	100	мут.
391 × 121-1	46	430	100	мут.	гк-513	2	430	100	мут.
391 × 173-1	66	330	100	д. т.	гк-514	2	430	100	мут.
391 × 173-2	53	330	100	д. т.	гк-515	3	430	100	мут.
					гк-516	2	430	100	мут.
					391 × 109-1	1	430	100	мут.
					391 × 109-4	6	430	100	мут.
					391 × 392-1	4	430	100	мут.
					к-8677	2	430	100	мут.
					к-8871	2	430	100	мут.

Таблица 4

Полиморфизм линий льна по длине рестрикционных фрагментов (CAPS-маркеров) для гена *LuFAD3B*

Номер каталога ВИР	LIN, %	Длина фрагмента (п. н.)		Аллель	Номер каталога ВИР	LIN, %	Длина фрагмента (п. н.)		Аллель
		1	2				1	2	
Высоколиноленовые линии					Среднелиноленовые линии				
гк-2	58	240	191	д. т.	гк-119	33	240	191	д. т.
гк-65	50	240	191	д. т.	гк-390	41	240	191	д. т.
гк-109	46	240	191	д. т.	гк-394	34	277	191	мут.
гк-136	61	240	191	д. т.	Низколиноленовые линии				
гк-173	55	240	191	д. т.	гк-391	5	277	191	мут.
гк-393	57	240	191	д. т.	гк-420	3	277	191	мут.
					гк-395	2	277	191	мут.
					гк-515	3	277	191	мут.

Одним из первых в ВИР поступил НЛ-сорт Еуге (Австралия), который был гетерогенен по генам НЛ. На его основе было получено несколько линий, но используется в гибридизации только одна (гк-391). С помощью полученных маркеров была подтверждена гомозиготность гибридов от скрещивания НЛ- (гк-391) и ВЛ-линий (см. табл. 3, рис. 5) по гену *LuFAD3A*. Гибриды F_7 от скрещивания гк-391 × гк-109 (л-1, -3, -4), гк-391 × гк-65 (л-2) и F_9 от скрещивания гк-391 × гк-392 (л-1) гомозиготны по рецессивной аллели гена *LuFAD3A*. Гибриды F_9 гк-391 × гк-121 (л-1, 2), гк-391 × гк-121 (л-1) и F_7 гк-391 × гк-65 (л-1), гк-391 × гк-109 (л-5) гомозиготны по доминантной аллели этого гена. Гибрид F_7 л-2 (гк-391 × гк-109) оказался гетерозиготен по этому гену. Интересна линия л-2 из гк-391 × гк-121: по результатам анализа ДНК она гомозиготна по рецессивной аллели гена НЛ, но имеет пограничное содержание линоленовой кислоты, поэтому была отнесена нами к ВЛ, а не к СЛ. Таким образом, у родительской линии гк-121 существует какой-то другой способ незначительно повысить уровень линоленовой кислоты. Хотя в литературе описаны только два гена, отвечающие за синтез LIN, по нашим данным, генетическое окружение не менее важно.

НЛ-сорты, находящиеся в нашем распоряжении, позднеспелые и не адаптированы к условиям России, поэтому в задачу исследования входил отбор перспективных раннеспелых форм. Было показано, что гибриды, в родословной которых была линия гк-109, созревали на 8–10 дней раньше родительской НЛ-линии гк-391. Наиболее перспективны СЛ-линии л-3 и НЛ-линии л-1 и л-4 от скрещивания гк-391 × гк-109.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Линии генколлекции льна ВИР обладают широким разнообразием ЖКС масла. Резкое снижение синтеза линоленовой кислоты вызывает несимметричные изменения в соотношении ЖК, что сказывается на корре-

ляциях между ними и другими признаками. Факторный анализ четко разделит линии по уровню линоленовой кислоты и связанных с ним признакам. Были сконструированы праймеры, подобраны рестриктазы и разработан протокол эксперимента для идентификации аллелей гена *LuFAD3A*. Установлено, что все имеющиеся в коллекции ВИР НЛ-формы несут мутацию в первом экзоне ($G_{255} \times A_{255}$) этого гена. Тест-система [13], разработанная для идентификации мутации в первом экзоне гена *LuFAD3B* генотипа 593–708, может быть использована и для мутации во втором экзоне у гк-391 и др.

Четырех поколений инбридинга в большинстве случаев достаточно для отбора гомозиготных форм.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке программы ВИР № 0662-2018-0005 АААА-А16-116040710366-3 «Идентификация и картирование генофонда важнейших сельскохозяйственных культур, формирование генетических коллекций с ценными для селекции аллелями генов и локусами количественных признаков».

Авторы благодарят РЦ СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий» и лично Е.Ю. Городилову и А.Э. Машарского за содействие в проведении секвенирования ДНК.

ЛИТЕРАТУРА

- Viju C, Yeung MT, Kerr WA. Post-moratorium EU regulation of genetically modified products: trifid flax. *CATPRN Commissioned Paper*. 2011;(3):1-30.
- ФАОСТАТ. Сельскохозяйственные культуры: “crops processed”, element: “Area harvested”, “Yield” crops: linseed, flax [cited 2017 Dec 15]. Available from: <http://www.fao.org/faostat/ru/#data/QC>. Ссылка активна на 15.12.2017.
- Лукомец В.М., Зеленцов С.В., Кривошлыков К.М. Перспективы и резервы расширения производства

- масличных культур в Российской Федерации // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень ВНИИМК. — 2015. — № 4. — С. 81–102. [Lukomets VM, Zelentsov SV, Krivoslyukov KM. Outlook and reserves the expansion of oil crops production in the Russian Federation. *Oil crops. Scientific and Technical Bulletin VNIIMK*. 2015;(4):81-102. (In Russ.)]
4. Кутузова С.Н. Лен // Генетика культурных растений. — СПб.: ВИР, 1998. — С. 6–52. [Kutuzova SN. Len. In: *Genetika kul'turnykh rastenii*. St. Petersburg: VIR; 1998. P. 6-52. (In Russ.)]
 5. Сорты растений, включенные в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию Сорты культуры «Лен-долгунец». [Sorta rasteniy, vklyuchennyye v Gosudarstvennyy reestr selektsionnykh dostizheniy, dopushchennykh k ispol'zovaniyu Sorta kul'tury "Len-dolgunets" (In Russ.)]. Доступно по: <http://reestr.gossort.com/reestr/culture/133>. Ссылка активна на 28.01.2018.
 6. Рожмина Т.А., Лошакова Н.И. Образцы прядильного и масличного льна (*Linum usitatissimum* L.) — источники эффективных генов устойчивости к фузариозному увяданию и ее зависимость от температуры // Сельскохозяйственная биология. — 2016. — Т. 51. — № 3. — С. 310–317. [Rozhmina TA, Loshakova NI. New sources of effective resistance genes to fusarium wilt in flax (*Linum usitatissimum* L.) depending on temperature. *Agricultural biology*. 2016;51(3):310-317. (In Russ.)]
 7. Каталог мировой коллекции ВИР. Лен (характеристика образцов по биохимическим показателям). — Вып. 775. — СПб.: ВИР; 2006. — 80 с. [Katalog mirovoi kolleksii VIR. Len (kharakteristika obraztsov po biokhimicheskim pokazatelyam). Issue 775. Saint Petersburg: VIR; 2006. 80 p. (In Russ.)]
 8. Тутельян В.А., Батурин А.К., Гаппаров М.Г., и др. Рациональное питание, нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации: Методические рекомендации. — М., 2008. — 39 с. [Tutel'yan VA, Baturin AK, Gapparov MG, et al. Ratsional'noye pitaniye, normy fiziologicheskikh potrebnostei v energii i pishchevykh veshchestvakh dlya razlichnykh grupp naseleniya Rossiiskoi Federatsii. Metodicheskiye rekomendatsii. Moscow; 2008. 39 p. (In Russ.)]
 9. Green AG. Genetic control of polyunsaturated fatty acid biosynthesis in flax (*Linum usitatissimum*) seed oil. *Theor Appl Genet*. 1986;72(5):654-661. <https://doi.org/10.1007/BF00289004>.
 10. Porokhvinova E, Shelenga T, Kosykh L, et al. Biochemical diversity of fatty acid composition in flax from VIR's genetic collection and effect of environment on its development. *Russ J Genet Appl Res*. 2017;7(6):626-639. <https://doi.org/10.1134/S2079059717060107>.
 11. Thambugala D, Duguid S, Loewen E, et al. Genetic variation of six desaturase genes in flax and their impact on fatty acid composition. *Theor Appl Genet*. 2013;126(10):2627-2641. <https://doi.org/10.1007/s00122-013-2161-2>.
 12. Krasowska A, Dziadkowiec D, Polinceusz A, et al. Cloning of flax oleic fatty acid desaturase and its expression in yeast. *J Am Oil Chem Soc*. 2007;84(9):809-816. <https://doi.org/10.1007/s11746-007-1106-9>.
 13. Vrinten P, Hu Z, Munchinsky MA, et al. Two FAD3 desaturase genes control the level of linolenic acid in flax seed. *Plant Physiol*. 2005;139(1):79-87. <https://doi.org/10.1104/pp.105.064451>.
 14. Fofana B, Duguid S, Cloutier S. Cloning of fatty acid biosynthetic genes — ketoacyl CoA synthase, fatty acid elongase, stearoyl-ACP desaturase, and fatty acid desaturase and analysis of expression in the early developmental stages of flax (*Linum usitatissimum* L.) seeds. *Plant Sci*. 2004;166(6):1487-1496. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.01.025>.
 15. You FM, Li P, Kumar S, et al. Genome-wide identification and characterization of the gene families controlling fatty acid biosynthesis in flax (*Linum usitatissimum* L.). *J Proteomics Bioinform*. 2014;7(10):310-326. <https://doi.org/10.4172/jpb.1000334>.
 16. Пороховинова Е.А. Генетический контроль морфологических признаков проростков, плода и семян у льна (*Linum usitatissimum*) // Вавиловский журнал генетики и селекции. — 2012. — Т. 16. — № 4–2. — С. 936–947. [Porokhvinova EA. Genetic control of morphological characters of seedlings, bolls, and seed in flax (*Linum usitatissimum*). *Vavilov journal of genetics and breeding*. 2012;16(4-2):936-947. (In Russ.)]
 17. Пороховинова Е.А. Изучение наследования окраски и формы цветка и семян, а также ее связи с продолжительностью фазы всходы — цветение у льна (*Linum usitatissimum* L.) // Научно-технический бюллетень ВНИИР им. Н.И. Вавилова. — 2000. — № 239. — С. 56–58. [Porokhvinova EA. Izucheniye nasledovaniya okraski i formy tsvetka i semyan, a takzhe ee svyazi s prodolzhitel'nost'yu fazy vskhodysveteniye u l'na (*Linum usitatissimum* L.). *Nauchno-tekhnicheskii byulleten' VNIIR im. N.I. Vavilova*. 2000;(239):56-58. (In Russ.)]
 18. Брач Н.Б., Пороховинова Е.А. Метод сравнительного анализа результатов изучения количественных признаков образцов, выращенных в различные годы (метод приведенных средних) // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. — 2011. — Т. 167. — С. 36–40. [Brutch NB, Porokhvinova EA. Method of comparative analysis used to access the results of evaluating quantitative characters of plant accessions grown in different years (method of reduced average values). *Proceedings of applied botany, genetics and breeding*. 2011;167:36-40. (In Russ.)]

19. StatSoft, Inc. (2013) Electronic Statistics Textbook. Tulsa, OK: StatSoft. Available at: <http://www.statsoft.com/textbook/>. Accessed November 14, 2018.
20. Наследов А.Д. Математические методы психологического исследования. Анализ и интерпретация данных. — СПб.: Речь, 2012. — 392 с. [Nasledov AD. Matematicheskiye metody psikhologicheskogo issledovaniya. Analiz i interpretatsiya dannykh. St. Petersburg: Rech'; 2012. 392 p. (In Russ.)]
21. Ивантер Э.В., Коросов А.В. Введение в количественную биологию. — Петрозаводск: Изд-во Петрозаводского ун-та, 2003. — 203 с. [Ivanter EV, Korosov AV. Vvedeniye v kolichestvennyuyu biologiyu. Petrozavodsk: Izdatel'stvo Petrozavodskogo universiteta; 2003. 203 p. (In Russ.)]
22. Ростова Н.С. Корреляции: структура и изменчивость. — СПб.: Изд-во СПбГУ, 2002. — 307 с. [Rostova NS. Korrelyatsii: struktura i izmenchivost'. Saint Petersburg: Izdatel'stvo SPBGU; 2002. 307 p. (In Russ.)]
23. Злотина М.М., Киселева А.А., Потокина Е.К. Использование аллель-специфичных маркеров генов *Vrn* и *Ppd* для экспресс-диагностики фотопериодической чувствительности и потребности в яровизации мягкой пшеницы и ячменя: Методические указания. — СПб.: ВИР, 2012. — 29 с. [Zlotina MM, Kiseleva AA, Potokina EK. Ispol'zovaniye allel'-spetsifichnykh markerov genov *Vrn* i *Ppd* dlya ekspress-diyagnostiki fotoperiodicheskoy chuvstvitel'nosti i potrebnosti v yarovizatsii myagkoi pshenitsy i yachmenya. Metodicheskie ukazaniya. Saint Petersburg: VIR; 2012. 29 p. (In Russ.)]
24. Сокоорнова С.В., Гасич Е.Л., Бемова В.Д., Матвеева Т.В. Поиск и видовая идентификация патогенов природно-трансгенного вида *Linaria vulgaris* // Экологическая генетика. — 2018. — Т. 16. — № 1. — С. 27–34. [Sokornova SV, Gasich EL, Bemova VD, Matveeva TV. Characterization and identification of naturally transgenic species *Linaria vulgaris* pathogenic mycomycetes. *Ecological genetics*. 2018;16(2):27-34. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.17816/ecogen16127-34>.
25. Integrated DNA technologies. Available at: <https://eu.idtdna.com>. Accessed November 14, 2018.
26. Notredame C, Higgins DG, Heringa J. T-Coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol*. 2000;302(1):205-217. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4042>.
27. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*. 2016;33(7):1870-1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
28. Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M, the UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 2012;28(8):1166-1167. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>.

✉ Информация об авторах

Елизавета Александровна Пороховинова — канд. биол. наук, старший научный сотрудник, отдел ГР масличных и прядильных культур. ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР)», Санкт-Петербург. SPIN: 5033-3263. E-mail: e.porohovinova@mail.ru.

Татьяна Васильевна Шеленга — канд. биол. наук, старший научный сотрудник, отдел биохимии. ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР)», Санкт-Петербург. E-mail: tatianashelenga@yandex.ru.

Татьяна Валерьевна Матвеева — д-р биол. наук, профессор, кафедра генетики и биотехнологии. ФГБУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург. SPIN: 3877-6598. E-mail: radishlet@gmail.com.

Андрей Валерьевич Павлов — канд. с-х. наук, старший научный сотрудник, отдел ГР масличных и прядильных культур. ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР)», Санкт-Петербург. E-mail: avpavlov77@yandex.ru.

Елизавета Александровна Григорьева — магистрант, лаборатория мониторинга генетической эрозии растительных ресурсов. ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР)», Санкт-Петербург. E-mail: e.grigoreva@vir.nw.ru.

Нина Борисовна Броч — д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник, отдел ГР масличных и прядильных культур. ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР)», Санкт-Петербург. SPIN: 1753-4382. E-mail: n.brutch@vir.nw.ru.

✉ Information about the authors

Elizaveta A. Porokhovinova — PhD, Senior Researcher, Oil and Fibre Crops Department. Federal Research Centre the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia. SPIN: 5033-3263. E-mail: e.porohovinova@mail.ru.

Tatyana V. Shelenga — PhD, Leader Researcher, Department of Biochemistry and Molecular Biology. Federal Research Centre the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia. E-mail: tatianashelenga@yandex.ru.

Tatyana V. Matveeva — Doctor of science, Professor, Chair of Genetics and Biotechnology. Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia. SPIN: 3877-6598. E-mail: radishlet@gmail.com.

Andrey V. Pavlov — PhD, Senior Researcher, Oil and Fibre Crops Department. Federal Research Centre the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia. E-mail: avpavlov77@yandex.ru.

Elizaveta A. Grigorieva — Master Student, Laboratory of Monitoring Genetic Erosion. Federal Research Centre the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia. E-mail: e.grigoreva@vir.nw.ru.

Nina B. Brutch — Doctor of Science, Main Researcher, Oil and Fibre Crops Department. Federal Research Centre the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia. SPIN: 1753-4382. E-mail: n.brutch@vir.nw.ru.