

Прикладные проблемы белкового маркирования растений. Методологические аспекты

В.И. Авдеев, д.с.-х.н., профессор,
ФГБОУ ВО Оренбургский ГАУ

В настоящее время в число важнейших методов изучения высших растений прочно вошёл анализ состава белков семян. При этом более 50 лет назад в связи с бурным техническим прогрессом в области молекулярных биотехнологий в сортоведении, селекции, семеноводстве стали развивать метод белковых маркёров. Его суть состоит в изучении генов и генных систем путём анализа фенотипических сигналей, или маркёров, — электрофоретических компонентов спектров запасных белков семян [1–3 и др.]. В качестве арбитражного с 1983 г. метод белковых маркёров утверждён в ISTA — Международной ассоциации по семенному контролю [4].

Однако при всей технической разработанности метода белковых маркёров его применение сталкивается с рядом проблем, связанных с самими растениями. Это феномены экологической изменчивости и мономорфизма спектров запасных белков у многих генотипов (сортов, форм) и видов, сложности в установлении связи белков с морфобиологическими (внешними) признаками: урожайность, окраска и размеры плода, иммунитет и т.д. В значительной степени эти и другие проблемы обусловлены тем, что объектами изучения изменчивости с помощью белковых маркёров остаются немногие виды растений, поэтому феномены эти ранее были почти неизвестны в научной литературе. Особенно слабо исследованы в этом плане дикорастущие виды, гибриды в условиях природы и культуры. Поэтому задачей данной работы стало следующее: заострить внимание учёных и практиков на этих ключевых проблемах и указать на дальнейшие перспективы развития метода белковых маркёров в современном растениеводстве.

Типы изменчивости электрофоретических белковых спектров. Из известных типов изменчивости признаков можно для белковых спектров учитывать изменчивость по годам (хронографическую или погодичную), внутри особи (метамерную) и её отдельных клонов (клональную), у особей в одном году и в определённой фазе онтогенеза (индивидуальную изменчивость).

Погодичной (экологической) изменчивости спектров не уделяется должного внимания. Считают, что у одних и тех же генотипов по годам состав компонентов спектра неизменен [1] или малоизменчив [5], хотя и любые белки семян, в том числе запасные, составляют часть фенотипа. Правда, в условиях Ленинградской области у сортов озимой мягкой пшеницы эта изменчивость выявилась [6], что объяснили действием естественного отбора на биотипы, из которых чаще состоит сорт.

Но не всегда изменчивость проламинов злаков по годам можно объяснить отбором биотипов. В 2011–2015 гг. в условиях Оренбуржья (Приуралье) изучали глиадиновые спектры сортов озимой мягкой пшеницы. У изученных трёх сортов спектры состояли из одного биотипа, но изменения спектров были отмечены во все годы. В 2011–2014 гг. исследовали и спектры ячменя обыкновенного. У него спектры сортов содержали чаще всего два биотипа, однако каждый из них всегда изменялся. Изменчивость по годам компонентов сортов пшеницы составляла 15–35%, у ячменя — от 20 до 94%. У сортов злаков в холодный 2014 г. изменчивость выросла на 12–50% числа компонентов. Наименее изменчивыми в 2013 и 2014 гг. были спектры природных видов злаков: от 0% у неравноцветника кровельного до 32% у мортука пшеничного [6]. Но кроме названной выше изменчивости по числу компонентов важно выявлять её по компонентам-маркёрам ценных признаков. Так, ещё В.Г. Конарев [2] указывал, что глиадиновые компоненты $\alpha 1$ (кодируется хромосомой 6A) и $\omega 8_1 9_1$ (хромосомой 1D) дают соответственно упругость клейковины зерна и высокие хлебопекарные качества. Из тех же данных за 2011–2015 гг. очевидно, что у сортов мягкой пшеницы всегда сохраняются компоненты $\omega 8_1 9_1$, но часто отсутствует компонент $\alpha 1$ (в 2011 г. у всех сортов, 2013 г. — у Пионерская 32, Оренбургская 105). По данным Н.Л. Деевой [6], компонента $\alpha 1$ не было в спектрах у известного сорта озимой мягкой пшеницы Мироновская 808, у ряда её биотипов — и компонента $\omega 9_1$, у сорта Альбидум 114 — лишь компонента $\alpha 1$ и т.д. По нашим подсчётам, за различные годы у сорта Мироновская 808 (а он — молекулярный метчик в электрофоретических исследованиях сортов и видов злаков) в белковых спектрах по годам выпадали отдельно в общей сложности до девяти компонентов глиадинов — $\beta 3_1 5_1$, $\gamma 1 2_3$, $\omega 4_6 1_8 2_9 10_1$ [7].

Уже сообщалось, что факт погодичной изменчивости спектров обнаружен при изучении местных форм абрикоса Оренбуржья. При этом изменение состава компонентов даже среди устойчивых к гипертермии форм составило 20–35%, в том числе временно выпадали в 2010 г. 9–19% компонентов [8, 9]. Однако ещё большая изменчивость установлена в спектрах у вишни обыкновенной. В 2010 г. изучены четыре сорта этой вишни из Оренбуржья. В их спектрах выявились 36–38 компонентов. В благоприятный же 2016 г. подобные исследования были проведены на сорте Маяк. Если у него в 2010 г. на электрофореграмме было 37 компонентов, то в 2016 г. на тех же особях (кустах) этого сорта их стало 65 шт., т.е. изменчивость возросла в 2016 г. до 76%. По 65–68 компонентов было в 2016 г. и у остальных 30 сортов и форм вишни [10].

Среди специалистов есть мнение, что у ксеногамов (абрикос, вишня и др.) может изменяться состав спектров отдельных семян за счёт действия различных опылителей. Речь идёт о метамерной (в пределах особи) и клоновой изменчивости признаков, называемых ещё модификационной и паратической изменчивостью. Но за все годы исследований на видах и сортах самых различных растений не обнаружено метамерной изменчивости белковых спектров семян, т.е. их состав формируется только по материнской линии [3]. Говоря о клоновой изменчивости, приведём следующие примеры. В 2010 г. изучали спектры семян культивируемых отпрысков тёрна (сливы колючей), они были неразличимы. Не было метамерной и клоновой изменчивости по спектрам и у 26 сортов и форм вишни обыкновенной, а также у культивируемых отпрысков местной дикой вишни кустарниковой. При этом изучали одни и те же сорта, произрастающие на орошаемых участках и на богарных. Добавим, что за все годы были проанализированы спектры более чем 50 видов злаков из различных триб, в пределах одной особи (колоса) и даже отдельных микропопуляций белковые спектры особей не различались [3, 10 и др.].

Основная часть научных публикаций по изменчивости спектров растений освещает индивидуальную (генотипическую) изменчивость. Это и понятно, так как экологической изменчивости спектров белков почти не придавали значения.

По имеющимся данным [11] очевидно следующее. Между сортами бобовых часто имеются различия по компонентам спектра: они больше у гороха, вики, бобов, менее всего — у люпина. Исключительное разнообразие спектров сортов и их биотипов установлено у бобовых трав — клевера, люцерны, донника. Однако у сои существует однообразие по спектрам не только у сортов, но даже и у видов. Поэтому её используют в работах как молекулярный метчик. Нужно заметить, что сорта разных видов выглядят однообразнее по спектрам, если не учитывать различия в интенсивности компонентов, которые могут возникать по техническим причинам. Тем более нельзя слабоинтенсивные компоненты принимать за отсутствующие компоненты. Иначе полиморфизм спектров, выявляемый у растений, оказывается завышенным не только по сортам, но и между биотипами одного сорта. По тем же данным, полиморфизм белковых спектров сортов бобовых обусловлен наличием 2–10 биотипов. Но есть сорта гороха и сои, которые представлены только одним спектром (т.е. они мономорфные). Отметим, что у бобовых видов полиморфизм спектров не связан со способом опыления. Так, к самоопылителям относятся как горох, у которого отмечен максимальный полиморфизм (до 10 спектров в сорте), так и соя. Очевидно, что это разнообразие сортов-самоопылителей объясняется мутациями, так что возникающие так называемые

«сорта-линии» самоопылителей состоят из смеси генотипов [12]. Этот вывод очень важен, ибо на таких «чистых линиях» строилась теория и практика селекции (Г. Мендель, В. Иогансен и др.).

У сортов злаков полиморфизм спектров хорошо связан с возрастом сорта и способом опыления. Так, у стародавних сортов озимой пшеницы в сортообразцах находят 1–30 биотипов (обычно 3–9 шт.), а у ржи, перекрытноопыляющегося растения, — до 50 и даже более. У природных видов злаков из трибы мятликовых, как ежа сборная, плевел пастбищный, овсяница луговая, индивидуальных может быть 5–51 тип спектра, их более всего у ежи, менее — у плевела. У дикорастущих видов пшеницы — беотийской, Урарту, кульгенной однозернянки — белковых типов спектра бывает до 10 шт., как и у видов эгилопса [6, 11]. В 2013 г. изучены спектры бело-, красно- и черноколосых особей у пшеницы беотийской из Крыма (близ г. Севастополя). По окраске колоса особи слабо различались по спектрам, будучи практически идентичными в α -зоне проламинов. Что же касается сортов пшеницы, ячменя, то в каждом году исследований, выполненных в Оренбуржье, они достаточно хорошо различались по спектрам [3, 7].

В 2005 г. на востоке Оренбуржья (г. Орск, пгт Энергетик) собраны семена и по спектрам изучены 95 сеянцевых форм местного абрикоса. Среди них выделены формы, разнообразные по признакам. Из их числа определены 44 типа спектра, по которым можно идентифицировать формы, сильно различающиеся по признакам (окраска, форма плода и т.д.). Каждая из форм всегда выделялась хотя бы одним-двумя компонентами, но сеянцы чаще отличались по их интенсивности, что не является надёжным признаком. Эти различия больше отмечают в зоне кислых легиуминоподобных (КЛГ), но изредка в зоне вицилиподобных глобулинов (ВГ). Всего лишь по 1–4 типа спектра найдены среди местных форм из Северного Кавказа (Дагестан, Северная Осетия-Алания), севера Ростовской области России, Центрального Таджикистана, Западного Туркменистана, близки между собой стародавние и молодые, известные сорта из Средней Азии, Китая, Европы [3].

Выше было сказано об изменчивости спектров вишни. В аномальный 2010 г. при числе оставшихся компонентов 36–38 шт. сорта различались на 2,7–5,6% и лишь в зоне КЛГ. В благоприятный 2016 г. компонентов стало уже 65–68 шт., различия были на 1,5–7,7% (больше у очень нестабильного сорта Маяк) и только лишь в зоне ВГ. Если сопоставить данные по годам [3, 10], оказалось, что в засушливый и жаркий 2010 г. (гипертермия) у вишни выпадают компоненты всех зон спектра, в т.ч. из зоны низкомолекулярных основных легиуминоподобных глобулинов (ОЛГ).

В отношении других родов семейства розаных отметим следующее. В разных зонах спектра

имеется значительная изменчивость особей видов миндаля, сливы, микровишни, луизеании, однако она минимальна у видов яблони, груши, боярышника. У миндаля низкого выявлена повышенная изменчивость в условиях г. Оренбурга, нежели у форм, произрастающих в природе [3].

Изменчивость спектров наблюдается и при интродукции видов в другие условия обитания. В 1989 г. в Оренбург семенами интродуцирована луизеания вязолистная. Семена собраны в субтропической части горного Таджикистана. Позднее у этого же вида получено в Оренбурге второе поколение (M_2), у которого изучили состав спектров в сравнении с исходными таджикистанскими особями. У интродуцентов выпало 30% прежних компонентов, выпадения были во всех зонах электрограммы, но в тех же зонах появились 11–15% новых компонентов, до этого неизвестных на родине, в Таджикистане [3].

Мономорфизм белковых спектров. Уже полвека назад установлено, что реальным природным явлением служит не только генетический полиморфизм, но и мономорфизм признаков у организмов [13]. Частным случаем его является образование у гибридов белковых спектров, не отличающихся от одного из родителей (обычно матери), хотя нередки случаи, когда спектры гибрида суммируют компоненты обоих родителей [14]. С 1983 г. во ВНИИР им. Н.И. Вавилова ведётся изучение белковых спектров видов и сортов сои. Среди шести видов, представленных, как считали, мономорфными спектрами [11], к ним можно отнести спектры только сои уссурийской и большой, родом из Дальнего Востока и Восточной Азии. Судя по спектрам, данные виды являются очень близкими, различаясь только интенсивностью отдельных компонентов.

В наших работах на юго-западе Туркменистана (это север Передней Азии) первые примеры мономорфизма обнаружены при исследовании в 1989 г. спектров яблони туркменов и двух видов боярышника — понтийского, Никитина. Однако во всех случаях, невзирая на сильные различия по признакам (особенно у яблони), по запасным белкам-глобулинам семян был получен только один тип спектра. То же самое отмечено и у лоха узколистного, дико растущего в Таджикистане [3].

В 2005 г. изучали белковые спектры семян у 10 сортов винограда винного, произрастающего в коллекциях Оренбурга. Сорта эти различного происхождения, например сорт Августин (он из Болгарии), сорт Алма-Ата (с юга Казахстана), размноженные вегетативно. Однако по спектрам сорта не различались. Один тип спектра также имели два гибрида винограда амурского с виноградом винным, т.е. у них доминировал спектр первого вида, матери [15]. В 2017 г. изучили 20 таких гибридов винограда, выведенных в Оренбурге, при этом в качестве отцов были различные сорта винограда винного. Спектры также оказались

мономорфными, наследуясь по материнскому типу, не отличимыми от форм винограда амурского, завезённых и выращиваемых в Оренбурге.

В условиях культуры (Крым, г. Ялта) в 2012 г. были собраны семена, а в Оренбурге изучен состав белковых спектров у 10 сортов персика обыкновенного, имевших происхождение из разных стран Евразии. Спектры мономорфные, кроме одного сорта, имеющего один компонент от миндаля обыкновенного, близкого к персику [3]. В 2017 г. были получены мономорфные спектры сеянцев магалебки (родственна сливе, абрикосу и др., но не вишне), растущих в Оренбурге.

В 2011–2012 гг. изучали спектры проламинов (кафеинов) культивируемых и сорных оренбургских форм проса. Они резко различались по форме соцветия (метёлки), окраске семян (зерновок), спектры были мономорфными [7]. В 2014 г. анализировали спектры четырёх сортов овса посевного, гексаплоидного вида, выращиваемого в Оренбуржье. Они также были идентичными [3]. Вообще среди видов овса с разным кариотипом, произрастающих в различных странах Евразии и даже на разных континентах (Евразия, Африка), отмечено много образцов (особей) из местных популяций с однотипными спектрами авенина [16].

В 2012 г. исследовано потомство в F_1 , полученное в Крыму от гибридизации персика обыкновенного с миндалём обыкновенным, а также потомство F_1 сливы вишневидной (алычи), которая скрещена с луизеанией вязолистной. У первых выявлялись только компоненты персика или персика с редким участием миндаля, у вторых — компоненты алычи и луизеании. Также изучали спектры гибрида в F_1 , спонтанно возникшего на Западном Памире (Таджикистан) от скрещивания луизеании с микровишней войлочной, у гибрида отмечено почти равное участие компонентов обоих родителей. Кроме того, во всех спектрах гибридов, где не было обнаружено доминирования какого-либо родителя, всегда появлялись новые компоненты, которых до этого не было как у отца, так и у матери [3].

Проблема белкового маркирования внешних признаков. Идентификация (узнавание) культивируемых сортов и форм растений по белковым маркерам остаётся важнейшей задачей прикладной науки. По белковым признакам также можно выявить так называемую «скрытую генетическую природу растений», т.е. определить потенциал генетической изменчивости, не узнаваемый по внешним признакам, оценить уровень сортовой чистоты, что важно в деле семеноводства [1, 2, 4 и др.]. Однако установление связи состава электрофоретических спектров белков семян со многими внешними признаками — большая редкость. Следуя представлениям Ю.П. Алтухова [13], белковые спектры семян больше связаны не с внешними признаками, а отражают сложившиеся у растений экологические адаптации [3].

Но в наших исследованиях по абрикосу удалось выявить белковые маркёры ряда внешних признаков. Об этом сообщалось ранее [3, 8, 9 и др.]. Так, выявлены компоненты электрофореграммы 47 из зоны КЛГ, связанный с выпреванием форм; 81 (в комплексе с ним — компоненты 86, 84) из зоны ОЛГ, обеспечивающие зимостойкость (адаптацию к гипотермии); группа 5, 7, 12 (ВГ), 35, 59 (КЛГ) и 81 (адаптация к гипертермии); компонент 82 (ОЛГ) сильной интенсивности на электрофореграмме, связанный с яркой покровной окраской плода.

Метод белковых маркёров был показателен при изучении изменчивости признаков природных популяций миндаля из Туркмено-Хорасанских гор. Здесь из ксерофитных обитают два вида — миндали арабский и туркменский. У первого на поверхности эндокарпия («косточки») плода на фоне сплошной светло-коричневой зумеланической окраски есть множество буроватых («оржавленных») меланических пятен. У второго вида окраска сплошная, от светло-коричневой до буроватой, в т.ч. ржаво-коричневая, однако пятен нет. В научной литературе подобный признак называют феном. В Центральном Копетдаге на контакте этих двух видов найдены популяции, где 19% особей первого не имеют характерных пятен, в популяциях второго 3–4% особей выделяются пятнистостью эндокарпия. Налицо существует интрогрессия признаков между видами [17]. Выявлено, что пятнистая окраска косточки миндаля арабского обусловлена компонентами 89 (ОЛГ), сплошная без пятен (размытая) окраска — компонентами 88 и (или) 90 (ОЛГ) от миндаля туркменского [3]. Наличие фенов по меланической окраске органов часто в живом мире. В Оренбуржье у копеечника крупноцветкового среди особей с обычной коричневой (зумеланической) окраской семян есть особи с жёлтой (феомеланической) окраской, на её фоне — коричневые пятна. Жёлтая окраска маркируется компонентами 65, 74, 77 (КЛГ), пятнистая же — 98 (ОЛГ) [3].

Главной задачей статьи было обратить самое пристальное внимание на фактические данные, которые не согласуются с принятыми в мировой науке представлениями. На самом деле белковые маркёры, являясь фенотипическим признаком, подвергаются значительной погодичной экологической изменчивости. Это даёт на практике нестабильность по годам электрофоретических спектров запасных белков семян, массово применяемых для идентификации отдельных генотипов. Но эта нестабильность в экстремальные годы (как при гипертермии у абрикоса в культуре) выявляет белковые маркёры адаптации к этому негативному фактору. При интродукции также имеет место нестабильность спектров (как это отмечено у луизеании вязолистной), ибо тогда растения попадают в иную среду обитания. Однако на изученных более чем 100 видах двудольных и однодольных растений

не выявлено метамерной и клоновой изменчивости спектров запасных белков семян. Эти спектры формируются по материнскому типу.

Итак, принятое мнение о полной независимости индивидуального состава белковых маркёров от условий внешней среды уже неприемлемо в науке и на практике. Этого явного факта нельзя не замечать. Возникло оно в то время, когда применяли первые, несовершенные, методы разделения белков электрофорезом. Позже, не желая менять воззрения и говоря словами известного генетика М.Д. Голубовского, это стало «семейной тайной», но уже прикладных молекулярных биологов (этой же «тайной» являются результаты ДНК-маркирования, в будущем она — источник исков и недоразумений в обществе). Фактически же при белковой идентификации генотипов растений можно использовать только экологически стабильную часть спектров. Кроме того, идентификацию генотипов и видов затрудняет известный и нередкий у растений мономорфизм белковых спектров. Поэтому метод белковых маркёров нужно обязательно сочетать с обычными методами фенотипического анализа растений.

Литература

1. Созинов А.А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции. М.: Наука, 1985. 272 с.
2. Конарев В.Г. Морфогенез и молекулярно-биологический анализ растений. СПб.: ВИР, 1999. 376 с.
3. Авдеев В.И. Изменчивость и биосистематика растений. Оренбург: Издат. центр ОГАУ, 2016. 316 с.
4. Конарев А.В. Использование молекулярных маркёров в решении проблем генетических ресурсов и селекции // Аграрная Россия. 2006. № 6. С. 4–22.
5. Конарев В.Г. Белки растений как генетические маркёры. М.: Колос, 1983. 320 с.
6. Деева Н.Л. Внутрисортный полиморфизм глина и фенотипическое разнообразие у озимой мягкой пшеницы // Сб. науч. тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. Л.: ВИР, 1987. Т. 114. С. 24–34.
7. Авдеев В.И., Саудабаева А.Ж., Красавин В.Д. Состав проламинов у ряда культивируемых злаков Оренбуржья // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2013. № 5 (43). С. 25–29.
8. Авдеев В.И. Итоги изучения местного абрикоса в Оренбуржье за 25 лет // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2017. № 6 (68). С. 59–63.
9. Авдеев В.И., Саудабаева А.Ж. Белковые маркёры гипертермоадаптации культиваров *Armeniaca* Scop. в условиях Приуралья // Вестник Костанайского госпедуниверситета. 2017. № 2 (46). С. 67–70.
10. Авдеев В.И., Сулимова М.А. Изменчивость белковых маркёров видов вишни (*Cerasus* Mill.) в Оренбуржье (Приуралье) // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2017. № 6 (68). С. 222–225.
11. Теоретические основы селекции / под ред. акад. В.Г. Конарева // Т. 1. Молекулярно-биологические аспекты прикладной ботаники, генетики и селекции. М.: Колос, 1993. 448 с.
12. Авдеев В.И. Генетика растений с основами селекции. Оренбург: Издат. центр ОГАУ, 2002. 228 с.
13. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. М.: Наука, 1983. 280 с.
14. Грант В. Видообразование у растений. М.: Мир, 1984. 528 с.
15. Авдеев В.И. Анализ очагов происхождения культивируемых растений и их предки в Евразии. Оренбург: Издат. центр ОГАУ, 2017. 228 с.
16. Лоскутов И.Г., Губарева Н.К., Алпатьева Н.В. Полиморфизм авенина в изучении дикорастущих видов овса // Аграрная Россия. 2005. № 2. С. 43–48.
17. Авдеев В.И. Плодовые растения Средней Азии, их происхождение, классификация, исходный материал для селекции: дисс. ... докт. с.-х. наук. СПб.: ВНИИР им. Н.И. Вавилова, 1997. 326 с.