

## Прикладные проблемы белкового маркирования растений. Аспекты биохимии, биометрии

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

Уже больше полувека у видов цветковых растений интенсивно исследуют фракционный состав белков и качество ферментов, затем электрофоретические спектры запасных белков семян. Среди учёных России основы таких работ заложены известными в мире школами А.В. Благовещенского и В.Г. Конарева [1–4 и др.]. Заметим, что изучение состава белков, качества ферментов выполнено в рамках наук филогения и систематика (теория эволюции), объектами же служили обычные особи разных видов растений. Кроме того, поскольку эти исследования оценивают в конечном счёте степень биоадаптации, и помня крылатое выражение Н.И. Вавилова, что «селекция есть эволюция, направляемая волей человека», то результаты изучения состава белков, качества ферментов могут быть полностью использованы в прикладных целях. Возможности широкого применения методов биохимии, молекулярной биологии обусловлены рядом следующих причин.

Во-первых, к концу XX века накоплен солидный фактический материал по содержанию в растениях различных веществ, прежде всего белков. Во-вторых, было понимание, что в основе жизненных процессов при формировании тканей, органов, облика растений лежат превращения химических веществ. В-третьих, биохимики пытались создать свою концепцию эволюции, отличную от ботаников. Но при этом они очень слабо использовали математико-статистический аппарат биометрии, что неизбежно приводило к недоучёту экологической изменчивости количественных признаков.

**Задачи** настоящей работы – выявить названные недостатки, показать возможность использования в прикладных целях данных и показателей, полученных в процессе становления эволюционной биохимии растений.

Привлечение белков у растений основано на ряде их важных преимуществ: максимальная их

близость к генам в ходе биосинтеза, уникальность и генная специфичность, роль белков как самого первичного продукта жизнедеятельности генетических систем, генетическая полиморфность многих (особенно запасных в семенах) белков. Кроме того, основанием для исследования белковых комплексов семян служит то, что в семени закладывается и развивается будущее растение с его специфическим обменом, белками, ферментами, нуклеиновыми кислотами, тканями [1]. Использование запасных белков семени связано также с тем, что они локализованы в однородных тканях – эндосперме злаков, семядолях двудольных растений. У них при семяобразовании сразу же экспрессируются гены ферментов метаболических путей синтеза белка, гены синтеза самих белков, а на последних стадиях – синтеза белков-глутелинов. В семени, уже начиная с его прорастания, функционирует ряд генов, сохраняющих свою экспрессию до конца онтогенеза, быстро расходуются запасные белки, позднее экспрессируются и другие гены, обеспечивающие создание биоструктуры и биохимического состава взрослого растения [3–5 и др.]. Из этих же сведений известно, что белки семян кодируются двумя десятками полиаллельных генов, которые локализованы лишь в нескольких хромосомах, что создаёт проблему «достаточного представительства» этих генов и белков не только для исследований по биохимической эволюции, но и для идентификации различных генотипов (сортов и форм). Этим и близким к ним проблемам посвящены научные совещания, монографии и т.д. Всё это создаёт впечатление разрешения многих вопросов. Но молекулярная биология, не говоря о генетике, не стояли на месте, а в самой биохимии растений неизбежно выявились рассмотренные ниже противоречия и недостатки.

**Фракционный состав белков.** Анализ собранных данных [1, 2, 6 и др.] свидетельствует, что по сравнению с двудольными растениями у злаков в

семенах в среднем снижены доли белков: альбуминов в 2,5–3 раза, глобулинов – в 3–4 раза, однако в 1,5–2 раза выше доля глютелинов, не говоря уже о наличии у злаков белков-проламинов. Даже если с ними сопоставлять семейства магнолиевых и анноновых (считающихся очень древними), то у злаков снижены в 2,5–3 раза доли альбуминов и глобулинов, как и выше в 2 раза доля глютелинов. Кстати, злаки – это не единственные таксоны однодольных, обладающих проламинами. В семенах родов лилейных содержится 1,0–6,4% проламинов (т.е. их в 5–7 раз меньше, чем у злаков), значительная доля альбуминов (23–42%), глютелинов в среднем в 1,5–2 раза меньше, чем у злаков, или их столько же, как у двудольных [6]. Но тогда лилейные биохимически стоят между двудольными растениями и злаками, ближе к первым.

А.В. Благовещенский [7] посчитал, что альбумины, имея в своём составе множество протеолитических ферментов, резко повышают показатели качества этих ферментов (это  $\mu$  – коэффициент Аррениуса и  $pN_{\text{акт}}$ ). Однако у злаков все эти показатели при резком падении долей альбуминов, глобулинов в среднем не изменились по сравнению с самыми древними двудольными растениями. Это связано и с тем, что показатели получены в опытах [7], где значительно варьируют их параметры (условия года, возраст растения и т.д.), так что различия средних значений всех показателей на 10–20% не могут считаться достоверными. К тому же для оценки различий используют уровень достоверности  $P=0,99$  и даже выше, но тогда недостоверными могут быть различия до 25–30%. Приведём примеры.

При изучении белков в семенах маша (бобовые) их значения двух растущих рядом образцов отличались в 2 раза. Два отборных местных образца из Европы (бывшие Югославия и ФРГ) бородачѣвника алеппского (злак) различались по белкам от 24% (глютелины) до 4,1 раз (проламины). Из тех же злаков отличия между образцами у сорго двуцветного из СССР и ФРГ были от 4 (глобулины) до 17% (альбумины), а между образцами проса волосовидного из Западной Европы – от 4 (глобулины) до 25% (проламины) [8]. Эти данные отражают изменчивость генотипов (образцов) по регионам мира, их нужно всегда принимать во внимание, давая для характеристики растений известные в науке показатели ( $pN_{\text{акт}}$  и др.).

В связи с изложенным выше возникают следующие вопросы: за счёт каких фракций белка у злаков, богатых глютелинами, появилась фракция проламинов, и почему в сравнении с двудольными резкое снижение доли альбуминов у злаков не привело к ожидаемому снижению качества их ферментов?

Сейчас сведений о составе и биохимии белков стало намного больше [3, 9–11 и мн. др.]. Глютелины – это самые высокоагрегированные белки с огромной молекулярной массой, с присущими

макромолекулам различными химическими связями. Молекулы нативного глютелина имеют массу от 50–100 до нескольких тыс. килодальтон (кДа), огромную рабочую поверхность. Глютелины по составу ближе к проламинам, однако включают молекулы альбумина, глобулина. Так что глютелины – это не просто «архаичные, древние белки» [7], а исходные и очень важные в эволюции молекулы. Альбумины различны по массе, но в целом их молекулы на порядок меньше. Среди них много ферментов-протеиназ, массой 30–67 кДа. Из глобулинов более изучены белки двудольных растений. Так, нативные молекулы легумина обладают массой 360–400, конвицилина – 280, а вицилина – 140–225 кДа. Самые малые молекулы – проламинов, 11,4–145 кДа, но среди них есть и низкомолекулярные глютелины (НМГ), их масса – от 104 до 125 кДа. Они, как показано ниже, играют важную роль в культивируемой эволюции злаков.

Было предположение [12], что синтез проламинов связан с одновременным падением доли неэкстрагируемых белков (остатка, или склеропротеинов) у семян. Но строгих расчётов для этого не проводили. Выше сказано, что глютелины очень близки к проламинам, поэтому есть основания полагать, что древние глютелины и стали источником синтеза молодых проламинов. Взяв имеющиеся данные [2, 12] по видам злаков с наибольшей выборкой по числу объектов (8 или 9 видов), были исчислены коэффициенты ранговой корреляции ( $r$ ) белковых фракций. Так, для видов ковра, овсяницы получены значения  $r$  между глютелинами и проламинами от -0,6 до -1,0, т.е. при падении глютелинов происходит накопление проламинов. В отношении других белков (альбумины, глобулины, остатка) достоверной связи нет. Сложнее с изучением  $r$  у просовых. У видов шетинника  $r = -0,6$ , у сорго  $r$  был недостоверным. То, что фракции белков легко взаимопревращаемы, показывает целый ряд данных, в т.ч. в монографии А.В. Благовещенского [7, 12 и др.].

Говоря о качестве ферментов, можно не всегда выявить постулируемую [7] достоверную связь с долей альбуминов. Дело опять-таки в том, что эти показатели экологически сильно варьируют. В этом можно убедиться, сопоставив в семенах значения  $pN_{\text{акт}}$  доли белков, азота у целого ряда видов лютиковых, розанных. Из имеющихся на сегодня данных можно заключить, что для поддержания качества ферментов важную роль играет фракция глютелинов. Для них у злаков  $r$  выше, чем для других белков, в 1,6 раза, а для двудольных, богатых глобулинами,  $r$  по глютелинам и глобулинам приближается к 1,0 [1, 7].

**Белковые маркѣры двудольных растений.** Наиболее широкое использование белков семян в систематике цветковых растений начато с 70-х гг. XX в. Тогда же стали применять ещё не очень совершенный метод электрофореза запасных белков,

а до этого — очень известный иммунохимический метод. Позже с 1990 г. на большом наборе видов растений стали активнее использовать метод электрофореза белков, прежде всего массовых глобулинов, проламинов, который позволял маркировать практически любые генные системы [4, 9, 11–13]. В результате выявлено, что как эволюционно молодые виды, так и новые селекционные особи содержат на электрофореграммах гораздо больше компонентов, чем старые. Это подтверждает данные С. Оно [14], что в процессе биоэволюции идёт неуклонный рост массы ДНК, т.е. усложнение генома. Кроме того, опять подтверждено, что у цветковых растений нет прямой связи показателей качества ферментов с долей альбуминов. Для первого вывода приведём пример из практики становления в Оренбуржье культуры абрикоса [15]. Так, местные формы, росшие 25 лет назад, содержали на электрофореграммах 44–46 компонентов, довольно однотипных. Позднее в процессе бурной культурной эволюции число компонентов увеличилось более чем вдвое.

**Белки злаков.** Выше приведён ряд сведений по биохимии злаков. Самые важные из них — у злаков по сравнению с двудольными высока доля глютелинов, но снижены доли альбуминов и глобулинов. Как у двудольных, у злаков наблюдается значительное экологическое варьирование количественных признаков и показателей. Это были средние значения, по трибам же злаки довольно сильно различаются.

Изучение биохимии злаков с середины 60-х гг. XX в. велось школой А.В. Благовещенского. Объектами были 140 видов, входившие в 20 родов злаков разного систематического положения, в основном у них определяли содержание в семенах азота, что на тот период и позднее является важным показателем. Так, наименьшая доля азота (1,7%) оказалась у видов полевички (триба свинороевых), максимальная (4,6%) — у трясунки (мятликовых). У других родов изучали также состав белков семян, качество ферментов. У видов овса (овсовых) оказалось очень мало альбуминов (1%) и глютелинов (5%), немного проламинов (10–15%), очень много глобулинов (80%), а значение  $pN_{\text{акт}} = 15,8$ , т.е. высокое у злаков (но среднее для видов цветковых). Тогда как у ржи (пшеницевых) глютелинов и проламинов было в среднем по 40%, альбуминов и глобулинов — по 5–10%, но значения  $pN_{\text{акт}}$  те же [7]. Из этих данных видно, что доля альбуминов и качество ферментов не имеют прямой связи. Обращает внимание и уже названный выше факт, что все эти показатели сильно варьируют по местам выращивания.

С 70-х гг. XX в. изучение злаков этой школой сильно расширилось [2, 6 и др.], а в школе В.Г. Конарева были начаты исследования по иммунохимическому и электрофоретическому анализу злаков, больше триб пшеницевых, мятликовых,

рисовых, растущих в условиях природы и культуры, в школе А.А. Созинова — по электрофоретическому изучению сортов пшеницы, ячменя [3, 4, 9, 11]. Интерес к показателям качества ферментов в это время стал заметно падать.

Как считают, проламины отражают специализацию злаков, больше всего накапливаясь в семенах таксонов, растущих в холодных и умеренных зонах или же в горах тропиков, где условия нетропические. Проламинов мало (0,7–3,3% от белкового азота) в семенах видов пальм, из злаков (0,5–7,0%) — в трибах рисовых, бамбуковых, многих родов просовых, кроме самого проса, и, как особенность, у ковылевых (включая род ковыль). Кстати, ковыль является главенствующим по доле глютелинов (84–91%), проламинов — в среднем 1,8%, глобулинов — 4,4%, альбуминов — 2,0%. Из важнейших аминокислот у ковыля мало глютаминовой кислоты (ГК, 20,8%), пролина (4,6%), однако высоки доли метионина, валина, лейцина [2]. То, что у ковыля сохраняется рекордное количество глютелинов, говорит об их очень важной роли в эволюции злаков. Например, у рода овёс немного больше ГК (22,6%), метионина (2,9%), пролина (6,1%), лизина (3,8%), но значительно меньше (7,3%) лейцина, доли других вышеназванных аминокислот близки. Если взять для сравнения род рожь, то у него, представителя довольно древних пшеницевых, чем у ковыля, в 1,5–2,5 раза больше ГК, пролина, меньше на 10–40% других показателей [6]. По этим же данным в спирторастворимой фракции белка (типа проламинов) у карифоидных видов пальм, сравниваемых с ковылём, близки доли ГК, на 10–30% выше доли пролина и валина, на 70% — лизина, но на 40–50% ниже доли метионина и лейцина.

Работы по злакам в рамках других названных выше школ молекулярных биологов были направлены на наиболее подробное изучение отдельных триб, прежде пшеницевых, имеющих большое практическое значение. Отметим, что в школе В.Г. Конарева примерно до 1997 г. первый по времени и значительный упор делали на иммунохимические исследования белков злаков, изучая родство их видов как родоначальников сортов. Затем перешли на электрофоретические методы, выделяя белковые маркёры признаков. Полученные тогда результаты и возникшие проблемы достаточно освещены в ряде работ [3, 4, 9, 11, 13, 16 и др.]. Можно кратко сказать, что решались проблемы происхождения сортов пшеницы, других злаков, их генетического родства, что практически позволяет выполнить синтез новых сортов путём гибридизации, а в будущем — за счёт биотехнологии.

Известно [11 и др.], что в верхней  $\omega$ -зоне электрофореграммы злаков всегда расположены высокомолекулярные белки, в составе которых есть так называемая высокомолекулярная фракция глютелина (ВМГ), а в нижней же её зоне нахо-

дятся низкомолекулярные фракции проламинов с низкомолекулярным глютелином [НМГ]. В настоящее время известно, что во фракцию НМГ пшеницы входят, в частности, белки  $\alpha 1$ , кодируемые хромосомой 6A, а во фракцию ВМГ – белки  $\omega 8_1 \rho_1$ , кодируемые хромосомой 1D. Эти белковые компоненты обеспечивают соответственно упругость клейковины зерна (семени) и высокие хлебопекарные качества. Также установлено, что представители пшеницевых (как, например, пырей) имеют подобную же организацию проламинов [4, 9 и др.]. Ранее уже отмечалось, что наличие компонентов  $\alpha 1$  и  $\alpha 6_1$ ,  $\omega 8_1 \rho_1$  и др. обнаружено у многих злаков, не только у пшеницевых [16]. Всё это говорит о генетической близости злаков, общности их эволюции. Наличие же маркёров  $\omega 8_1 \rho_1$ , являющихся частью глютелинов, говорит о древности злаков. Кроме того, в спектрах целого ряда видов злаков есть так называемые быстрые полипептиды (БП), образующие свою зону, что ещё ниже  $\alpha$ -зоны. БП-зона содержится и у других изученных злаков, очевидно, играя важную роль в процессе адаптации этих растений [3, 9, 13 и др.].

В заключение отметим следующее. Обычно виды, формы, сорта растений характеризовали по показателям небелковых химических веществ, т.е. вторичного синтеза (содержание витамина С, каротина, масла и т.д.). Практика показывает, что их содержание в органах сильно колеблется в зависимости от условий среды. Поэтому с помощью этих показателей трудно выявить роль генов в развитии того или иного признака. Из них А.В. Благовещенский [1, 17 и др.] посчитал наиболее стабильным долю общего азота в семенах. Этот автор ещё в первой половине XX века и особенно позднее указал, что адаптацию растений лучше характеризовать с помощью показателей качества белков-ферментов ( $\mu$ ,  $pN_{\text{акт}}$ ). Как выше отмечено, использование белков, особенно запасных в семенах, затем дало большой стимул для биохимического и молекулярно-биологического исследования видов и сортов растений, познания их генетической структуры.

Но на этом поприще, естественно, возникли новые научные проблемы. В данной статье обращено внимание на то, что биохимики в своих выводах были не совсем правы, ибо не опирались на биометрические методы анализа полученных данных. В частности, сомнительно, что показатели качества ферментов связаны с функционированием белков-альбуминов, а не глютелинов. Во всяком случае, это не подтверждается на ряде таксонов злаков. Необходимых статистических данных для своих выводов у биохимиков пока что явно недостаточно.

В статье для характеристики видов не даны эволюционные показатели, как-то подвинутости, или молодости таксонов ( $A_e$ ), их специализации ( $I_s$ ) и т.д. [1, 2], хотя они основаны на сопоставлении фракций белков в семенах. Эти показатели расчётные, но не все они, судя по отзывам [2 и др.], являются безупречными.

### Литература

1. Благовещенский А.В., Александрова Е.Г. Биохимические основы филогении высших растений. М.: Наука, 1974. 106 с.
2. Биохимические аспекты филогении высших растений. М.: Наука, 1981. 126 с.
3. Конарев В.Г. Белки пшеницы. М.: Колос, 1980. 352 с.
4. Конарев В.Г. Морфогенез и молекулярно-биологический анализ растений. СПб.: ВИР, 1999. 376 с.
5. Лутова Л.А. Генетика развития растений / Л.А. Лутова, Н.А. Проворов, О.Н. Тиходеев [и др.]. СПб.: Наука, 2000. 539 с.
6. Филогения и систематика растений. М.: Наука, 1991. 148 с.
7. Благовещенский А.В. Биохимическая эволюция цветковых растений. М.: Наука, 1966. 328 с.
8. Проблемы филогении высших растений. М.: Наука, 1974. 196 с.
9. Теоретические основы селекции / под ред. акад. В.Г. Конарева // Т. 1. Молекулярно-биологические аспекты прикладной ботаники, генетики и селекции. М.: Колос, 1993. 448 с.
10. Вакар А.Б. Белковый комплекс клейковины // Растительные белки и их биосинтез. М.: Наука, 1975. С. 31–38.
11. Созинов А.А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции. М.: Наука, 1985. 272 с.
12. Биохимия и филогения растений. М.: Наука, 1972. 240 с.
13. Авдеев В.И. Изменчивость и биосистематика растений. Оренбург: Издат. центр ОГАУ, 2016. 316 с.
14. Оно С. Генетические механизмы прогрессивной эволюции. М.: Мир, 1973. 228 с.
15. Авдеев В.И. Запасные белки семян как молекулярные маркёры (на примере культивируемого абрикоса Оренбуржья) // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2016. № 6 (62). С. 51–55.
16. Авдеев В.И. К проблеме происхождения видов пшеницы (*Triticum L.*) // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2018. № 2 (70). С. 53–56.
17. Эволюционная биохимия растений. М.: Наука, 1964. 144 с.