

ИЗОФЕРМЕНТНЫЕ МАРКЕРЫ В ИССЛЕДОВАНИИ ИЗМЕНЧИВОСТИ СОРТОВ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ, РАЙОНИРОВАННЫХ В БАШКОРТОСТАНЕ

С использованием полиакриламидного геля-электрофореза исследована изменчивость изоферментных локусов 14 ферментных систем сортов яровой мягкой пшеницы, районированных в Башкортостане. Обсуждаются проблемы использования изоферментных маркеров при введении растений в культуру *in vitro*.

Ключевые слова: изоферменты, яровая мягкая пшеница, культура *in vitro*, мутации, соматическая изменчивость.

Несмотря на длительную историю использования мировых генетических ресурсов культивируемых растений и их диких сородичей для улучшения сельскохозяйственных культур, успешное выявление и применение информативных признаков в этих целях, успех селекции пшеницы до сих пор определяется эффективностью имеющегося и создаваемого нового методического арсенала. Недавно [3, с. 91-92] была опубликована обзорная статья о сферах применения запасных белков в качестве признака на разных этапах работы с генетическими ресурсами сельскохозяйственных растений. Обширный перечень задач, решаемых с помощью этих молекулярных маркеров, в основном охватывает проблемы выявления и характеристики генетического разнообразия и идентификации растительного материала на разных этапах селекционной работы. Отмечается, что, по сравнению с запасными белками, многие изоферментные системы обладают нежелательной для маркеров онтогенетической, тканевой либо органной специфичностью, а также изменчивостью в зависимости от факторов среды [3, с. 93]. Справедливость этого заключения несомненна при характеристике растительного материала, осуществляемой в ходе отбора растительного материала и его селекции традиционными методами. В то же время изоферменты имеют большие перспективы при проведении интенсивно развивающихся биотехнологических исследований пшеницы. Недостатки этих маркеров, отмеченные выше, при исследовании растений в культуре *in vitro* оборачиваются несомненными достоинствами. Одной из главных причин этих достоинств является то, что изоферменты не являются нейтральными маркерами генома. Участвуя в различных биохимических процессах и физиологических реакциях, они определяют адаптации организмов к различным средовым факторам. Ю.П. Алтуховым [1, с. 908] проведен масштабный

анализ связи аллозимных данных со свойствами видов по 77 зоологическим и 30 растительным видам. Установлено, что гетерозиготность генома коррелирует со скоростью полового созревания ($r=0.815$, $P<0.001$) и продолжительностью жизни организмов ($r=-0.793$, $P<0.001$). Доказательства селективных различий различных изоферментов в настоящее время в основном поступают из области медицинской генетики. Тем не менее, такие данные получены и при исследованиях растений, в частности, пшеницы. Например, экологические ассоциации изоферментной изменчивости исследованы у дикорастущей *Triticum dicoccum* из Израиля и Турции [10, с. 73]. Выявлена клинальная изменчивость параметров популяционного разнообразия по направлению с севера на юг, связанная с градиентом климатических факторов. В экологически более изменчивых условиях полиморфизм изоферментных локусов был выше. Обнаружены различия разных локусов по вкладу в формирование дифференциации популяций. Для *Triticum aestivum* показано, что устойчивость к стрессу от воздействия кадмия связана с активностью отдельных изоформ глутатионредуктазы [14, с. 505]. Установлено [9, с. 59], что кинетика пероксидаз и их физиологическая роль различаются в зависимости от изоформ фермента при добавлении в среду ионов кальция.

Регенерация растений посредством разных путей морфогенеза в культуре *in vitro* предоставляет исследователю различные возможности [4, с. 398]. Так, одноклеточное происхождение эмбриоидов (зародышеподобных структур [2, с. 63]) делает возможным сохранение генетической однородности и является основой для биотехнологического клонирования полноценных плодоносящих гибридов яровой мягкой пшеницы с закрепленным гетерозисным эффектом. Получение растений-регенерантов через каллусную культуру целесообразно для индукции соматической

изменчивости, которая является основой для получения новых признаков. В то же время введение растений в культуру *in vitro* является для них сильнейшим стрессовым фактором, вызывающим изменения в самой ДНК, структурные изменения хромосом и их числа (миксоплоидию и другие аномалии). При этом индуцируется селективная экспрессия генов, изменяется синтез ферментов, в том числе участвующих в физиологическом и биохимическом ответах на стресс и каллусообразование [5, с. 920]. Геном растений при каллусообразовании и пролиферации значительно перестраивается, в том числе *de novo* [5, с. 919]. Такие факторы, как механические повреждения, другие физические, а также химические (добавляемые в среду фитогормоны, минеральные вещества) воздействия часто превышают норму реакции клеточных популяций и являются мутагенными. Частота этих генетических изменений превышает фоновые значения на несколько порядков и доходит до 10^{-2} . В связи с этим, оценка генетической однородности растений-регенерантов, полученных посредством различных путей морфогенеза *in vitro* представляется актуальной. Изоферменты позволяют оценивать частоты мутаций [7, с. 157], в том числе при культивировании растительных эксплантов в условиях *in vitro*. И, наконец, явным преимуществом изоферментов является возможность оперирования терминами «аллели» и «локусы», без чего полноценное описание генофонда невозможно. Они имеют моногенный генетический контроль, кодоминантны, в отличие от некоторых типов ДНК-маркеров. При этом их разрешающая способность является достаточно высокой. Недавнее сравнение трех типов признаков *Aegilops cylindrica* (RAPD-, микросателлитные и изоферментные маркеры) показало [10, с. 610], что все они позволили успешно дифференцировать выборки различного происхождения.

Приведенные доказательства обуславливают актуальность и практическую значимость изучения фонового изоферментного состава сортов пшеницы, вводимых в культуру *in vitro*, что составило цель данной работы. В качестве объектов исследования служила яровая мягкая пшеница. Изучали сорта (Башкирская 4, Башкирская 28, Воронежская 12, Жница, Московская 35, Омская 35, Саратовская 29, Саратовская 55, Симбирка, Скала, Соналика, Тулайковская золотистая, Экада 53, Экада 70), линии (Фотос, 76/98а, Л 42864, Л 42875) и их гибриды (ГП 15, ГП 42, ГП 43, ГП 91, ГП 94, ГП 95, ГП 139,

ГП 176, ГП 180), районированные в Башкортостане и используемые в регионе в селекционной работе Башкирского НИИ СХ РАСХН в качестве родительских для создания новых гибридов и линий. В лаборатории экспериментальной эмбриологии растений Института биологии Уфимского научного центра РАН на их базе проводятся исследования по разработке биотехнологических способов клонирования гибридов с закрепленным гетерозисным эффектом.

В качестве молекулярных маркеров использовали изоферменты аланинаминопептидазы (ААР, кодовый номер фермента 3.4.11.2), аспаратаминотрансферазы (ААТ, 2.6.1.1), глутаматдегидрогеназы (GDH, 1.4.1.2), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (G6PDH, 1.1.1.49.), диафоразы (DIA, 1.6.4.3), кислой фосфатазы (APH, 3.1.3.2), лейцинаминопептидазы (LAP, 3.4.11.1), малатдегидрогеназы (MDH, 1.1.1.37), малик-энзима (ME, 1.1.1.40), НАДН-дегидрогеназы (NADHDH, 1.6.99.1.), неспецифических эстераз (EST, 3.1.1...), супероксиддисмутазы (SOD, 1.15.1.1), формиатдегидрогеназы (FDH, 1.2.1.2) и шикиматдегидрогеназы (SKDH, 1.1.1.25). Растительным материалом для выделения ферментов служили этиолированные 7-дневные проростки. В роли основного метода лабораторных анализов выбран полиакриламидный диск-электрофорез изоферментов в щелочном разделяющем геле. Детальное описание метода и способов гистохимического выявления ферментов в гелях после электрофореза было приведено ранее [6, с. 1566].

У некоторых ферментов (SKDH, LAP, ААР, ADH, DIA) на фоне мономорфизма зон активности выявлена множественность изоформ. В некоторых случаях (MDH-1, ААТ-1, ААТ-3) из нескольких областей активности изменчивость выявлена у 1-2 из них. Этот феномен может быть следствием гетерозиготности соответствующих локусов и полиплоидии исследованного таксона.

Наибольший интерес при изучении пшеницы в культуре *in vitro* имеют следующие ферментные системы и группы их изоформ.

Ряд ферментов в гелях у растений образовывали однополосные фенотипы в единственной зоне активности. На этой основе постулировано, что они контролируются гомозиготными локусами Gdh-1, Fdh-1, G6pdh-1 и Me-1. Некоторые ферменты всех исследованных образцов проявляют изменчивость, но у них наблюдается мономорфизм в отдельных областях окрашивания (ААТ,

Aat-2; SOD, Sod-1; MDH, Mdh-2). Эти локусы являются кандидатами для оценки темпа мутирования в условиях *in vitro*. В этих целях использовать гетерозиготные локусы не рекомендуются, так как у них образуются не только истинные мутации, но и мутациеподобные события из-за внутридистронной рекомбинации [7, с. 159] и, таким образом, частота мутаций может быть завышена. Окрашивание NADH-дегидрогеназы показало, что основная часть исследованных сортов, линий и гибридов были мономорфными в двух выявленных зонах активности NADHDH-1 и NADHDH-2, а у отдельных образцов обнаруживался полиморфизм и дифференциальная активность изоформ, зависящая от эффекта «дозы генов» из-за полиплоидности растения. В случае этого фермента частоты мутаций возможно изучать только у гомозиготных генотипов.

EST, APH, а также SOD (кроме зоны SOD-1) образывали несколько областей активности, активность которых зависела от возраста проростка. Эти ферменты рекомендуются нами для изучения процессов тканевой диф-

ференциации и дедифференциации в культуре *in vitro*. Известно, что изоферменты способны маркировать этапы развития тканей растений [8, с. 207]. Например, в эндоспермах *Triticum aestivum* выявлены различия активности разных форм ферментов, регулирующих метаболизм крахмала на разных стадиях формирования растения [11, с. 201]. У *Triticum aestivum* cv. *Kundan* активность Fe-зависимой изоформы супероксиддисмутазы возрастала на этапе развития листа [13, с. 1037].

Таким образом, электрофоретический скрининг 14 ферментных систем позволил выявить ферменты и локусы, перспективные для выявления генетических изменений (мутаций, соматической изменчивости) при регенерации растений пшеницы в культуре *in vitro* и для маркирования отдельных этапов дифференциации и дедифференциации тканей. Следующим этапом работы является проведение таких исследований в отношении районированных в Республике Башкортостан сортов, линий и гибридов яровой мягкой пшеницы.

Список использованной литературы:

1. Алтухов Ю.П. Аллозимная гетерозиготность, скорость полового созревания и продолжительность жизни // Генетика. – 1998. – Т. 34. – № 7. – С. 908-919.
2. Батыгина Т.Б. Хлебное зерно: атлас. – Л.: Наука, 1987. – 103 с.
3. Конарев А.В., Конарев В.Г., Губарева Н.К. и др. Белки семян как маркеры в решении проблем генетических ресурсов растений, селекции и семеноводства // Цитология и генетика. – 2000. – Т. 34. – С. 91-104.
4. Круглова Н.Н., Сельдиминова О.А., Катасонова А.А. и др. Биотехнология экспериментальной андроклинической гаплоидии яровой мягкой пшеницы *in vitro* на основе комплекса цитоэмбриологических и физиологических данных // Сб. научн. трудов IV междунар. научн. конф. «Факторы экспериментальной эволюции организмов». Т. 5. – Алушта, 2008. – С. 397-402.
5. Кунах В.А. Изменчивость растительного генома в процессе дедифференцировки и каллусообразования // Физиология растений. – 1999. – Т. 46. – № 7. – С. 919-929.
6. Янбаев Ю.А., Байрамгулов Н.Р., Редькина Н.Н. и др. Межпопуляционная дифференциация родиолы иремельской (*Rhodiola iremelica* Boriss., *Crassulaceae*) на Южном Урале // Генетика. – 2007. – Т. 43. – С. 1565-1570.
7. Bakhtiyarova R.M., Starova N.V., Yanbayev Yu. A. Genetic changes in populations of Scots pine growing under industrial air pollution conditions // *Silvae Genetica*. – 1995. – V. 44. – P. 157-160.
8. Bhatia C.R., Nilson J.P. Isoenzyme changes accompanying germination of wheat seeds // *Biochem. Genet.* – 1969. – V. 3. – № 3. – P. 207-214.
9. Converso D.A., Fernández M.E. Ca²⁺ activation of wheat peroxidase: a possible physiological mechanism of control // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1996. – V. 333. – № 1. – P. 59-65.
10. Guadagnuolo R., Bianchi D.S., Felber F. Specific genetic markers for wheat, spelt, and four wild relatives: comparison of isozymes, RAPDs, and wheat microsatellites // *Genome*. – 2001. – V. 44. – № 4. – P. 610-621.
11. Jaradat A.A. Spatial and temporal genetic structure of wild emmer wheat in Jordan. High-molecular-weight glutenins and allozymes // *Israel Journal of Plant Sciences*. – 2001. – V. 49. – № 1. – P. 65-76.
12. Morell M.K., Blennow A., Kosar-Hashemi B. et al. Differential expression and properties of starch branching enzyme isoforms in developing wheat endosperm // *Plant Physiol.* – 1997. – V. 113. – № 1. – P. 201-208.
13. Srivalli B., Khanna-Chopra R. Induction of new isoforms of superoxide dismutase and catalase enzymes in the flag leaf of wheat during monocarpic senescence // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2001. – V. 288. – № 9. – P. 1037-1042.
14. Yannarelli G.G., Fernández-Alvarez A.J., Santa-Cruz D.M. et al. Glutathione reductase activity and isoforms in leaves and roots of wheat plants subjected to cadmium stress // *Phytochemistry*. – 2007. – V. 68. – № 4. – P. 505-512.

Исследования поддержаны Российским фондом фундаментальных исследований (проекты № 05-04-97911, № 05-04-08114, № 08-04-97045), Академией наук Республики Башкортостан (проект № 40/40-П), а также программой «Ведущие научные школы Российской Федерации» (проекты НШ 4834.2006.4, НШ 2096.2008.4, лидер Школы – член-корр. РАН Т.Б. Батыгина).