

ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЗАПАСНЫХ БЕЛКОВ ЗЕРЕН ПШЕНИЦЫ КИТАЙСКОЙ СЕЛЕКЦИИ

А. Н. ИВАНИСТОВ, С. В. ЕГОРОВ, Ю. Л. ТИБЕЦ

УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия»,
г. Горки, Республика Беларусь, 213407, e-mail: ivanistov09@mail.ru

(Поступила в редакцию 12.03.2021)

Электрофорез – это современный биохимический метод, с помощью которого смесь белков может быть разделена на отчетливые компоненты в геле, помещенном в электрическое поле. Образцы семян разных сортов, характеризующиеся различными белковыми связями, обладают генетически обусловленными различиями, которые приравниваются к понятию «отпечатка пальцев» или «паспорта сорта». Эти отличительные особенности сохраняются в разных условиях произрастания. Поэтому электрофорез является надежным методом тестирования, который используется сегодня для идентификации сортов сельскохозяйственных культур [1, 2, 3].

В статье представлены результаты электрофоретического анализа сортов пшеницы китайского происхождения в сравнении с сортами пшеницы, районированными в Республике Беларусь.

Электрофоретический спектр запасных белков пшеницы КНР являлся насыщенным по компонентному составу, стабильным по маркерным компонентам белка, имеет сочетания селекционно-ценных позиций компонентов и представляет интерес для селекционных целей.

Ключевые слова: электрофорез, сорта-популяции, белковые маркеры, биотипы, гетерогенность сортов, селекционно-ценные компоненты.

Electrophoresis is a modern biochemical method by which a mixture of proteins can be separated into distinct components in a gel placed in an electric field. Samples of seeds of different varieties, characterized by different protein bonds, have genetically determined differences that are equated with the concept of «fingerprint» or «variety passport». These distinctive features persist under different growing conditions. Therefore, electrophoresis is a reliable testing method that is used today to identify crop varieties.

The article presents results of electrophoretic analysis of wheat varieties of Chinese origin in comparison with wheat varieties zoned in the Republic of Belarus.

The electrophoretic spectrum of spare proteins of wheat from the People's Republic of China was saturated in terms of component composition, stable in marker components of protein, has a combination of selection-valuable positions of components and is of interest for breeding purposes.

Key words: electrophoresis, varieties-populations, protein markers, biotypes, heterogeneity of varieties, selection-valuable components.

Введение

Основным методом оценки генетического качества семенного материала служит электрофоретический анализ запасных белков, который сегодня по праву можно назвать универсальным методом контроля качества семенной продукции. Данный анализ позволяет определять генетический состав определенного сорта через биотипы [4].

Современные сорта зерновых культур – это сложные сорта-популяции, которые обладают высокой пластичностью и адаптивностью, но их трудно сохранить в процессе семеноводства, так как большинство составляющих их биотипов, различаясь по биологическим свойствам, одинаковы по морфологическим признакам. Состав и соотношение биотипов сорта может существенно измениться за 3–4 года, поэтому принципиально важным является вопрос оценки оригинальной генетической структуры сорта [1, 5].

Многочисленными исследованиями была установлена достоверная разница между биотипами по количественным и качественным признакам [6, 7, 8, 9, 10]. Также было установлено, что биотипы в процессе возделывания сорта могут менять свое соотношение в его структуре и даже элиминировать под влиянием антропогенного фактора и проявления естественного отбора в процессе формирования элиты в питомниках первичного семеноводства [11].

Использование белковых маркеров (электрофоретический анализ запасных белков семян) позволяет в лабораторных условиях осуществлять сортовую идентификацию, оценивать сортовую чистоту, контролировать состав и соотношение биотипов [12, 13, с. 264–291].

Белковые маркеры широко используются в селекционных программах для решения многих вопросов, в частности, для отбора определенных генотипов (по соответствующим типам спектра) при селекции различных культур [14]. Так, например, на основании анализа состава электрофоретических

спектров глиадины у родословных сортов озимой мягкой пшеницы с разным уровнем морозоустойчивости показана возможность использования белковых маркеров в оценке морозоустойчивости в пределах конкретных групп селекции [14]. На большом числе сортов показано, что наличие генотипа с компонентами $\alpha 2467$ и $\omega 8910$ придает сорту повышенную морозоустойчивость [15].

Имея характеристику совокупности индивидуальных белков определенной категории, можно получить ценную информацию о структуре генома, об экспрессии отдельных генов [16, 17]. Например, селекционеры особенно интересуют экспрессия генов устойчивости к различным болезням злаковых культур.

В литературе имеется много данных о том, что прогресс в селекции мягкой пшеницы на устойчивость к болезням и неблагоприятным факторам среды во многом связан с расширением потенциала ее изменчивости за счет введения чужеродного генетического материала от других родов и видов, главным образом, от эгилопса, ржи и пырея [18].

На основе электрофоретических спектров белков в полиморфных сортах пшеницы идентифицированы глиадиновые биотипы, соотношение которых в сортовой популяции может изменяться в зависимости от условий года, региона возделывания. Такая особенность может быть использована в оценке селекционного материала в разных условиях репродукции, оценки адаптивного потенциала генотипов [5].

Основная часть

В рамках подписанного соглашения о сотрудничестве между академией и Северо-Западным университетом сельского и лесного хозяйства (КНР) в УО БГСХА был создан агротехнопарк. Основными направлениями деятельности которого являются: экологическое испытание сельскохозяйственных культур и оценка их адаптивности; инновации в селекционном процессе при создании новых сортов; обмен исходным материалом для селекции пшеницы.

В сентябре 2019 г. китайская сторона предоставила семена пшеницы. В 2019–2020 гг. проводилось экологическое испытание сельскохозяйственных культур. В условиях УНЦ «Опытные поля БГСХА» изучались пшеница озимая, сорт Арктис, пшеница яровая Любава, и пшеница, предоставленная Северо-Западным университетом сельского и лесного хозяйства (КНР).

Испытание селекционного материала нужно проводить на разных этапах работы. В связи с этим задача заключалась в том, чтобы дать полную оценку пшенице китайского происхождения в сравнении с сортами пшеницы районированным в Республике Беларусь и вынести решение о целесообразности использования данного материала в селекционном процессе.

На протяжении последних лет, целый ряд ведущих международных организаций (UPOV, ISTA, CUMMIT), работающих в областях оценки, регистрации и контроля сортов, неоднократно подчеркивали важность и крайнюю необходимость использования в области практических селекционных алгоритмов методов, свободных от действия окружающей среды, внешних факторов и способных к генетической интерпретации. Адаптивный характер полиморфизма запасных белков, выявляемый на основе белковых маркеров семян, в совокупности с разработанной на сегодняшний момент системой учета и регистрации данных по критериям внутренней гетерогенности сортов, белковых маркеров сорта (линии), позволяют надежно фиксировать как оригинальный генотипический уровень генотипа, так и оценивать изменения, происходящие в генотипическом составе сортовых популяций в ходе репродукции в различных климатических условиях.

Оценка внутренней структуры сортов с использованием белковых маркеров семян, формирование сортовых белковых формул проводились на базе аккредитованной Испытательной лаборатории качества семян УО БГСХА, соответствующей критериям системы аккредитации Республики Беларусь и международным требованиям по ГОСТ ISO/IEC 17025-2019.

Объектом испытаний являлась пшеница мягкая селекции КНР, пшеница озимая сорта Арктис, яровая пшеница Любава.

Методы испытаний: – ISO 8981:1993(Е), «Пшеница – идентификация сортов с помощью электрофореза».

Для точной оценки дифференцирующих позиций (зон) спектра, оценки молекулярных масс белков использовались стандартные маркер-растворы белков «Thermo Scientific» – Unstained Protein Ladder (диапазон 5–112 кДа, число идентифицируемых белков – 11).

Поведенная оценка сортов пшеницы позволила установить характер внутренней полиморфности генотипов, обусловленный разным числом биотипов, их частотами встречаемости в сортовой популяции и сформировать сортовую белковую формулу изучаемых сортов.

Полученные электрофоретические спектры индивидуальных семян были разделены на группы, имеющие одинаковый компонентный состав, т.е. на биотипы. К одному и тому же биотипу отнесены белковые спектры с идентичным компонентным составом (как по подвижности, так и по степени интенсивности), а также спектры, незначительно отличающиеся по интенсивности отдельных компонентов.

Основываясь на данных критериях идентификации белковых биотипов, в ходе исследований были установлены четкие отличительные позиции при сравнении биотипов как внутри отдельного сорта, так и в сравнении сортов между собой. Данные отличия выражались как в разной степени интенсивности белковых полос спектра, так и включением нового, ранее не проявлявшегося сочетания позиций в спектре.

Именно биотипы, составляют структурную основу популяции, представляют собой группы особей растений, имеющих, как правило, идентичные морфологические признаки, но отличающиеся между собой вполне определенными устойчивыми, генетически обусловленными биологическими свойствами. Отмечено, что характерной особенностью биотипов, является специфичность компонентного состава белков, что в свою очередь может быть использовано как фактор идентификации.

Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1. Количество биотипов и сортовая белковая формула

Имя образца	Биотип №	Содержание в популяции, %	Сортовая белковая формула генотипа
Пшеница КНР (яровой сев)	1	60,0	10,13,15,19,22,25,40,41,44,45,47,52,55,57,60,62,63,66,68,70,71,77,81,85, 88, 90,95,97,98
	2	30,0	10,13,15,19,21,25,39,41,44,45,47,52,55,57,60,63,66,70,71,77,84,90,95,98, 100
	3	10,0	10,13,15,19,22,25,26,40,42,45,51,52,53,55,57,60,65,70,72,75,78,80,85,90,96
Пшеница КНР (озимый сев)	1	75,0	10,13,19,22,25,40,41,44,45,47,52,55,57,60,62,63,66,68,70,71,77,81,85,88, 90,95,97,98
	2	25,0	10,13,19,21,25,39,41,44,45,47,52,55,57,60,63,66,70,71,77,84,90,95,98,100
Пшеница КНР (урожай 2019г.) - исходная форма	1	50,0	10,13,15,19,22,25,40,41,44,45,47,52,55,57,60,62,63,66,68,70,71,77,81,85, 88, 90,95,97,98
	2	25,0	10,13,15,19,21,25,39,41,44,45,47,52,55,57,60,63,66,70,71,77,84,90,95,98, 100
	3	25,0	10,13,15,19,22,25,26,40,42,45,51,52,53,55,57,60,65,70,72,75,78,80,85,90,96
Контроль 1 (Арктис), озимая	1	80,0	10,12,15,20,25,26,30,35,40,42,46,47,51,52,55,56,60,63,65,67,75,76,80,85,90,95,97
	2	20,0	10,12,17,20,23,26,30,37,40,42,46,48,51,52,55,57,59,63,65,67,72,75,81,85,89,95
Контроль 2 (Любава), яровая	1	65,0	10,12,17,20,22,24,26,30,37,40,44,46,48,50,52,55,57,59,60,65,67,72,75,81,85,89,95,97
	2	25,0	10,12,17,20,22,24,26,30,37,40,44,46,48,50,52,55,57,59,60,65,67,72,75,81,85,89,95
	3	10,0	10,12,17,20,22,23,26,30,35,40,42,46,48,50,52,56,57,59,60,65,67,72,75,81,85,89,95,97

В целом, по результатам исследований можно выделить несколько основных положений:

1) В разрезе проанализированного набора сортов, идентифицированы сорта средней степени полиморфности (генетической разнородности), включающие два белковых биотипа, сорта, характеризующиеся высокой степенью полиморфности, состоящие из трех биотипов.

Как следует из полученных данных, сорта озимой мягкой пшеницы характеризуются четкими идентификационными критериями по белковому спектру. Число дифференцирующих позиций (компонентов спектра) колеблется от трех до 6 единиц, что позволяет четко и однозначно идентифицировать любой сорт на основе сравнения с эталонным белковым спектром.

2) В результате пересева происходит изменение внутренней полиморфности, что может быть выражено через уменьшение числа биотипов сорта и частоты их встречаемости в суммарной популяции сорта.

Идентифицированная внутренняя структура сорта не является величиной постоянной и подвержена вариабельности под действием ряда внешних факторов, в данном случае под воздействием факторов среды. Отмечено, что в случаях воздействия на структуру сорта условий среды с незначительными отклонениями, например при репродуцировании сортовой популяции в иной климатической зоне, колебания в уровне полиморфности менее значительны.

В таких условиях, варьирование в уровне биотинов сорта может достигать значений 10–20 % при сохранности всей генетической конституции характерной для оригинальной популяции сорта. Наиболее вариабельными являются неосновные (вторые–третьи) биотипы сортовой популяции, характеризующиеся частотой встречаемостью на уровне 10–25 %.

3) Электрофоретический спектр запасных белков пшеницы КНР является насыщенным по компонентному составу, стабильным по маркерным компонентам белка, имеет сочетания селекционно-ценных позиций компонентов. Было выявлено, что компонентная представленность белкового комплекса сортов селекции КНР, кроме сортоспецифичности, характеризуется стабильностью в меняющихся средовых условиях и не зависит от условий репродуцирования растительного генотипа.

4) Внутренняя структура генотипа является довольно стабильной, так как в результате репродуцирования в условиях Республики Беларусь, не произошло существенного изменения уровня гетерогенности и сдвига по компонентной представленности.

5) Установлена изменчивость частот встречаемости биотипов сорта, что связано с новыми условиями репродуцирования в условиях Республики Беларусь.

В спектре проанализированных сортов выявляется четкая дифференциация по целому ряду критериев белкового спектра, характеризующих особенности внутренней структуры генотипа (табл. 2, 3). Исследуемые сорта КНР имеют разный уровень общей компонентной представленности спектра белка, различаются числом сортоспецифичных компонентов, компонентов внутрисортной дифференциации, а также размахом величин их относительной подвижности в спектре.

Таблица 2. Критерии внутренней гетерогенности сортов пшеницы

№ п/п	Сорт	Число биотипов, ед.	Rf маркеров биотипов	Число маркеров биотипа, ед.	Содержание основного биотипа, %
1	Пшеница КНР (яровой сев)	3	0,30–0,45	4	60,0
2	Пшеница КНР (озимый сев)	2	0,40–0,75	3	75,0
3	Контроль 1 (Арктис), озимая	2	0,30–0,45	2	80,0
4	Контроль 2 (Любава), яровая	3	0,35–0,40	2	65,0

Примечание: Rf – относительная подвижность компонента, ед.

Базовым результатом анализа генотипов пшеницы на начальном этапе являлся белковый электрофоретический спектр, содержащий уникальную индивидуальную характеристику каждого проанализированного семени в виде белковых компонентов разной подвижности и степени интенсивности.

Спектральный состав белков пшеницы можно разграничить по позициям, которые связаны с дифференцирующими или идентификационными критериями. К числу таких позиций относятся:

- частота встречаемости отдельных компонентов белкового спектра;
- общая представленность белкового спектра сорта;
- общие и уникальные позиции белкового спектра.

Таблица 3. Количество компонентов внутренней гетерогенности сортов пшеницы

Сорт	Число компонентов по отличительным позициям						Общее количество компонентов (усредненное значение по популяции)
	Уникальные позиции компонентов		Отсутствующие компоненты		Различия в степени интенсивности компонентов		
	Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%	
Пшеница КНР (яровой сев)	4	11,7	2	8,7	4	8,7	29
Пшеница КНР (озимый сев)	2	5,3	3	15,8	3	5,3	27

В спектре проанализированных сортов пшеницы выявляется четкая дифференциация по целому ряду критериев белкового спектра, характеризующих особенности внутренней структуры генотипа.

Исследуемые сорта имеют разный уровень общей компонентой представленности спектра белка, различаются числом сортоспецифичных компонентов, компонентов внутрисортной дифференциации, а также размахом величин их относительной подвижности в спектре.

Общее число компонентов белка на спектре находилось в границах от 19 до 26 единиц с группировкой по трем зонам спектра – «А», «В» и «С», что зависит от частоты встречаемости компонентов и их информативности. К зоне «А» относят компоненты спектра с порядковыми номерами от 1 до 19. Зона «В» включает компоненты с порядковыми номерами в пределах от 19 до 80. Зона «С» представлена порядковыми номерами компонентов от 81 до 100.

В среднем частоты проявления маркерных сортовых компонентов находились в диапазоне от 4,0 до 12,5 %, что объясняется наличием четких сортовых маркеров в количестве от 1 до 3.

По результатам исследований установлено, что наибольший уровень различий между сортами и биотипами определяется в зоне «В» спектра в сочетании с высокой информативностью идентифицируемых компонентов данной зоны.

Выявленная градация генотипов по суммарному числу белковых компонентов спектра может служить дополнительным критерием оценки разных адаптивных способностей форм в условиях региона.

Наибольший интерес для селекционных целей представляет группа белковых компонентов, характеризующихся как уникальные, имеющие единичную представленность по определенным генотипам. Как правило, данные компоненты имеют четкие отличительные характеристики (величины относительной подвижности, степени интенсивности), благодаря чему могут быть использованы в качестве сортовых маркеров. В результате анализа белков семян пшеницы, были выделены редкие, обладающие наибольшей информативностью позиции белковых компонентов – 21, 24, 39, 42, 60, 71.

В целом, проведенные оценки сортов пшеницы, позволили выявить четкие отличительные особенности, проявляемые по белковым признакам на основе идентификации критериев электрофоретического спектра запасных белков семян, что может быть использовано как фактор идентификации сортов и биотипов с целью использования в селекционных алгоритмах.

Заключение

Выявленная градация генотипов по суммарному числу белковых компонентов спектра, может служить дополнительным критерием оценки разных адаптивных способностей форм в условиях региона.

Наибольший интерес для селекционных целей представляет группа белковых компонентов, характеризующихся как уникальные, имеющие единичную представленность по определенным генотипам.

Как правило, данные компоненты имеют четкие отличительные характеристики (величины относительной подвижности, степени интенсивности), благодаря чему могут быть использованы в качестве сортовых маркеров. В результате анализа белков семян, были выделены редкие, обладающие наибольшей информативностью позиции белковые компоненты – 13,15,25,41,62,70,71,100.

Электрофоретический спектр запасных белков пшеницы КНР является насыщенным по компонентному составу, стабильным по маркерным компонентам белка, имеет сочетания селекционно-ценных позиций компонентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Петрова, Н. Н. Семена кукурузы. Определение уровня гибридности семян гибридов первого поколения и оценка однородности, и маркирование инбредных линий: методика определения / Н. Н. Петрова [и др.]. – Минск: БГАТУ, 2005. – 16 с.
2. Петрова, Н. Н. Семена сахарной свеклы. Определение уровня гибридности семян гибридов первого поколения и оценка сортовой чистоты методом электрофоретического анализа запасных белков 11S-глобулинов: методика определения / Н. Н. Петрова [и др.] – Минск: БГАТУ, 2005. – 20 с.
3. Федулова, Т. П. Применение белковых маркеров в селекции сахарной свеклы / Т. П. Федулова, С. Н. Митин // Сахарная свекла. – 2004. – № 1. – С. 13–14.
4. Петрова, Н. Н. Применение метода электрофоретического анализа для определения гибридности и генетического качества семян кукурузы, сахарной свеклы и других культур / Н. Н. Петрова, Т. В. Кардис // Вестник Белорус. гос. с.-х. акад. – 2005. – № 1. – С. 56–59.
5. Егоров С. В. Изменчивость структуры сортов в аспектах использования для оценки качества семян/ С.В.Егоров, Н. А. Дуктова // Вестник Белорус. гос. с.-х. акад. – 2014. – № 2. – С. 125–131.
6. Аbugалиева, А. И. Компоненты глиаина и субъединицы глютеина в селекции пшеницы на качество зерна: автореф. дис. ... д-ра биол. наук / А.И. Аbugалиева; Каз. НИИ земледелия им. В.Р. Вильямса. – Алматы, 1994. – 50 с.
7. Булатова, К. М. Электрофоретический спектр глютеина как биохимический показатель внутрисортного полиморфизма пшеницы по запасным белкам / К. М. Булатова // Биохимические показатели в селекции зерновых культур. – Ал-

ма-Ата, 1986. – С. 14–23.

8. Молчан, И. М. Структура и изменчивость сорта пшеницы по признаку остистости / И. М. Молчан, Т. В. Лезжова // Проблемы селекции сортов мягкой яровой пшеницы интенсивного типа. – Новосибирск, 1980. – С. 32–36.

9. Неттевич, Э. Д. Метод электрофореза при изучении внутрисортной изменчивости качества зерна пшеницы / Э. Д. Неттевич, Н. С. Беркутова, Л. Г. Погорелова // Селекция и семеноводство. – 1983. – № 2. – С. 8–10.

10. Сеитова, А. М. Биотипный состав и блоки компонентов глиадина у мягкой пшеницы Богарная 56 / А. М. Сеитова, Е. В. Метаковский, А. А. Созинов // Цитология и генетика. – 1986. – Т. 20. – № 3. – С. 196–201.

11. Петрова, Н. Н. Применение электрофореза белков для оценки генетического качества сортовых семян в семеноводстве / Н. Н. Петрова, Л. И. Галкова // Междунар. аграр. журн. – 1999. – № 3. – С. 29–31.

12. Идентификация сортов и регистрация генофонда культурных растений по белкам семян / В. Г. Конарев [и др.]; ВИР. – СПб, 2000. – 185 с.

13. Конарев, В. Г. Морфогенез и молекулярно-биологический анализ растений / В. Г. Конарев. – СПб.: ВИР, 2001. – 417 с.

14. Алпатьева, Н. В. К вопросу об использовании белковых маркеров в оценке морозостойкости озимой мягкой пшеницы / Н. В. Алпатьева, Н. К. Губарева // Аграр. Россия. – 2002. – № 3. – С. 31–34.

15. Vedenskaja, N. Use of storage protein electrophoresis in the analysis of genetic resources of some cereals. Erhaltung and nutzung pflanzengenetischer resourcen – eine international aufgabe fur naturschutzer / I. Vedenskaja et. al. // Vortage fur pflanzenzuchtung. – 1993. – Vol. 25. – P. 187–201.

16. Пенёва, Т. И. Оценка геномного и хромосомного состава тритикале по белковым маркерам / Т. И. Пенёва [и др.] // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 1981. – Т. 70, вып. 2. – С. 55–68.

17. Cooke, R. J. Modern methods for cultivar verification and transgenic plant challenge / R. J. Cooke // 25th International seed Testing Congress: Abstracts, Pretoria, April 15–24, 1998 / ISTA. – Zurich, 1998. – P. 9–10.

18. Пенёва, Т. И. Белковые маркеры в анализе генетической стабильности сортов пшеницы, содержащих хроматин 1R / Т. И. Пенёва, О. П. Митрофанова, А. В. Конарев // Аграр. Россия. – 2002. – № 3. – С. 35–40.