

ОТСУТСТВИЕ ИЗМЕНЧИВОСТИ ВОДОРАСТВОРИМЫХ БЕЛКОВ *DE NOVO* ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ *IN VITRO*

© 2011 Ю.А. Янбаев, Н.Н. Круглова, И.Р. Кутлуахметов

Институт биологии Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

Поступила 27.05.2011

С применением гель-электрофореза с додецилсульфатом натрия исследована изменчивость водорастворимых белков *de novo* у яровой мягкой пшеницы. Обсуждаются проблемы возникновения мутаций в кодирующей части генома при выращивании растений в культуре пыльников *in vitro*.

Ключевые слова: *гель-электрофорез с додецилсульфатом натрия, водорастворимые белки, яровая мягкая пшеница, мутации, культура пыльников in vitro.*

Более 40 лет назад на примере растений рода *Datura L.* было открыто явление андрогенеза *in vitro* [1], названное позднее андроклинией [2]. Этот биологический феномен состоит в образовании растения-регенеранта в условиях культуры *in vitro* изолированных пыльников из гаплоидной микроспоры – морфогенетически компетентной клетки пыльника [3]. Явление андроклинии легло в основу метода культуры *in vitro* пыльников – одного из наиболее перспективных нетрадиционных экспериментальных подходов в современных биотехнологических исследованиях [4].

Андроклиния, как нетрадиционная система бесполого (вегетативного) размножения в культуре *in vitro* [3, 5], позволяет получать растения из гаплоидных клеток–микроспор без опыления и гибридизации. Именно этот факт дает возможность закрепить гетерозисный эффект донорной особи в регенерантах, которые по сути являются гомозиготными гаплоидными клонами (генетическими копиями) исходного гетерозисного растения. Дальнейшая искусственная дигаплоидизация растений-регенерантов ведет к образованию полноценных семян, что позволяет массово тиражировать полученные андроклинные гетерозисные растения.

Один из способов получения растений-регенерантов в культуре *in vitro* пыльников – гемморизогенез, состоящий в формировании растения-регенеранта из андроклинного каллуса [3]. Каллус при этом рассматривается как гетерогенная интегрированная структура (система), образующаяся в результате пролиферации клеток (в данном случае – микроспор. – *Авт.*) и состоящая из групп неоднородных клеток, имеющих различные морфогенетические потенции (по [6]). Актуальным является вопрос – насколько растения-регенеранты генетически тождественны материнским растениям? Не слишком ли велика плата за закрепление гетерозисного эффекта у андроклинного потомства из-за изменений в геноме в процессе биотехнологических манипуляций [7]?

Цель работы состояла в электрофоретическом сравнении фракционного состава водорастворимых белков донорных растений яровой мягкой пшеницы – гибридов 1-го поколения, проявивших гетерозисный эффект, и растений-регенерантов, образовавшихся из андроклинных каллусов, полученных в культуре *in vitro* изолированных пыльников.

Гипотеза исследования заключалась в следующем. Добавка в среду фитогормонов, минеральных веществ и других веществ, являясь для клетки мощным стрессовым фактором, вызывает в этих условиях события мутационной природы [7]. Если эти изменения затрагивают кодирующую часть генома, они в условиях *in vitro* должны приводить к образованию новых фракций белков в результате изменения процессов биосинтеза данных макромолекул и выявляться в лабораторном эксперименте. Это явление ранее было показано нами при изучении обусловленности увеличения частоты мутаций и мутациеподобных событий у растений химическим загрязнением [8].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования в данной работе послужили 10 впервые полученных гибридных линий яровой мягкой пшеницы, проявившие гетерозисный эффект по признаку «семенная продуктивность»: Л42809 х Л42866, Л42809 х Тулайковская золотистая, Л42875 х 76/98, Л42875 х Экада 78, Л42864 х Тулайковская золотистая, Л42864 х Экада 53, Л42864 х Экада 70, Воронежская 16 х Л42833, Симбирка х Боевчанка, Боевчанка х Башкирская 26. Линии получены в лаборатории селекции яровой пшеницы Селекционного центра по растениеводству БашНИИ СХ РАСХН (заведующий лабораторией – к.с.-х.н. В.И. Никонов) и переданы в лабораторию экспериментальной эмбриологии растений согласно Договору о творческом сотрудничестве между Институтом биологии УНЦ РАН и БашНИИ СХ РАСХН (2006-2010 гг.).

Экстракты для изучения изменения фракционного состава водорастворимых белков в условиях культуры *in vitro* были приготовлены из навесок одинакового веса с использованием Трис-НСL экстрагирующего буфера с рН 6,8, включающего 10%

Янбаев Юлай Аглямич, докт. биол. наук, проф., e-mail: Yanbaev_ua@mail.ru; Круглова Наталья Николаевна, докт. биол. наук, проф., e-mail: kruglova@anrb.ru; Кутлуахметов Ильнур Рафисович

додецилсульфата натрия, 10 mM 2-меркаптоэтанол, 20% глицерина и 0.05% лидирующего красителя бромфенолового синего. Разделение белков на фракции проводили с применением вертикального диск-электрофореза в щелочном 7% разделяющем геле [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Нами установлено полное сходство спектра водорастворимых белков исходных генотипов и каллусных тканей *in vitro* (рис.).

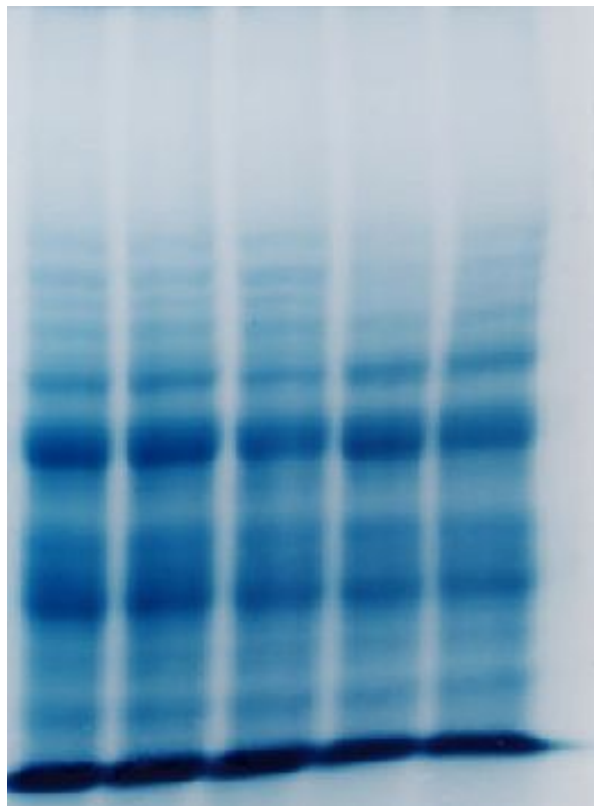


Рис. Электрофореграмма водорастворимых белков яровой мягкой пшеницы. Примечание. Направление движения фракций белков происходит от катодной (верхней) до анодной (нижней) частей геля

Это явление оказалось справедливым как для фракций, доминирующих в составе альбуминов мягкой яровой пшеницы, так и белков, представленных в экстракте в меньшем количестве (локализованных, как показано на рисунке, в верхней части геля).

Каллусообразование сопряжено с воздействием *in vitro* на клетку комплекса экологических факторов (механических повреждений в тканях, физического и химического воздействия привнесенных извне фитогормонов, минеральных веществ и других добавок). Они, видимо, являются сильнейшим стрессовым фактором и по этой причине мутагенами. Частота событий *de novo* (изменения в ДНК, структурные перестройки в хромосомах, миксоплоидия и другие аномалии) существенно превышает фоновые значения на несколько порядков и достигает до 10^{-2} [7]. Но до сих пор оставалось невыясненным – изменяется ли существенно экспрессия генов, участвующих в физиологическом и биохимическом ответах на каллусообразование? Перестраивается ли геном растений при каллусообразовании и пролиферации таким образом, что серьезно задеваются структурные гены и кодирующая часть наследственного материала? Полученные нами данные свидетельствуют, что мутации и мутацие-

подобные события вероятнее для некодирующей (превалирующей по величине) части генома – различия в биосинтезе альбуминов у исходных растений и регенерантов, полученных при андроклинии, не обнаружены.

Ранее нами [9] для сравнения проростков семян и каллусной ткани одних и тех же сортов в качестве молекулярных маркеров были использованы изоферменты 14 ферментных систем (аланинаминопептидазы, аспаратаминотрансферазы, глутаматдегидрогеназы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, диафоразы, кислой фосфатазы, лейцинаминопептидазы, малатдегидрогеназы, малик-энзима, НАДН-дегидрогеназы, неспецифических эстераз, супероксиддисмутазы, формиатдегидрогеназы и шикиматдегидрогеназы). Установлено, что ни для моноомфных ферментов, ни для полиморфных по составу изоферментов систем, как и в случае с водорастворимыми белками, не наблюдается. Возможно, возникающие в геноме в каллусных тканях изменения касаются в основном некодирующей части генома. Следовательно, при этом не нарушается существенно биосинтез ферментов, биохимическая и физиологическая роль которых в жизни клетки и растения громадна и незаменима.

Полученные нами сведения является новым аргументом для более широкого применения обсуждаемого способа закрепления гетерозисного эффекта донорной особи в потомстве, полученном в культуре *in vitro* [10]. Перспективным представляется изучение мутаций и мутациеподобных событий в некодирующей части генома, роль которых известна в меньшей степени, но она может быть связана с адаптивностью в стрессовых условиях [11].

Авторы благодарят сотрудников лаборатории экспериментальной эмбриологии растений к.б.н. О.А. Сельдимирова и к.б.н. Д.Ю. Зайцева, принимавших участие в экспериментальной части работы, а также заведующего лабораторией селекции яровой пшеницы Селекционного центра по растениеводству БашНИИ СХ РАСХН к.с.-х.н. В.И. Никонова за предоставленный материал для исследования.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 08-04-97045 и программой «Ведущие научные школы РФ» (грант № НШ 7637.2010.4, лидер Школы – член-корр. РАН Т.Б. Батыгина, БИН РАН, Санкт-Петербург).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Guha S., Maheshwari S. *In vitro* production of embryos from anther of *Datura* // Nature. 1964. V. 204. № 4957. P. 497.
2. Хохлов С.С. Общие вопросы гаплоидии // Гаплоидия и селекция. М.: Наука, 1976. С. 5-14.
3. Эмбриологические основы андроклинии пшеницы / Н.Н. Круглова, Т.Б. Батыгина, В.Ю. Горбунова, Г.Е. Титова, О.А. Сельдимирова. М.: Наука, 2005. 99 с.
4. От микроспоры – к сорту / Т.Б. Батыгина, Н.Н. Круглова, В.Ю. Горбунова, Г.Е. Титова, О.А. Сельдимирова. М.: Наука, 2010. 174 с.
5. Суханов В.М. Андроклиния и ее особенности у пшеницы: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Саратов, 1983. 24 с.
6. Батыгина Т.Б. Хлебное зерно. Л.: Наука, 1987. 103 с.
7. Кунах В.А. Изменчивость растительного генома в процессе дедифференцировки и каллусообразования // Физиология растений. 1999. Т. 46. № 7. С. 919-929.
8. 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.
9. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the heat of bacteriophage T4 // Nature. 1970. V. 227. P. 680-685.
9. Сельдимирова О.А., Ямбаев Ю.А., Зайцев Д.Ю. Изоферментные маркеры в исследовании изменчивости сортов яровой мягкой пшеницы, районированных в Башкортостане // Вестник Оренбургского ун-та. 2009. № 6. С. 337-339.
10. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Катасонова А.А. и др. Биотехнология экспериментальной андроклинии гаплоидии яровой мягкой пшеницы *in vitro* на основе комплекса цитозембриологических и физиологических данных // IV междунар. научн. конф. «Факторы экспериментальной эволюции организмов»: Труды. Т. 5. Алушта, 2008. С. 397-402.
11. Biémont C., Vieira C. Genetics: Junk DNA as an evolutionary force // Nature. 2006. V. 443. P. 521-524.

NO VARIATION *DE NOVO* OF WATER-SOLUBLE PROTEINS IN SPRING SOFT WHEAT VARIETIES, ZONED IN BASHKORTOSTAN, UNDER CONDITIONS OF CULTURE *IN VITRO*

© 2011 Yu.A. Yanbaev, N.N. Kruglova, I.R. Kutluahmetov

Institute of Biology, Ufa Sci. Centre of RAS, Ufa

Variation *de novo* of water-soluble proteins of varieties of spring wheat, zoned in Bashkortostan, have been studied by using gel electrophoresis with sodium dodecyl sulfate. The problems of mutations in the coding region of the genome of plants under conditions of culture *in vitro* of anthers are discussed.

Key words: *gel-electrophoresis with sodium dodecyl sulfate, water-soluble proteins, spring soft wheat, anther culture in vitro.*