

**АДАПТИВНЫЙ ХАРАКТЕР МОЛЕКУЛЯРНОГО ПОЛИМОРФИЗМА И ЕГО
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В РЕШЕНИИ ПРОБЛЕМ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ
РАСТЕНИЙ И СЕЛЕКЦИИ**

Конарев А.В.

При всех очевидных успехах генетической инженерии, мировые генетические ресурсы растений продолжают рассматриваться как основной источник улучшения сельскохозяйственных культур на ближайшие десятилетия. В первую очередь это справедливо в отношении источников сложных, количественных полигенных признаков, контролируемых большим числом генов. К таковым относится большинство экономически и селекционно-важных признаков таких как устойчивость к абиотическим стрессам, качество зерна и признаки продуктивности и вообще все размерные признаки [4,49]. В селекционных программах все большее значение приобретают агроэкологически и технологически специализированные (соответственно их размещению и использованию) сорта и гибриды. Многочисленные данные свидетельствуют в пользу «агроэкологической адресности» селекционных программ [3]. Проблема адаптации существует не только для селекции. Она актуальна на всех этапах сортоиспытания и семеноводства [2,3], а также работы с исходным материалом - генетическими ресурсами растений [33].

Растение следует изменениям окружающей среды двумя способами [48]: индивидуальными процессами экспрессии фенотипической пластичности (норма реакции) и (или) популяционными процессами в поколениях (эволюционные изменения). Количественные признаки представляют в этом плане особую сложность, т.к. они в высокой степени зависят от среды. Allard R. [23] приходит к заключению, что для ряда культурных видов (ячмень, овес, кукуруза и др.) в процессе эволюции реализовывался следующий наиболее важный генетический механизм адаптации: «развитие и стабилизация путем инбридинга благоприятных эпистатических комбинаций аллелей различных локусов, что привело к формированию стабильных мультилокусных генотипов, обеспечивших выдающуюся адаптивность в специфических условиях среды». К менее важным генетическим механизмам этот автор относит элиминацию вредных аллелей и благоприятный эффект от взаимодействия аллелей одного локуса (параллельно сверхдоминированию).

Во многих работах было показано, что приспособляемость (адаптация) осуществляется при дискретных изменениях частот генотипов и (или) аллелей по локусам морфологических

признаков, признаков, обуславливающих устойчивость к неблагоприятным факторам среды, изоферментным локусам, локусам запасных белков и различных ДНК маркерных систем и др. [12,14,23,28]. Также было показано, что анализ адаптивности с использованием маркерных систем, который базируется на динамике частот дискретно наследуемых аллелей локусов разного рода (изоферментов, запасных белков, фрагментов рестрикции, микросателлитов и др.) вполне корректен [1,20,23].

Несмотря на ряд ограничений, молекулярные маркерные технологии имеют явные преимущества перед многими другими подходами к анализу адаптивных процессов в популяциях [1,12,23,14]. В работах отдельных исследователей выявляемый в громадном числе экспериментов молекулярный (белковый и ДНК) полиморфизм объявляется селективно (читай – адаптивно) нейтральным [11]. Следует сказать, что адаптивный характер молекулярного полиморфизма показан в работах многих исследователей. Наиболее убедительно это было сделано для белков [1,12,23]. Известно, что значительная часть генетического материала генома представлена нетранскрибируемыми участками. Давление отбора на такие области не сравнимо с таковым на структурные и регуляторные гены. Специалистам в области белкового и ДНК полиморфизма хорошо известно, что характер полиморфизма в своем проявлении не представляет собой нечто однородное даже внутри одной маркерной системы (т.е. имеет разную степень связи с адаптивностью), не говоря уже о различных белковых и ДНК системах. Какая доля регистрируемой на уровне ДНК или белков изменчивости адаптивна или нейтральна и по отношению к каким факторам среды, более пригодна для решения проблем внутривидового или межвидового полиморфизма и т.д. и т.п. Поэтому и ставится отдельная проблема – отбор адекватных маркерных систем и таковых, пригодных для анализа адаптивных процессов.

В литературе имеется достаточное число убедительных данных, свидетельствующих в пользу связи между распределением соответствующих аллельных комбинаций, или «альтернативных аллельных мультилокусных ассоциаций», компонентов в спектрах белков и фрагментов ДНК и конкретными условиями среды. Адаптивность ДНК полиморфизма в отличие от таковой белкового полиморфизма имеет, как было сказано выше, более сложный характер, поскольку часто не известна функциональная роль компонентов спектра анализируемой ДНК маркерной системы. Так полиморфизм длины рестриционных фрагментов (RFLP) в целом представляет набор генетических маркеров более близких к нейтральным, чем, например, изозимы [48].

Адаптивный характер полиморфизма изучался на многих белковых системах. Начало было положено для ферментов. Роль большинства ферментов в метаболизме, а также в формировании тех или иных признаков известна. Постепенно выясняется вклад в формирование признака отдельных компонентов изоферментного спектра, контролируемых

аллелями гена. Имея маркеры аллелей, можно осуществлять отбор генотипов с желаемыми признаками, а также получить информацию о природе (организации) сложного признака. Так характер полиморфизма 4 из 14 изученных изоферментных локусов у популяций ячменя из Испании оказался четко связанным с уровнем осадков и температурой [48]. Allard R. [23] приводит пример 14-локусного «холодостойкого» генотипа *Avena barbata*, который с высокой частотой встречается в северной части испанского центрального плоскогорья. «Молекулярная адаптация» в условиях этой холодной зоны просматривается особенно четко, если рассмотреть ассоциацию только из 4-х локусов. «Северные генотипы» оказались сосредоточенными исключительно в узкой области с четкими характеристиками по числу морозных дней в году и низкой средней весенней температурой.

Корреляции между распределением мультилокусных ассоциаций и температурой наблюдали также у испанских озимых местных сортов овса. Частоты двух альтернативных аллельных мультилокусных ассоциаций, включающих 6 изоферментных локусов четко коррелировали с «теплым» и «холодным» ареалами. Авторы заключают, что температура, в частности, число морозных дней определяет распределение генотипов в популяции [48]. Для популяций *Avena barbata* в Калифорнии количество осадков является лимитирующим фактором в адаптивном распределении генотипов, маркируемых группой изоферментных локусов [48].

Свидетельства в пользу адаптивного характера распределения аллелей супероксиддисмутазного (СОД) локуса Sod S у ярового ячменя на территории бывшего СССР приведены в работе В.П.Нецветова с соавторами [13]. Установлено, что частота встречаемости быстроподвижного изозима, соответствующего аллелю Sod S2 уменьшается с севера на юг от 31,8% до 10%, а при продвижении с запада на восток – от 12% до 50%. Поскольку генотипы ячменя, имеющие этот изозим, обладают лучшей устойчивостью к кислым почвам, обнаруженный характер географического распределения аллеля Sod S2 кажется вполне логичным, поскольку он согласуется с распространением кислых почв по территории бывшего СССР. Не менее важным является вывод о том, что наибольшее распространение Sod S2 имеет среди старых сортов. То, что за 60 лет селекции частота встречаемости Sod S2 уменьшилась более чем в два раза, свидетельствует, по мнению авторов, что отбор был направлен в сторону «выделения более интенсивных генотипов, но менее приспособленных к неблагоприятным условиям, т.е. в сторону аллеля Sod S1» [13]. Электрофоретический маркер аллеля Sod S2, очевидно, может быть использован в анализе генетического разнообразия ячменя для отбора генотипов с повышенной устойчивостью к кислым и засоленным почвам.

Большое число примеров, свидетельствующих в пользу адаптивного характера полиморфизма запасных белков семян, мы находим в монографиях В.Г.Конарева [8] и А.А.Созинова [20], а также в других публикациях этих и многих других исследователей [12,14,18,21,54]. Рядом примеров может быть аргументирован адаптивный характер

полиморфизма, выявляемого по локусам фрагментов рестрикции [32,41,44], микросателлитных локусов и RAPD спектров [46,52]. Возникает вопрос, отражает ли молекулярный полиморфизм маркерной системы ее непосредственное участие в процессе адаптации (см. выше о локусе Sod S), либо с его помощью возможно только маркировать изменения в адаптивно значимых генетических системах (например в генных ансамблях количественных признаков).

А.А.Созинов [21] считает более вероятным, что аллельные варианты белков служат эффективными маркерами генетических систем, определяющих выраженность количественных признаков. Для изоферментных систем четко показана их собственная роль в адаптации. [13,27,47]. Адаптивная роль проламинов в эволюции злаков [19], а также других запасных белков растений, кажется, также не вызывает особых сомнений [8,37]. Видимо, надо признать, что полиморфизм основных белковых маркерных систем – изоферментов, запасных белков (проламинов злаков, глобулинов двудольных), ингибиторов протеолитических ферментов (см. наст. сборник, статью Ал.В. Конарева) все же несет определенную адаптивную нагрузку. Оценить ее адекватно – крайне сложно, поэтому возрастает ответственность за корректность интерпретации полученных данных.

Существует мнение, что адаптивность происходит от действия главных и минорных генов, на базе которых формируется более или менее сложный «ко-адаптивный генный комплекс». Согласно другим воззрениям, адаптивность – есть результат суммарного эффекта действия многих аллелей с малым эффектом, а главные или менделевские гены прямо в адаптацию не вовлекаются. Но роль главных генов в адаптивности в последнее время снова активно обсуждается [40,45], в частности в связи с их ролью в адаптации к быстро изменяющимся условиям окружающей среды [40]. В любом случае адаптивность все исследователи связывают со многими генами, действие которых сильно зависит от окружающей среды. Можно предположить, что многие достаточно простые с малым числом локусов маркерные системы, такие как, например проламины служат эффективными маркерами генетических систем, определяющих степень выраженности важнейших адаптивно значимых количественных признаков [21], другими словами: проламины и еще ряд эффективных мультиаллельных маркерных систем с малым числом генных локусов являются маркерами уже упомянутого выше [1] адаптивного генного комплекса [6] или благоприятных эпистатических комбинаций аллелей различных локусов, обеспечивающих стабильные мультилокусные генотипы с высокой адаптивностью в специфических условиях среды [23]. В наших исследованиях это подтверждается, в частности, наличием четко выраженной связи между уровнем морозостойкости озимых мягких пшениц и присутствием или отсутствием в их глиадиновых спектрах специфических комбинаций компонентов этого белка [6] (см. наст. сборник статью Губаревой и Алпатьевой). Такая же связь обнаружена между распределением

типов спектра глиаина у образцов пшеницы спельта и эколого-географической классификацией этой культуры [18].

А.А.Поморцев с соавторами [15] показали разнонаправленные изменения по локусам, контролирующим гордеины ячменя, пленчатость/голозерность и рядность колоса при репродукции межсортовых гибридных популяций в Москве и на Памире. И таких примеров можно привести достаточно много [8,12,14,20]. Механизм таких связей можно объяснить опять же только с позиций признания адаптивного характера полиморфизма запасных белков, обусловленного множеством аллельных вариантов этих белков. Не исключено при этом, что «отобранные» в результате адаптивных изменений компоненты проламина могут нести собственную функциональную адаптивную нагрузку как это, например, рассматривает В.Ф.Семихов [19]. С другой стороны, структурную и функциональную сопряженность всех генетических и морфогенетических систем в организме В.Г.Конарев [7,8,12] рассматривает как одну из главных предпосылок в разработке методов маркирования этих систем.

В практике использования белковых и других молекулярных маркеров часто возникает вопрос об уровне такой сопряженности, особенно когда с использованием молекулярного полиморфизма по мультиаллельному локусу не удается маркировать те или иные адаптивные сдвиги или, например, различить близкородственные сорта. Вероятно, это можно объяснить различиями в формировании адаптивных изменений в генах разных полиморфных локусов. Хорошо известно, что некоторые сорта пшеницы неразличимые по спектрам глиаина, в тоже время дифференцируются по спектрам глютеинов или ингибиторов протеаз [12] (см. также наст. сборник). Здесь скорее речь может идти не о более тесной сцепленности маркера с признаком, а о более сходном «адаптивном поведении» генетических систем. Таким образом, мы снова приходим к выводу о важности фундаментального обоснования и выбора маркерных систем для решения конкретных проблем генетических ресурсов растений, селекции, семеноводства и т.д. Но в любом случае, нет идеальных молекулярных маркеров [55]. Последние также не являются инструментами, использование которых в изоляции от других подходов, обеспечат успех в решении той или иной проблемы [10].

Наличие во ВНИИР им. Н.И.Вавилова мирового генофонда по большинству ведущих культур создает благоприятные условия для развития методологий и методов исследований исходного и селекционного материала в том числе и молекулярно-биологических. Последние всегда разрабатывались на базе всего доступного генетического разнообразия культуры, включая дикорастущих сородичей [5,7,12]. Особое внимание уделялось разработке эффективных методов для использования их в сортоиспытании, селекции, семеноводстве и семенном контроле.

Молекулярные маркеры чаще всего используются для маркирования аллелей локусов, участков хромосом или целых хромосом (см. статью Т.И.Пеневой и др. в наст.

выпуске), а также генотипов по принципу «отпечатков пальцев». Последнее применение наряду с маркерной селекцией (селекцией, сопровождаемой молекулярными маркерами) получило за последние два десятилетия, пожалуй, наибольшее распространение в практике. Речь идет об использовании спектров запасных белков семян в идентификации сортов и семенном контроле [7,8,34].

В работе с ГРР, а равно и в решении проблем селекции и семеноводства, где анализируется множество объектов, одним из важных требований к маркерным системам является воспроизводимость результатов и доступность для широкого использования, особенно если ставится задача разработки стандартных и арбитражных методов [5,9,12]. Спектры запасных белков семян остаются неизменными часто в течение многих десятков лет [51]. Воспроизводимость результатов электрофореза запасных белков хорошая [8,20,24,26]. Наличие большого числа аллельных вариантов по гену (одному или группам тесно сцепленных генов сложных локусов) обеспечивает электрофоретический полиморфизм проламинов, глютелинов, а также запасных белков семян других культур. Большое число суммарных типов спектров обусловлено множеством комбинаций аллельных вариантов. В целом же, то, что для многих культур практически каждому сорту, дикорастущему образцу и составляющим их популяции биотипам соответствуют свои собственные, характерные только для них электрофоретические спектры таких белков – их «отпечатки пальцев», непосредственно (тесно) связано с адаптивным характером полиморфизма маркерных белков. Адекватность характера полиморфизма запасных белков семян отличиям на уровне генотипов и сортов обеспечивает успех в маркировании этих генетических систем. Поэтому с использованием запасных белков семян в качестве маркеров связаны реальные практические достижения в идентификации и регистрации сортов важнейших сельскохозяйственных культур, в семеноводстве и семенном контроле, что закреплено в решениях такой авторитетной международной организации как ISTA и ряда других [29,30,34].

С 1922 года вся мировая активность в области семенного контроля объединяется под эгидой ISTA (Международная Ассоциация по Испытанию Семян). Статья 3 Конституции ISTA определяет первоочередной задачей Ассоциации **«...разработку, утверждение и опубликование стандартных процессов (методов) отбора образцов и испытания семян, а также обеспечение единообразного применения таких процессов для оценки семян в международном масштабе».**

Сотрудничество ВИРа с ISTA в области разработки методов сортовой идентификации с использованием электрофореза белков началось в 1972-1973 гг. **Разработанные в ВИРе методы сортовой идентификации по белкам были в 1980 году рекомендованы 19-м конгрессом ISTA к использованию в семеноводстве и семенном контроле и приняты конгрессом ISTA в 1983 году как стандартные для идентификации сортов пшеницы и**

ячменя. Биохимической идентификации сортов был посвящен ряд симпозиумов, один из которых был проведен на базе ВИР в 1987 г. В 1989 году на XII конгрессе EUCARPIA в Геттингене (Германия) организация работы секции «биохимические методы идентификации сортов» была поручена ВИРу.

На протяжении ряда лет отдел молекулярной биологии ВИРа участвовал в разработке международных стандартных арбитражных методов идентификации сортов пшеницы, ячменя, райграса, гороха, кукурузы и овса электрофорезом белков семян, которые были потом включены в Международные правила семенного контроля [34]. На подходе для включения в Международные Правила семенного контроля методы электрофореза для подсолнечника, рапса, хлопчатника и свеклы.

Все эти годы ВИР активно сотрудничал по вопросам разработки стандартных методов идентификации сортов с Госкомиссией по сортоиспытанию и Семенной инспекцией. С 1982 года ВИР по договору с Госкомиссией по сортоиспытанию регистрировал в виде белковых формул поступающие на испытание сорта многих культур для оценки их на «оригинальность», «однородность» и «стабильность». Это, прежде всего, пшеница, ячмень, рожь, овес, кукуруза, ежа, овсяница и райграс, горох. Для пшеницы белковые формулы включались в ежегодные Государственные реестры сортов.

В 1989 году под патронажем Госагропрома СССР (ВАСХНИЛ, ВИР и Госкомиссия по сортоиспытанию сельскохозяйственных культур) были выпущены «Рекомендации по использованию белковых маркеров в сортоиспытании, семеноводстве и семенном контроле [17]. Рекомендации были утверждены научно-техническим советом Госагропрома СССР 15 декабря 1988 года. При подготовке Рекомендаций учтен многолетний опыт работы биохимической группы ISTA и ВИРа по подготовке стандартных арбитражных методов электрофореза белков для Международных Правил семенного контроля. В ноябре 2000 года Министерством сельского хозяйства РФ было издано распоряжение о том, что «...элитные семена всех сортов пшеницы и ячменя, предназначенные для реализации, подлежат определению их сортовой принадлежности методом электрофореза». В ближайшем будущем предполагается распространить аналогичные методики лабораторного контроля и на другие сельскохозяйственные культуры.

Использование ДНК-маркерных технологий привлекает исследователя прежде всего возможностью работать с самим носителем наследственной информации. Однако для наиболее простых в исполнении методов (RAPD) характерны плохая воспроизводимость и доминантный характер маркера (невозможность различения гомо- и гетерозиготных генотипов). Более совершенные методы трудоемки и дороги в исполнении [5,10,36]. Заключение о недостаточной готовности ДНК-маркерных технологий для широкого использования в

сортовой идентификации и семенном контроле сделано специальной Рабочей Группой ISTA (ISTA NB. No 113, 1997).

Во многих работах зарубежных исследователей последних лет [36,42-44] отмечается, что разные ДНК-маркерные системы (в первую очередь, наиболее доступные такие как RFLP, RAPD, AFLP) достаточно широко и эффективно используются для выяснения степени родства (или генетических связей) на внутривидовом и межвидовом уровнях (см. наст. выпуск, статьи П.П.Стрельченко и др.; И.Н.Перчук и др.). Успехи, достигнутые использованием ДНК-маркерных систем в решении самых разных проблем биологии и сельского хозяйства очевидны. В последние годы достигнут значительный прогресс в развитии ДНК-маркерных технологий с целью их широкого практического использования в сортоиспытании, семеноводстве и семенном контроле. Значительное количество серьезных публикаций на эту тему можно найти в журнале «Plant Varieties and Seeds». По мнению авторитетных в этой области специалистов разные ДНК тесты находятся сейчас в развитии и очень перспективны в будущем для сортовой идентификации. С их помощью можно получать ценную информацию о свойствах сортов, а также более фундаментально обосновывать «различимость новых сортов, предлагаемых для регистрации» [38]. Тем не менее, в настоящее время белковым спектрам отдается предпочтение «как лучшим индикаторам генотипа» [56]. В ряде работ все проблемы идентификации и регистрации сортов (и генетических ресурсов растений в целом), практические проблемы рациональной организации коллекций предлагается решать исключительно с использованием ДНК-маркеров [42]. Впрочем, при этом не приводится ни одной разработанной системы идентификации и регистрации генетических ресурсов культуры или группы культур с использованием ДНК-маркерных систем.

Преимущества белкового полиморфизма по сравнению с таковым некоторых ДНК маркерных систем для дифференциации и идентификации генотипов помимо других причин во многом обусловлены более адекватным характером адаптивного полиморфизма соответствующих белковых систем. Об этом свидетельствуют многочисленные данные, а также приведенные выше примеры адаптивного характера полиморфизма проламинов.

Международный союз по защите новых сортов (UPOV) постоянно подчеркивает важность использования для тестирования отличимости, однородности и стабильности сортов характеристик сортов свободных от влияния окружающей среды и которые могут быть интерпретированы генетически.. Проблема различимости сортов особенно остро встала перед UPOV, а теперь и перед Госкомиссией РФ по охране селекционных достижений с появлением большого числа сортов, имеющих минимальные генетические отличия (например, сорта аналоги). В ряде случаев такие сорта могут быть неразличимы и стандартными методами белкового анализа. Для пшеницы это спектры глиаина и глютеина. Такие сорта предлагается

различать грунт контролем **по полной схеме признаков UPOV или по таковой принятой в стране** [35]. В ВИРе для этих целей успешно применяются другие белковые маркеры, например ингибиторы протеолитических ферментов [12] (см. также статью Ал.В.Конарева в наст. сборнике). Для тестирования таких трудно различимых сортов использование грунт контроля при посеве «рядом» (side-by-side) обязательно. К решению такого рода проблем активно привлекаются ДНК маркеры [38]. **Нельзя не согласиться с авторами данной работы - и это подтверждено многолетним опытом исследований в ВИРе [6,9,12], что для каждой культуры должны подбираться оптимальные маркерные системы и это потребует кропотливой работы: «культура за культурой – маркер за маркером» [38].**

В процессе распространения маркерных технологий на новые виды и культуры неизбежно возникают трудности как объективного, так и субъективного характера. Часто для нового объекта метод идентификации отрабатывается на ограниченном наборе образцов, нерепрезентативном для культуры (вида) в целом. **Т.о. уровень полиморфизма и его характер (в том числе адаптивный) для используемой маркерной системы остается неясным.** Использованные маркерные техники порой не отвечают основным требованиям, предъявляемым к стандартным методикам. Смешиваются понятия «идентификация» и «дифференциация» или различение сортов, генотипов (биотипов) и т.п. Предлагая новые методы «идентификации» сортов, образцов, гибридов, повышения эффективности и качества семеноводства и семенного контроля, разработчики часто не знакомятся с соответствующими нормативными документами, регламентирующими деятельность государственных или иных структур, имеющих дело с сортоиспытанием, семенным контролем и семеноводством. «Сортовая чистота», «подлинность», «оригинальность», «стабильность» сортов - характеристики, для оценки которых пригодны методы, прошедшие всесторонние испытания и зарекомендовавшие себя на практике [16,17,34]. Для того чтобы идентифицировать сорт, генотип, гибрид, линию, клон (узнать его с использованием белковых или иных спектров в любой ситуации) **необходимо иметь каталоги и базы данных спектров, охватывающие генетическое разнообразие культуры или в целом вида, в том числе всех допущенных к использованию сортов.**

У белков как молекулярных маркеров наряду с определенными недостатками и преимуществами есть еще одно принципиально важное. Наиболее часто и эффективно используемые белковые маркерные системы в подавляющем большинстве были отобраны среди множества разнообразных белков в результате многолетнего биохимического и генетического изучения генофондов культур [8,20,25]. Теперь специалисты в области применения ДНК маркерных технологий называют этот этап предскринингом маркерных систем, который является необходимым элементом работы с большинством ДНК маркерных систем [36,39,43,50].

Так для РАПД анализа – этот принципиальный момент работы соответствует отбору из множества (как правило, из нескольких сотен) случайных праймеров (наборов случайных последовательностей ДНК), небольшого числа таких, которые обеспечивают соответствующий поставленным задачам уровень полиморфизма электрофоретических спектров или праймеров, формирующих спектры ДНК, имеющие адаптивный характер полиморфизма. Следующий этап работы – это отбор компонентов в электрофоретических спектрах, которые следует учитывать при обработке данных и которые включаются в матрицу для статистической обработки результатов по оценке генетического полиморфизма или генетической дифференциации биоразнообразия.

В результате такого предскрининга (scoring of patterns) исследователь реально имеет дело с отобранными электрофоретическими компонентами, соответствующими ограниченному числу эффективных для решения данной задачи генных локусов. Т.е. даже при таком «простом» и быстром как РАПД подходе каждый исследователь всякий раз должен просеивать громадное число последовательностей, чтобы отобрать подходящие для решения конкретной задачи. Так П.П.Стрельченко при анализе дифференциации разнообразия мягкой пшеницы с использованием RAPD маркеров отобрал в ходе первичного скрининга из 700 праймеров только 28, которые выявляли полиморфизм у изучаемого набора сортов (Стрельченко и др., см. наст. сборник). Таким образом, используемые для генетической дифференциации биоразнообразия наиболее популярные техники анализа ДНК полиморфизма реально базируются на относительно небольшом числе анонимных локусов. Последние по имеющимся данным, впрочем, могут быть равномерно распределены по хромосомам [31]. По этим характеристикам белковые маркерные системы уступают ДНК. Так у гексаплоидной пшеницы главные маркерные белки проламины контролируются кластерами генов только шести, хотя и сильно полиморфных локусов. Однако, по данным ряда исследователей, проводивших в последнее время сравнение возможностей анализа ДНК полиморфизма (RAPD, RFLP) и полиморфизма проламинов для генетической дифференциации биоразнообразия пшеницевых злаков, использование полиморфизма проламинов оказалось более эффективным.

В обзоре A. Karp and K. Edwards [36] прямо указывается на серьезные ограничения при использовании для анализа генетической дифференциации растительного биоразнообразия мультилокусных мультиаллельных маркерных систем. К таковым относятся популярные VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) маркерные системы, базирующиеся на микросателлитах и минисателлитах. Причины подробно анализируются рядом авторов. Оказалось, что статистические методы, необходимые для оценки результатов анализа популяций по многим, да еще мультиаллельным локусам в этих случаях оказываются практически мало пригодными (очевидно, как в целом из-за наличия слишком большого количества лишней - непригодной информации).

Большинство исследователей сходятся на том, что проблема может быть решена путем использования ограниченного числа заранее отобранных локусов, т.е. всякий раз нужна большая предскрининговая работа. А это долго и дорого [39,50,36]. Большинство же эффективно работающих белковых маркерных систем, как было сказано выше, были отобраны в результате предварительных обстоятельных исследований. В ряде случаев показано хорошее совпадение данных по дифференциации разнообразия различных культур, полученных с использованием полиморфизма белков (чаще всего – проламинов) с существующими сведениями по эколого-географической дифференциации этих культур [12,18,53]. Накоплено много свидетельств в пользу того, что полиморфизма, по нескольким генным локусам (у гексаплоидной пшеницы - по шести сложными мультигенным локусам глиадинов) может быть достаточно для выяснения характера взаимосвязей (родства) между образцами. Другое дело, насколько правильно выбрана маркерная система, каким образом подбирается материал для исследований и корректно ли обсуждаются результаты. Таким образом, большое значение имеет «качество» используемых маркерных систем, их пригодность для решения конкретной задачи. Теория и практика многолетних исследований свидетельствует, что число таких маркерных систем ограничено и их еще надо найти.

Дифференциация пшеницы спельты была проведена нами с использованием полиморфизма по локусам глиадинов [18]. При этом удалось не только получить хорошее совпадение генетической группировки образцов с основными эколого-географическими группами спельты, но и предложить более детальную дифференциацию генофонда культуры. Упомянутые выше работы по генетической дифференциации биоразнообразия по молекулярным маркерам служат не только целям генетической структуризации коллекций. Скрининг генофонда с использованием молекулярных маркеров – эффективный инструмент контроля за состоянием коллекций (генетическая целостность или подлинность образцов, наличие дублетных образцов, наличие технических ошибок в определении образцов и т.д.). Все это в конечном счете, вместе со знанием генетической структуры коллекции является важными элементами формирования рационально организованных коллекций, обеспечивающих высокую эффективность сохранения и использования генетического разнообразия в селекции.

Наглядным примером использования адаптивного характера полиморфизма белков является его применение для контроля за генотипическим составом популяций. Для практической селекции, семеноводства, а также для генных банков, где в процессе хранения и репродукции образцов коллекции могут происходить неконтролируемые изменения генотипического состава, спектры изоферментов и запасных белков – эффективный инструмент для анализа и управления генетической структурой популяций. Проблеме контроля за генетической целостностью репродуцированных и сохраняемых *ex situ* образцов посвящена статья Н.В.Алпатьевой и Н.К.Губаревой (см. наст. сборник), а также ряд других публикаций

[5,12,54]. Эффективность использования белкового полиморфизма для сопровождения селекции показана во многих работах в том числе на примере пшеницы (см. наст.сборник статью Губаревой, Алпатьевой) и ржи [14]. Белковые маркеры успешно используются наряду с полевой апробацией для определения сортовой чистоты при семеноводстве и семенном контроле. Метод позволяет вести отбор элитных растений и потомств. Особенно эффективны белковые маркеры в последующих звеньях первичного семеноводства – питомниках испытания потомств и питомниках размножения, где обязателен контроль за появлением нетипичных для сорта растений. Нетипичные формы растений могут быть выявлены путем позернового анализа. В ряде случаев в ходе элитного семеноводства может нарушаться биотипный (генотипный) состав сорта, а значит, могут измениться его характеристики [2]. Контроль посредством электрофореза белков отдельных семян очень эффективен для решения этих практических вопросов и может резко поднять качество семеноводства и сократить сроки создания элиты с 7 до 5 лет, что продемонстрировано на многих примерах [17,34]. Наиболее наглядно это продемонстрировано на примере первичного семеноводства сорта ячменя Криничный [16]. Использование электрофореза белков в семеноводстве и семенном контроле и, в частности, для конкретных культур и групп культур описано в соответствующих методических указаниях и рекомендациях, перечень которых приведен в специальной работе В.Г.Конарева [9]. В настоящий сборник включена статья А.В.Конарева, И.Н.Перчук и С.Накаяма, в которой продемонстрирована эффективность использования спектров запасных белков для контроля качества семеноводства сортов ежи сборной. Адаптивный характер полиморфизма проламинов в совокупности с используемой системой учета, регистрации и обработки данных по частотам встречаемости спектров [12] позволяют надежно фиксировать изменения, происходящие в генотипическом составе семенных репродукций в различных условиях окружающей среды.

И так, в результате многолетних исследований показан адаптивный характер полиморфизма многих белковых систем, в частности, запасных белков семян большинства культурных растений и их диких сородичей. Это позволяет успешно использовать этот полиморфизм для осуществления надежной дифференциации и идентификации генотипов (биотипов) растений, а также для анализа многих генетических процессов, связанных с адаптацией к условиям среды и протекающих в популяциях в естественных условиях, в ходе селекции и в процессе семеноводства, при репродукции образцов в генных банках и др.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. М.: Наука, 1988, 328с.
2. Бриггс Ф., Ноулс П. Научные основы селекции растений. М., «Колос». 1972, 398с.

3. Жученко А.А. Эколого-генетические основы адаптивного семеноводства. Тезисы конференции «Семя» (Москва, декабрь, 1999). 1999: 10-49
4. Картель Н.А., Макеева Е.Н., Мезенко А.М. Генетика. Энциклопедический словарь. Минск. «Тэхналогія». 1999: 275.
5. Конарев А.В. Использование молекулярных маркеров в работе с генетическими ресурсами растений. Сельскохозяйственная биология. 1998, 5: 3-25.
6. Конарев А.В., Конарев В.Г., Губарева Н.К., Пенева Т.И. Белки семян как маркеры в решении проблем генетических ресурсов растений, селекции и семеноводства. Цитология и генетика. 2000, 34, 2:91-104
7. Конарев В.Г. Принцип белковых маркеров в генетическом анализе исходного и селекционного материала. Физиология растений в помощь селекции. М., 1974 : 242-269
8. Конарев В.Г. Белки растений как генетические маркеры. М.: Колос, 1983, 320с.
9. Конарев В.Г. Молекулярно-биологические исследования генофонда культурных растений в ВИРе (1967-1997). Спб.: ВИР.1998, 97с.
10. Конарев В.Г. Морфогенез и молекулярно-биологический анализ растений. Спб., ВИР, 1998: 370с
11. Кимура М. Молекулярная эволюция: теория нейтральности. М.: «Мир».1985: 394с.
12. Молекулярно-биологические аспекты прикладной ботаники, генетики и селекции. Теоретические основы селекции. Том I.(под ред. В.Г.Конарева) М.: Колос, 1993, 447с.
13. Нецветаев В.П., Поморцев А.А., Крестников И.С. Распределение аллелей супердиоксидмутазного локуса в культуре ярового ячменя по территории бывшего СССР. Генетика. 1995, 31, 12: 1664-1670.
14. Пенева Т.И., Конарев В.Г., Кобылянский В.Д., Лапиков Н.С. Анализ полиморфизма по спектрам секалина в процессе становления сорта озимой ржи Ильмень. Сельскохозяйственная биология, 1998, 1: 55-62
15. Поморцев А.А., Калабушкин Б.А., Бланк М.Л., Бахронов А. Изучение естественного отбора в искусственных гибридных популяциях ярового ячменя. Генетика. 1996, 32,11: 1536-1544.
16. Применение электрофореза белков в первичном семеноводстве зерновых культур. Методические указания (под ред. В.Г.Конарева и В.Г.Еникеева). Санкт-Петербург, ВИР, 1993, 42с.
17. Рекомендации по использованию белковых маркеров в сортоиспытании, семеноводстве и семенном контроле (под ред. В.Г.Конарева). Москва-Ленинград, Госагропром СССР, ВИР, 1989, 20с.

18. Романова Ю.А., Губарева Н.К., Конарев А.В., Митрофанова О.П. и др. Исследование коллекции вида пшеницы *Triticum spelta* L. по полиморфизму глиадинов. Генетика. 2001, т.37, 9: 1258-1265
19. Семихов В.Ф., Арефьева Л.П., Новожилова О.А. Адаптивные типы проламинов, специализированных белков семян злаков. Физиология растений. 2000,3:303-321.
20. Созинов А.А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции. М.: Наука, 1985.
21. Созинов А.А. Генетические маркеры у растений. Цитология и генетика. 1993, 23, 5:3-14.
22. Фарбер С.П., Артемьева А.М. Полиморфизм основного запасного белка семян видов рода *Brassica* L. Сельскохозяйственная биология. 2000, 3: 17-23.
23. Allard R.W. Genetic basis of the evolution of the adaptedness in plants. Adaptation in plant Breeding (Ed. P.M.A. Tigerstedt). 1997:1-12.
24. Autran J.C. and Bourdet A. L'identification des varietes de ble: etablissement d'un tableau general de determination fonde sur le diagramme electrophoretique des gliadines du grain . Ann. Amelior. Plantes, 1975, 25, 3: 227-301.
25. Biochemical Identification of Varieties. Materials III Intern. Symp. ISTA(Leningad, 1987) (Eds. Konarev V., Gavriljuk I). 1988, 257p.
26. Bushuk W. and Zillman R. Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams . I. Apparatus, method and nomenclature. Can. J. Plant Sci., 1978, 58: 505-515.
27. Bergman F., Gregorius H.R. Ecogeographical distribution and thermostability of isocitrate dehydrogenase (IDH) allozymes in European silver Fir (*Abies alba*). Biochem Syst. Ecol 1993. 21:597-605
28. Clegg M.T., Allard R.W. Patterns of genetic differentiation in the slender wild oat species *Avena Barbata*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:1820-1824.
29. Cooke R.J. The standartization of electrophoresis methods for variety identification. In: Biochemical Identification of varieties (Materials III International Symposium ISTA, Leningrad, USSR, 1978), VIR, Leningrad, USSR, 1988: 14-27.
30. Cooke R.J. Modern methods for cultivar verification and the transgenic plant challenge. Abstracts of 25th International Seed Testing Congress (Pretoria, April 15-24, 1998), ISTA, Zurich, 1998: 9-10.
31. Devos K.M., Gale M.D. The use of random amplified DNA markers in wheat. Theor. Appl. Genet. 1992, 84: 567-572.
32. Graner A.E., Bauer A.,Kellerman G. RFLP analysis of resistance to the barley yellow mosaic virus complex. Agronomie. 1995.15:475-479.

33. Hawtin G., Ivanga M., Hodgkin T. Genetic resources in breeding for adaptation. *Adaptation in plant Breeding* (Ed. P.M.A. Tigerstedt). 1997:277-288.
34. International Rules for Seed Testing. Rules 1996. Verification of species and cultivar. *Seed Sci.& Technol.*, 1996, 24 (Supplement): 253-270.
35. Jarman R.J., Jones H. A MAFF funded project to manage and rationalise variety reference collections in testing for Distinctness, Uniformity and Stability (DUS) using winter wheat *T.aestivum* as example species. *Plant Var. and Seeds*. 1999, 12:221-223.
36. Karp A. and Edwards K. Molecular techniques in the analysis of the extent and distribution of genetic diversity. *Molecular genetic techniques for plant genetic resources. Report of an IPGRI Workshop, October 1995, Rome, Italy*, 1997: 11-22.
37. Kreis M., Shewry P.R., Forde B.G., Forde J., Miflin B.J. Structure and evolution of seed proteins. *Oxford Surveys of Plant Molecular & Cell Biolohy*. 1985, 2: 253-317.
38. Law J.R., Cooke R.J., Reeves J.C., Donini P., Smith J.S.S. Most similar variety comparison as a grouping tool. *Plant Varieties and Seeds*. 1999, 12: 181-190
39. Lynch M. The similarity index and DNA fingerprinting. *Mol. Biol. Evol.* 1990,7:478-484.
40. Macnair M.R. Why the evolution of resistance to anthropogenic toxins normally involves major genes: the limits to natural selection. *Genetica*. 1991,84: 213-219.
41. Martin B.J., Nienhuis G. Restriction fragment length polymorphism associated with use efficiency in tomato. *Science (Washington, D.C.)*. 1989. 243: 1725-1728.
42. *Molecular genetic techniques for plant genetic resources. Report of an IPGRI Workshop 9-11 October 1995 Rome, Italy*. Editors: Ayard W.G., Hodgkin T., Jaradat A., and Rao V.R. IPGRI, 1997: 137p.
43. Newbury H.J., Ford-Lloyd B.V. The use of RAPD for assessing variation in plants. *Plant Grow Regulation*. 1993, 12:43-51.
44. O'Donoghue L.S., Souza E., Tanksley S.D., Sorrels M.E. Relationships among North American oat cultivars based on restriction length polymorphism. *Crop Sci*. 1994, 34:1251-1258.
45. Orr H.A., Coyne J.A. The genetics of adaptation: A reassessment. *Am Nat*. 1992, 140:725-742.
46. Ordon F., Bauer E., Friedt W. Marker based selection for the *ym4* BaMMV-resistance gene in barley using RAPDs. *Agronomie*. 1995, 15: 481-485.
47. Parsnon P.A. Evolutionary rates under environmental stress. *Evol. Biol*. 1987. 21:311-347.
48. Perez de la Vega. Plant genetic adaptedness to climatic and edaphic enviroment. *Adaptation in plant Breeding* (Ed. P.M.A. Tigerstedt). 1997:27-38.
- 49 Rieger R., Michaelis A., Green M.M. *Glossary of Genetics. Classical and Molecular*. Springer-Verlag. 1991. 553p.

50. Scribner K.T., Arntzen J.W., Burke T. Comparative analysis on Intra- and Interpopulation genetic diversity on *Bufo bufo* using allozyme, single locus microsatellite, Minisatellite and multilocus mini-satellite data. *Mol.Biol.Evol.* 1994, 11: 737-748.
51. Schulze A., Steiner A. and Ruckenbauer P. Variability of an Austro-Hungarian landrace of barley (*Hordeum vulgare* L.) - Electrophoretic analysis of the hordeins of the Vienna sample of 1877. *Varieties and Seeds.* 1994, 7: 193-197
52. Strelchenko P., Kovaleva O., Okuno K. Genetic differentiation and geographical distribution of barley germplasm based on RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution.* 1999, 46:193-205.
53. Strelchenko P., Gubareva N., Kovaleva O., Graner A. Geographical and breeding trends within Eurasian cultivated barley germplasm revealed by molecular markers. *Plant Genetic Resources. Characterization and Evaluation.* NIAR, Tsukuba, Japan. 1998:115-133.
54. Vvedenskaja I.O., Alpatyeva N.V., Gubareva N.K. and Konarev A.V. Use of storage protein electrophoresis in the analysis of genetic resources of some cereals. *Erhaltung and Nutzung pflanzengenetischer Ressourcen - eine internationale Aufgabe für Naturschützer, Genbanken und Pflanzenzüchter.* Vorträge für Pflanzenzüchtung, 1993, 25: 187-201.
55. Weising K., Nybom H., Wolff K. and Meyer W. DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press, 1995, 322p.
56. Wrigley C.W., Batey I.L. Methods for establishing: distinctness of cereal-grain genotype in cultivar registration. *Plant Varieties and Seeds.* 1999. 12: 169-179.

Д-р биол н-к, проф. Конарев А.В. Всероссийский НИИ растениеводства им. Н.И.Вавилова (ВИР), 190000, С.-Петербург, ул. Большая Морская, 42. E-mail: a.konarev@vir.nw.ru

АДАПТИВНЫЙ ХАРАКТЕР МОЛЕКУЛЯРНОГО ПОЛИМОРФИЗМА И ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В РЕШЕНИИ ПРОБЛЕМ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ РАСТЕНИЙ И СЕЛЕКЦИИ

Конарев А.В.

Обсуждаются проблемы молекулярного полиморфизма и возможности его использования для решения теоретических и прикладных проблем генетических ресурсов растений, селекции. Адаптивный характер полиморфизма наиболее широко используемых белковых маркерных систем рассматривается как важнейший аргумент для успешного использования белковых спектров не только в идентификации генетических ресурсов растений, но и для генетической дифференциации биоразнообразия, а также анализа генетических процессов происходящих в популяциях в естественных условиях, в ходе репродукции, селекции, семеноводства.