

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СОХРАНЕНИЯ БИОРАЗНООБРАЗИЯ *EX SITU*

А. В. Конарев, Н. К. Губарева, И.П.Гаврилюк, Т.И.Пенева, И.Н.Перчук, И.Г.Лоскутов
Государственный научный центр РФ Всероссийский НИИ растениеводства им.
Н.И.Вавилова a.konarev@vir.nw.ru

Одной из основных задач генных банков является *ex situ* сохранение образцов коллекции (генетического разнообразия) без изменения их (его) генетической конституции, или генетической целостности (genetic integrity). В генных банках и центрах генетических ресурсов растений помимо длительного хранения существует необходимость воспроизводства образцов для передачи в селекционные центры, а также для изучения. Необходимо свести к минимуму изменения образцов (генетическую эрозию) посредством мутаций, селекции, случайного дрейфа или засорения [5,10-13]. Контроль за генетической целостностью – подлинностью и чистотой хранимого и периодически пересеваемого материала – обязанность генного банка. Очевидно, что нужна экономически эффективная и генетически обоснованная процедура поддержания образцов коллекции. В ВИР им. Н.И.Вавилова в течение многих лет воспроизведение образцов коллекций, как правило, осуществлялось в условиях оптимальных для сохранения оригинальной генетической конституции каждого образца. К таковым относятся: репродукция в соответствующих почвенно-климатических условиях образца определенного размера, условия изоляции (особенно для перекрестноопыляющихся видов), исключение механических примесей и т.д.

Контроль за генетической целостностью образцов традиционно осуществляется с использованием морфологических признаков. Образцы часто представляют собой разной сложности смеси генотипов (биотипов). Идентифицировать их, как правило, трудно, поскольку надежных морфологических маркеров мало [3,7,11]. Наличие же в популяциях (образцах) генетического полиморфизма часто придает особую ценность для селекции такому сохраняемому материалу [1].

Так в коллекции ВИР хранятся старые и местные сорта различных культур – ценные как источники экономически важных признаков [1,6,7]. Эти образцы чаще всего генетически полиморфны [1,2,6,7]. Другая группа образцов, представляющих сложность в сохранении – это генетические коллекции с идентифицированными генами, а также формы или сорта с чужеродным генетическим материалом – хромосомами, транслокациями. Сохранение оригинальности образцов коллекций и, особенно упомянутых выше, – проблема, поскольку в процессе репродукции возможны потеря или появление «новых» генотипов, изменение частоты их встречаемости, полная или частичная элиминация чужеродной хромосомы либо транслокации [7,8,11].

С точки зрения популяционной генетики адаптация к среде считается осуществленной после формирования самовоспроизводящейся популяции с устойчивым интегрированным генным фондом. Такая популяция должна быть способна существовать в этих условиях неограниченно долго. Ее генотипический состав не претерпевает достоверных изменений во многих поколениях. Следует напомнить о консервативности и уникальности локальных адаптаций, которые формируются и поддерживаются в конкретной среде на протяжении тысяч поколений.

В процессе адаптации популяции к конкретным условиям среды формируются т.н. адаптивные генные комплексы. Согласно классификации аллельного разнообразия адаптивными признакам популяций соответствуют общие локально распространенные

аллели [5,11] . Эти аллели наиболее важны с практической точки зрения, поскольку именно с ними связан адаптивный потенциал локальных популяций.

Если популяцию вырывают из исторически сложившейся среды (сбор образцов для генного банка) и переносят в новую (репродукция образцов), то запаса генетической прочности популяции может не хватить. Последствия для популяции могут быть разные в т.ч. дестабилизация адаптивного генного комплекса. На практике это может означать, что большинство практически ценных локальных адаптаций с одной стороны могут «разрушиться» на этапе репродукций, а с другой – оказаться непригодными для использования в селекционных программах без учета привязанности адаптивного генного комплекса к конкретным условиям среды. Все это необходимо учитывать при формировании стратегии сбора, сохранения генетического разнообразия и эффективного использования такого ценного исходного материала в селекционных программах.

В новой среде популяции по-разному будут реагировать на изменения. Очевидно, что большими шансами на выживание и сохранение своей оригинальности путем некоторого сдвига в своем составе обладают гетерогенные популяции или состоящие преимущественно из т.н. генотипов с усредненными характеристиками полигенных количественных признаков. Если новые условия являются приемлемыми только для минорных генотипов оригинальной популяции, в ходе репродукций такая популяция неизбежно потеряет оригинальность (а образец – генетическую целостность) и т.д.

Для того, чтобы предметно обсуждать генетические процессы, происходящие в популяциях или образцах коллекции необходим методический подход (инструмент), позволяющий такие процессы отслеживать более или менее объективно. Как было сказано, среди морфологических признаков мало таких, которые могли бы служить в качестве надежных генетических маркеров.

Прогресс в развитии методов популяционной генетики (и, соответственно, в изучении сохраняемых *ex situ* образцов коллекций культурных растений и их дикорастущих родичей) был достигнут с развитием молекулярных маркерных подходов. Появилась возможность анализировать динамику аллельных частот конкретных генов в популяциях (образцах), в том числе адаптивно важных генов – ферментов, запасных белков и др.[4,5,7-11]. Полиморфные спектры белков и ДНК в ряде случаев служат надежными «интегральными» генетическими маркерами для идентификации отдельных генотипов [4-10]. Принципы белкового и ДНК-«фингерпринтинга» успешно используются в решении фундаментальных и прикладных проблем в медицине, сельском хозяйстве и др. отраслях. Наиболее распространенным является использование их для идентификации личности (индивидуума) в криминалистике [4], а также при идентификации генетических ресурсов культурных растений и их дикорастущих родичей, в т.ч. сортов с.-х. растений [5-8]. Использование белковых и ДНК-маркеров оказалось весьма полезным для контроля за динамикой генотипического состава популяций у различных видов [7,12,13]. В сортоиспытании, семеноводстве и семенном контроле наибольшее практическое распространение получили стандартные методы электрофореза белков семян [5,7,8].

В ВИРе накоплен опыт эффективного использования спектров белков семян для анализа динамики популяций перекрестноопыляющихся культур и биотипного состава самоопыляющихся в процессе репродукции образцов. Эффективность подхода обусловлена тем, что маркерная система была отобрана среди разнообразия белков растений в ходе многолетних биохимических и молекулярно-генетических исследований во многих научных коллективах мира. Признано, что электрофоретический спектр запасного белка соответствует генетической конституции образца (семени) и может служить в качестве его «отпечатка пальца»[5,7].

Проблема генетической целостности сохраняемых *ex situ* образцов, всегда рассматривалась в ВИРе как приоритетная при молекулярных исследованиях биоразнообразия. Как было сказано выше, в коллекции ВИР сохраняется большое число образцов старых и местных сортов и форм различных культур. Задача центров

генетических ресурсов – не только собрать, зарегистрировать и изучить эти образцы, но и сохранить все богатство генетической изменчивости уникальных форм.

Один из последних примеров такой работы – изучение хранящихся в коллекции ВИР с 20-х годов прошлого столетия оригинальных образцов овса посевного (староместные сорта) и их репродукций 1989–2000 гг. Сравнение спектров образцов-оригиналов и репродукций выявило у восьми образцов коллекции изменения в биотипном составе: уменьшение у четырех репродуцированных образцов доли минорных биотипов и, соответственно, увеличение встречаемости основного биотипа. Таким образом, полиморфные образцы в ходе репродукций становились все более мономорфными (пример генетической эрозии). Для ряда репродуцированных образцов, наоборот, наблюдали увеличение частоты встречаемости минорных биотипов и уменьшение таковой основного биотипа. Монотипные образцы становились в ходе репродукций полиморфными. У ряда полиморфных образцов наблюдали увеличение количества биотипов. В ряде случаев часть минорных биотипов исчезает и появляются новые, что может быть следствием биологического или механического засорения и т.д. Такого рода изменения выявлены у небольшого числа образцов коллекции. Тем не менее, очевидна необходимость контроля за генотипическим составом сохраняемых в коллекции образцов. Сравнили степени генетической целостности более 100 соответствующих образцов (сортов) овса посевного (*Avena sativa* L.) из коллекций ВИР и Нордического генного банка (NGB, Швеция). Образцы поступили в коллекцию ВИР с 1921 по 1999 год, в коллекцию NGB – в 60-80-е гг. 20-го столетия. Большая часть изученных образцов из ВИРа и NGB сохранили оригинальный биотипный состав (генетическую целостность) – оказались соответственно идентичными по спектрам белков. У остальных были зафиксированы различия. Причины несходства одноименных образцов двух коллекций могут быть разными. Основная, видимо, – разные условия репродуцирования.

В институте генетики и селекции растений (Гатерслебен, Германия) А. Бёрнер и др. провели изучение восьми образцов мягкой пшеницы, хранящихся в генбанке института и репродуцированных от 5 до 24 раз в течение 50 лет [12]. Были использованы микросателлитные маркеры. Изменения (genetic shift – генетический дрейф) были зафиксированы у одного образца. В ВИРе с использованием спектров глиадинов подтвердили высокий уровень сохранения генетической целостности этих образцов в ходе многократной репродукции в генбанке Гатерслебена. Анализ спектров отдельных семян позволил сравнить биотипный состав оригиналов и репродукций, в том числе на уровне минорных биотипов. У одного образца действительно произошли изменения в генотипическом составе в ходе репродукций [10]. Аналогичные исследования проводят в ВИРе с генофондами пшеницы, ячменя, ржи, злаковых трав, бобовых, капусты, подсолнечника, салата, свеклы и др. Так сравнение биотипных составов коллекционной и производственной репродукций полиморфного сорта гороха Эрбус выявило утерю одного биотипа в производственной репродукции и т.п. Молекулярные подходы не смогут обеспечить информацию обо всех образцах коллекций. Их применение может быть оправданно при решении спорных вопросов, касающихся особо ценных образцов.

Генетические коллекции – именно такой особо ценный материал, сохранность которого сопряжена с трудностями. Белковые спектры используют в ВИРе для контроля за стабильностью генотипов растений, представляющих генетические линии, для идентификации чужеродных транслокаций, мутаций, изменения числа и состава хромосом. Сравнительный анализ спектров глиадинов сортов-оригиналов мягкой пшеницы с транслокациями и замещениями пшеничной хромосомы на ржаную (1B/1R) и их репродукций, проведенный в ВИРе Т. И. Пеновой и др. показал, что у ряда репродуцированных образцов встречаются генотипы с отсутствием глиадиновых маркеров короткого плеча хромосомы 1RS ржи, что свидетельствует о генетических изменениях в процессе репродукции. Молекулярные маркеры эффективны в анализе этих изменений. Использование же в качестве маркеров – белков, полученных из части

зерновки с сохранением жизнеспособности зародыша, позволяет воспроизводить и анализировать по потомству генотипы с выявленными изменениями [7].

Наиболее трудно осуществить контроль за генетической целостностью образцов перекрестноопыляющихся растений, состоящих из множества генотипов. В ВИРе спектры белков семян используют для анализа динамики популяций этих культур в процессе репродукции образцов [7,13]. По спектрам проламина изучали динамику сортовых и дикорастущих популяций ежи сборной, овсяницы луговой, плевела многолетнего и др. при репродукции образцов на Павловской опытной станции (ПОС) ВИР. В ряде случаев выявляли достоверные изменения генотипического состава (величина χ^2 при сравнении частот генотипов превышала критические значения). Популяции из разных регионов страны в условиях ПОС ВИР ведут себя по-разному. Выяснено, что оригинальные образцы дикорастущих популяций овсяницы луговой (*Festuca pratensis* L.) из Горного Алтая, ряда горных районов Северного Кавказа претерпевают значительные изменения после репродукции на ПОС ВИР. В то же время популяции из Тамбовской и Воронежской областей достоверных изменений после репродукции на ПОС ВИР не претерпели [7,13].

Можно предположить, что приведенные выше изменения в популяциях есть результат реакции на нетипичную для сорта среду. Приведенные примеры изменений в составе популяций образцов (утрата их оригинальности и подлинности) относятся к разряду исключений. Но игнорировать такие факты нельзя. Проблема генетической целостности исходного и селекционного материала нуждается в дальнейшем серьезном фундаментальном осмыслении и эффективном методическом обеспечении.

1. Вавилов Н.И. Селекция как наука. Теоретические основы селекции // Т.1.(под ред. Н.И.Вавилова) М.-Л. 1935. С.17-18
2. Бриггс Ф., Ноулс П. Научные основы селекции растений // М. «Колос».1972. 398с.
3. Биохимические и молекулярно-биологические подходы к изучению генетических ресурсов растений (под ред. А.В.Конарева) // Аграрная Россия. 2006. № 6. С. 2-72.
4. Картель Н.А., Макеева Е.Н., Мезенко А.М. Генетика. Энциклопедический словарь // Минск. «Тэхналогія». 1999. 275с.
5. Конарев А.В. Использование молекулярных маркеров в работе с генетическими ресурсами растений // Сельскохозяйственная биология. 1998. 5. С.3-25.
6. Идентификация стародавних сортов озимой мягкой пшеницы по электрофоретическим спектрам глиадины // Каталог мировой коллекции ВИР (под ред. В.Г.Конарева). Л. 1990. Вып. 559. 63с.
7. Молекулярно-биологические аспекты прикладной ботаники, генетики и селекции. Теоретические основы селекции // Том I.(под ред. В.Г.Конарева) М. Колос. 1993. 447с.
8. Молекулярные маркеры в решении проблем генетических ресурсов растений и селекции (под ред. А.В.Конарева) // Аграрная Россия. 2002. № 3. С.4-65.
9. 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.
10. Boerner A., Chebotar S., Korzun V. Molecular characterization of the genetic integrity of wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm after long-term maintenance // Theor.Appl. Genet. 2000. V.100. P.494-497.
11. Hodgkin T. Some current issues in the conservation and use of plant genetic resources. Molecular genetic techniques for plant genetic resources // Report of an IPGRI Workshop, October 1995, Rome, Italy. 1997. P. 3-10.
12. A.Konarev, N.Gubareva, D.Kornuchin, A.Berner. Gliadin electrophoretic analysis of the genetic integrity of wheat (*Triticum aestivum* L.) accessions after frequent seed reproduction // Genetic Resources and Crop Evolution. 2005. V. 52. P. 519-523

13. Konarev A.V., Vvedenskaya I.O., Nasonova E.A. and Perchuk I.N. Use of prolamine polymorphism in studying genetic resources of forage grasses // Genetic Resources and Crop Evolution. 1995. V. 42. P.197-209.