

БЕЛКИ СЕМЯН СЛОЖНОЦВЕТНЫХ: ГЕТЕРОГЕННОСТЬ, ПОЛИМОРФИЗМ, ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В СЕЛЕКЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ (обзор)

И. Н. Анисимова

В статье обобщены данные литературы, а также результаты многолетних исследований белков семян сложноцветных, которые были выполнены в отделе биохимии и молекулярной биологии ВИР под руководством академика РАСХН В. Г. Конарева. Суммарные белковые фракции семян основных возделываемых растений семейства сложноцветных — подсолнечника (*Helianthus*), салата (*Lactuca*) и сафлора (*Carthamus*) — представлены гетерогенной смесью полипептидов. Главные компоненты фракции запасных белков принадлежат солерастворимым 11S (12S) глобулинам и водорастворимым 2S альбуминам; 11S (12S) глобулины сложноцветных включают несколько типов субъединиц и полипептидов, различающихся по молекулярной массе и физико-химическим свойствам. Доказана уникальная четвертичная структура 2S альбуминов подсолнечника и салата; 2S альбумины этих видов, в отличие от гомологичных белков других двудольных растений, представлены одноцепочечными полипептидами, четвертичная структура которых поддерживается внутримолекулярными дисульфидными связями. Определены генотипы линий генетической коллекции культурного подсолнечника (*H. annuus*) по аллелям локусов *HelA*, *HelB* и *HelC*, кодирующих субъединицы 11S глобулина (гелиантинина) и структурного гена *SFA8*, ответственного за синтез богатого метионином альбумина *SFA8*. Изучен аллельный полиморфизм локусов, кодирующих ингибиторы протеолитических ферментов. Уровень внутривидового полиморфизма белков семян различен у разных видов. Наиболее полиморфны среди них белки подсолнечника и салата, низким уровнем полиморфизма характеризуются белки сафлора. Молекулярные основы гетерогенности и полиморфизма запасных белков семян сложноцветных изучены мало; наиболее полная информация получена для подсолнечника. Обсуждаются вопросы использования запасных белков семян подсолнечника в семеноводстве гибридов в качестве маркерных признаков для контроля генетической чистоты родительских линий и определения уровня гибридности семян.

Ключевые слова: подсолнечник; салат; сафлор; белки семян; 11S (12S) глобулины; гелиантинин; 2S альбумины; гетерогенность; полиморфизм; генетический контроль.

Семена растений содержат различные запасные вещества, среди которых значительную часть составляют белки. Принято выделять следующие

группы белков семян: 1) запасные; 2) биологически активные (лектины, ферменты и ингибиторы ферментов); 3) структурные (белки рибосом, хромосом и мем-

бран). Наиболее избыточная в количественном отношении фракция представлена запасными белками с различными структурными, физико-химическими и биологическими свойствами. Четкого определения запасных белков нет. Как правило, к этой группе относят белки, доля которых в суммарной белковой фракции семян составляет более 5 % [1].

Отличительные особенности запасных белков — отсутствие каталитической функции, высокое содержание остатков глутаминовой и аспарагиновой кислот, являющихся источниками азота для прорастающего зародыша, а также локализация внутри мембрано-связанных вакуолей, называемых белковыми телами. Недавно обнаружена еще одна важная биологическая роль запасных белков. Установлено, что они защищают от окислительного стресса белки, необходимые для прорастания и развития проростка и тем самым предотвращают старение семян [2]. Многие сельскохозяйственные растения культивируются преимущественно ради семян. Накапливающиеся в них белки представляют собой исключительно важный компонент в питании человека и животных, а также служат сырьем для пищевой промышленности. Поэтому запасные белки семян в течение последних десятилетий стали объектом многочисленных исследований. Степень их изученности определяется интенсивностью практического использования. Кроме того, высокий уровень синтеза в развивающихся семенах, а также строгая тканевая специфичность обусловили выбор запасных белков в качестве привлекательной системы для изучения контроля экспрессии генов [3]. Важным свойством запасных белков является их гетерогенность. Все запасные белки представлены смесью компонентов, характеризующихся полиморфизмом между различными генотипами и проявляющих видовую (геномную) и генотипическую (сортовую, линейную) специфичность. Именно эта особенность запасных белков семян была положена в основу разработанной академиком РАСХН В. Г. Конаревым концепции белковых маркеров [4]. С помощью белковых маркеров успешно решены вопросы филогении и таксономии многих видов и родов культурных растений, разработаны методы идентификации сортов, предложены схемы контроля сортовой и линейной чистоты, однородности межлинейных гибридов. В настоящее время, в век бурно развивающихся геномных технологий, методы белковых маркеров не утратили своего значения и широко используются для решения различных генетико-селекционных задач. В. Г. Конарев большое значение уделял также и познанию биохимической природы белков семян, изучению генетических основ их полиморфизма.

В литературе накоплена обширная информация о составе и изменчивости запасных белков семян злаковых растений. Среди двудольных растений наиболее изучены белки бобовых, крестоцветных и ряда масличных растений (хлопчатника, подсолнечника, клещеви-

ны). Данные о составе белков семян многих других видов, не имеющих практического значения, пока отсутствуют или весьма ограничены. Так, например, к началу нашего исследования в литературе не было информации о составе и изменчивости белков семян видов салата — растения, у которого в пищу используются только вегетативные части. Вытяжки из семян нашли применение лишь в народной медицине.

Настоящая статья посвящена обзору данных о составе и изменчивости белков семян отдельных представителей семейства сложноцветных. В ней представлены результаты исследований, выполненных в отделе биохимии и молекулярной биологии под руководством В. Г. Конарева, а также данные литературы. Сложноцветные (Asteraceae) — одно из самых семейств двудольных растений, широко распространенных во всех климатических зонах. Оно включает почти 33 тыс. видов, объединенных в 1911 родов [5]. Многие виды этого семейства используются человеком в качестве пищевых, лекарственных и декоративных растений. Однако среди всего многообразия возделываемых видов сложноцветных экономическое значение имеют лишь источники растительных масел — подсолнечник однолетний (*Helianthus annuus* L.), сафлор (*Carthamus tinctorius* L.), а также многолетний клубненосный подсолнечник (*H. tuberosus* L.) и популярная листовая овощная культура салат посевной (*Lactuca sativa* L.).

Методы исследования

Материал для исследований — образцы подсолнечника, салата и сафлора — получен из коллекций ВНИИ растениеводства им. Н. И. Вавилова (ВИР), ВНИИ масличных культур (ВНИИМК), а также ряда других отечественных и зарубежных научных учреждений. Суммарные водо-солеорастворимые белки экстрагировали из индивидуальных семян 0,065 М трис-НСI буфером, рН 6,8. Для получения фракций глобулинов и 2S альбуминов из отдельных семян или их частей нами модифицированы описанные в литературе методы [6, 7]. Глобулиновую фракцию экстрагировали из навески семян преципитацией на холоде при разбавлении солевого экстракта семян дистиллированной водой [8]. Фракции 2S альбуминов осаждали ацетоном после осаждения глобулинов (метанолом или этанолом) из суммарного солевого экстракта [9]. Электрофоретический анализ выполнен в присутствии детергента додецилсульфата натрия (SDS) с использованием трис-глициновой (рН 8,3) и трис-трициновой (рН 8,8) буферных систем [9–12]. Отмывали гель и высушивали пластины в соответствии с методиками, принятыми в отделе молекулярной биологии ВИР [13]. Основные детали других использованных в работе методов (двумерного электрофореза, высокоразрешающей хроматографии с обращенной фазой — RP-HPLC, изоэлектрического фокусирования, аминокислотного анализа) приведены в цитируемых статьях.

Результаты и обсуждение

Белки семян подсолнечника. Известно, что около 16 – 40 % веществ, экстрагируемых из семян масличных растений (подсолнечника, рапса, клещевины, сафлора), приходится на долю белковой фракции. Ее главными компонентами являются высокомолекулярные солерастворимые белки 11S и 12S глобулины и низкомолекулярные водорастворимые белки 2S альбумины. Их соотношение в суммарной фракции белков составляет 2:1 [14].

Электрофоретический спектр обработанных восстанавливающим агентом β-меркаптоэтанолом суммарных белков подсолнечника высокогетерогенен. Он включает более 70 компонентов с относительными молекулярными массами (M_r) от 5 до 75 кДа. Главные компоненты принадлежат солерастворимому белку 11S глобулину (гелиантинину) и водорастворимым 2S альбуминам, различающимся по молекулярной массе, составу аминокислот и физико-химическим свойствам (табл. 1). Количественное соотношение глобулиновой и альбуминовой фракций в семенах подсолнечника в среднем составляет 2:1 и в значительной степени определяет качество и функциональные свойства продуктов, получаемых из семян подсолнечника [15]. Гелиантинин представляет собой олигомерный белок с молекулярной массой около 305 кДа, состоящий из шести сферических субъединиц [16]. Каждая субъединица включает кислый и основной полипептиды, соединенные дисульфидными связями. В составе гелиантинина идентифицированы несколько типов субъединиц и полипептидов, различающихся по заряду и молекулярной массе (табл. 1) [8, 16, 17]. В электрофоретическом спектре гелиантинина, полученном при фракционировании в 12,5 %-ном полиакриламидном геле в присутствии SDS, идентифицируются три различающиеся по молекулярной массе группы субъединиц: А ($M_r \sim 56$ кДа), В ($M_r \sim 55$ кДа) и С ($M_r \sim 52$ кДа). При обработке гелиантинина в-меркаптоэтанолом, восстанавливающим в белке дисульфидные связи,

субъединицы диссоциируют до полипептидов, спектр которых включает 3 группы компонентов — два класса кислых с молекулярными массами $M_r \sim 37,5 - 38,5$ кДа (α) и $31 - 31,5$ кДа (α') и группу основных полипептидов ($\beta - \beta'$) с $M_r \sim 21 - 24$ кДа [16 – 20].

Результаты сравнительного анализа электрофоретических спектров гелиантинина, выделенного из семян различных генотипов, свидетельствовали о полиморфизме субъединиц и полипептидов этого белка у сортов, линий культурного подсолнечника, диких видов рода *Helianthus* [20]. Суммарный спектр гелиантинина, включающий все идентифицированные варианты полипептидов, представлен на рис. 1.

Выяснение характера наследования полиморфных вариантов запасных белков является важным этапом исследований при разработке методов белковых маркеров. Данные о характере наследования полиморфных вариантов позволяют идентифицировать локусы генома, ответственные за синтез отдельных компонентов белковой фракции семян, и определить аллельный состав этих локусов. Для выяснения характера генетического контроля запасных белков семян подсолнечника в генетической коллекции линий подобраны родительские формы с альтернативными вариантами компонентов электрофоретического спектра гелиантинина, выполнены скрещивания и изучен характер расщепления в гибридных поколениях. Гибридологический анализ расщепляющихся гибридных популяций от скрещиваний линий с альтернативными (различающимися по подвижности) компонентами позволил уточнить состав дисульфидно связанных пар полипептидов гелиантинина. Показано, что расщепление в F_2 и поколениях от анализирующих скрещиваний по подвижности вариантных компонентов субъединиц и полипептидов носит согласованный характер. На основе этих данных и с учетом результатов, полученных другими исследователями с использованием различных биохимических методов [21 – 23], идентифицированы аллельные вари-

Таблица 1. Главные компоненты фракции запасных белков семян сложноцветных растений

Вид	Белок	Субъединичный состав	Полипептидный состав	Ссылки
Подсолнечник <i>H. annuus</i>	11S глобулин (гелиантинин)	Олигомер, 3 группы субъединиц: А, В, С ($M_r \sim 50 - 60$ кДа)	Три группы полипептидов: кислые с $M_r \sim 37500 - 38500$ (α) и $30000 - 31500$ кДа (α'), основные с $M_r \sim 21000 - 24000$ кДа	[8, 16, 22, 23]
	2S альбумины	Мономеры, третичная структура поддерживается за счет внутримолекулярных дисульфидных связей	Главные компоненты с M_r от 8 – 18 кДа, и ряд минорных полос с $M_r \sim 2 - 5$ кДа	[7, 9]
Салат <i>L. sativa</i>	11S глобулин	Олигомер, 3 группы субъединиц с $M_r \sim 65 - 67$ кДа	Кислые с M_r 40 – 31 кДа, основные с $M_r \sim 21 - 24$ кДа	[46]
	2S альбумины	Мономеры, внутримолекулярные дисульфидные связи	Главные компоненты с $M_r \sim 10 - 16$ кДа, а также ряд минорных с M_r 8 – 9 кДа	[46]
Сафлор <i>C. tinctorius</i>	12S глобулин (кармин)	Олигомер	Две группы полипептидов: кислые с M_r 36 – 43 кДа и основные с $M_r \sim 27 - 29$ кДа	
	2S альбумины	Нет данных		

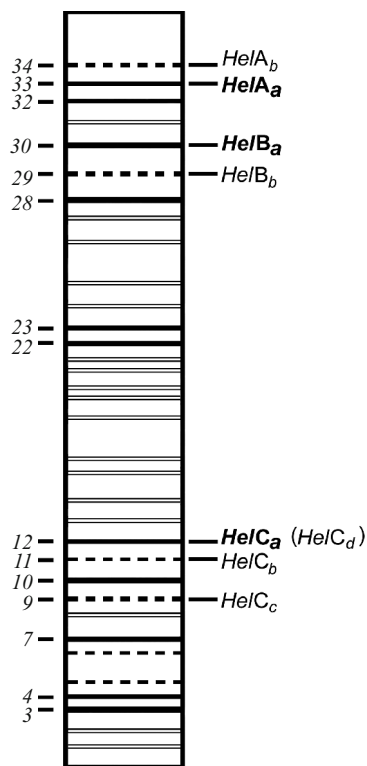


Рис. 1. Суммарный электрофоретический спектр неочищенного препарата гелиантинина. Линиями отмечены: сплошными — позиции главных компонентов стандартного типа; пунктирными — позиции вариантных компонентов; двойными — позиции минорных компонентов (в анализе не учитывались). Слева даны номера компонентов, справа — обозначения контролирующих их локусов

анты локусов *HelA*, *HelB* и *HelC*, кодирующих синтез субъединиц гелиантинина (рис. 1).

Определен аллельный состав гелиантинин кодирующих локусов у линий генетической коллекции (табл. 2). Во многих случаях наличие тех или иных аллелей связано с происхождением линий. В частности, присутствие аллелей *HelCb* или *HelCc* у линий ВИР104, НА61, РНА273, РНА274 указывало на наличие генетического материала дикорастущих форм. Компонент, кодируемый аллелем *HelBb*, характерен для образца

Таблица 2. Генотипы некоторых линий генетической коллекции подсолнечника по локусам, кодирующим запасные белки семян

Линия	Аллели локусов, кодирующих полипептиды запасных белков			
	<i>HelC</i>	<i>HelB</i>	<i>HelA</i>	<i>SFA8</i>
ВИР104	<i>HelCc</i>	<i>HelBa</i>	<i>HelAa</i>	<i>SFA8_n</i>
ВИР122	<i>HelCa</i>	<i>HelBa</i>	<i>HelAa</i>	<i>SFA8_n</i>
ВИР130	<i>HelCa</i>	<i>HelBb</i>	<i>HelAa</i>	<i>SFA8_v</i>
ВИР131	<i>HelCa</i>	<i>HelBa</i>	<i>HelAb</i>	<i>SFA8_n</i>
ВИР302	<i>HelCa</i>	<i>HelBa</i>	<i>HelAb</i>	<i>SFA8_n</i>
ВИР369	<i>HelCa</i>	<i>HelBa</i>	<i>HelAa</i>	<i>SFA8_n</i>
СМ44	<i>HelCb</i>	<i>HelBa</i>	<i>HelAa</i>	<i>SFA8_n</i>
и-469802	<i>HelCa</i>	<i>HelBa</i>	<i>HelAa</i>	<i>SFA8_n</i>

к-2266 и присутствовал также у созданных на его основе инбредных линий ВИР130 и ВИР365.

Молекулярные основы гетерогенности и полиморфизма запасных белков семян подсолнечника изучены мало. Известно, что молекулярная гетерогенность гелиантинина так же, как и многих других типов запасных белков, обусловлена генетической гетерогенностью, т.е. определяется множественными генами или, как их принято называть, мультигенными семьями. К настоящему времени в геноме подсолнечника идентифицированы два генных подсемейства, кодирующие гелиантинин. Известны последовательности некоторых генов из этих подсемейств [24–26]. Сходство предсказанных последовательностей двух генов из дивергентных подсемейств не превысило 43 %, что сопоставимо с данными (46 %), полученными при сравнении генов, кодирующих гелиантинин и 11S глобулин крестоцветных (круциферин). Каждый ген гелиантинина кодирует предшественник, содержащий последовательности для кислого и основного полипептидов. Затем предшественник подвергается процессингу, в результате которого его полипептидная цепь расщепляется на α - и β -полипептиды в строго определенном участке, или сайте. Кислый и основной полипептиды в дальнейшем сохраняются связанными благодаря дисульфидным мостикам, образующимся в определенных частях молекулы. Последовательность нуклеотидов в районе α/β сайта оказалась консервативной не только у генов гелиантинина, но также у их гомологов из других двудольных растений. Происхождение двух значительно отличающихся групп полипептидов гелиантинина, на наш взгляд, можно объяснить либо дивергенцией в результате эволюции, либо амфилоидным происхождением рода *Helianthus* L. гибридизацией 8- и 9-хромосомных предковых родов. Для проверки этих гипотез необходим анализ первичных нуклеотидных последовательностей 11S глобулинов у различных представителей сложноцветных, филогенетически близких к роду *Helianthus*. Однако до настоящего времени геномные последовательности, кодирующие полиморфные варианты полипептидов гелиантинина, не идентифицированы. Фрагменты кДНК 11S глобулина подсолнечника длиной около 700 пн, опубликованные в биоинформативных базах данных [26] на 100 % оказались гомологичны фрагментам полной последовательности гена *G-3* [27]. В связи с этим пока не ясно, обусловлен ли полиморфизм гелиантинина так же, как и других белков семян подсолнечника, изменчивостью нуклеотидных последовательностей структурных генов, либо генетически детерминированными посттрансляционными модификациями. В пользу второй гипотезы свидетельствуют данные исследования о неслучайном характере изменчивости гелиантинина в потомствах межвидовых гибридов от скрещиваний культурного подсолнечника с многолетними видами рода *Helianthus* [28].

Водорастворимые белки семени подсолнечника, 2S альбумины, представляют собой гетерогенную смесь одноцепочечных полипептидов с $M_r \sim 10 - 18$ кДа. При разделении в присутствии SDS их электрофоретическая подвижность оказалась выше подвижности компонентов, полученных после обработки β -меркаптоэтанолом. Это свидетельствовало о том, что альбумины семян подсолнечника по своей структуре отличаются от гомологичных белков других растений и характеризуются присутствием внутримолекулярных дисульфидных связей. Методом двумерного электрофореза мы показали, что большинство альбуминов семян подсолнечника имеют внутрицепочечные дисульфидные связи [9]. По своей четвертичной структуре 2S альбумины подсолнечника отличаются от 2S альбуминов многих других изученных к настоящему времени растений. Аналогичный эффект наблюдался нами и другими авторами [29] при анализе запасных белков семян хохобы *Simmondsia chinensis* (Link) C. K. Schneid., преобладающими компонентами которых, как было установлено, являются низкомолекулярные полипептиды с коэффициентами седиментации 2S. Отличительной особенностью водорастворимых белков семян подсолнечника и других масличных растений является высокое содержание богатых серой аминокислот — метионина и цистеина [14].

Методом RP-HPLC в суммарной фракции 2S альбуминов подсолнечника идентифицировано до 13 индивидуальных компонентов, среди которых количественно преобладали наиболее гидрофобные из них — белки *SFA7* и *SFA8* [7, 9]. Альбумины *SFA7* и *SFA8* ($M_r \sim 10$ кДа) имеют почти идентичный аминокислотный состав и богаты серусодержащими аминокислотами. Содержание остатков метионина в этих полипептидах у сорта-гибрида Нусуп составило 15 моль %, а относительная доля в суммарной белковой фракции семян — 7 % [30].

У пяти линий генетической коллекции ВИР (ВИР130, ВИР365, ВИР666, ВИР676, ВИР262) выявлен электрофоретический вариант *SFA8*, отличавшийся от варианта, присутствовавшего у 95 других изученных линий, подвижностью в полиакриламидном геле (SDS-трис-трициновая система, pH 8,8) и изоэлектрической точке. В F_1 от скрещивания линий ВИР130 и ВИР104, характеризовавшихся различными вариантами *SFA8*, наблюдали кодминантное наследование, а характер расщепления в F_2 свидетельствовал о том, что нормальный и вариантный белки *SFA8* кодируются аллелями одного локуса, обозначенного *SFA8* [31].

К настоящему времени опубликована кодирующая последовательность гена, кодирующего богатый метионином альбумин *SFA8* [30]. Еще один ген, *HaG5*, последовательность которого известна [24, 25], входит в состав небольшой мультигенной семьи, включающей, по меньшей мере, два дивергентных гена. Предшественники с $M_r \sim 38$ кДа, кодируемые этими генами, под-

вергаются протеолитическому процессингу, расщепляясь на два самостоятельных полипептида, тогда как продукт гена *SFA8* дальнейшему процессингу, за исключением отщепления сигнального пептида, не подвергается. В работе [32] для каждого из предполагаемых генов альбуминов были идентифицированы по два аллеля, а у генетически различных линий и гибридов наблюдались различные аллельные сочетания. О существовании аллельной изменчивости свидетельствовали также и результаты анализа полиморфизма фракций 2S альбуминов среди линий генетической коллекции. На молекулярно-генетической карте подсолнечника пока локализован лишь один из генов 2S альбуминов, кодирующий полипептиды с $M_r \sim 14$ и 15 кДа [33]. Однако локализация других генов запасных белков семян, включая гены богатых метионином альбуминов и гелиантинина, до сих пор не установлена.

Среди полипептидов семян значительный интерес представляют низкомолекулярные белки, играющие роль ингибиторов протеолитических ферментов. Эти белки, как правило, присутствуют в водорастворимых фракциях семян. Накапливаясь в сравнительно небольших количествах, они, тем не менее, проявляют сильную ингибирующую активность в отношении гидролаз насекомых и патогенных микроорганизмов. Таким образом, они относятся к группе веществ, играющих важную защитную роль в растении. В семенах подсолнечника обнаружены и детально изучены на материале 70 линий генетической коллекции два типа полиморфных ингибиторов: ингибиторы трипсина (*TI*) и бифункциональные ингибиторы трипсина/субтилизина (*T/SI*) [34]. Гибридологическим анализом установлены 3 локуса, кодирующие различные электрофоретические варианты трипсина/субтилизина — T/SI_a , T/SI_b и T/SI_c . Все три локуса локализованы в одной группе сцепления. Расстояние между локусами T/SI_a и T/SI_b составило 32 % (в единицах рекомбинации), а между локусами T/SI_b и T/SI_c — 23 %. Порядок расположения локусов на хромосоме оказался следующим: $T/SI_a - T/SI_b - T/SI_c$. Не выявлено сцепления локуса T/SI_c с локусами T/SI_a и TI_m , но слабое сцепление — с локусом T/SI_b .

Нами показано, что состав электрофоретических спектров запасных белков семян подсолнечника различен у разных видов рода *Helianthus* и, кроме того, характеризуется внутривидовой изменчивостью [20, 35]. Степень внутривидового полиморфизма гелиантинина у культурного подсолнечника сравнительно невысока, однако к настоящему времени накоплен достаточно обширный материал о присутствии тех или иных полиморфных вариантов у инбредных линий и в сортовых популяциях.

Более 200 линий генетической коллекции подсолнечника маркированы с использованием спектров гелиантинина [36, 37]. Для 7 линий детально (с использованием комплекса биохимических методов) изучен полиморфизм 2S альбуминов семян [9], у 100 линий

Таблица 3. Использование белков семян в селекционных и генетических исследованиях сложноцветных

Задача	Метод	Белки	Наличие эталонного спектра	Ссылка
Идентификация сортов, линий и гибридов подсолнечника	Электрофорез гелиантинина	Гелиантинин	+	[18]
Оценка гибридности семян подсолнечника	Электрофорез запасных белков семян и изоферментов	Белки, осаждаемые ацетоном из суммарной фракции семян, эстераза	–	[43]
Оценка генетической чистоты гибридных семян подсолнечника	Электрофорез запасных белков семян и изоферментов	Суммарные белки семян, системы изоферментов: фосфоглюконатдегидрогеназа, фосфоглюкомутаза, малакдегидрогеназа, изоцитратдегидрогеназа, кислая фосфатаза	–	[40, 41]
Идентификация инбредных линий подсолнечника	Электрофорез запасных белков семян	Суммарные белки, экстрагируемые мочевиной	+	[44]
Определение генетической чистоты гибридов подсолнечника	Электрофорез запасных белков семян и изоферментов	Суммарные белки семян, системы изоферментов: фосфоглюконатдегидрогеназа, фосфоглюкомутаза, фосфогексоизомераза, малакдегидрогеназа, изоцитратдегидрогеназа, кислая фосфатаза	–	[39]
Структурирование коллекции салата	Электрофорез запасных белков семян	Суммарные белки семян	+	[46]
Выяснение родственных связей среди образцов сафлора	Электрофорез запасных белков семян	Суммарные белки семян	–	[50]

исследован полиморфизм главных богатых метионином компонентов альбуминовой фракции — белков *SFA7* и *SFA8* [31], а у 70 линий изучен полиморфизм ингибиторов протеолитических ферментов (табл. 3) [34]. Изучен полиморфизм гелиантинина у сортов отечественной селекции [37]. Результаты этих исследований указывали также на возможность использования метода электрофореза гелиантинина в семеноводстве гибридов подсолнечника для контроля генетической чистоты и определения гибридности семян [11, 18].

Вопросы практического использования полиморфизма белков семян подсолнечника в последние годы обсуждаются достаточно активно в связи с задачами контроля генетической чистоты родительских линий, используемых при производстве гибридов, а также определения уровня гибридности партий семян. Поскольку возможности использования гелиантинина часто ограничиваются невысоким уровнем его полиморфизма у близкородственных линий, для анализа селекционного материала более эффективен метод электрофореза суммарной белковой фракции семян. Кроме того, для повышения разрешающей способности могут быть использованы дополнительные маркеры, в частности изоферменты, ингибиторы протеаз и т.д. Нами и другими авторами показано, что методы электрофореза гелиантинина и изоферментов обладают сопоставимой разрешающей способностью для идентификации и паспортизации инбредных линий и в то же время эффективно дополняют друг друга [11, 39–41]. К сожалению, до сих пор в литературе отсутствует единая номенклатура электрофоретических спектров, а анализируемые белковые фракции зачастую получают названия, не соответствующие их биохимической природе. Термин «гелиантинин» ввели в литературу Schwenke et al. [6] для обозначения солерастворимого белка 11S глобулина

подсолнечника. В последние годы в ряде публикаций этот термин стали использовать для обозначения высокогетерогенной суммарной белковой фракции, которая, как известно, включает различные группы белков [39–42], для обозначения белков, осаждаемых ацетоном из солерастворимой фракции [43], а также экстрагируемых мочевиной белков [44].

Белки семян салата. У салата в суммарном спектре белков, диссоциированных в присутствии детергента SDS и восстанавливающего агента (β -меркаптоэтанола), выявлено 60 компонентов с молекулярными массами от 10 до 75 кДа. Две группы компонентов, имеющие молекулярные массы от 20 до 50 кДа, соответствует 11S глобулину, а компоненты, имеющие молекулярную массу менее 18 кДа, — альбуминовой фракции. Кислые полипептиды 11S глобулина салата имеют молекулярную массу $M_r \sim 40–31$ кДа, основные — $M_r \sim 21–24$ кДа (табл. 1). Как и у подсолнечника, компоненты 2S альбуминов после обработки меркаптоэтанолом уменьшали свою подвижность, что можно объяснить их одноцепочечной структурой и наличием внутримолекулярных дисульфидных связей.

Впервые полиморфизм запасных белков семян салата изучен у небольшого числа генотипов, преимущественно представленных дикорастущими видами или группами сортов [45]. Методом SDS-электрофореза авторами выявлены типов спектров в пределах культурного вида, тогда как разновидности и отдельные образцы идентифицировать не удалось.

На материале 63 образцов культурного салата *L. sativa* из коллекции ВИР, представлявших все известные разновидности этой культуры, а также 7 образцов дикорастущих видов И. А. Якуповой с соавт. [46] детально изучен полиморфизм компонентов спектра с M_r от 20 до 50 кДа. На основе анализа изменчивости составлен

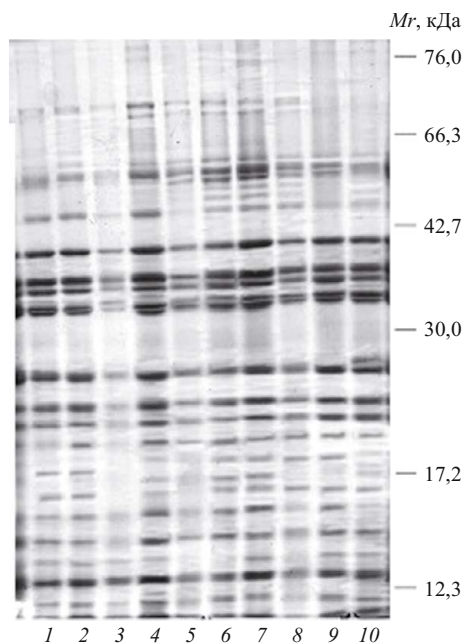


Рис. 2. Электрофоретические спектры запасных белков образцов салата: 1, 2 — Profos; 3 — Во-сунг; 4 — Мона; 5–7 — Lobi; 8–10 — Cybele

эталонный спектр 11S глобулина салата, включающий 24 различающиеся по интенсивности позиции. В спектре 11S глобулина салата выделено 7–9 главных и 15–17 минорных компонентов. Различия между образцами выражались в наличии или отсутствии в электрофоретическом спектре тех или иных компонентов 11S глобулина. Различия по типам спектра 11S глобулина выявлялись только между образцами, но не между генотипами одного образца. Это, по-видимому, объясняется тем, что салат является факультативным самоопылителем. В зависимости от компонентного состава электрофоретического спектра белков с $M_r \sim 20$ –50 кДа изученные образцы разделены на 10 групп, различающихся по наличию компонентов 5, 6, 10, 14, 19, 22 и 24. Выявлены компоненты, специфичные для определенных морфологических разновидностей *L. sativa*. Так, образцы разновидности *capitata* (кочанная) в исследованиях представлены двумя морфологическими группами: *crisphead* (хрустящелистный) и *butterhead* (маслянолистный). Характерной особенностью большинства образцов с маслянолистным типом кочана было наличие компонента 5, тогда как образцы с хрустящелистным кочаном характеризовались наличием компонентов 19 и 24, но отсутствием компонента 5 (рис. 2).

Результаты гибридологического анализа (данные не показаны) свидетельствовали о моногенном контроле компонентов 19, 22 и 24. В опытах по изучению репродукций семян, полученных без изоляции, установлено, что компоненты электрофоретического спектра могут служить удобными генетическими маркерами для оценки аутентичности образцов в процессе репродукции, а также для контроля за переносом генов из попу-

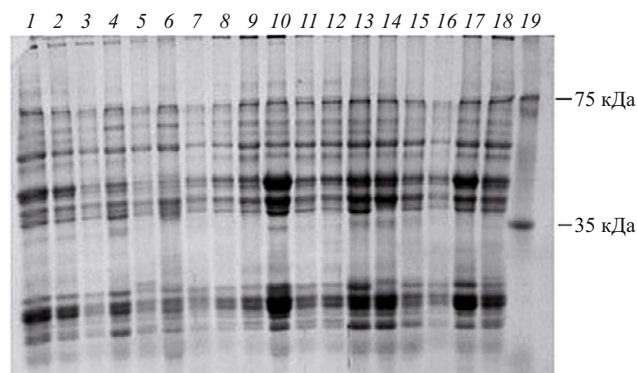


Рис. 3. Электрофоретические спектры 12S глобулина, выделенного из отдельных семян образцов сафлора: 1–3 — образец 1; 4–6 — образец 2; 7–9 — образец 3; 10–12 — образец 4; 13–15 — образец 5; 16–18 — образец 6; 19 — маркеры молекулярной массы

ляций диких видов к культурным формам и в обратном направлении [47].

Белки семян сафлора. Состав и изменчивость белков семян сафлора изучены мало. Latha and Prakash [48] впервые охарактеризовали белковую фракцию семян сафлора и показали, что она состоит из 4 групп белков с коэффициентами седиментации 2S (26%), 7S (6%), 12S (65%), 17S (2%). Авторы назвали главный компонент белковой фракции (12S глобулин) кармином. В суммарном спектре белков семян двух видов сафлора (культурного *C. tinctorius* L. и дикого *C. lanatus* L.) идентифицированы компоненты с молекулярными массами в диапазоне от 120 до 20 кДа [49]. Молекулярные массы полипептидов, идентифицированных в работе [50], варьировали в более широких пределах — от 5 до 232 кДа. В наших экспериментах в электрофоретических спектрах 12S глобулина, выделенного из семян различных образцов сафлора, идентифицированы две группы компонентов — кислые и основные полипептиды с M_r соответственно 36–43 и 27–29 кДа (рис. 3). Таким образом, по подвижности в денатурирующем геле кислые и основные полипептиды сафлора оказались близки к белкам подсолнечника и салата.

Полиморфизм белков семян сафлора оказался невысоким. Все изученные в работе [49] образцы *C. tinctorius* имели идентичные спектры белков и отличались от образцов *C. lanatus* по компонентам с $M_r \sim 60$, 43–36 и 30 кДа. Методом электрофореза суммарных белков изучены 116 образцов сафлора различного происхождения, 18 (60%) белковых компонентов оказались полиморфными [50]. В зависимости от типов спектра все образцы были объединены в 4 главных кластера. Однако существенного разнообразия изученных образцов *C. tinctorius* не выявлено, что свидетельствует о мономорфности их запасных белков семян. Авторы объяснили это происхождением культуры из одного географического региона — стран Средиземноморья.

Заклучение

Установлено, что фракции запасных белков семян у изученных к настоящему времени представителей семейства сложноцветных — подсолнечника, салата и сафлора — близки по своему составу. Солеорастворимые белки — 11S (12S) глобулины — включают несколько типов различающихся по молекулярной массе субъединиц и полипептидов. Водорастворимые 2S альбумины подсолнечника и салата имеют уникальную четвертичную структуру. Структура и гетерогенность 2S альбуминов сафлора, составляющих значительную часть фракции запасных белков семян [48], пока не изучены. Уровень внутривидового полиморфизма белков семян различен у разных видов. Наиболее полиморфны среди них белки подсолнечника и салата. Относительно низким уровнем полиморфизма характеризуются белки сафлора. Генетические основы полиморфизма главных компонентов запасных белков семян сложноцветных изучены недостаточно, но более полно — у подсолнечника.

Анализ полиморфизма белков семян эффективен для решения задач структурирования генетического разнообразия, идентификации видов и разновидностей. Электрофоретические спектры запасных белков семян подсолнечника могут быть использованы в семеноводстве гибридов в качестве маркерных признаков для контроля генетической чистоты родительских линий и определения гибридности семян.

ЛИТЕРАТУРА

- González-Pérez S., Arellano J. B. Handbook of hydrocolloids. — Oxford Cambridge New Delhi: Woodhead Publishing in Food Science, Technology and Nutrition, 2009. P. 1 – 27.
- Nguyen T.-Ph., Cuffe G., Hegedus D. D., et al. / J. Exp. Bot. 2015. DOI: 10.1093/jxb/erv348.
- Shewry P. R. / Biol. Rev. 1995. V. 70. P. 375 – 426.
- Конярев В. Г. Белки растений как генетические маркеры. — М.: Колос, 1983. С. 1 – 319.
- Bremers K. Asteraceae: cladistics and classification. — Portland, Or: Timber Press, 1994. P. 1 – 752.
- Schwenke K. D., Schultz M., Linow K. J. / Nahrung. 1975. V. 19. No. 9/10. P. 817– 822.
- Kortt A. A., Caldwell J. B. / Phytochemistry. 1990. V. 29. No. 9. P. 2805 – 2810.
- Анисимова И. Н., Гаврилюк И. П., Конярев В. Г. / Докл. ВАСХНИЛ. 1986. № 8. С. 4 – 8.
- Anisimova I. N., Fido R. J., Tatham A. S., et al. / Euphytica. 1995. V. 83. P. 15 – 23.
- Laemmli U. K. / Nature. 1970. V. 227. No. 5259. P. 680 – 685.
- Anisimova I. N., Gavriljuk I. P., Konarev V. G. / Plant Variet. Seeds. 1991. No. 4. P. 133 – 141.
- Schagger H., Von Jagow G. / Anal. Biochem. 1987. V. 166. P. 379 – 386.
- Конярев В. Г. Идентификация сортов и регистрация генофонда культурных растений по белкам семян. — СПб.: ВИР, 2000. С. 111 – 123.
- Youle R. J., Huang A. H. C. / Am. J. Bot. 1981. V. 68. P. 44 – 48.
- González-Pérez S., van Koningsveld G. A., Vereijken J. M., et al. / J. Agric. Food Chem. 2005. V. 53. P. 2261– 2267.
- Dalgarrondo M., Raymond J., Azanza J. L. / J. Exp. Bot. 1984. V. 35. P. 1618 – 1628.
- Žilić S., Barać M., Pešić M., et al. / Helia. 2010. V. 33. No. 52. P. 103 – 114.
- Анисимова И. Н. / Тр. по прикл. бот., генет. и селек. 1987. Т. 114. С. 114 – 125.
- Rahma E. H., Rao M. S. N. / J. Agric. Food Chem. 1981. V. 29. P. 518 – 521.
- Анисимова И. Н., Гаврилюк И. П. / Генетика. 1989. Т. 25. № 7. С. 1248 – 1255.
- Bogue M. A., Vonder Haar R. A., Nuccio M. L., et al. / Mol. Gen. Genet. 1990. V. 220. P. 49 – 57.
- Kortt A. A., Caldwell J. B. / Phytochemistry. 1990. V. 29. P. 1389 – 1396.
- Raymond J., Inquello V., Azanza J. L. / Phytochemistry. 1991. V. 30. No. 9. P. 2849 – 2856.
- Allen R. D., Nessler C. L., Thomas T. L. Developmental expression of sunflower 11S storage protein genes / Plant Mol. Biol. 1985. V. 5. P. 165 – 173.
- Allen R. D., Cohen E. A., Vonder Haar R. A., et al. / Mol. Gen. Genet. 1987. V. 210. P. 211 – 218.
- Vonder H. R. A., Allen R. D., Cohen E. A., et al. / Gene. 1988. V. 74. P. 433 – 443.
- GenBank (электронный ресурс); офиц. сайт. National Center for Biotechnology Information, U. S. National Library of Medicine. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide> (дата обращения 16.08.2014).
- Анисимова И. Н., Туманова Л. Г., Гаврилова В. А. и др. / Генетика. 2009. Т. 45. № 9. С. 1067 – 1077.
- Shah A., Stegemann H. / J. Agron. Crop Sci. 1983. V. 152. P. 39 – 47.
- Kortt A. A., Caldwell J. B., Lilley G. G., et al. / Eur. J. Biochem. 1991. V. 195. P. 329 – 334.
- Anisimova I. N., Konarev A. V., Gavrilova V. A., et al. / Euphytica. 2003. V. 129. No. 1. P. 99 – 107.
- Brunel D. / Seed Sci. 1994. V. 22. P. 185 – 194.
- Serre M., Feingold S., Salaberry T., et al. / Euphytica. 2001. V. 121. Issue 3. P. 273 – 278.
- Konarev A. V., Anisimova I. N., Gavrilova V. A., et al. / Theor. Appl. Genet. 2000. V. 100. No. 1. P. 82 – 88.
- Anisimova I., Georgieva-Todorova J., Vassileva R. / Helia. 1993. V. 16. No. 18. P. 49 – 58.
- Анисимова И. Н., Гаврилова В. А., Лоскутов А. В. и др. / Генетика. 2004. Т. 40. № 9. С. 1215 – 1223.
- Анисимова И. Н. / Теоретические основы селекции. Т. 1. Под ред. В. Г. Конярева. — М.: Колос, 1993. С. 287 – 314.
- Анисимова И. Н., Лоскутов А. В., Боровкова И. Г. / Докл. ВАСХНИЛ. 1991. № 6. С. 12 – 15.
- Nikolić Z., Vujaković M., Jevtić A. / Helia. 2008. V. 31. No. 48. P. 47 – 54.
- Alireza S., Saeedeh R. / Int. Sci. Investig. J. 2013. V. 2. No. 3. P. 33 – 39.
- Alireza S. / Biotechnology. 2014. V. 13. No. 3. P. 74 – 79.
- Alireza S. / Discov. Proteins. 2015. No. 3. P. 5 – 11.
- Pallavi H. M., Ramegowda K. B., Vishwanath K., et al. / Res. J. Agric. Sci. 2010. V. 1. No. 3. P. 189 – 192.
- Aksyonov I. V. / Helia. 2005. V. 28. No. 43. P. 49 – 54.
- De Vries I. M. / Genet. Res. Crop Evol. 1996. No. 43. P. 193 – 202.
- Якупова И. А., Анисимова И. Н., Шашилова Л. И. / Аграрная Россия. 2005. № 2. С. 26 – 31.
- Анисимова И. Н., Шашилова Л. И., Якупова И. А. / Докл. РАСХН. 2006. № 3. С. 15 – 17.
- Latha T. S., Prakash V. J. / Agric. Food Chem. 1984. V. 32. P. 1412 – 1416.
- Obreht D. R., Vapa L. B., Kis S. A., et al. / Proceed. Nat. Sci. Matica Srpska. 2002. V. 103. P. 29 – 34.
- Shinwari Z. K., Rehman H., Rabbani M. A. / Pak. J. Bot. 2014. V. 46. No. 3. P. 811 – 815.

REFERENCES

1. González-Pérez S., Arellano J. B. Handbook of hydrocolloids. — Oxford Cambridge New Delhi: Woodhead Publishing in Food Science, Technology and Nutrition, 2009. P. 1 – 27.
2. Nguyen T.-Ph., Cueff G., Hegedus D. D., et al. / J. Exp. Bot. 2015. DOI: 10.1093/jxb/erv348.
3. Shewry P. R. / Biol. Rev. 1995. V. 70. P. 375 – 426.
4. Konarev V. G. Belki rastenii kak geneticheskie markery [Protein plants as genetic markers]. — Moscow: Kolos, 1983. P. 1 – 319 [in Russian].
5. Bremers K. Asteraceae: cladistics and classification. — Portland, Or: Timber Press, 1994. P. 1 – 752.
6. Schwenke K. D., Schultz M., Linow K. J. / Nahrung. 1975. V. 19. No. 9/10. P. 817 – 822.
7. Kortt A. A., Caldwell J. B. / Phytochemistry. 1990. V. 29. No. 9. P. 2805 – 2810.
8. Anisimova I. N., Gavriljuk I. P., Konarev V. G. / Dokl. VASKhNIL. 1986. No. 8. P. 4 – 8 [in Russian].
9. Anisimova I. N., Fido R. J., Tatham A. S., et al. / Euphytica. 1995. V. 83. P. 15 – 23.
10. Laemmli U. K. / Nature. 1970. V. 227. No. 5259. P. 680 – 685.
11. Anisimova I. N., Gavriljuk I. P., Konarev V. G. / Plant Variet. Seeds. 1991. No. 4. P. 133 – 141.
12. Schagger H., Von Jagow G. / Anal. Biochem. 1987. V. 166. P. 379 – 386.
13. Konarev V. G. Identifikatsiya sortov i registratsiya genofonda kul'turnykh rastenii po belkam semyan [Identification and registration of varieties of the gene pool of cultivated plants for seed protein]. — St. Petersburg: Izd. VIR, 2000. P. 111 – 123.
14. Youle R. J., Huang A. H. C. / Am. J. Bot. 1981. V. 68. P. 44 – 48.
15. González-Pérez S., van Koningsveld G. A., Vereijken J. M., et al. / J. Agric. Food Chem. 2005. V. 53. P. 2261–2267.
16. Dalgalarondo M., Raymond J., Azanza J. L. / J. Exp. Bot. 1984. V. 35. P. 1618 – 1628.
17. Žilić S., Barać M., Pešić M., et al. / Helia. 2010. V. 33. No. 52. P. 103 – 114.
18. Anisimova I. N. / Tr. Prikl. Bot. Genet. Selekt. 1987. V. 114. P. 114 – 125 [in Russian].
19. Rahma E. H., Rao M. S. N. / J. Agric. Food Chem. 1981. V. 29. P. 518 – 521.
20. Anisimova I. N., Gavriljuk I. P. / Genetika. 1989. V. 25. No. 7. P. 1248 – 1255 [in Russian].
21. Bogue M. A., Vonder Haar R. A., Nuccio M. L., et al. / Mol. Gen. Genet. 1990. V. 220. P. 49 – 57.
22. Kortt A. A., Caldwell J. B. / Phytochemistry. 1990. V. 29. P. 1389 – 1396.
23. Raymond J., Inquello V., Azanza J. L. / Phytochemistry. 1991. V. 30. No. 9. P. 2849 – 2856.
24. Allen R. D., Nessler C. L., Thomas T. L. Developmental expression of sunflower 11S storage protein genes / Plant Mol. Biol. 1985. V. 5. P. 165 – 173.
25. Allen R. D., Cohen E. A., Vonder Haar R. A., et al. / Mol. Gen. Genet. 1987. V. 210. P. 211 – 218.
26. Vonder H. R. A., Allen R. D., Cohen E. A., et al. / Gene. 1988. V. 74. P. 433 – 443.
27. GenBank (on-line); National Center for Biotechnology Information, U. S. National Library of Medicine. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore> (16.08.2014).
28. Anisimova I. N., Tumanova L. G., Gavrilova V. A., et al. / Genetika. 2009. V. 45. No. 9. P. 1067 – 1077 [in Russian].
29. Shah A., Stegemann H. / J. Agron. Crop Sci. 1983. V. 152. P. 39 – 47.
30. Kortt A. A., Caldwell J. B., Lilley G. G., et al. / Eur. J. Biochem. 1991. V. 195. P. 329 – 334.
31. Anisimova I. N., Konarev A. V., Gavrilova V. A., et al. / Euphytica. 2003. V. 129. No. 1. P. 99 – 107.
32. Brunel D. / Seed Sci. 1994. V. 22. P. 185 – 194.
33. Serre M., Feingold S., Salaberry T., et al. / Euphytica. 2001. V. 121. Issue 3. P. 273 – 278.
34. Konarev A. V., Anisimova I. N., Gavrilova V. A., et al. / Theor. Appl. Genet. 2000. V. 100. No. 1. P. 82 – 88.
35. Anisimova I., Georgieva-Todorova J., Vassileva R. / Helia. 1993. V. 16. No. 18. P. 49 – 58.
36. Anisimova I. N., Gavrilova V. A., Loskutov A. V., et al. / Genetika. 2004. V. 40. No. 9. P. 1215 – 1223 [in Russian].
37. Anisimova I. N. / Konarev V. G. (ed.). Teoreticheskie osnovy selektsii [Theoretical basis of selection]. V. 1. — Moscow: Kolos, 1993. P. 287 – 314 [in Russian].
38. Anisimova I. N., Loskutov A. V., Borovkova I. G. / Dokl. VASKhNIL. 1991. No. 6. P. 12 – 15 [in Russian].
39. Nikolić Z., Vujaković M., Jevtić A. / Helia. 2008. V. 31. No. 48. P. 47 – 54.
40. Alireza S., Saeedeh R. / Int. Sci. Investig. J. 2013. V. 2. No. 3. P. 33 – 39.
41. Alireza S. / Biotechnology. 2014. V. 13. No. 3. P. 74 – 79.
42. Alireza S. / Discov. Proteins. 2015. No. 3. P. 5 – 11.
43. Pallavi H. M., Ramegowda K. B., Vishwanath K., et al. / Res. J. Agric. Sci. 2010. V. 1. No. 3. P. 189 – 192.
44. Aksyonov I. V. / Helia. 2005. V. 28. No. 43. P. 49 – 54.
45. De Vries I. M. / Genet. Res. Crop Evol. 1996. No. 43. P. 193 – 202.
46. Yakupova I. A., Anisimova I. N., Shashilova L. I. / Agrar. Ross. 2005. No. 2. P. 26 – 31 [in Russian].
47. Anisimova I. N., Shashilova L. I., Yakupova I. A. / Dokl. RASKhN. 2006. No. 3. P. 15 – 17 [in Russian].
48. Latha T. S., Prakash V. J. / Agric. Food Chem. 1984. V. 32. P. 1412 – 1416.
49. Obreht D. R., Vapa L. B., Kis S. A., et al. / Proceed. Nat. Sci. Matica Srpska. 2002. V. 103. P. 29 – 34.
50. Shinwari Z. K., Rehman H., Rabbani M. A. / Pak. J. Bot. 2014. V. 46. No. 3. P. 811 – 815.

Поступила 10.09.2015

Анисимова И. Н., докт. биол. наук

Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова (ВИР)

irina_anisimova@inbox.ru