

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНОМА СОМАКЛОНАЛЬНЫХ ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ ПО МОЛЕКУЛЯРНЫМ ФОРМАМ ЗЕИНА

Комарова Галина, доктор сельскохозяйственных наук, конференциар университетар, Ротарь Александр, доктор хабилитат биологических наук, главный научный сотрудник, Батыру Григорий, доктор сельскохозяйственных наук, конференциар университетар, Боунегру Сергей, научный сотрудник, Факультет Аграрных, Лесных и Экологических наук, Научно-исследовательский центр Сельского Хозяйства, Биоразнообразия и Сельского Развития, Технический Университет Молдовы, МОИ, Ротарь Евгений, доктор биологических наук, конференциар-исследователь, старший научный сотрудник Лаборатории семеноводства, Национальный центр исследований и производства семян, Министерство Сельского Хозяйства и Пищевой Промышленности.

The paper presents the results of the somaclonal maize lines genome study at the level of the storage protein (zein) molecular forms. The effectiveness of using protein markers based on computer automation of electrophoretic data processing is analyzed in order to identify the enriching and eliminating effect of somaclonal variability in comparison with the original lines. The comparative characteristics of the 14 somaclonal maize lines and three original lines are studied using zein protein markers. The possibility of recommending the inclusion of these somaclonal lines in the active collection created at the Technical University of Moldova in order to expand the range of its genetic diversity is discussed.

Key words: *maize, somaclonal lines, protein markers, electrophoresis, zein, eliminating and enriching effects.*

ВВЕДЕНИЕ

Помимо широко распространенных методов создания исходного селекционного материала - гибридизация, мутагенез, полиплоидия – используется и ряд биотехнологических приемов, среди которых большое внимание уделяется технологии, базирующейся на феномене „сомаклональной изменчивости”. Под термином „сомаклональная изменчивость” подразумевают новый вид реальной генетической изменчивости, которая проявляется в потомстве растений-регенерантов, полученных методом культуры *in vitro* [1]. Главное преимущество этой технологии клеточной селекции состоит в том, что она создает дополнительную генетическую изменчивость уже адаптированных ценных сельскохозяйственных сортов без гибридизации [2], отличается простотой аналитических процедур по сравнению с технологией генетической инженерии, кроме того, использование полученных соматоклональных линий не ограничивается законодательными рамками (в отличие от использования растений, полученных методами генной инженерии) [3].

В новой научно-исследовательской субпрограмме „GREEN”, разрабатываемой с 2024 года на Факультете Аграрных, Лесных и Экологических наук Технического Университета Молдовы, поставлена задача создания, расширения и изучения генетической коллекции специфической гермоплазмы кукурузы. Учитывая, что в 2016 году в лабораторию растительных генетических ресурсов Института Генетики, Физиологии и Защиты Растений Государственного Университета Молдовы была передана генетическая коллекция соматоклональных линий кукурузы, созданных в результате многолетнего сотрудничества двух коллективов – кафедры селекции, генетики и биотехнологии ГАУМ и Лаборатории биохимии и физиологии Института растениеводства „Порумбень” [4], - было предложено рассмотреть возможность использования этого материала для включения во вновь создаваемую рабочую генетическую коллекцию программы „GREEN”.

С этой целью была сформулирована серия задач проверки выбранных соматоклональных линий кукурузы. Одним из определяющих этапов этой проверки явилось

использование современного инструментария, по электрофоретической оценке, предлагаемой коллекции соматональных линий кукурузы [5, 6], позволяющего провести сопоставление сходства и различий этих соматоклов с исходными линиями-донорами (оригиналами) на уровне белковых молекул запасного белка зеина проламиновой фракции эндосперма зерновки. Настоящая публикация представляет результаты экспериментальной разработки поставленной задачи.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве *объекта исследования* использовали три группы соматональных линий кукурузы: а) группа линии Poly 17 и полученных из нее 6 соматональных линий (C2, C9, C10, C16, C17, C.18); в) группа линии BC 27D4 и полученных из нее 3 соматональные линии (C55, C56, C.58); с) группа линии МК 01 и полученных из нее 6 соматональных линий (C61, C63, C64, C102, C107).

Все перечисленные генотипы представляют генетическую коллекцию соматональных линий кукурузы, полученных в результате индукция соматональной изменчивости в эмбриокультуре оригинальных линий Poly 17, МК01 și BC27D4, широко используемых в качестве исходного материала в селекционном процессе.

Для получения исходных электрофоретических (ЭФ) спектров запасного белка семян кукурузы (зеина) для соматональных линий по каждой из трех групп соматоклов использовали стандартный метод электрофореза зеина SM-2003. Затем проводили расчет и составление формул ЭФ спектров исходных электрофореграмм на основе программы «FOREZ-2» для каждого анализируемого генотипа [7].

В результате пошагового выполнения алгоритма программы «FOREZ-2» было проведено компьютерное моделирование 14 электрофоретических матриц линий-соматоклов в совокупности с 3 матрицами соответствующих линий-оригиналов. Благодаря использованию программы «FOREZ-2» на полученных ЭФ матрицах проводилась компьютерная обработка с целью последующего автоматического расчета следующих параметров: а) количественной специфики полиморфизма зеина для каждого генотипа по молекулярным формам зеина (МФЗ), представленных на матрице синтезированного ЭФ спектра группами (*полосами*) „пептидных субъединиц зеина” (ПСЗ); б) количественной специфики маркирования по бинарной интенсивности „молекулярных форм зеина” (МФЗ) гибридов кукурузы, являющихся составляющими ЭФ полос „пептидных субъединиц зеина” (ПСЗ).

По результатам компьютерного анализа определяли следующие пять итоговых параметров, характеризующих автоматически синтезируемые ЭФ-ские матрицы родственных гибридных комбинаций (РГК): [соматональная линия скрещенная(х) с соответствующей линией-оригиналом]:

1) $\sum ПСЗ$ - автоматически определяемое общее количество *групп «пептидных субъединиц зеина»* (ПСЗ), совокупность которых визуальнo, в виде полос, характеризует общий ЭФ спектр РГК;

2) $\sum Спсз$ - «общая площадь всей совокупности ЭФ зон», характеризующих белковый профиль матрицы соответствующей родственной гибридной комбинации;

3) $\sum мМФЗ$ – сумма количественных характеристик *маркерных молекулярных форм зеина* (мМФЗ), выявляемых в ЭФ полосах *пептидных субъединиц зеина* ЭФ спектра РГК;

4) $\sum S_{мФЗ}$ – „общая площадь всех маркерных МФЗ гибридности” для соответствующего белкового профиля изучаемого РГК;

5) $\% \sum S_{\text{мфз}} \text{ от } \sum S_{\text{псз}}$ – „процентная доля общей площади маркерных молекулярных форм *зеина*” в „общей площади” всей совокупности ЭФ зон, характеризующих белковый профиль матрицы соответствующей родственной гибридной комбинации.

В работе использована также методология автоматического синтеза двух сравниваемых *зеиновых* ЭФ профилей, предложенная в 2020 году Г. Комаровой [6], с целью ее использования в экспериментальной части представленной работы путем проведения прямого и обратного моделирования ЭФ матриц родственных гибридных комбинаций для выявления маркерных молекулярных форм *зеина* (ММФЗ), позволяющих обсуждать обогащающий и элиминирующий эффект самоклональной изменчивости по каждой из изученных соматоклональных линий.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе проведенных экспериментов, путем использования алгоритма формирования электрофоретических спектров на основе программы „FOREZ-2”, были получены белковые профили *зеина* соматоклональных линий кукурузы и соответствующих линий-оригиналов, из которых были индуцированы соматоклоны в эмбриокультуре.

В соответствии с Рис. 1 можно ограничиться визуальной констатацией существенного генотипического разнообразия по количеству *групп „пептидных субъединиц *зеина*”* (ПСЗ) у соматоклональных линий изучаемой генетической коллекции по трем группам линий-оригиналов: Poly17, BC27D4 и МК01.

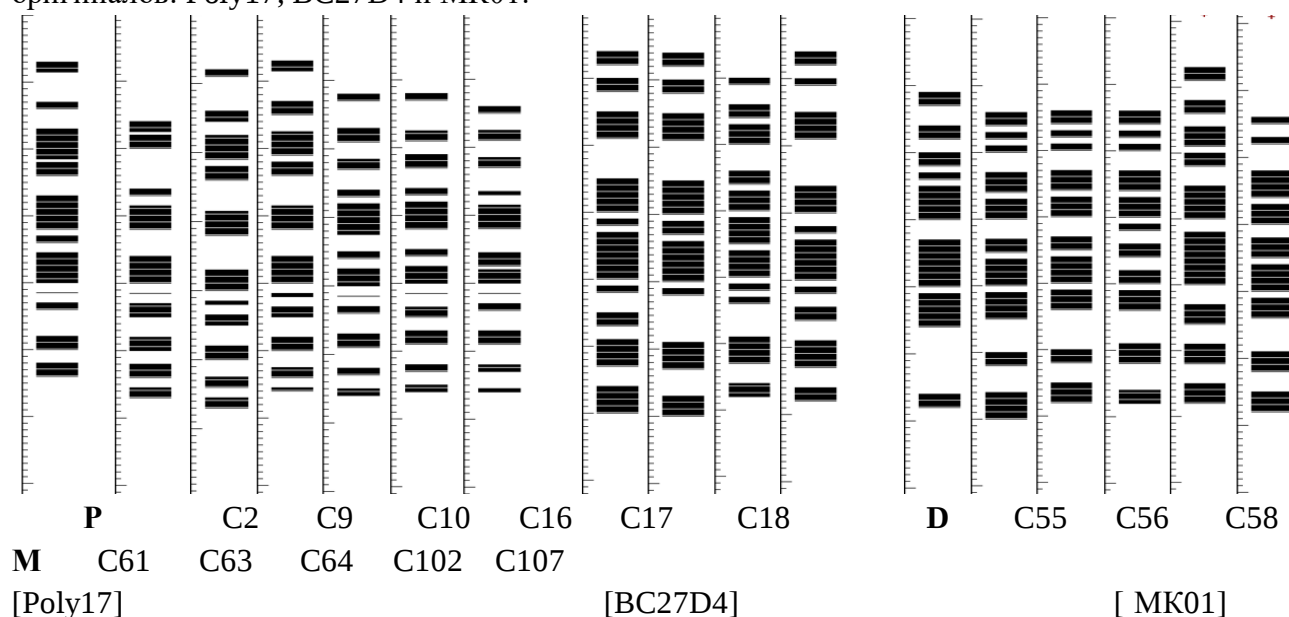


Рис.1. Электрофоретические матрицы белковых профилей *зеина*, соматоклональных линий кукурузы и их линий-оригиналов.

Полученная информация была использована как определяющая основа выполнения второго этапа эксперимента: создания ЭФ-их матриц родственных гибридных комбинаций каждой из изучаемых соматоклональных линий с соответствующей линией-оригиналом путем их автоматического синтеза по принципу кодоминантности (результат прямого и реципрокного гибридного комбинирования).

На Рис. 2, на примере одной соматоклональной линии (C17), проиллюстрирована структура апробации технологии Г. Комаровой с целью выявления элиминирующего и обогащающего эффекта самоклональной изменчивости.

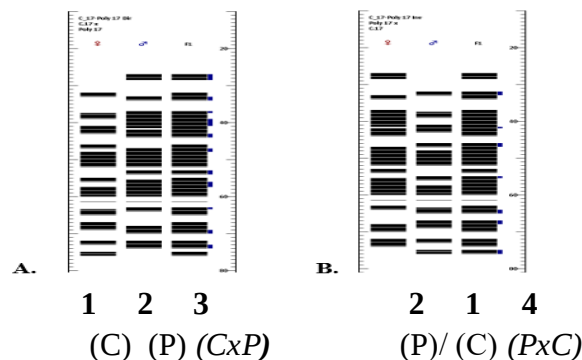


Рис. 2. Результаты ЭФ-ского маркирования родственных гибридных комбинаций соматклональной линии кукурузы C. 17 (C) с соответствующей линией-оригиналом Poly 17 (P) путем их автоматического синтеза по принципу кодоминантности: результат прямого (А) и обратного (В) гибридного комбинирования.

Прямое моделирование (Рис. 2 А):

а) на первом этапе в базу данных программы „FOREZ 2” вводят расчетную формулу, характеризующую ЭФ спектр каждой из соматклональной линии изучаемой коллекции (например, см.рис.2, вариант А, спектр 1);

б) затем вводят ЭФ формулу зеина линии-оригинала (см. Рис. 2, вариант А, спектр 2);

с) в результате автоматической комбинации формул этих двух линий (C x P), по принципу кодоминирования, на табло высвечивается ЭФ-ая матрица (3), на которой указаны маркеры элиминирующего эффекта соматклональной изменчивости на проламинановую фракцию белка (зеина) эндосперма кукурузы. Т.е. автоматически указаны те молекулярные формы зеина (МФЗ), которые исчезают в белковой молекуле линии-оригинала под воздействием факторов индукции соматклональной изменчивости в условиях *in vitro*.

Обратное моделирование (Рис. 2 В):

а) сначала в базу данных вводят расчетную формулу, характеризующую ЭФ спектр линии-оригинала (например, см. Рис. 2, вариант В, спектр 2);

б) затем вводят ЭФ формулу зеина соматклональной линии соответствующего генотипа (см. Рис. 2, вариант В, спектр 1);

в) в результате автоматической комбинации формул генотипов 2 и 1 (Р x С), по принципу кодоминирования, на табло высвечивается ЭФ-ая матрица (4), на которой указаны маркеры, обогащающего эффекта соматклональной изменчивости на проламинановую фракцию белка (зеина) эндосперма кукурузы. Т.е. автоматически указаны новые молекулярные формы зеина (МФЗ), которые появляются в белковой молекуле линии-оригинала под воздействием факторов индукции соматклональной изменчивости в условиях *in vitro*.

Таким образом, благодаря использованию предложенной технологии была получена возможность провести количественный анализ элиминирующего и обогащающего эффекта соматклональной изменчивости на проламинановую фракцию зеина.

Для оптимизации изложения результатов компьютерной обработки в представленной публикации были выбраны три ключевых параметра (№3, 4, 5 – см. раздел „Материалы и методы”), характеризующих автоматически синтезируемые ЭФ-ские матрицы родственных гибридных комбинаций (РГК) для последующего обсуждения элиминирующего и обогащающего эффекта соматклональной изменчивости на проламинановую фракцию зеина для всех 14 соматклональных линий (табл.1): $\sum \text{МФЗ}$; $\sum S_{\text{МФЗ}}$; и $\% \sum S_{\text{МФЗ}} \text{ от } \sum S_{\text{псз}}$.

Таблица 1. Выявление элиминирующего (прямое комбинирование – тип А) и обогащающего (обратное комбинирование – тип В) эффекта соматоклональной изменчивости по белковым профилям родственных гибридных комбинаций между соматоклонными линиями и их линиями-оригиналами

Гибридная комбинация	$\Sigma \text{мМФЗ}$		Доминир. эфф.	$\Sigma S_{\text{мМФЗ}}$		Доминир. эфф.	% $\Sigma S_{\text{мМФЗ}}$ от $\Sigma S_{\text{псз}}$		
	А-элим. эфф.	В-обог. эфф.		А-элим. эфф.	В-обог. эфф.		А-элим. эфф.	В-обог. эфф.	Доминир. эфф.
C2xPoly 17	8	4	2,0 А	9,7	4,6	2,1 А	32%	15%	2,1 А
C9xPoly 17	9	5	1,8 А	8,1	5,1	1,6 А	26%	17%	1,5 А
C10xPoly 17	7	4	1,8 А	5,1	3,1	1,6 А	18%	11%	1,5 А
C16xPoly 17	9	7	1,3 А	11,4	5,5	2,1 А	37%	18%	2,1 А
C17xPoly 17	11	7	1,6 А	11,9	6,0	2,0 А	38%	19%	2,0 А
C18xPoly 17	10	5	2,0 А	11,4	3,5	3,3 А	39%	12%	3, 3А
C55xBC27D4	3	1	3,0А	4,0	0,9	4,4А	12%	3%	4,0А
C56xBC27D4	7	5	1,4А	9,9	5,0	2,0А	26%	13%	2,0А
C58xBC27D4	6	2	3,0А	6,9	1,9	3,6А	20%	5%	4,0А
C61xМК 01	6	5	1,2 А	7,8	8,0	<u>1,02 В</u>	22%	23%	<u>1,05 В</u>
C63xМК 01	6	5	1,2 А	8,8	7,0	1,3 А	26%	21%	1,2 А
C64xМК 01	7	5	1,4 А	10,8	8,1	1,3 А	31%	23%	1,3 А
C102xМК 01	3	6	2,0 В	4,1	9,2	2,2 В	11%	25%	2,3 В
C107xМК 01	6	6	<u>1,0(А=В)</u>	8,9	8,0	<u>1,1 А</u>	26%	23%	<u>1,1 А</u>
min	3	1	1,0	4,0	0,9	1,1	11%	3%	1,1
max	11	7	3,0	11,9	9,2	4,4	39%	25%	4,0

Как свидетельствуют данные Табл.1, для большинства изученных соматоклонных линий кукурузы по всем трем обсуждаемым параметрам характерно доминирование элиминирующего эффекта соматоклональной изменчивости от 1,2 до 3,0 раз (по количеству маркерных молекулярных форм зеина) и от 1,1 до 4,0 раз – по сумме „общей площади маркерных молекулярных форм зеина” и их „процентной доли от общей площади пептидных субъединиц зеина” соответствующего ЭФ-ского спектра изученных РГК.

Наибольший элиминирующий эффект соматоклональной изменчивости установлен для генотипов группы линии BC27D4: C55 и C58, а также соматоклональной линии C18 из группы линии Poly 17.

Существенный обогащающий эффект соматоклональной изменчивости выявлен лишь для одной соматоклональной линии кукурузы – C102 – из группы линии МК01. Именно в группе соматоклонов линии МК 01 выявлен широкий диапазон экспрессии – не только элиминирующего (линии C63 и C64), обогащающего (линия C.102), но и нейтрального эффекта соматоклональной изменчивости (линии C61 и C107).

В заключении следует также отметить, что из изученного набора параметров, характеризующих автоматически синтезируемые ЭФ-матрицы РГК, наиболее информативной является величина «общей площади совокупности всех маркерных молекулярных форм зеина ($\Sigma S_{\text{мМФЗ}}$), а также близкая к ней величина пересчета „%-ной доли общей площади мМФЗ” ($\% \Sigma S_{\text{мМФЗ}}$ от $\Sigma S_{\text{псз}}$). Самым удобным и, следовательно, оптимальным параметром для количественного анализа элиминирующего и обогащающего эффекта соматоклональной изменчивости является показатель $\Sigma S_{\text{мМФЗ}}$.