

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ГРЕЧИХИ ТАТАРСКОЙ  
*FAGOPYRUM TATARICUM* GAERTN. ПО БЕЛКАМ СЕМЯН,  
 ВЫЯВЛЯЕМАЯ ЭЛЕКТРОФОРЕЗОМ В ПААГ\*

Т.Н. ЛАЗАРЕВА, И.Н. ФЕСЕНКО, к.б.н.; Н.Е. ПАВЛОНСКАЯ, д.б.н.

(Кафедра биохимии и физиологии растений  
 ВНИИ зернобобовых и крупяных культур, Орел)

Электрофоретическим анализом белков семян гречихи татарской *Fagopyrum tataricum* Gaertn. установлено, что изменчивость этого вида сводится к наличию/отсутствию в спектре очень интенсивного компонента с относительной подвижностью 87, который характерен для образцов из Юго-Восточной Азии. Наличие компонента наследуется как доминантный моногенный признак. Отсутствие этой полосы в спектре образца С9119, представляющего дикий подвид с опадающими семенами, может свидетельствовать о его вторичном происхождении путем спонтанной гибридизации между подвидами.

*Fagopyrum tataricum* Gaertn. (гречиха татарская) — однолетний самоопыляющийся вид, возделываемый как зерновая культура в условиях низкозатратного земледелия в странах Юго-Восточной Азии. В Китае посевы *F. tataricum* занимают около трети площадей под гречихой [2, 3]. Зерно татарской гречихи используется для производства муки [4]. Возделывание *F. tataricum* в России ограничивается традициями использования гречихи в основном как крупяной культуры: получение крупы из зерна этого вида проблематично.

Представители дикого подвида *F. tataricum* ssp. *potanini* Batalin, который рассматривается как предковый по отношению к возделываемой татарской гречихе, распространены в Китае (Тибет, провинции Юньнань и Сычуань), Гималаях, а также в Индии и Пакистане [5]. Известны также сорняковые формы татарской гречихи [6–8], которые возникли предположительно в результате спонтанной гибридизации диких и культивируемых

форм [6]. Сорняковые формы, встречающиеся в Китае, относятся к подвиду *F. tataricum* ssp. *potanini* (обладают действующим разделительным слоем на цветоножке [6]). Сорняковые формы, произрастающие в России и Восточной Европе, не обладают функциональным разделительным слоем на цветоножке [9] и, следовательно, относятся к подвиду *F. tataricum* ssp. *tataricum*.

Внутривидовая изменчивость *F. tataricum* по ряду морфологических признаков, например по форме зерна, превосходит таковую у других видов гречихи. Изменчивость по продолжительности периода всходы — цветение оказалась достаточной для достижения фактически северной границы возделывания гречихи в России. Однако данные ряда биохимических и генетических исследований свидетельствуют в пользу эффекта основателя на ранней стадии эволюции этого вида [9, 10]. Происхождение *F. tataricum* было связано с утратой генетической системы, контролирующей ге-

\* Работа выполнена в рамках ФСП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России 2007-2012 гг.» Мероприятия 1.2 «Технологии биоинженерии».

тероморфную несовместимость, характерную для большинства других видов *Fagopyrum* Mill. [11], что могло быть последствием прохождения «бутылочного горлышка». Отмечена существенно более узкая (по сравнению с другими видами *Fagopyrum*) изменчивость по изоферментам [10], а также отсутствие изменчивости по запасным белкам семян среди ряда образцов индийского происхождения [12].

В статье представлены результаты анализа внутривидовой изменчивости *F. tataricum* по белкам семян, выявляемой электрофорезом в полиакриламидном геле, а также обсуждены первые результаты анализа полиморфизма этого вида по идентифицированным генетическим маркерам.

### Материал и методика

Исследования проводили в 2004-2006 гг. Материалом служили семена образцов *F. tataricum*, представляющие почти весь ареал естественного распространения этого вида. Это образцы из коллекции ВНИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова к-2 — к-112, образец из коллекции лаборатории генетики ВНИИЗБК ALP (Altay Local Population — местная популяция из Алтайского края), и образец С9119 из коллекции университета Киото, единственный задействованный в этой работе представитель дикого подвида *F. tataricum* ssp. *potanini*.

В опыте использовали стандартный арбитражный метод ISTA для выделения и электрофоретического разделения белков семян двудольных [13, 14], адаптированный для гречихи в лаборатории биохимии ВНИИЗБК. Для характеристики образцов по составу полипептидов проводили анализ 28-36 семян индивидуально. Спектр каждого из образцов дополнительно сравнивали со спектрами 3-5 образцов в пределах одного геля.

Белки экстрагировали из муки в течение 20 ч при температуре 3-4°C с помощью электродного буфера (Tris,

глицин, DS-Na): pH=8,3. После центрифугирования 10 мкл экстракта переносили в ячейку планшетки, где смешивали с равным объемом буфера нанесения (DS-Na, Tris-HCl, глицерин, меркаптоэтанол, бромфеноловый синий). Концентрация разделяющего геля — 10%, концентрирующего — 5%.

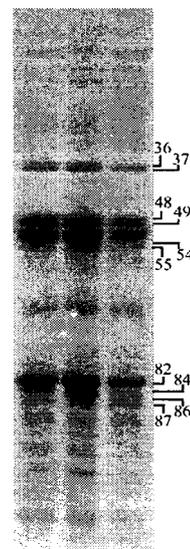
Интенсивность компонентов спектра оценивали как: 1 — слабый, 2 — интенсивный и 3 — очень интенсивный. Относительную подвижность полипептидов анализировали по «соевой» шкале [13].

### Результаты

#### Полиморфизм *F. tataricum* по спектрам запасных белков минимален

Суммарный спектр *F. tataricum* включает в себя 46 компонентов, среди которых можно выделить 9 интенсивных и 8 очень интенсивных. Для спектра этого вида характерно достаточно четкое разделение на три блока интенсивно и очень интенсивно окрашенных компонентов. Эти блоки включают полосы с относительной подвижностью: 1) 36 и 37; 2) 48-49—50—52-54-55 и 3) 82-84-86-87 (рисунок). Полностью спектр вида представлен в табл. 1.

Внутривидовая изменчивость *F. tataricum* сводится к наличию/отсутствию одного очень интенсивного компонента в нижней части спектра (позиция 87 на «соевой» шкале). Этот компонент характерен для образцов азиатского происхождения к-17 (Китай), к-87 (Индия), к-56 (Непал), к-80 (Индия) (табл. 2). В спектре образца к-98,



Электрофоретический спектр белков семян *F. tataricum* (линия к-17)

Полипептидный состав белков семян *F. tataricum*

Характеристика компонентов белкового спектра																					
Относительная подвижность	7	8	10	12	15	16	19	22	25	26	28	29	30	32	36	37	39	43	46	48	49
Интенсивность	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	3	3

Продолжение таблицы

50	52	54	55	57	58	61	62	65	66	67	69	71	75	79	80	82	84	86	87	90	94	99	102	112
2	3	3	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	3	2	2	2	2	2

Таблица 2

Распределение образцов *Fagopyrum tataricum* по типам спектра белков семян

Происхождение образца	Отсутствие компонента 87	Наличие компонента 87
Канада	к-2, к-3, к-4	
Россия*	к-5, к-9, к-10, к-11, к-24	
Китай	C9119	к-17
Индия	к-19, к-77, к-78, к-88, к-100, к-101, к-102, к-103	к-80, к-87
Прибалтика, Польша	к-20, к-53, к-57	
Восточная Сибирь	к-22, к-30, к-31, к-32, к-33	
Псковская обл.	к-40	
Западная Сибирь	к-43, ALP	
Непал	к-70, к-111	к-56
Татарстан	к-65	
Монголия	к-71, к-73	
Белоруссия	к-66, к-37, к-21, к-28, к-29, к-38, к-45	
Зап. Украина	к-23, к-25, к-26, к-35, к-27, к-34	
Зап. Европа	к-67, к-42, к-50, к-36, к-46, к-52, к-8, к-12, к-6, к-7, к-41, к-44, к-60, к-69, к-14	к-98
Дальний Восток	к-55, к-47, к-48, к-64, к-107, к-68	

\* Более точная информация о географической принадлежности отсутствует.

поступившего в коллекцию ВИР из Швеции, также обнаружена полоса 87, что, скорее всего, свидетельствует о его азиатском происхождении (это согласуется с результатами анализа по другим признакам). В спектре образца C9119, представляющего дикий подвид *F. tataricum* ssp. *potanini*, этот компонент не обнаружен.

**Генетический контроль различий по наличию/отсутствию компонента 87 в спектре *F. tataricum***

Генетический анализ проведен на материале гибридов между линиями к-17 и к-66. Анализировали индивидуальные семена, собранные с гибрида F<sub>1</sub> (к-66 х к-17), т. е. первое расщепляющееся поколение. Получено расщепле-

ние по наличию компонента 87 (табл. 3). Гипотеза о моногенном наследовании различий не отвергается с вероятностью 59%, следовательно, нарушение синтеза соответствующего полипептида связано с единичной мутацией.

**Тест на аллелизм мутаций, нарушающих синтез компонента 87 у образцов ALP (*F.t. ssp. tataricum*) и C9119 (*F.t. ssp. potanini*)**

Нарушение синтеза компонента 87 могло произойти один или несколько раз за время существования вида *F. tataricum*. Если отсутствие этого элемента в спектрах разных линий связано с независимыми мутациями, вероятно, что эти мутации затрагивают разные локусы, и тогда возможно получение рекомбинантов, синтезирующих «поте-

Наследование различий между линиями *F. tataricum* ssp. *tataricum* по признаку наличие/отсутствие компонента спектра с относительной подвижностью 87

Гибрид	Число спектров индивидуальных семян		$\chi^2$ (3:1)	P*
	с компонентом 87	без компонента 87		
F <sub>1</sub> (к-66 × к-17)	52	20	0,30	0,59

\* Вероятность подтверждения рабочей гипотезы.

рянный» полипептид. Был проведен тест на аллелизм мутантных генов, нарушающих синтез полипептида с относительной подвижностью 87 у двух образцов разного географического происхождения, представляющих разные подвиды.

Анализировали спектры индивидуальных семян, собранных с гибрида F<sub>1</sub> ALP × C9119. Ни в одном из 68 проанализированных спектров гибридных семян не обнаружено компонента 87. Следовательно, мутации, нарушающие синтез этого полипептида у представителей двух подвидов, аллельны.

#### Обсуждение результатов

При анализе изменчивости белков семян, выявляемой электрофорезом в ПААГ, установлена высокая консервативность этой генетической системы у вида *F. tataricum*. Ранее нами обнаружена изменчивость по этому признаку в пределах вида *F. sycosum* Meisn., который является ближайшим родственником *F. tataricum* [1]. Таким образом, данные электрофоретического анализа белков семян согласуются с результатами других исследований, свидетельствующими о большой вероятности эффекта основателя или «бутылочного горлышка» на ранней стадии эволюции этого вида [10, 11].

Зафиксирована единственная мутация (выпадение компонента 87), распространившаяся на большей части ареала вида. Компонент 87 обнаружен в спектрах нескольких образцов из Индии, Непала и Китая, а также в спектре одного образца, поступившего в коллекцию ВИР из Швеции (что, по-видимому, свидетельствует о его азиатском происхождении).

В настоящее время на татарской гречихе идентифицировано еще две мутации (каждая из которых нарушает развитие функционального разделительного слоя на цветоножке), обнаруженные в образцах к-17, к-66 и ALP, представляющих разные (в т. ч. отдаленные) области естественного распространения этого вида [9]. Представленные данные позволяют частично воспроизвести филогению исследованных образцов. Предком культивируемой татарской гречихи принято считать *F. tataricum* ssp. *potanini*, подвид, для которого характерно обязательное опадение созревших плодов по разделительному слою. Устойчивость к опадению — рецессивный и, следовательно, мутантный признак [9]. Устойчивые к опадению плодов линии, в спектре которых отсутствует полоса 87, мутантны по двум признакам (как минимум по двум генам).

Гипотетический предок всех линий татарской гречихи должен был бы нести доминантные аллели в локусах, контролирующих опадение семян и синтез полипептида, формирующего компонент спектра с относительной подвижностью 87. В спектре единственного изученного нами образца *F. tataricum* ssp. *potanini* C9119 компонент 87 отсутствует. Следовательно, этот образец не может рассматриваться как непосредственный предок линий, в спектрах которых этот компонент присутствует.

Ни один из устойчивых к опадению образцов, синтезирующих компонент 87, в свою очередь, не может быть непосредственным предком какой-либо линии с опадающими плодами (в т. ч.

С9119). Таким образом, пока не идентифицирован образец, который соответствовал бы гипотетическому «дикому типу» по двум признакам, один из которых (опадение) имеет ключевое taxonomическое значение.

Отдельного внимания заслуживает происхождение линии С9119. С одной стороны, С9119 несет мутацию, выключающую синтез полипептида 87, аллельную таковой у ALP, что, по-видимому, свидетельствует об общности происхождения этих мутаций в этих линиях. С другой стороны, ALP несет две мутации, блокирующие формирование действующего разделительного слоя, как минимум одна из которых аллельна одной из двух таких мутаций у линии к-17 [9], для которой характерна полоса 87. Автор [6] по результатам анализа частот аллелей изоферментов предположил, что произрастающие в Юго-Восточной Азии сорняковые формы *F. tataricum* произошли в результате гибридизации культивируемых форм с дикими. По-видимому, примером такого рода является образец С9119. Анализ набора образцов дикого подвида *F. tataricum* ssp. *potanini*, вероятно, может выявить линию, синтезирующую полипептид 87, которую можно будет рассматривать в качестве наиболее вероятного предка возделываемой татарской гречихи.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Лазарева Т.Н., Фесенко И.Н. Электрофоретическая изменчивость запасных белков семян гречихи полузонтной *Fagopyrum cymosum* Meisn / В кн.: Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов. Воронеж: Центрально-Черноземное книжное издательство, 2006. С. 130-132. — 2. Lin R., Tao Y., Li X. Preliminary division of cultural

and ecological regions of Chinese buckwheat // Proc. 5<sup>th</sup> Intl. Symp. Buckwheat at Taiyuan (China), 1992. P. 29-35. — 3. Wang Y.J., Campbell C. Buckwheat production, utilization and research in China // *Fagopyrum*, 2004. Vol. 21. P. 123-133. — 4. Kreft I., Chang K.J., Choi Y.S., Park C.H. Ethnobotany of buckwheat. Seoul: Jinsol Publishing Co., 2003. — 5. Ohnishi O. Search for the wild ancestor of common buckwheat. 3. The wild ancestor of cultivated common buckwheat, and of tartary buckwheat // *Econ. Botany*, 1998. Vol. 52. P. 123-133. — 6. Ohnishi O. Geographical distribution of allozymes in natural population of wild tartary buckwheat // *Fagopyrum*, 2000. Vol. 17. P. 29-34. — 7. Kump B., Javornik B. Genetic diversity and relationships among cultivated and wild accession of tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) as revealed by RAPD markers // *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2002. Vol. 49. P. 565-572. — 8. Romanova O. Northern populations of tartary buckwheat with respect to day length // Proc. 9<sup>th</sup> Intl. Symp. Buckwheat at Prague, 2004. P. 173-178. — 9. Fesenko I.N. Non-shattering accessions of *Fagopyrum tataricum* Gaertn. carry recessive alleles at two loci affecting development of functional abscission layer // *Fagopyrum*, 2006. Vol. 23. — 10. Ohnishi O. Evaluation of world buckwheat varieties from the view points of genetics, breeding and the origin of buckwheat cultivation // Proc. 3<sup>rd</sup> Intl. Symp. Buckwheat at Pulawy, 1986. Part 1. P. 198-213. — 11. Fesenko I.N. Flower homostyly of *Fagopyrum tataricum* Gaertn. is determined by minus-alleles of polymeric genes which related to the loci of heterostyly background in *F. cymosum* Meisn // *Fagopyrum*, 2005. Vol. 22. P. 7-12. — 12. Chungoo N.K., Anusuya. Genetic diversity in accessions of himalayan buckwheats revealed by SDS PAGE of soluble proteins extracted from single seeds and RAPD based DNA fingerprinting // Proc. 9<sup>th</sup> Intl. Symp. Buckwheat at Prague, 2004. P. 326-335. — 13. Идентификация сортов и регистрация генофонда культурных растений по белкам семян / Под ред. В.Г. Конарева. СПб.: ВИР, 2000. — 14. International rules for seeds testing // *Seed Sci. Technol.*, 1993. Suppl. 21.

## SUMMARY

By electrophoretic analysis of total seed protein it's been revealed that variability of *Fagopyrum tataricum* Gaertn. is reduced to presence / absence in a spectrum of one very intensive component with relative mobility 87. This appeared in samples from South-East Asia. Presence of the band is inherited as dominant monogenic trait. Absence of the component in a spectrum of the sample С9119 representing a wild subspecies with falling seeds, suggests its secondary origin by spontaneous hybridization between subspecies.