

МІНЛИВІСТЬ ФЕРМЕНТНИХ СИСТЕМ У ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ *PHASEOLUSL.*

Л.В. Головань, В.К. Пузік, В.М. Попов

*Харківський національний аграрний університет ім. В.В.Докучаєва
п/в «Комуніст-1», Харків, 62483, Україна, e-mail: L1985KL@mail.ru*

У роботі наведені результати вивчення міжвидової та внутрішньовидової мінливості ферментних систем (ME, MDH, EST, cEST, GDH) у 4-х видів квасолі (*Ph. vulgaris* (L.) Savi, *Ph. lunatus* L. Ssp. *Microsperma*, *Ph. acutifolius* A Grau, *Ph. multiflorus* Lam). Проведені нами дослідження показали, що майже для всіх ізоферментів була характерна наявність декількох чітких ферментативних зон. Для ферментів *Meta Est* був встановлений поліморфізм на міжвидовому рівні. Ці ферментні системи можуть бути використані в якості маркерів окремих видів. Ферментні системи *Gdh* та *cEst* виявилися мономорфними у вивчених видів квасолі. Поліморфізм вивчених ферментних систем у подальшому можна використовувати для вивчення взаємовідношень між зразками колекції, а також для вивчення філогенетичних зв'язків між видами квасолі.

Ключові слова: *Ph. vulgaris* (L.) Savi, *Ph. lunatus* L. Ssp. *Microsperma*, *Ph. acutifolius* A Grau, *Ph. multiflorus* Lam, ферменти, мінливість.

Однією з найважливіших задач селекції рослин є оцінка генетичного різноманіття та класифікація вихідного матеріалу. Характеристика зразків квасолі за комплексом маркерних ознак має особливе значення при підборі батьківських пар для створення вихідного матеріалу. Наявність великої кількості зразків з невідомим походженням потребує розподілення їх за рівнем генетичного віддалення. Для розподілення селекційного матеріалу необхідні методи, що дозволяють тестувати велику кількість генотипів та використовувати мінімальну кількість рослинних тканин. Значного успіху у цьому плані досягнуто за допомогою різних маркерів, серед яких найбільше розповсюдження отримали біохімічні та молекулярні. Їх перевага у тому, що порівняно з генетично обумовленими морфологічними ознаками ізоферменти як фенотипові маркери є прямими продуктами активності генів і тому менш підлягають впливу навколишнього середовища, у той час як шлях від гену до прояву більшості ознак обумовлений великою кількістю біохімічних процесів, які протікають у клітинах організму, і піддаються дії навколишнього середовища. Крім того алельні ізоферменти проявляються у більшості випадків кодомінантно – один ген не пригнічує прояв іншого, тобто у гетерозигот присутні два типи субодиниць ферменту, тоді як у гомозигот – тільки одна. Тобто про генотип рослини можна говорити за фенотиповою ознакою – спектру ізоферментів. Широкомасштабному використанню цього методу перешкоджають великі часові та матеріальні затрати.

У іноземних дослідженнях були використані ізозими для визначення генетичного різноманіття та вивчення філогенії роду *Phaseolus* L. Так, було вивчено мінливість ферментів естерази, кислій фосфатази та пероксидази у межах роду *Phaseolus* [1]. Вивчення еволюційних змін аспартатамінотрансферази (ААТ) та супероксиддисмутази (SOD) у диких та культивованих видів роду *Phaseolus* показало, що рід *Phaseolus* з видами *Ph. vulgaris*, *Ph. coccineus*, *Ph. lunatus* и *Ph. acutifolius* мають гомогенну групу з незначними змінами цих ферментів [2]. Вивчено поліморфізм таких ферментів: рибулозобіфосфат карбоксилаза (RBCS), шикімаатдегідрогеназа (SKDH), катодна пероксидаза (PER), малик-ензим (ME), глюкозофосфатізомераза

(GPI), N-ацетил глюкозамінідаза (NAG), аденілазакіназа (ADK) та встановлено, що кожна з цих систем знаходиться під контролем одного окремого гену, а саме *Rbcs-1*, *Per-1*, *Me-1*, *Gpi-1*, *Nag-1* та *Adk-1* [3, 4, 5, 6].

Пізніше було встановлено, що поліморфізм НАДФ-залежної діафрази (DIA) контролюється зчепленими генами - *Diap-1* и *Diap-2* [7]. Дослідники Koenig та Gepts [8] ідентифікували нові ізоформи для лейцинамінопептидази (LAP) та малатдегідрогенази (MDH), які контролюються генами *Lap-3* та *Mdh-1* відповідно.

Біохімічний аналіз вказаних вище ферментних систем деякі автори використовують для вивчення родинних зв'язків [10, 11] та еволюційних процесів, а також структури популяцій квасолі [12, 13, 14, 15]. Вивчення генетичного різноманіття квасолі лимської взагалі залишається обмеженим. Генетичні маркери використовувалися лише для таксономічних досліджень [16, 17, 18], інші дослідження були проведені щоб оцінити внутрішньопопуляційну структуру квасолі лимської [19, 20]. Літературні дані по ферментам видів *Ph. coccineus* (*sun. multiflorus* Lam) та *Ph. acutifolius* A Grau взагалі відсутні. Крім того, українські зразки цієї культури не вивчали і тому роботи проведені у цьому напрямі є актуальними.

Метою нашої роботи було вивчення поліморфізму ізоферментів у видів роду *Phaseolus*L., що необхідно для визначення еволюційно складеного популяційно-генетичного різноманіття.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

В якості рослинного матеріалу використовували 25 зразків квасолі з колекції Харківського національного аграрного університету ім. В.В.Докучаєва та Національного центру генетичних ресурсів рослин України (НЦГРРУ) (табл. 1). Зразки інтродуковані з різних еколого-географічних районів (Україна, Болгарія, Туреччина, Франція, США, Філіппіни, Росія, Іран, Мексика та ін.) і належать до 4-х видів - *Ph. vulgaris* (L.) Savi, *Ph. lunatus* L. Ssp. *Microsperma*, *Ph. acutifolius* A Grau, *Ph. multiflorus* Lam. Вибір рослинного матеріалу пов'язаний з використанням його у селекційному процесі з створення вихідного матеріалу квасолі.

Таблиця 1

Перелік зразків квасолі, що вивчалися

п/п	№ Національного каталогу України	Назва зразка	Країна походження
1	2	3	4
<i>Ph. vulgaris</i> (L.) Savi			
1	UD0300775	Докучаєвська	Україна
2	UD0300025	Первомайська	Україна
3	UD0501709	-	Україна
4	UD0501722	-	Україна
5	UD0503341	-	Україна
6	UD0503256	-	Україна
7	UD0500045	Прелом	Болгарія
8	UD0501043	Horoz	Туреччина
9	UD0500223	Isex	Франція
10	UD0500227	Holberg	США
<i>Ph. lunatus</i> L. Ssp. <i>Microsperma</i>			
11	UD0302220	Пестропалевая	Росія
12	UD0303348	Geszentye Bab	Угорщина
13	UD0303348	Henderson	США
14	UD0303247	Three Color Poll	США

1	2	3	4
15	UD0301530	Koro Irion	Філіппіни
<i>Ph. multiflorus Lam</i>			
16	UD0300461	Місцева 15	Україна
17	UD0301762	-	Україна
18	UD0303436	-	Україна
19	UD0303446	Blanka	Польща
20	UD0300843	-	Німеччина
<i>Ph. acutifolius A Grau</i>			
21	UD0301625	-	Україна
22	UD0301237	Accutifolius	Німеччина
23	UD0301869	Зард американ	Іран
24	UD0300124	PI 440798	Мексика
25	UD0300498	PI 476858	Мексика

Об'єктом біохімічного аналізу слугувало насіння. Для оцінки міжвидового поліморфізму було проаналізовано суміш 10 насінин кожного зразка. Для внутрішньовидового аналізу брали 29 насінин кожного зразка.

Ізоферментний спектр виявляли методом вертикального електрофорезу у поліакріламідному гелі. Екстракція ферментів проводилась з окремих насінин 0,02 М Трис-НСІ буфером (рН 7,5), який містить 0,01 мМРVP; 0,006 мМ ЕДТА; 0,01 мМ ДТТ і 20% цукрози, на холоді протягом однієї години.

Готували розчин для екстракції. Брали 2,175 г цукрози; 217,5 мг РVP; 4,35 мг ЕДТА; 43,5 мг ДТТ і 10,88 мл Трис-НСІ. Додавали 200 мкл розчину в епіндорфи з мукою. Супернатант відокремлювали за допомогою центрифугування на протязі 5 хв 7 тис.об/хв. Отримані екстракцією ферменти одразу використовуються для електрофорезу.

Для розподілу ферментів використовувалась Трис-ЕДТА-боратна буферна система – 0,09 М Трис, 0,09 М Н₃ВО₃, 0,0031 М ЕДТА з рН 8,3 (концентрація акриламідну і метиленбісакриламідну в гелі складала 7% та 0,37% відповідно).

В якості каталізатора та ініціатора реакції полімеризації використовували N'N'N'N'-тетраметилетилендіамін (ТЕМЕД) та персульфат амонію.

Режим електрофорезу: входження білків у гель – 10 хв. 80V, робочий режим – 3год, 300V при температурі електродного буферу не вище 8⁰С.

Гістохімічне забарвлення гелів здійснювалось за методикою Шоу та Прассада з модифікаціями [21].

Вивчали наступні ферментні системи: НАДФ-залежна малатдегідрогеназа (малик-ензим, ME, К.Ф.1.1.1.40), НАД-залежна малатдегідрогеназа (MDH, К.Ф.1.1.1.37), анодна естераза (EST, К.Ф. 3.1.1.1), катодна естераза (сEST, К.Ф. 3.1.1.1) та глутаматдегідрогеназа (GDH, К.Ф. 1.4.1.2).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Перед використанням ізоферментних систем як генетичних маркерів, необхідно виявити та вивчити генетично обумовлений внутрішньо та міжвидовий поліморфізм, а також знати характер їх успадкування та генетичний контроль. Для виявлення міжвидового поліморфізму квасолі ми проводили аналіз суміші насіння, що дав змогу виявити різницю у спектрах.

Аналіз EST, сEST, GOT та GDH був проведений лише на суміші насіння квасолі. Понасінний аналіз EST та сEST дозволив виявити слабку активність цих ферментів, що унеможлиблює інтерпретацію даних при цих умовах електрофорезу. GOT та GDH виявилися мономорфними для всіх видів квасолі. Аналіз ME та MDH був проведений з

сумішшю та понасінно, поліморфізм був виявлений як на міжвидовому, так і на внутрішньовидовому рівні.

Малик-ензим (ME, К.Ф.1.1.1.40). Зимографічний аналіз білкових спектрів на міжвидовому рівні дозволив виявити наявність чотирьох зон активності малик-ензиму. Спектр першої зони активності ферменту характеризувався наявністю швидкого (F) та повільного (S) компонентів. Також нами було виявлено гібридні спектри для даної зони. Для них було характерно об'єднання S та F компонентів, що свідчить про кодомінантний тип успадкування. Друга зона активності ферменту була дифузною та мономорфною, скоріш за все складається з декількох компонентів, але ідентифікувати окремо складові цієї зони при даних умовах електрофорезу не вдалося. Третя зона активності ферменту виявилася поліморфною. У ній виявлено два алозими: повільний (S) та швидкий (F). Четверта зона активності ферменту також була поліморфною. Цей локус був представлений аельними варіантами, що розрізнялися за електрофоретичною рухливістю (рис. 1, ME). Всього було ідентифіковано 3 алозими - S, F и vF. При аналізі у деяких видів не вдалося встановити наявність деяких зон ферментативної активності цього ферменту (2, 4 зони). Це є свідченням міжвидового поліморфізму малик-ензиму квасолі. Четверта зона активності ферменту малик-ензиму зразку UD0301237 окрім мажорного компоненту характеризувалася наявністю повільного тонкого компоненту, що може свідчити про наявність нуль-алеля.

Деякі автори [8, 9] вивчаючи поліморфізм малик-ензиму відмічали наявність однієї зони активності ферменту. Ця зона є поліморфною з трьома алелями (98, 100, 102). Співставити отримані нами результати неможливо, оскільки у роботах відсутні зображення спектрів.

НАД-залежна малатдегідрогеназа (MDH, К.Ф.1.1.1.37). Інформація по генетичному контролю малатдегідрогенази у квасолі звичайної описана у декількох літературних джерелах [3, 8, 9]. Автори відмічають наявність двох зон активності ферменту MDH1 та MDH2. У цих зонах описано по два алеля Mdh1 (100, 103) та у Mdh2 – (100, 102). Santana описав додатковий алель у Mdh1 – 98. Вчений Maquet описав малатдегідрогеназу у квасолі лимської [22]. Він встановив відсутність першої зони активності ферменту, та наявності двох інших – другої та третьої. У Mdh2 описано два алелі з електрофоретичною рухливістю 100 та 140. Та відкрито ще два алелі третьої зони активності з електрофоретичною рухливістю – 100 та 104.

Нами встановлено, що спектр цього ферменту є доволі складний і містить багато компонентів. Так, у зразках різних видів квасолі у системі малатдегідрогенази було ідентифіковано дві основні зони активності ферменту: повільна (зона I) та швидка (зона II). Кожна з цих зон була представлена двома алозимами (S та F) (рис. 1, MDH). Між двома основними зонами активності ферменту виявлені проміжні додаткові компоненти, що можливо свідчить про міжгенні взаємодії (міжлокусні гетеродимери).

Анодна естераза (EST, К.Ф.3.1.1.1). Особливості генетичного контролю анодної естерази були описані у роботах Weeden [4, 5], який виявив дві зони активності. Вони є поліморфними та містять два алелі повільний та швидкий.

У результаті електрофорезу при вивченні поліморфізму анодної естерази було виявлено чотири основні зони активності даного ферменту. Вивчення естерази у поліакріламідному гелі показало, що вона варіювала за субстратною специфічністю. Так, зони ферментативної активності EST1, EST2, EST3 виявили субстратну специфічність до α -нафтилацетату, а зона EST4 до β -нафтилацетату. Для першої зони характерна наявність однокомпонентного лінійного спектру. Друга зона ферментної активності естерази була дифузною, проявлялася досить слабо, ідентифікувати окремі компоненти не можливо. Зона EST3 являє собою мажорний компонент, можливо складається з декількох компонентів, які за методикою електрофорезу, що використовувалась нами розділити не вдалося. У зоні EST4 виявлений міжвидовий поліморфізм. У ній виявлено 3 алозими, які розрізняються за електрофоретичною

рухливістю і позначені нами як «повільний» S, «швидкий» F та дуже швидкий vF (рис.1, EST). А також виявлений гібридний спектр для якого було характерне об'єднання S та vF клонентів.

Катодна естераза (сEST, К.Ф. 3.1.1.1). Зимограми катодної естерази у вивчених видів квасолі були представлені однією зоною активності сEST1 (рис.1, сEST). Дана зона була представлена однокомпонентним лінійним спектром у всіх видів квасолі. Інформація про генетичний контроль у літературі відсутня.

Глутаматдегідрогеназа (GDH, К.Ф.1.4.1.2). При гістохімічному фарбуванні була виявлена одна зона активності ферменту, яка ймовірно контролюється одним геном Gdh1 (рис.1, GDH). Цей локус виявився мономорфними для всіх видів квасолі взятих в аналіз. Інформація про генетичний контроль у літературі відсутня.

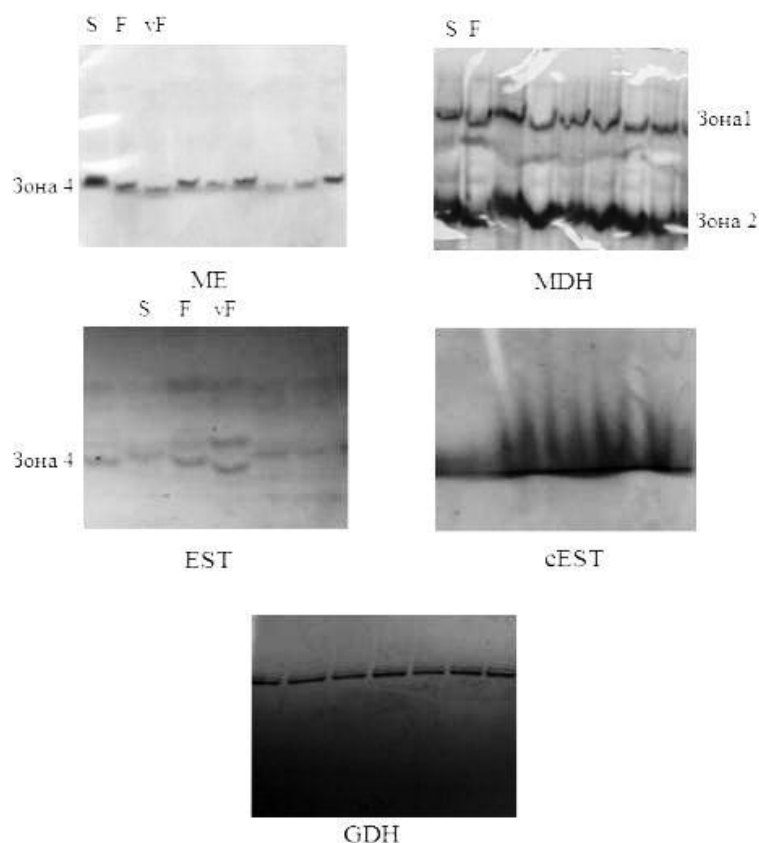


Рис. 1. Електрофореграми малік-ензіма (ME), НАД-залежної малатдегідрогенази (MDH), анодної естерази (EST), катодної естерази (сEST), глутаматдегідрогенази (GDH).

ВИСНОВКИ

Таким чином, проведені нами дослідження показали, що майже для всіх ізоферментів була характерна наявність декількох чітких ферментативних зон. За виключенням GDH та сEST для яких було виявлено по одній зоні активності. Для ферментів *MetaEst* був встановлений поліморфізм на міжвидовому рівні. Так, лише у виду *Ph. acutifolius* виявлені 2-а та 3-я зони активності малік-ензіму, а у видів *Ph. lunatus* та *Ph. acutifolius* відсутні 2-а та 3-я зони активності ферменту EST. Ці ферментні системи можуть бути використані в якості маркерів окремих видів. Зони активності ферменту малатдегідрогенази виявилися спільними для всіх видів квасолі взятих в аналіз. Ферментні системи *Gdh* та *cEst* виявилися мономорфними у вивчених видів квасолі. Поліморфізм вивчених ферментних систем у подальшому можна використовувати для вивчення взаємовідношень між зразками колекції, а також для вивчення філогенетичних зв'язків між видами квасолі.

ЖИТЕПАТЫПА

1. Bassiri A., Adams M.W. An electrophoretic survey of seed isozymes in several *Phaseolus* species // *Euphytica*. – 1978. - №27. - P. 447-459.
2. Jaaska V., Jaaska V. Isoenzyme variation in the genera *Phaseolus* and *Vigna* (Fabaceae) in relation to their systematics: Aspartate aminotransferase and superoxide dismutase // *Plant Syst Evol.* –1988. - №159. - P. 145-159.
3. Weeden N.F. Linkage between the gene coding for the small unit of ribulose biphosphate carboxylase and the gene coding for malic enzyme in *Phaseolus vulgaris* // *Annu Rep Bean Impr Coop.*-1984.-№ 27.- P.123-124.
4. Weeden N.F. Distinguishing among white-seeded bean cultivars by means of allozyme genotypes // *Euphytica.*-1984.-№33.-P.199-208.
5. Weeden N.F. Genetic confirmation that the variation in the zymograms of 3 enzyme systems is produced by allelic polymorphism // *Annu Rep Bean Impr Coop.*-1986.-№29.- P.117-118.
6. Weeden N.F., Liang C.Y. Detection of a linkage between flower color and Est-2 in common bean // *Annu Rep Bean Impr Coop.*-1985.-№27.-P.87-88.
7. Sprecher SL Allozyme differentiation between gene pools in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), with special reference to Malawian germplasm. PhD thesis, Michigan State University, East Lansing (UMI, Diss. Inform. Serv.8900102).-1988
8. Koenig R., Gepts P. Allozyme diversity in wild *Phaseolus vulgaris*: further evidence for two major centers of genetic diversity // *Theor Appl Genet.*– 1989.- V. 78.-P.809-817.
9. Santalla M., Rodiño A.P., De Ron A.M. Allozyme evidence supporting southwestern Europe as a secondary center of genetic diversity for the common bean // *Theor Appl Genet.*-2002.-№104.- P.934–944.
10. Crawford DJ Enzyme electrophoresis and plant systematics. In: Soltis DE, Soltis PS (eds) *Isozymes in plant biology.* // *Theor Appl Genet.*-1990.-№96.- P. 165-178.
11. Murphy R.W., Sites Jr. J.W., Buth D.G., Hauber C.H. (1990) *Proteins I. Isozyme electrophoresis*// In: Hillis DM, Moritz C (eds) *Molecular systematics.* Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, USA.-1990.-P.45-126.
12. Doebley J. Isozymic evidence and the evolution of crop plants // In: Soltis DE, Soltis PS (eds) *Isozymes in plant biology.* Chapman and Hall, London, England.-1990.-P. 165-191.
13. May B. Starch-gel electrophoresis of allozymes // In: Hoelzel AR (ed) *Molecular genetic analysis of populations - a practical approach.* Oxford University Press, Oxford, England.-1992.- P. 1-27.
14. Schaal B.A., Leverich W.J., Rogstad S.H. A comparison of methods for assessing genetic variation in plant conservation biology // In: Falk DA, Holsinger KE (eds) *Genetics and conservation of rare plants.* Oxford University Press, New York, USA.-1991.-P. 123-134.
15. Gepts P. Genetic markers and core collections // In : Hodgkin T, Brown AHD, van Hintum TJJ, Morales EAV (eds) *Core collections of plant genetic resources.* John Wiley and Sons, Chichester, UK.-1995.- P. 127-146.
16. West N.B., Garber E.D. Genetic studies of variant enzymes // I. An electrophoretic survey of esterases and leucine aminopeptidases in the genus *Phaseolus*. *Can J Genet Cytol.*-1967.-№ 9.-P. 640-645.
17. Hamann A., Zink D., Nagl W. Microsatellite fingerprinting in the genus *Phaseolus* // *Genome.*-1995.-№ 38 P. 507-515.
18. Jaaska V. Isoenzyme diversity and phylogenetic affinities among the *Phaseolus* beans (Fabaceae) // *Pl Syst Evol.*-1996.-№ 200 P. 233-252.
19. Nienhuis J., Tivang J., Skroch P., dos Santos B. Genetic relationships among cultivars and landraces of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as measured by RAPD markers // *J Am Soc Hort Sci.*-1995.-№120 P. 300-306.
20. Lioi L., Lotti C. Allozyme variability in cultivated Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) // *Bean Improv Coop Annu Rep.*-1996.-№ 39 P.249-250.

21. Show C.R., Prasad R. Starch gel electrophoresis of enzymes – a compilation of recipes // Biochem. Genet. – 1970. – 4, № 2. – P. 297-320.
22. Maquet A. Zoro Bi I. Delvaux M. Wathelet B. Baudoin J.-P. Genetic structure of a Lima bean base collection using allozyme markers // Theor Appl Genet. -1997.-№ 95 P. 980-991.

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *PHASEOLUS* L.

Л.В. Головань, В.К. Пузик, В.Н. Попов.

*Харьковский национальный аграрный университет имени В.В. Докучаева
62483, Украина, Харьковская обл., Харьковский р-н, п/о «Коммунист-1»*

В работе изложены результаты изучения межвидовой и внутривидовой изменчивости ферментных систем (ME, MDH, EST, cEST, GDH) у 4-х видов фасоли (*Ph. vulgaris* (L.) Savi, *Ph. lunatus* L. Ssp. *Microsperma*, *Ph. acutifolius* A Grau, *Ph. multiflorus* Lam). Проведенные нами исследования показали, что для всех изоферментов было характерно наличие нескольких четких ферментативных зон. Для ферментов Me та Est был выявлен полиморфизм на межвидовом уровне. Эти ферментные системы могут быть использованные в качестве маркеров отдельных видов. Ферментные системы Gdh та cEst оказались мономорфными у изученных видов фасоли. Полиморфизм изученных ферментных систем в дальнейшем будет использован для изучения взаимоотношений между образцами коллекции, а также для изучения филогенетических связей между видами фасоли.

Ключевые слова: *Ph. vulgaris* (L.) Savi, *Ph. lunatus* L. Ssp. *Microsperma*, *Ph. acutifolius* A Grau, *Ph. multiflorus* Lam, ферменты, изменчивость.

ENZYMATIC SYSTEMS VARIABILITY IN REPRESENTATIVES OF PHASEOLUS L.

L. V. Golovan', V. K. Pouzik, V. N. Popov

*Kharkiv National Agrarian University named after V. V. Dokuchayev
62483, p/o Kommunist, Kharkiv Oblast', Kharkiv Region, Ukraine*

The results of interspecific and intraspecific enzymatic system variability (ME, MDH, EST, cEST, GDH) of 4 bean species (*Ph. vulgaris* (L.) Savi, *Ph. lunatus* L. Ssp. *Microsperma*, *Ph. acutifolius* A Grau, *Ph. multiflorus* Lam) are stated in the work. The investigations showed that some particular enzymatic zones were typical for all isoenzymes. Polymorphism on interspecific level was revealed for enzymes Me and Est. These enzymatic systems may be used as markers of particular species. Enzymatic systems Gdh and cEst appeared to be monomorphic in the studied bean species. Polymorphism of the studied enzymatic systems will be used to learn the interrelation of the collection samples, and also to study phylogenetic interrelation of bean species.

Key words: *Ph. vulgaris* (L.) Savi, *Ph. lunatus* L. Ssp. *Microsperma*, *Ph. acutifolius* A Grau, *Ph. multiflorus* Lam us, enzymes, variability.