

Владимир ТАЛИ

ДИСК-ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СОЛЕРАСТВОРИМЫХ БЕЛКОВ СЕМЯН ВИДОВ РОДА ГОРОШЕК *VICIA L.*

В таксономических исследованиях все возрастающее значение придают биохимическим и химическим данным. Особое внимание в последнее время уделяют белковому составу как таксономическому признаку. Частично это связано с разработкой подходящих быстрых методов анализа очень сложных природных белковых систем. Наиболее часто для сравнения свойств растительных белков используется метод диск-электрофореза в полиакриламидном геле (см. обзоры: Steward, Barber, 1964; Boulter, Thurman, Turner, 1966; Boulter, Thurman, 1968; Fairbrothers, 1968; 1969; Johanson, 1969; Przybylska, Hurich, 1971).

Целью данного исследования является сравнение диск-электрофоретических профилей солерастворимых белков семян видов и сортов рода горошек (*Vicia L.*), чтобы установить применимость этого метода для таксономии рода.

Материал и методика

Исследовались семена полной спелости 11 видов растений рода горошек (*Vicia L.*). В большинстве случаев использовались семена различных мест и годов произрастания. У широко культивируемых видов горошка посевного (*V. sativa L.*) и конских бобов (*V. faba L.*) изучались также и различные сорта (соответственно 7 и 8 сортов). В общем числе рассматривалась 51 проба семян, характеристика которых дана в таблице.

Видовая принадлежность семян автором не проверялась.

Подготовка семян к анализу и фракционирование белков проводились, как и в предыдущем исследовании (Тали, 1974).

Тонко измельченные семена (сито 0,25 мм) экстрагировали для выделения суммарных солерастворимых белков 5%-ным раствором K_2SO_4 в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,0) в соотношении 1:5 (вес/объем) при температуре 2—4 °С в течение 1 ч (Boulter и др., 1967). Остаток отделяли центрифугированием (9000 об/мин) в течение 30 мин. В надосадочной жидкости определяли содержание белка методом Лоури (Lowry и др., 1951) и объем, соответствующий приблизительно 200 мкг белка, подвергали диск-электрофорезу в полиакриламидном геле по Орнштейн (Ornstein, 1964) и Дэвис (Davis, 1964). Разделенные белки окрашивали амидочерным 10 Б.

Окрашенные гели сравнивались визуально, измерялись дистанции, пройденные отдельными белковыми зонами, и вычислялись R_f по отношению к наиболее быстро мигрирующей зоне.

Гели денситометрировались на микрофотометре МФ-2 и фотографировались в проходящем свете на матовом стекле. Для лучшего сравнения денситограммы и фотографии гелей приводились к 10 см длине.

Результаты диск-электрофореза представлялись в виде фотографий и денситограмм гелей (пример приведен на рис. 1), а также диаграмм с усредненными данными R_f .

Процент сходства между двумя таксонами вычислялся по Уайтнэ (Whitney и др., 1968) на основании формулы:

$$\frac{\text{число пар сходных зон} \times 100}{\text{число несходных зон} + \text{число пар сходных зон}}$$

Результаты и обсуждение

С целью выяснения возможного влияния места и года произрастания растения на белковый состав его семян исследовались семена, полученные из различных районов Советского Союза и собранные в разные годы (таблица). Различия в относительной скорости миграции белковых зон (R_f) семян, относящихся к различным популяциям и географическим районам, оказались незначительными и не превышали вариации между отдельными диск-электрофореграммами одного и того же образца. Стабильность электрофоретического профиля белков семян отмечалась ранее у конских бобов (Fox и др., 1964) и у видов трибы *Trifolieae* L. (Przybylska, Hurich, 1971; Тали, 1974).

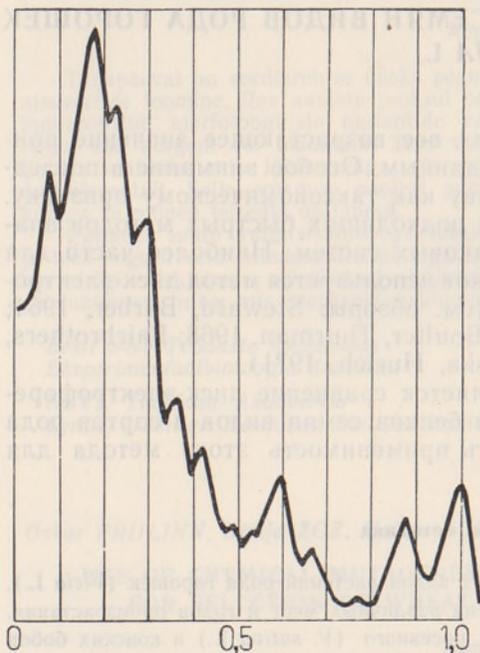


Рис. 1. Денситограмма и фотография геля *V. faba* L.

При исследовании сортов *V. sativa* L. и *V. faba* L. выяснилось, что заметных качественных различий между белковыми профилями сортов одного и того же вида не наблюдается, хотя количественные соотношения между белковыми зонами в некоторой мере варьируют.

Электрофореграммы солерастворимых белков семян всех видов рода горошек (рис. 2) характеризуются наличием яркоокрашенной главной белковой зоны с одинаковым значением R_f для всех исследованных видов (в пределах нормальной вариации), над которой расположены 2—4 четкие узкие зоны. Число этих зон варьирует в зависимости от количества белка, подверженного электрофорезу, а также от дистанции, пройденной белковыми зонами. Под главной белковой зоной в большинстве случаев расположены 3—4 зоны со средней интенсивностью. Только у *V. cassubica* L., *V. lathyroides* L., *V. sativa* L., *V. silvatica* L., *V. angustifolia* L. и *V. faba* L. находятся некоторые яркоокрашенные зоны и в нижней части гелей. Одна зона у всех видов движется с фронтом мигрантов.

Несмотря на общее сходство белковых профилей видов рода горошек, отмеченное уже ранее (Boulter и др., 1967), более детальный анализ выявляет и некоторые вполне определенные качественные различия отдель-

Перечень исследованных семян рода *Vicia* L.*

Таксон	Год сбора	Источ-ник семян	Таксон	Год сбора	Источ-ник семян
1. Подрод <i>Ervilia</i> Link			<i>V. sativa</i> L.		
<i>V. ervilia</i> (L.) Willd.	1968	В	„ 'Камалинская'	1970	Е
„	1968	Г	„ <i>var. leucosperma</i>		
„	1970	Г	Ser.	1968	А
„	1970	В	„	1969	А
2. Подрод <i>Craccoidea</i> B. Fedtsch.			<i>V. angustifolia</i> L.	1970	Д
1. Секция <i>Lenticula</i> (Endl.)			„	1970	Г
Aschers. et Graebn.			3. Подрод <i>Faba</i> (Adans.)		
<i>V. hirsuta</i> (L.) S. F. Gray			S. F. Gray		
„	1970	Д	<i>V. faba</i> L. <i>var. minor</i> Beck.	1968	А
2. Секция <i>Cracca</i> S. F. Gray			„	1968	В
<i>V. cassubica</i> L.	1970	З	„ „ 'Askott'	1967	Е
„	1970	В	„	1968	Е
<i>V. silvatica</i> L.	1968	Г	„ 'Friedrich Berg'	1967	Е
<i>V. cracca</i> L.	1968	Б	„ 'Качалкинский		
„	1968	Г	ВИК'	1967	Е
„	1970	Г	<i>V. faba</i> L. <i>var. equina</i>		
<i>V. villosa</i> Roth	1968	Г	Pers. 'Erfurter'	1970	З
„	1970	З	„ 'Местные		
3. Секция <i>Euvicia</i> Vis.			фиолетовые'	1967	Е
<i>V. sepium</i> L.	1968	В	„ 'Горноальпийские'	1967	Е
„	1968	Г	<i>var. major</i> Harz		
<i>V. lathyroides</i> L.	1968	А	„ 'Русские черные'	1968	Е
„	1968	В			
„	1970	В			
<i>V. sativa</i> L.	1968	А			
„	1969	А			
„	1970	А			
„	1970	В			
„	1968	В			
„	1968	Г			
„ 'Белая'	1968	А			
„	1969	А			
„	1970	А			
„ 'Львовская'	1968	А			
„	1969	А			
„	1970	А			
„ 'Svalöfs					
Süssvichen'	1968	А			
„	1969	А			
„	1970	А			
„ 'Вика посевная'	1968	А			
„	1969	А			
„	1970	А			

* Классификация видов дана по Флоре ЭССР III (1959).

А — Ботанический сад Тартуского гос. ун-та, г. Тарту.

Б — Главный ботанический сад АН СССР, г. Москва.

В — Ботанический сад и дендрарий им. Р. И. Шредера Московской сельскохозяйственной академии им. К. А. Тимирязева, г. Москва.

Г — Ботанический сад Белорусского гос. ун-та им. В. И. Ленина, г. Минск.

Д — Ботанический сад Одесского гос. ун-та им. И. И. Мечникова, г. Одесса.

Е — Сибирский ботанический сад при Томском гос. ун-те им. В. В. Куйбышева, г. Томск.

З — Ботанический сад Латвийского гос. ун-та, г. Рига.

ных таксон, которые согласуются с существующей классификацией рода. Представитель подрода *Ervilia* Link. *V. ervilia* (L.) Willd. отличается по расположению белковых фракций от *V. hirsuta* (L.) S. F. Gray, входящего в секцию *Lenticula* (Endl.) Aschers. et Graebn подрода *Craccoidea* B. Fedtsch., будучи в то же время очень сходным с остальными видами подрода *Craccoidea*. Остальные секции подрода *Craccoidea* по белковому профилю более сходны между собой, но и здесь наблюдаются различия. Так, виды секции *Cracca* S. F. Gray отличаются от секции *Euvicia* Vis. отсутствием белковой зоны с $R_f \approx 0,75$ и наличием зоны с $R_f \approx 0,81$. Представитель подрода *Faba* (Adans.) S. F. Gray *V. faba* по белковому профилю очень близок к видам подрода *Euvicia*, отличаясь более значительно от видов подрода *Cracca*.

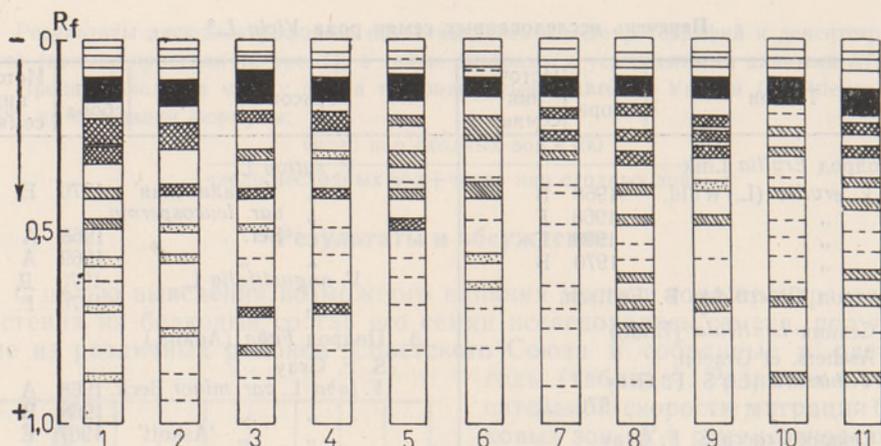


Рис. 2. Диаграммы электрофореграмм солерастворимых белков видов рода горошек.
 1 — *Vicia ervilia*; 2 — *V. hirsuta*; 3 — *V. cassubica*; 4 — *V. silvatica*; 5 — *V. cracca*; 6 — *V. villosa*; 7 — *V. sepium*; 8 — *V. lathyroides*; 9 — *V. sativa*; 10 — *V. angustifolia*; 11 — *V. faba*.

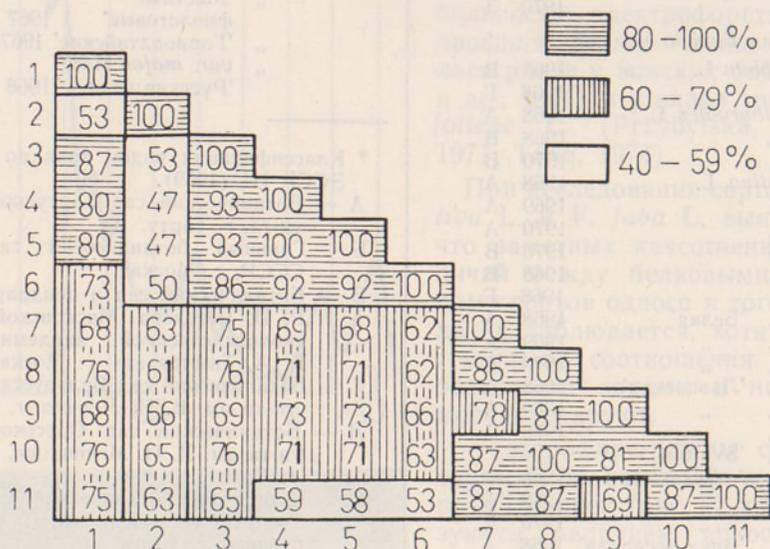


Рис. 3. Коэффициенты сходства электрофореграмм белков видов рода горошек.
 1 — *Vicia ervilia*; 2 — *V. hirsuta*; 3 — *V. cassubica*; 4 — *V. silvatica*; 5 — *V. cracca*; 6 — *V. villosa*; 7 — *V. sepium*; 8 — *V. lathyroides*; 9 — *V. sativa*; 10 — *V. angustifolia*; 11 — *V. faba*.

Сходство между исследованными таксонами, выраженное в коэффициентах сходства белкового состава, показано на рис. 3.

Четко вырисовываются на диаграмме две группы видов с наибольшим сходством. Одну группу составляют виды секции *Cracca* подрода *Craccoidea*, коэффициенты сходства между белковыми профилями которых находятся в пределах 86—100%. К этой группе близко расположен вид *V. ervilia* из подрода *Ervilia*, коэффициенты сходства которого с видами

секции *Cracca* находятся в пределах 73—87%. Особенно тесной оказывается сходство *V. ervilia* с *V. cassubica*, *V. silvatica* и *V. cracca* (от 80 до 87%). С остальными изученными видами сходство *V. ervilia* колеблется в пределах 53—76%.

Вторую группу образуют виды секции *Euvicia* из подрода *Craccoidea* (*V. sepium*, *V. lathyroides*, *V. sativa*, *V. angustifolia*). Вид *V. hirsuta*, относящийся к секции *Lenticula*, отличается довольно значительно как от представителей секции *Cracca* (коэффициенты сходства 47—53%), так и от представителей секции *Euvicia* (коэффициенты сходства 61—76%). При этом сходство белкового профиля *V. hirsuta* с белковым профилем видов секции *Euvicia* больше, чем с белковыми профилями секции *Cracca*.

Подрод *Faba* (*V. faba*) по белковому профилю больше сходен с видами секции *Euvicia* (коэффициенты сходства 81—100%, исключая *V. sativa* с коэффициентом сходства 69%), чем с видами секции *Lenticula* и *Cracca*. Особенно низки коэффициенты сходства белкового профиля *V. faba* с видами *V. silvatica*, *V. cracca* и *V. villosa* (53—59%).

Дифференциация исследованных таксонов на основе электрофоретических профилей белков семян в общем согласуется с существующей классификацией, основанной на морфологических признаках, по которой род делится на подроды и секции. Различия же в белковом составе не столь значительные, как морфологические, и охватывают главным образом минорные компоненты белкового комплекса, причем общая картина белкового профиля остается довольно сходной во всех подродах и секциях.

При общем качественном сходстве наблюдаются некоторые определенные, характерные для видов и даже сортов, различия в количественных соотношениях между белковыми фракциями, ясно выступающие на денситометрических кривых и фотографиях гелей, но не учитываемые при использовании метода Уайтти, который основывается только на наличии или отсутствии сходных зон.

Количественная интерпретация денситометрических кривых может дать дополнительную таксономическую информацию. Но при этом возникают определенные трудности ввиду изменчивости количественных соотношений белков в зависимости от условий произрастания и несовершенства количественной денситометрии гелей.

О характерном рисунке белкового профиля видов *Vicia*, состоящего из главного белкового компонента и находящейся под ним диффузной кольцеобразной зоны, сообщается ранее (Boulter и др., 1967). В наших опытах эту зону удалось разделить на 2—3 тесноближенные зоны. К тому же у видов *V. cassubica*, *V. silvatica*, *V. angustifolia* и *V. faba* были обнаружены интенсивно окрашивающиеся зоны в нижней части гелей и у всех таксонов еще целый ряд минорных белковых компонентов. Именно при сравнении последних вырисовываются некоторые нами описанные внутриродовые различия, которые согласуются с делением исследованных видов на три подрода (*Ervilia*, *Craccoidea* и *Faba*). Подрод *Craccoidea* в свою очередь делится на три секции (*Lenticula*, *Cracca* и *Euvicia*). Создается впечатление, что подрод *Ervilia* по белковому профилю более сходен с секцией *Cracca* из подрода *Craccoidea*, чем с секцией *Lenticula*. Подрод *Faba* же во многом сходен с секцией *Euvicia* из подрода *Craccoidea*.

ЛИТЕРАТУРА

- Тали В. С., 1974. Исследование белков семян бобовых. I. Диск-электрофоретическое изучение соластворимых белков семян видов трибы *Trifolieae* Bronn. Сб. научных трудов ЭСХА 80 : 76.
- Boulter D., Thurman D. A., Turner B. L., 1966. The use of disc electrophoresis of plant proteins in systematics. *Taxon* 15 : 135—143.
- Boulter D., Thurman D. A., Derbyshire E., 1967. A disc electrophoretic study of globulin proteins of legume seeds with reference to the systematics. *New Phytol.* 66 (1) : 27.
- Boulter D., Thurman D. A., 1968. Acrylamide gel electrophoresis of proteins in plant systematics. In: *Chemotaxonomy and Serotaxonomy*, J. G. Hawkes ed., Academic Press, London: 39.
- Davis B. J., 1964. Disc electrophoresis — II. Method and application to human serum proteins. *Annales de la New York Academy of Sciences* 121 : 404.
- Fairbrothers D. E., 1968. Chemosystematics with emphasis on systematic serology. In: *Modern Methods in Plant Taxonomy*, V. H. Heywood ed., Academic Press, London: 141.
- Fairbrothers D. E., 1969. Comparisons of proteins obtained from diverse plant organs for chemosystematic research. *Rev. Roum. Biochim.* 6 : 95.
- Fox D. J., Thurman D. A., Boulter D., 1964. Studies on the proteins of seeds of the Leguminosae. I. *Phytochemistry* 3 : 417.
- Johnson B. L., 1969. The protein electrophoresis approach to species relationships in wheat. *Genetics Lectures* 1 : 19.
- Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Faer A. L., Randall R. J., 1951. *J. Biol. Chem.* 193 : 265. Цит. по: Биохимические методы исследования в клинике (справочник), 1969. М. : 62.
- Ornstein L., 1964. Disc electrophoresis-I. Background and theory. *Ann. New York Acad. Sci.* 121 : 321.
- Przybylska J., Hurich J., 1971. Disc electrophoretic study of seed proteins of various *Medicago* species, *Melilotus albus*, *Trifolium pratense* and *T. repens*. *Acta Soc. Bot. Polon.* 11 (4) : 682.
- Steward F. C., Barbes J. T., 1964. The use of acrylamide gel electrophoresis in the investigation on the soluble proteins of plants. *Ann. New York Acad. Sci.* 121 : 525.
- Whitney P. J., Vaughan J. G., Heale J. B., 1968. A disc electrophoretic study of the proteins of *Verticillium albo-atrum*, *Verticillium dahliae*, and *Fusarium oxysporum* with reference to their taxonomy. *J. Exptl. Bot.* 19 : 415.

Эстонская сельскохозяйственная академия

Поступила в редакцию
14/XII 1973

Vladimir TALI

PEREKONNA HIIREHERNED (*VICIA* L.) LIIKIDE SEEMNETE SOOLALAHUSES LAHUSTUVATE VALKUDE DISK-ELEKTROFOREETILISE UURIMISE TULEMUSI

Resümee

Disk-elektroforeesi abil uuriti perekonna hiireherned (*Vicia* L.) 11 liigi soolalahuses lahustuvate seemnevalkude elektroforeetilist koostist. Seemned olid kogutud NSV Liidu mitmest erinevast rajoonist. Tulemustest nähtub, et hiireherneste perekonna nende liikide seemnevalkude elektroforeetilise profiili üldise sarnasuse juures on minoorsete komponentide koostises täheldatavad ka mõned erinevused, mis ühtivad kehtiva, morfoloogilistel tunnustel baseeruva perekonnasisese klassifikatsiooniga. Sama liigi eri sortide seemnete valguprofiilides kvalitatiivseid erinevusi ei esinenud, varieerus ainult üksikute valgutsoonide kvantitatiivne sisaldus. Erinevused sama liigi eri populatsioonide ja erinevaist geograafilistest rajoonidest kogutud seemnete valguprofiilides olid väheolulised ega ületanud üksikute disk-elektroforeogrammide vahel esinevat varieeruvust.

Eesti Põllumajanduse Akadeemia

Toimetusse saabunud
14. XII 1973

Vladimir TALI

DISC ELECTROPHORETIC STUDY OF SALT-SOLUBLE SEED PROTEINS
OF VARIOUS *VICIA* SPECIES

Summary

Eleven *Vicia* species have been compared in respect to disc electrophoretic patterns of seed proteins. Some of the examined species were represented by seed samples originating from different sources and varieties. In total 51 seed samples were examined. The electrophoretic analysis covered salt-soluble proteins.

The electrophoretic data differentiated most of the examined *Vicia* species. Seed samples of individual species from different sources and varieties proved to be identical in respect to electrophoretic protein patterns. The variation in Rf values of the protein fractions of seeds collected from different populations falls within that normally encountered when samples of the same population are electrophorized on different occasions. The gel pattern of each species has a major protein band of the same Rf value (within the limits of variation normally encountered). There were some differences in the minor band patterns. The results obtained are discussed with reference to the established classification.

Estonian Agricultural Academy

Received
Dec. 14, 1973