

УДК 577.15:635.652.654

© 2011

Головань Л. В., аспірант*

Харківський національний аграрний університет ім. В. В. Докучаєва

АЛОЗИМНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ АМЕРИКАНСЬКОЇ ГРУПИ ВИДІВ РОДУ *PHASEOLUS L.*

Рецензент – кандидат біологічних наук Р. В. Рожков

Проаналізовано поліморфізм 25 зразків квасолі з різних еколого-географічних зон за 5-ферментними системами. Для вивчених ферментних систем була характерна наявність декількох чітких зон. Для ферментів GOT та ACP було встановлено дві зони активності, для ADH та BPGD – 3 зони. Ферментна система SKDH характеризувалася однією зоною активності. У системах ADH, B-PGD та ACP встановлений міжвидовий поліморфізм; для ферментної системи SKDH – поліморфізм як на міжвидовому, так і на внутрішньовидовому рівнях. Система GOT виявилася мономорфною для всіх видів квасолі, взятих для аналізу. Результати досліджень актуальні як для моніторингу, так і для розширення генетичної бази колекції.

Ключові слова: *Phaseolus vulgaris L.*, *Phaseolus lunatus L.*, *Phaseolus coccineus L.*, *Phaseolus acutifolius* Grau, ізоферменти, електрофорез, алель, ген, поліморфізм.

Постановка проблеми. Значення внутрішньопопуляційної мінливості за морфологічними, фізіологічними та біохімічними ознаками широко обговорюється у спеціальній літературі з генетики та біології. Мінливість популяції забезпечує не тільки збереження, але й удосконалення її як еволюційної одиниці. Використання біохімічних методів дає змогу виявити генотипічну мінливість за біохімічними показниками, такими, наприклад, як ізоферментиний склад білків. Дослідження між- та внутрішньопопуляційної мінливості за якісними й кількісними ознаками викликає неабиякий інтерес для генетики популяцій.

Аналіз основних досліджень і публікацій, в яких започатковано розв'язання даної проблеми. З точки зору біохімічної генетики квасоля в Україні залишається вивченою недостатньо. У літературі зустрічаються дані стосовно використання ізозимів для вивчення філогенії та еволюційних процесів, генетичного різноманіття, а також систематики популяцій квасолі роду *Phaseolus L.* [2–4, 8, 11, 12, 14, 15]. Так, у роботах Weeden [19, 20, 21]

та Weeden та Liang [22] описаний поліморфізм наступних ферментних систем: рибулозобіфосфат карбоксилаза (RBCS), шикімаатдегідрогеназа (SKDH), катодна пероксидаза (PRX), малік-ензим (ME), глюкозофосфатізомераза (GPI), N-ацетилглюкозамінідаза (NAG), аденілазакиназа (ADK). На основі отриманих даних було встановлено, що вони контролюються одним геном. Вчений Jaaska зі світавторами вивчили генетичний контроль аспаратамінотрансферази (GOT) та супероксиддисмутази (SOD) [7].

Дослідженням Sprecher [17] встановлено, що поліморфізм НАДФ-залежної діафори (DIA) контролюється двома зчепленими генами – *Diap-1* і *Diap-2*. Так, Koenig та Gepts [8] ідентифікували два додаткових поліморфізми для лейцинамінотрипсидази (LAP) та малатдегідрогенази (MDH), що контролюються, відповідно, генами *Lap-3* та *Mdh-1*.

Ізозимна оцінка генетичної колекції квасолі лимської (*Ph. lunatus*) описана у кількох працях [5, 6, 18], зокрема для вивчення таксономічних зв'язків й оцінки внутрішньопопуляційної структури [9, 10, 13].

Однак поліморфізм вказаних ферментних систем квасолі залишається вивченим недостатньо, зокрема, відсутні дані про ферментні системи видів *Ph. multiflorus* та *Ph. acutifolius*, що розглядаються у даній статті. Доречно зауважити, що в Україні не проводяться дослідження щодо біохімічної генетики квасолі. Використання рослинного матеріалу різного еколого-географічного походження, у тому числі й українських зразків, для вивчення генетичного різноманіття культури дасть можливість розширити знання про поліморфізм ізоферментних систем.

Мета досліджень – вивчення поліморфізму п'яти ізоферментів у видів роду *Phaseolus L.*, необхідних для визначення еволюційно складеного популяційно-генетичного різноманіття, алельної та генотипової гетерогенності локусів, що контролюють ці ферментні системи.

* Керівник – доктор сільськогосподарських наук, професор, член.-кор. НААНУ В. К. Пузік

Матеріал і методика досліджень. В якості рослинного матеріалу використовували 25 зразків квасолі з колекції Харківського національного аграрного університету ім. В.В. Докучаєва (ХНАУ) та Національного центру генетичних ресурсів рослин України (НЦГРУ) (табл. 1). Зразки інтродуковані з різних еколого-географічних зон (Україна, Росія, Іран, Болгарія, Франція, Туреччина, США, Мексика, Філіппіни та ін.) і відносяться до 4-х видів – *Ph. vulgaris*, *Ph. lunatus*, *Ph. coccineus (multiflorus)*, *Ph. acutifolius*. Вибір рослинного матеріалу пов'язаний із залученням його у селекційний процес зі створення вихідного матеріалу для квасолі.

Об'єктом біохімічного аналізу слугувало насіння зразків різних видів квасолі, оскільки цей матеріал є стабільною системою з відносно постійним компонентним складом, а крім того дає можливість проводити аналіз у будь-який час. Для оцінки міжвидового поліморфізму було проаналізовано суміш насіння кожного зразка

(по 10 насінин у суміші). Для внутрішньовидового аналізу брали 29 насінин кожного зі зразків.

Ізоферментний спектр виявляли методом вертикального електрофорезу в поліакриламідному гелі (ПААГ). Екстракція ферментів проводилась з окремих насінин 0,02 М Tris-HCl буфером (pH 7,5), який містить 0,01 mM PVP; 0,006 mM EDTA; 0,01 mM DTT і 20 % сахарози, за температури +4 °C протягом однієї години.

Розчин для екстракції. Брали 2,175 г сахарози; 217,5 мг PVP; 4,35 мг EDTA; 43,5 мг DTT і 10,88 мл Tris-HCl. Додавали 200 мкл розчину в епіндорфи з борошном. Супернатант відокремлювали за допомогою центрифугування впродовж 5 хв. зі швидкістю 7 тис. об./хв. Отримані екстракцією ферменти відразу використовуються для електрофорезу. Для розподілу ферментів використовувалася Tris-EDTA-боратна буферна система – 0,09 М tris, 0,09 М H₃BO₃, 0,0031 М EDTA з pH 8,3 (концентрація акриламідів і метиленбісакриламідів у гелі складала 7 % та 0,37 % відповідно).

1. Перелік досліджуваних зразків квасолі

№ п/п	№ Національного каталогу України	Назва зразка	Країна походження
<i>Ph. vulgaris</i>			
1	UDO300775	Докучаєвська	Україна
2	UDO300025	Первомайська	Україна
3	UDO501709	-	Україна
4	UDO501722	-	Україна
5	UDO503341	-	Україна
6	UDO503256	-	Україна
7	UDO500045	Прелом	Болгарія
8	UDO501043	Horoz	Туреччина
9	UDO500223	Isex	Франція
10	UDO500227	Holberg	США
<i>Ph. lunatus</i>			
11	UDO302220	Пестропалевая	Росія
12	UDO503348	Geszentye Bab	Угорщина
13	UDO503348	Henderson	США
14	UDO503247	Three Color Poll	США
15	UDO301530	Koro Irion	Філіппіни
<i>Ph. coccineus (multiflorus)</i>			
16	UDO300461	Місцева 15	Україна
17	UDO301762	-	Україна
18	UDO303436	-	Україна
19	UDO503446	Blanka	Польща
20	UDO500843	-	Німеччина
<i>Ph. acutifolius</i>			
21	UDO301625	-	Україна
22	UDO301237	Accutifolius	Німеччина
23	UDO501869	Зард американ	Іран
24	UDO300124	PI 440798	Мексика
25	UDO500498	PI 476858	Мексика

В якості каталізатора й ініціатора реакції полімеризації використовували N’N’N’N-тетраметилетилендіамін (ТЕМЕД) і персульфат амонію. Режим електрофорезу: входження білків у гель – 10 хв. 80 V, робочий режим – 3 год., 300 V при температурі електродного буфера не вище 8 °С. Гістохімічне забарвлення гелів здійснювалося за методикою Шоу та Прассада [16] із модифікаціями.

Результати досліджень. Умови екстракції білків із насіння квасолі та їх електрофоретичного розподілення дали змогу отримати надійні для генетичної інтерпретації результати чотирьох видів квасолі. На вміщених фотографіях показані зони активності ферментів, що добре інтерпретуються (див. рис.).

Алкогольдегідрогеназа (ADH, К.Ф.1.1.1.1) Зимографічний аналіз білкових спектрів на міжвидовому рівні дозволив виявити наявність трьох зон активності ферменту, перша з яких була ха-

рактерною для видів *Ph. vulgaris* та *Ph. multiflorus* і мала вигляд однокомпонентного лінійного спектру. Поліморфізму у цій зоні не було виявлено. Зразки видів *Ph. acutifolius* та *Ph. lunatus* характеризувалися відсутністю даної зони. Зона ADH2 була наявна у трьох видів квасолі (*Ph. vulgaris*, *Ph. multiflorus* та *Ph. lunatus*). Ця зона виявилася поліморфною, – у ній було ідентифіковано дві ізоформи, що різнилися за електрофоретичною рухливістю (рис.1, ADH). Найбільш повільний компонент позначили як S, а – швидкий (F). Спектр ферменту був трикомпонентним. У виду квасолі *Ph. vulgaris* повільномігруючий варіант ферменту (S) є більш розповсюдженим у порівнянні з швидко мігруючим (F). У квасолі лимської (*Ph. lunatus*) у популяціях Three Color Poll, Koro Irion, Geszentye Bab та Пестропалевая швидко мігруючий варіант ферменту (FF) менш поширений у порівнянні з повільно мігруючим (SS).

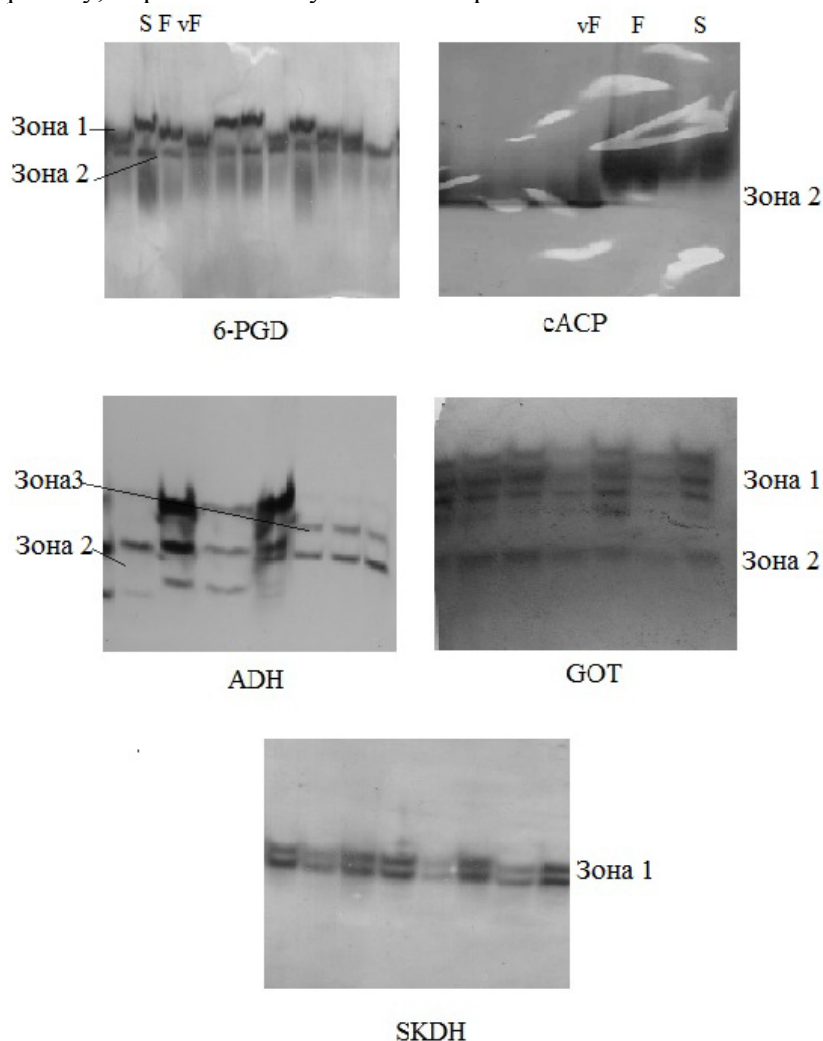


Рис. Електрофореграми 6-фосфоглюконатдегідрогенази (6-PGD), катодної кислій фосфатази (cACP), алкогольдегідрогенази (ADH), аспаратамінотрансферази (GOT), шикімаатдегідрогенази (SKDH)

Популяція Henderson характеризується майже однаковою поширеністю цих ізоформ. У деяких зразків видів *Ph. vulgaris* та *Ph. multiflorus* виявлені гібридні спектри, що характеризувалися поєднанням повільного й швидкого компонентів (шестиполосний спектр). Ми вважаємо, що синтез другої зони ферменту Adh знаходиться під контролем одного гена з двома алелями – Adh-S та Adh-F. Зона ADH3 була характерна лише для виду *Ph. Acutifolius*, однак відстань між компонентами цієї зони менша у порівнянні з квасолею звичайною та багатоквітковою (рис., ADH). Ймовірно, ця зона відповідає одному локусу. У трьох популяцій із п'яти виявлено два варіанти з різною електрофоретичною рухливістю – повільномігруючий (Adh-S) і швидкомігруючий (Adh-F). У популяції PI 440798 та UDO301625 швидкомігруючий варіант є досить рідкісний, популяція Зард американ – характеризувалася більшою частотою зустрічності даного варіанта. Популяції PI 476858 та *Accutifolius* характеризувалися повною відсутністю швидкомігруючого варіанта – наявним був лише повільно мігруючий (Adh-S). У популяції *Accutifolius* у двох слотах нами виявлено додатковий компонент, який знаходився нижче основної зони ферменту (оскільки він не стабільний, то не був включений в аналіз). Всі популяції характеризувалися триполосним спектром.

6-фосфоглюконатдегідрогеназа (6-PGD, К.Ф.1.1.1.44). Аналіз міжвидового поліморфізму насіння квасолі показав наступне: зимограми цього ферменту зразків, що були взяті в аналіз, представлені трьома основними зонами ферментативної активності – 6-PGD1, 6-PGD2 та 6-PGD3. Друга зона активності виявилася спільною для всіх видів квасолі й була представлена у вигляді однокомпонентного лінійного спектру. Поліморфізму в цій зоні виявлено не було. Зона 6-PGD1 характерна для всіх зразків виду *Ph. multiflorus*. У ній виявлено три ізоформи, що розрізнялися за електрофоретичною рухливістю і позначені нами як «повільний» (S), «швидкий» (F) і «дуже швидкий» (vF) (рис., 6-PGD). Третя зона активності ферменту була характерна для виду *Ph. lunatus*, – вона виявилася мономорфною для всіх зразків колекції (див. рис.) і була представлена у вигляді однокомпонентного лінійного спектру.

Генетичний контроль та успадкування електрофоретичних варіантів цього ферменту вивчали R. Koenig, P. Gepts [8], які встановили, що синтез 6-PGD контролюється одним геном з одним алелем – 100. Ми припускаємо, що вивчена ними ферментативна зона відповідає нашій 6-PGD2.

Шикімаатдегідрогеназа (SKDH, К.Ф.1.1.1.25).

Аналіз успадкування електрофоретичних варіантів був проведений R. Koenig, P. Gepts [8]. Ними встановлена наявність одного гена з двома алелями – 100 та 103, що контролює синтез шикімаатдегідрогенази. Пізніше аналогічні результати були отримані M. Santana зі співавторами.

У результаті аналізу у цього ферменту встановлений поліморфізм на міжвидовому рівні, а також на внутрішньовидовому (лише у видів *Ph. vulgaris* та *Ph. multiflorus*). У процесі вивчення зразків квасолі було виявлено двокомпонентний поліморфний спектр шикімаатдегідрогенази (рис., SKDH). Наявність у цій зоні активності ферменту двох компонентів, можливо, пов'язано з післятранскрипційною мінливістю. Нами були виділені швидкий і повільний компоненти, що можуть відповідати алельним варіантам одного гену. У зразку PI476858 виду *Ph. acutifolius* виявлено гібридний спектр даної зони, що характеризувався об'єднанням F та S компонентів. Виявлені нами спектри відповідають описаним раніше.

Аспартамінотрансфераза (GOT, К.Ф. 2.6.1.1). Вивчаючи цей фермент методом електрофорезу, R. Koenig і P. Gepts описали два гена – Got1 та Got2, кожен із яких має по одному алелю – 100 [8]. Отримані дана були підтверджені й іншими дослідженнями [7].

Ми, вивчаючи GOT у поліакріламідному гелі (ПААГ), отримали аналогічні результати. Зона GOT1 була представлена багатокомпонентним спектром. Поліморфізму виявлено не було. Зона GOT2 була також мономорфною й представлена лінійним однокомпонентним спектром (рис., GOT). Такий тип спектру був характерний для всіх досліджуваних видів квасолі.

Катодна кисла фосфатаза (сACP, К.Ф. 3.1.3.2). Зимограми цього ферменту зразків, взятих в аналіз, були представлені на міжвидовому рівні двома зонами ферментної активності – сACP1 та сACP2. Ізоформи виявлені у першій зоні не розрізнялися за електрофоретичною рухливістю й були представлені широким лінійним спектром, який, можливо, складається з декількох компонентів із близькою електрофоретичною рухливістю. Зона сACP2 була поліморфною; у ній виявлено 3 алелі з різною електрофоретичною рухливістю: S, F и vF (рис., сACP). Інформація про генетичний контроль цього ферменту у квасолі у літературних джерелах відсутня.

Висновки. Таким чином, у результаті проведених нами досліджень був вивчений поліморфізм п'яти ферментних систем, для вивчених яких була характерна наявність декількох чітких

зон. Для ферментів GOT та сАСР було встановлено дві зони активності, для ADH та 6PGD – три зони. Ферментна система SKDH характеризувалася однією зоною активності. На міжвидовому рівні поліморфними виявилися ADH, сАСР

та 6PGD; ферментна система GOT – мономорфною для всіх видів квасолі. Результати досліджень актуальні як для ідентифікації, так і для розширення генетичної бази колекції.

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Bassiri A., Adams M. W. An electrophoretic survey of seeding isozymes in several Phaseolus species // *Euphytica*. – 1978. – №27. – P. 447–459.
2. Crawford D. J. (1990). Enzyme electrophoresis and plant systematics. // In: Soltis DE, Soltis PS (eds) *Isozymes in plant biology* Chapman and Hall. – London, England. – P. 146–164.
3. 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.
4. 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.
5. Hamann A., Zink D., Nagl W. Microsatellite fingerprinting in the genus Phaseolus // *Genome*. – 1995. – № 38. – P. 507–515.
6. Jaaska V. Isoenzyme diversity and phylogenetic affinities among the Phaseolus beans (Fabaceae) // *Pl Syst Evol*. – 1996. – № 200. – P. 233–252.
7. 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.
8. Koenig R., Gepts P. Allozyme diversity in wild Phaseolus vulgaris: further evidence for two major centers of genetic diversity // *Theor Appl Genet*. – 1989. – №78. – P. 809–817.
9. Lioi L., Lotti C. Allozyme variability in cultivated Lima bean (Phaseolus lunatus L.) // *Bean Improv Coop Annu Rep*. – 1996. – № 39. – P. 249–250.
10. 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.
11. 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.
12. Murphy R. W., Sites Jr. J. W., Buth D. G., Hauffer C. H. (1990) Proteins I. Isozyme electrophoresis // In: Hillis DM, Moritz C (eds) *Molecular systematics*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, USA. – 1990. – pp. 45–126.
13. 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.
14. 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.
15. 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. – pp. 123–134.
16. Show C. R., Prasad R. Starch gel electrophoresis of enzymes – a compilation of recipes // *Biochem. Genet*. – 1970. – 4, № 2. – C. 297–320.
17. Sprecher S. L. (1988) 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).
18. 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.
19. 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.
20. Weeden N. F. Distinguishing among white-seeded bean cultivars by means of allozyme genotypes // *Euphytica*. – 1984. – №33. – P. 199–208.
21. 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.
22. 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.