

23. *Yeast ARS function and nuclear matrix association coincide in a short sequence from the human HPRT locus*/R. C. Sykes, D. Lin, S. G. Huang et al.// *Mol. and Gen. Genet.*—1988.—212, N 2.—P. 301—309.
24. *Сьяксте Н. И., Будылин А. В.* Изменение взаимодействий ДНК с белками ядерного матрикса при переваривании ядер рестриктазами и нуклеазой *Bal31*// *Биохимия.*—1988.—53, № 1.—С. 54—60.
25. *Сьяксте Н. И., Будылин А. В.* Распределение ДНК во фракциях, различающихся по прочности ассоциации с ядерным матриксом при активации ДНК-эндонуклеаз клеточных ядер и действию S_1 -нуклеазы// *Молекуляр. генетика.*—1990.—№ 7.—С. 21—24.
26. *Jackson D. A., Dickinson P., Cook P. R.* Attachment of DNA to the nucleoskeleton of *HeLa* cells examined using physiological conditions// *Nucl. Acids Res.*—1990.—18, N 15.—P. 4385—4393.
27. *Werner D., Neuer-Nitsche B.* Site-specific location of covalent DNA-polypeptide complexes in the chicken genome// *Ibid.*—1989.—17, N 15.—P. 6005—6015.
28. *Сьяксте Н. И., Сьяксте Т. Г.* Гетерогенность по прочности связи с ДНК белков, устойчивых к депротенинизации// *Бюл. эксперим. биологии и медицины.*—1990.—110, № 8.—С. 194—196.
29. *Sjakste N. I., Budylin A. V., Sjakste T. G.* Disconnection of DNA domains in quiescent and differentiating cells// *Nuclear structure and function.*—New York, 1990.—P. 365—369.
30. *Identification of a rosette-enriched chromatin fraction from mouse fibroblast nuclei*/C. A. Ascoli, M. R. Link, N. Ventura et al.// *Arch. Biochem. and Biophys.*—1988.—263, N 2.—P. 334—348.
31. *Isolation and characterization of stable nuclear matrix preparations and associated DNA from avian erythroblasts*/J. Rzeszowska-Wolny, S. Razin, E. Puvion et al.// *Biol. Cell.*—1988.—64.—P. 13—222.

Ин-т орг. синтеза Латв. АН, Рига

Получено 04.02.91

УДК 581.134.4:633.362

А. Ю. Козловский, Ю. В. Пацковский

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ЗАПАСНЫХ БЕЛКОВ СЕМЯН ЯЗВЕННИКА МНОГОЛИСТНОГО

В работе проведено изучение полиморфизма солерастворимых запасных белков семян нескольких популяций язвенника многолистного. Методом электрофореза денатурированных белков в ПААГ с 0,1% Ds-Na определена молекулярная масса (м. м.) основных фракций солерастворимых белков (от 15 000 до 100 000). Выявлено, что наряду с константными областями белкового спектра (белка с м. м. ($\cdot 10^3$) 15—50 и 70—90) обнаруживаются переменные области, каждая из которых представлена одним или двумя белками с м. м. ($\cdot 10^3$) 93—96, 63—66, 53—55. Показано, что помимо появления белков с несколько измененной молекулярной массой в переменных областях изменяется соотношение белка в двух отдельных фракциях, причем взаимозависимо, так что относительное количество белка переменной зоны остается постоянным у всех изученных вариантов. Обсуждается возможный механизм регуляции биосинтеза запасных белков растений.

Введение. В решении вопросов рационального использования ресурсов растительного мира важное место принадлежит бобовым растениям. Весьма перспективным видом для Полесья УССР является язвенник многолистный, обладающий, как и другие бобовые, высокой продуктивностью, способный произрастать на бедных почвах благодаря симбиотической азотфиксации, неприхотливый к изменениям природных условий, содержащий значительное количество незаменимых аминокислот и имеющий ряд других практически ценных признаков [1, 2].

Несмотря на это, данный вид комплексно не изучался и многие его особенности оставались вне поля зрения исследователей. Учитывая вышеизложенное, мы решили провести более детальное и систематическое исследование язвенника многолистного в генетическом и биохимическом аспектах.

Для повышения эффективности селекции необходимо оценить уровень видового полиморфизма. Одним из подходов для этого является

© А. Ю. КОЗЛОВСКИЙ, Ю. В. ПАЦКОВСКИЙ, 1991

изучение полиморфизма запасных белков семян. Сравнение электрофоретических спектров таких белков широко используется для идентификации сортов культурных растений [3, 4], а также позволяет охарактеризовать геномные различия на уровне рода, вида, сорта и биотипа.

Мы провели анализ дикорастущего язвенника по спектру запасных белков семян. В настоящей работе представлены данные по количественному и качественному сравнению электрофоретических спектров соластворимых белков нескольких популяций язвенника зоны Украинского Полесья.

Материалы и методы. Семена язвенника многолистного собраны в трех районах Житомирской области УССР (обозначены в тексте как варианты 1—3) и в одном районе Черниговской области УССР (4). Участки, на которых отбирали семена, удалены друг от друга на десятки километров, что практически исключает возможность перекрестного опыления. Растения же каждого участка произрастали компактной группой на небольшой площади, т. е. в условиях перекрестного опыления. Различия между растениями разных популяций касались только количественных признаков (высота растения, число побегов, количество листьев, соцветий и т. п. [2]). Кроме того, в работе использованы семена язвенника сорта *Trebisky* (ЧСФР) (вариант 5).

Для получения белков воздушно-сухие семена (50 мг) измельчали до однородности растиранием в фарфоровой ступке, а затем проводили экстракцию белков раствором 2 М NaCl (2 мл) в течение ночи при 4 °С. Экстракт осветляли центрифугированием (5000 g, 20 мин) и высаливали белки добавлением к раствору четырех объемов насыщенного сульфата аммония. Белковый осадок отделяли центрифугированием (3000 g, 15 мин, 4 °С), растворяли в 1 мл дистиллированной воды и диализировали против электролитного трис-глицинового буфера. Концентрацию белка после диализа определяли спектрофотометрически.

Электрофорез белков проводили в 10- и 15 %-ном полиакриламидном геле (ПААГ) с DS-Na (0,1 %) по методу Лэммли [5] в вертикальных пластинках длиной 12 см на приборе для вертикального электрофореза фирмы «Хийя Калур» (Эстонская Республика). Полученные белковые гели денситометрировали на приборе Ultrosan XL («ЛКВ», Швеция). Программное обеспечение денситометра позволяет оценить расположение белковых полос, их абсолютное и относительное содержание.

Результаты и обсуждение. Электрофоретический анализ спектров соластворимых белков семян различных популяций язвенника показал их значительное сходство и в то же время гетерогенность по молекулярной массе отдельных белковых фракций. Область белков с м. м. от 15 000 до 50 000 была практически идентичной у разных изученных вариантов (рис. 1: электрофореграмма соластворимых белков семян различных популяций язвенника многолистного). Цифрами и стрелками указано расположение маркерных белков и их молекулярная масса ($\cdot 10^3$). Разделение белков проводили в 10 %-ном ПААГ с 0,1 % DS-Na в течение 4 ч при силе тока 22 мА). Наблюдалась корреляция как в расположении белковых полос, так и в относительном содержании отдельных белковых фракций. Эту область можно условно отнести к кон-



Рис. 1

стантным и использовать для видовой характеристики язвенника. В то же время выявляются небольшие различия в высокомолекулярной области белкового спектра (50 000—100 000). Для детального анализа высокомолекулярных белков мы применили длительное разделение их

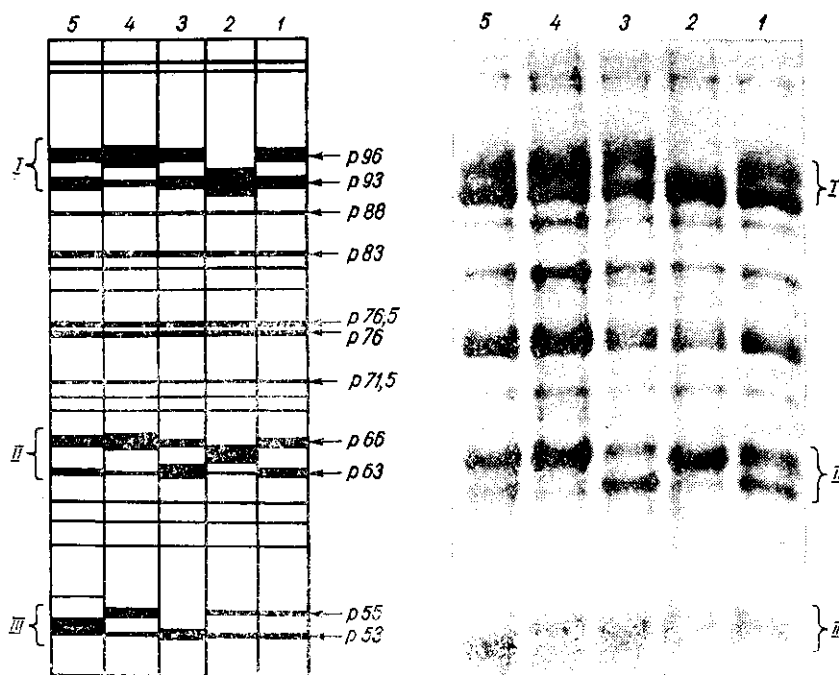


Рис. 2

смеси электрофорезом в 15 %-ном ПААГ. В таких условиях разница между отдельными вариантами стала более очевидной (рис. 2: электрофореграмма (а) и ее схема (б) солерастворимых белков семян раз-

*Молекулярная масса и относительное содержание запасных белков семян различных популяций язвенника многолистного **

Белковые фракции	Относительное содержание белка в вариантах, %				
	1	2	3	4	5
I					
p96	17,0	0	15,9	18,2	15,5
p93	14,5	24,7	13,4	8,0	14,2
p96+p93	31,5	24,7	29,3	26,2	29,7
Константная область					
p88	4,4	4,2	3,7	4,5	3,6
p83	5,2	4,5	5,1	6,6	5,2
p76,5+p76	11,5	9,5	9,8	13,4	12,9
p71,5	3,5	5,6	3,6	3,9	3,1
II					
p66	11,1	0	6,3	12,9	10,3
p64,5	0	16,5	0	0	0
p63	7,5	2,0	8,7	1,9	4,7
p66+p63	18,6	18,5**	15,0	14,8	15,0
III					
p55	3,3	2,7	0	4,6	0
p53,5	0	0	0	0	9,5
p53	5,7	5,5	10,2	3,8	0
p53+p55	9,0	8,2	10,2	8,4	9,5**

* Приведен сравнительный анализ белков с м. м. выше 50 000, точность определения м. м. ± 500 ; ** относительное количество белка в зоне варибельности без учета различий в м. м. отдельных фракций

личных популяций язвенника многолистного. Цифрами и стрелками указана молекулярная масса отдельных белков. Разделение белков проводили в 15 %-ном ПААГ с 0,1 % DS-Na в течение 18 ч при силе тока 10 мА. Остальные объяснения в тексте). Отметим, что в экстрактах не обнаруживается протеолитической активности, что могло бы в данных условиях стать причиной указанных различий. То есть белковый полиморфизм отражает, вероятно, генетический полиморфизм вида.

Качественные и, как показано ниже, количественные различия между вариантами касаются в основном трех областей (зон) белкового спектра, каждая из которых включает один или два белка у различных вариантов (обозначены на рис. 2 соответственно I, II, III). Такая переменность отдельных зон нам показалась достаточно интересной, чтобы попытаться определить закономерности распределения белков в этих областях. На рис. 3 представлена денситограмма отдельных дорожек геля, представляющих варианты 1—5 (для сравнения см. рис. 2). Сравнительный анализ показывает, что при качественной отмывке гелей можно рассчитывать на довольно точное определение абсолютного (при наличии маркера) и относительного количества белка в дискретных полосках. При рассмотрении результатов опытов разница в показаниях обычно не превышала 10—15 %. На денситограмме белкового геля хорошо заметны не только качественные, но и количественные изменения в переменных областях белковых спектров. При сравнении относительного содержания белков в гомологичных полосках были обнаружены определенные закономерности.

Число белков с м. м. от 70 000 до 90 000 и относительное количество каждой белковой фракции в гомологичных полосках за небольшим исключением довольно близко между собой. Результаты этих измерений представлены в таблице, а белки обозначены соответственно их м. м. ($\cdot 10^3$) — р88, р83, р76,5 и т. д. Учитывая эти данные, а также характеристики более низкомолекулярной части белкового спектра (область 15 000 — 50 000), можно условно константную часть спектра разделить на два кластера белков, отличающихся по м. м. — кластер А, включающий более 15 белков с м. м. от 15 000 до 52 000, и кластер Б, состоящий из более чем семи белков с м. м. от 70 000 до 88 000.

Рассмотрим основные закономерности проявления полиморфизма переменных областей белкового спектра. Высокомолекулярная переменная область I включает в себя два белка с м. м. 93 000 и 96 000.

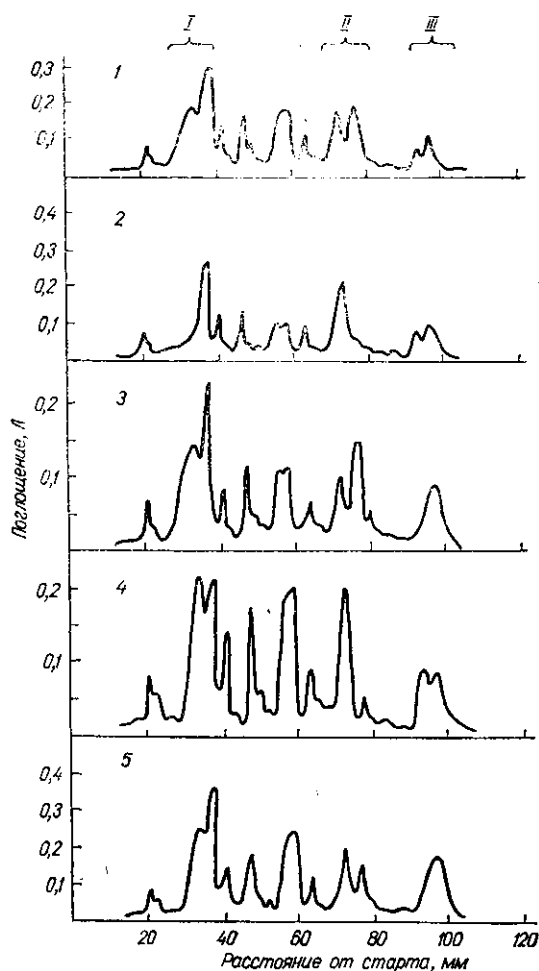


Рис. 3

Варианты 1 и 3—5 содержат оба этих белка, вариант 2 — только один белок с м. м. 93 000. Кроме того, в варианте 4 другое количественное соотношение между двумя белковыми фракциями (р93 и р96), тогда как варианты 1, 3 и 5 по этому показателю очень близки между собой и резко отличаются от варианта 4 (см. рис. 3 и таблицу). Отметим также, что суммарное количество белка в области I каждого из вариантов остается величиной довольно постоянной. Можно полагать, что в данном случае проявляется белковый диморфизм и его особенность заключается во взаимозависимом изменении соотношения белка в двух полосах вплоть до исчезновения одной из них (вариант 2).

Варибельная область II включает у большинства вариантов (1, 3—5) два белка с м. м. порядка 63 000 и 66 000. У варианта 2 отсутствует белок р66, однако присутствует другой белок с м. м. 64 000 (см. рис. 2 и рис. 3). Однако поводом для выделения этой области послужило то обстоятельство, что в каждом из вариантов имеется свое, специфическое содержание белка в гомологичных полосах, причем изменение относительного количества одного белка компенсируется соответствующим изменением содержания другого белка этой же варибельной области. В конечном итоге суммарное количество белка в варибельной области не изменяется и приблизительно одинаково у разных вариантов, однако соотношение белковых фракций уникально для каждого из исследованных образцов (см. таблицу).

Варибельная область III включает два белка с м. м. порядка 53 000 и 55 000 (варианты 1, 2 и 4), один белок р53 (вариант 3) и один белок р53,5 (вариант 5). Не вдаваясь в детали отметим, что закономерности изменения количественного соотношения белков области III такие же, как указаны выше для областей I и II. По характеристикам белков р53 и р55 гомологичны между собой варианты 1 и 2 (см. таблицу). Учитывая тот факт, что и в константных, и в варибельных областях белковых спектров относительное количество белка достаточно постоянно, можно считать очевидным существование механизма, регулирующего количественное содержание (биосинтез) запасных белков в семенах. Ранее уже отмечалось, что соотношение белковых фракций запасных белков, а не их абсолютное содержание, является величиной постоянной и определяющей геномные различия в пределах вида [3, 4]. И кажется вполне логичным, что в процессе естественного отбора сохраняются варианты со стабильным соотношением запасных белков. В то же время внутривидовая дивергенция, выражающаяся в полиморфизме запасных белков, также находит свое объяснение. Известно, что аминокислотный состав, да и первичная структура многих типов запасных белков (зеинов кукурузы, глиадинов пшеницы и т. п.) довольно близки между собой [4]. Поэтому можно предположить, что жизнеспособность семян (и растений) не будет уменьшаться в том случае, если недостаток или отсутствие одного из белков, вызванные генной мутацией, будут компенсированы увеличением синтеза другого белка, его аналога. Не исключено, что с проявлением такого механизма регуляции мы столкнулись при изучении запасных белков явсенника. Учитывая также, что белки варибельных областей явсенника относятся к мажорным фракциям (относительное количество белка в зонах I—III составляет около 30 % общего содержания солейрастворимых белков), то вероятно, что предложенный механизм отбора или регуляции имеет отношение к модальным классам запасных белков. Хотя, возможно, что у него универсальный характер.

О количественной регуляции биосинтеза (накопления) запасных белков в семенах точных данных нет. Но о существовании такой регуляции свидетельствует ряд фактов. Прежде всего, содержание белка прямо зависит от дозы гена — так называемый «дозовый эффект», который обнаруживается при скрещивании или полиплоидизации. Для ряда запасных белков, в частности глиадинов пшеницы, такая зависимость проявляется для групп (блоков) белков, кодирующихся одним хромосомным локусом [4]. Вероятно, их синтез регулируется коорди-

нировано одним механизмом (регулятором). В пользу последнего предположения свидетельствует факт одновременного появления в ходе созревания зерна специфических блоков глиадинов [6]. Биосинтез запасных белков в онтогенезе инициируется на определенной стадии развития, однако о природе регуляторов (активаторов) точных данных нет. Известно, что существует инициация синтеза на уровне транскрипции [7, 8], но роль фитогормонов в этом процессе точно не доказана. Можно предположить, что регуляция синтеза и накопления запасных белков в семенах осуществляется по принципу обратной связи.

Внутривидовой полиморфизм язвенника многолистного может объясняться разными причинами, однако наиболее вероятным мы полагаем то, что белки каждой из вариабельных областей кодируются двумя аллельными генами, причем количественные различия в содержании отдельных фракций могут быть связаны с проявлением механизма доминирования, изменение молекулярной массы белка — с генной мутацией структурной области гена. В заключение хотелось бы обратить внимание на важность количественных характеристик спектров запасных белков культурных растений. С одной стороны, это позволяет определить подходы к изучению механизма регуляции биосинтеза белков эндосперма, а с другой — может ускорить создание новых сортов.

Резюме

В роботі вивчено поліморфізм солерозчинних запасних білків насіння різних популяцій *Anthyllis polyphilla*. Встановлено наявність більше як 30 білків з молекулярною масою (м. м.) від 15 000 до 100 000. В білковому спектрі є дві константні області ((15—50)·10³ та (70—90)·10³) і три варіабельні, кожна з яких включає один чи два білки ((53—55)·10³, (63—66)·10³, (93—96)·10³). У варіабельних областях співвідношення між окремими фракціями змінюється, однак їх сумарний вміст є постійним в різних варіантах. Показано, що відносна кількість гомологічних білків в константних областях білкового спектру також є однаковою величиною для різних варіантів. Обговорюється можливий механізм регуляції біосинтезу запасних білків.

Summary

This study is aimed at the polymorphism of salt-soluble spare proteins from different populations of *Anthyllis polyphilla* Kit. seeds. More than 30 proteins with the molecular weight from 15 to 100 kDa are determined. The protein spectrum has two constant areas (15—50 and 70—90 kDa) and three variable ones, each of which includes one or two proteins (53—55, 63—66 and 93—96 kDa). Correlation between some fractions changes in variable areas, but their total contents are constant in different variants. It is shown, that relative quantity of homology proteins in constant areas of the protein spectrum is also the same in different variants. A possible mechanism of the regulation of spare proteins biosynthesis is discussed.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Акулова З. В. Полезные свойства видов рода *Anthyllis* L. флоры СССР // Растит. ресурсы.— 1985.— 21, № 1.— С. 96—103.
2. Козловский А. Ю. К вопросу об эколого-биологическом изучении язвенника многолистного // Агротром. комплекс Полесья УССР— науч. обеспечение: Тез. докл. науч.-практ. конф.— Житомир, 1989.— Ч. 2.— С. 145—146.
3. Конарев В. Г. Белки растений как генетические маркеры.— М.: Колос, 1983.— 320 с.
4. Социнов А. А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции.— М.: Наука, 1985.— 272 с.
5. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование: Практик. пособие.— М.: Наука, 1981.— 288 с.
6. Зинров С. З. Накопление и обмен белков в зерне пшеницы.— Алма-Ата: Наука, 1987.— 176 с.
7. Экспрессия геномов в созревающих семенах сои / А. Ю. Алексеев, С. М. Епшин, С. Л. Киселев и др. // Геном растений. Структура и экспрессия.— Уфа: БФАН СССР, 1983.— С. 110—118.
8. Кузнецов В. В., Кулаева О. Н. Гормональная регуляция экспрессии генов растений // Геном растений.— Киев: Наук. думка, 1988.— С. 74—92.

Житомир. с.-х. ин-т;

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 23.01.91