

ДЬЯЧЕНКО Л.Ф.¹, ТОПТИКОВ В.А.¹, ТОЦКИЙ В.Н.¹, СИЧКАРЬ В.И.²,

¹Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова

Украина, 65058, Одесса, Шампанский пер., 2, e-mail: diachenkolff@mail.ru

²Селекционно-генетический институт НААНУ,

Украина, 65036, Одесса, Овидиопольская дор., 3

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИХ СПЕКТРОВ ЭСТЕРАЗЫ ЛИСТЬЕВ В ОНТОГЕНЕЗЕ СОИ

Соя — одно из самых важных сельскохозяйственных растений благодаря высокому содержанию в ней белка, жира и ее способности фиксировать атмосферный азот [1]. В перспективе она может стать одной из главных культур в Украине [2]. Жизненный цикл сои состоит из нескольких этапов, которые регулируются как внешними факторами (питание, длина дня, интенсивность и качество света, температура), так и внутренними составляющими, которые находятся под контролем растительных гормонов [3]. На каждом этапе онтогенеза создается база для успешного прохождения последующего этапа роста и развития, при этом компенсировать недостатки предыдущего этапа практически невозможно [4]. Все эти процессы обеспечиваются дифференциальной экспрессией генетических систем. Ранее было показано динамичное изменение экспрессивности значительной части изоформ пероксидазы в онтогенезе сои [5]. Целью данной работы явилось изучение онтогенетических особенностей экспрессивности разных изоформ эстеразы.

Материалы и методы

Материалом служили 20 сортов сои, из которых 9 условно обозначили как “скороспелые” (Устя, Медея, Юг-30, Диона, Л-2 (Орел), Валентиа, Блискавица, Аннушка, Спринт — период вегетации 85–95 дней), а 11 — “раннеспелые” (Аметист, Елена, Марьяна, Селекта, Киевская 98, Припять, Рось, Романтика, Степовичка, Ксения, Георгина) — продолжительность вегетации 95–110 дней.

Листья для экстракции эстеразы отбирали на трех стадиях развития растений: I — появление первого тройчатого листа, II — начало цветения, III — начало созревания бобов. Для исключения влияния фактора старения листа для анализа фермента отбирали самый последний развернутый лист. Экстрагирование, разделение в полиакриламидном геле и визуализацию эстеразы проводили по ранее описанным методикам [6–7]. Анализ электрофореграмм проводили по компьютерной программе АнаИС, с помощью которой для каждой изоформы определяли удельный вес, площадь и интенсивность окрашивания (в условных единицах — пикселях) соответствующих полос. Статистическую обработку данных проводили в Excel. Оценку внутреннего разнообразия спектров проводили по формуле [8]:

$$K_D = \log_2 N / \sum p_i^2,$$

где K_D — показатель разнообразия спектра, N — количество фракций в спектре, p_i — удельный вес в спектре каждой фракции, выраженный в долях.

Результаты и обсуждение

В данном исследовании изучали динамику средне- и быстроподвижных фракций эстераз листьев сои. Всего таких форм на трех вышеуказанных этапах развития растений выявилось восемь, их электрофоретическая подвижность Rf варьировала в пределах 0,46–0,67. На электрофореграммах различные полосы окрашивались с разной интенсивностью, что свидетельствовало о неодинаковой экспрессивности отдельных форм фермента. На рис. 1 представлена денситограмма листовых эстераз сорта Диона. Видно, что экспрессивность форм эстеразы листьев в начале цветения растений существенно больше по сравнению с экспрессивностью фермента на двух других этапах их развития. На каждом из этапов выявляется от одной до трех форм эстеразы с высокой экспрессивностью. В тканях первого тройчатого листа у сорта Диона максимальной экспрессивностью характеризуется быстроподвижная форма Est 2 с Rf 0,64. В начале цветения сильнее других экспрессируется менее подвижная форма Est 4 с Rf 0,58, а также увеличена по сравнению с III этапом экспрессия Est 6 с Rf 0,53 и Est 7 с Rf 0,5. В начале созревания бобов экспрессивность листовых эстераз наименьшая.

Приблизительно такие же электрофореграммы эстераз с небольшими вариациями наблюдаются и у других исследованных сортов. На стадии первого настоящего тройчатого листа практически у всех сортов (18 из 20) сильнее других экспрессируется Est 2. Исключение составили сорта Киевская 98 и Георгина, у которых максимальная экспрессивность отмечена у изоформ Est 4 и Est 3 соответственно.

На стадии начала цветения растений, как уже отмечено ранее, повышена экспрессивность практически всех изоформ эстеразы. Максимальная экспрессивность наблюдается у изоформ: Est 1 (4 сорта), Est 2 (11 сортов), Est 3 (8 сортов), Est 4 (7 сортов), Est 6 (3 сорта). При этом почти у половины

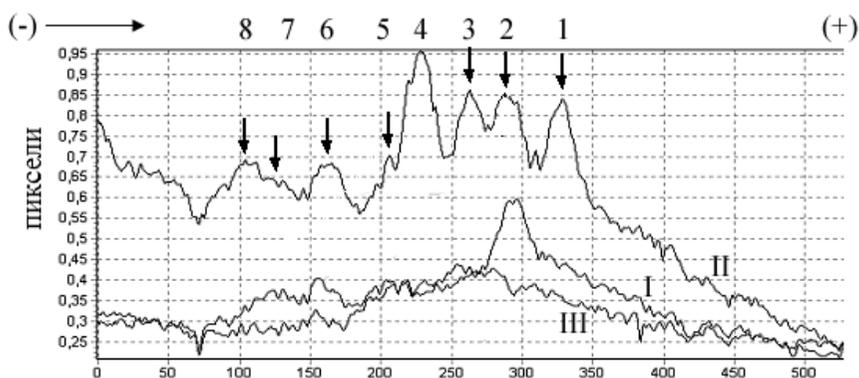


Рис. 1. Денситограмма электрофоретических спектров эстеразы листьев сои на разных этапах онтогенеза растений (сорт Диона). I, II, III — этапы онтогенеза растений

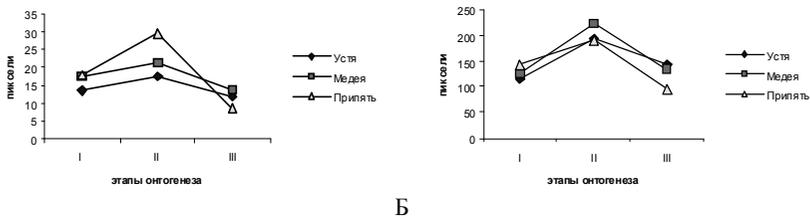


Рис. 2. Динамика экспрессивности эстеразы листьев сои. А — Est 4, С — суммарная экспрессивность

Таблица 1

Удельный вес (%) форм эстеразы листьев на разных этапах развития растений сои

№ изоформы	Rf	I стадия	II стадия	III стадия
1	0,67	16,12 ± 0,43	15,77 ± 0,48	16,12 ± 0,47
2	0,64	15,99 ± 0,37	13,77** ± 0,40	13,73** ± 0,36
3	0,61	12,36 ± 0,29	12,75 ± 0,40	12,47 ± 0,37
4	0,58	13,16 ± 0,34	11,55** ± 0,40	10,97** ± 0,32
5	0,56	11,13 ± 0,24	10,56 ± 0,25	10,69 ± 0,34
6	0,53	10,31 ± 0,34	14,11** ± 0,32	10,08^^ ± 0,53
7	0,50	9,89 ± 0,28	11,44** ± 0,28	11,29* ± 0,39
8	0,46	11,02 ± 0,34	10,04 ± 0,37	14,63**^^ ± 0,52

Примечание: n = 20 сортов, * — P ≤ 0,05, ** — P ≤ 0,005 при сравнении с такой же изоформой на I стадии, ^ — P ≤ 0,05, ^^ — P ≤ 0,005 при сравнении с такой же изоформой на II стадии.

исследованных сортов сои максимально экспрессируется не одна, а две и даже три изоформы эстеразы.

На стадии начала созревания бобов наиболее активны Est 2 и Est 3 (у 11 сортов), хотя у отдельных сортов активируются менее подвижные формы эстеразы — Est 6 и Est 7 (сорта Елена, Селекта, Рось).

Представленная на рис. 2 динамика изменений экспрессивности формы Est 4 и суммарной экспрессивности эстеразы у трех исследованных сортов сои показывает однозначную направленность изменений этих показателей в онтогенезе растений.

В табл. 1 представлено процентное содержание каждой изоформы эстеразы на трех стадиях развития растений. Видно, что по сравнению со стадией появления первого тройчатого листа на более поздних стадиях развития достоверно снижается удельный вес форм Est 2 и Est 4, но одновременно возрастает удельный вес Est 7. Увеличение доли Est 6 (37%) наблюдается только на этапе II, на III этапе эта величина снижается, оставаясь все же больше, чем на I этапе наблюдений. Удельный вес Est 8 возрастает на 33% только на стадии созревания бобов.

Изменения экспрессивности эстеразы листьев в процессе онтогенеза более значительны (табл. 2). На стадии начала цветения по сравнению со

Таблица 2

Экспрессивность (условные единицы) форм эстеразы листьев на разных этапах развития растений сои

№ изоформы	Rf	I стадия	II стадия	III стадия
1	0,67	20,48 ± 0,99	27,34** ± 1,57	17,87*^^ ± 0,70
2	0,64	20,45 ± 1,04	23,72*± 1,14	15,41***^ ± 0,74
3	0,61	15,63 ± 0,65	21,96** ± 1,07	13,94^^ ± 0,66
4	0,58	16,85 ± 0,96	19,80* ± 0,93	12,20***^ ± 0,50
5	0,56	14,06 ± 0,50	18,04** ± 0,64	12,08*^^ ± 0,77
6	0,53	12,97 ± 0,51	24,12** ± 0,80	11,49^^ ± 0,96
7	0,50	12,45 ± 0,46	19,62** ± 0,76	12,66^^ ± 0,70
8	0,46	13,88 ± 0,53	17,27** ± 0,87	16,08** ± 0,46
Σ		126,77 ± 4,62	171,86** ± 5,90	111,72*^^ ± 4,16

Примечание: обозначения, как в табл. 1. Σ — суммарная экспрессивность.

стадией I экспрессивность всех без исключения изоформ эстеразы сои достоверно возрастает в пределах 20–80%, что приводит к увеличению суммарной активности фермента на 36%. На III стадии экспрессивность всех форм фермента снижается, однако при этом она не возвращается до состояния, наблюдавшегося на I стадии развития растений сои. В начале созревания бобов экспрессивность пяти изоформ эстеразы достоверно отличается от их экспрессивности на стадии I и семи изоформ на стадии II.

Сравнительный анализ удельного веса изоформ эстеразы двух групп сортов сои, различающихся длительностью периода вегетации примерно на 10 дней, показал, что достоверные различия этого показателя наблюдаются в единичных случаях. Так, на I стадии онтогенеза у скороспелых сортов по сравнению с раннеспелыми достоверно ниже доля Est 3 ($P_d \leq 0,005$), на II стадии — выше доля Est 1 ($P_d \leq 0,05$), на III — выше доля Est 3 ($P_d \leq 0,05$). Достоверное различие экспрессивности эстеразы двух сравниваемых групп сортов сои выявлено только на ранней стадии развития растений — экспрессивность Est 1 и Est 2 больше у скороспелых сортов.

Сложность спектра, оцениваемая по показателю внутреннего разнообразия K_D , свидетельствует об уровне контроля над экспрессией исследуемого фермента. Значения данного показателя изменялись в ходе индивидуального развития растений и различались у растений сортов, отличавшихся скоростью развития. Достоверные различия между исследуемыми группами сортов сои проявлялись только на I стадии онтогенеза ($P=0,005$). На последующих этапах развития сложность спектров эстеразы у скоро- и раннеспелых сортов изменялась в разных направлениях. В первой группе сортов величина K_D в ходе развития растений возрастала и на III этапе достоверно отличалась от начального значения ($P=0,025$), у раннеспелых сортов — наоборот, снижалась ($P=0,045$). Это свидетельствует о разнонаправленности изменений системы генетического и эпигенетического контроля экспрессии

исследуемых эстераз в ходе онтогенеза у растений сои с разной скоростью развития.

Выводы

1. Удельные веса отдельных форм и в значительно большей степени экспрессивность изоформ эстеразы динамично изменяются в зависимости от стадии развития сои.

2. Максимальная экспрессивность исследуемых изоформ эстеразы наблюдается в начале цветения растений.

3. Наибольшие различия экспрессивности листовых эстераз скоро- и раннеспелых сортов сои наблюдаются на ранней стадии развития растений.

Литература

1. Schmutz J., Cannon S.B., Schluter J. et al., Genome sequence of the palaeopolyploid soybean // Nature.— 2010.— №463.— P. 178–183.

2. Бабич А.О., Бабич-Побережна А.А. Селекція і виробництво сої в Україні: Монографія.— К.: ФОП Данилюк В.Г., 2008.— 216 с.

3. Baurle J., Dean C. The Timing of Developmental Transitions in Plants // Cell, 2006.— V.125.— №19.— P. 655–633.

4. Животков Л.А., Бирюков С.В., Степаненко А.Я. и др. Пшеница.— К.: Урожай, 1989.— 320 с.

5. Дьяченко Л.Ф., Тоцкий В.Н., Топтиков В.А., Сичкарь В.И. Экспрессивность множественных форм пероксидазы в онтогенезе сои // Сб-к научн. трудов “Актуальные проблемы прикладной генетики, селекции и биотехнологии растений”.— Ялта, 2009.— Т.131.— С. 171–176.

6. Корочкин Л.П., Серов О.Л., Пудовкин А.И. и др. Генетика изоферментов.— М.: Наука, 1977.— 275 с.

7. Топтиков В.А., Мирось С.Л., Дьяченко Л.Ф., Тоцкий В.Н., Залогина М.А. Сопряженность устойчивости озимых мягких пшениц к *Fusarium graminearum* Schwabe и множественных молекулярных форм некоторых ферментов // Цитология и генетика.— 2002.— Т.36, №3.— С. 3–11.

8. Топтиков В.А., Дьяченко Л.Ф., Тоцкий В.Н. Оценка спектров множественных форм ферментов с помощью показателя уровня внутреннего разнообразия // Цитология и генетика.— 2010.— Т.44, №1.— С. 46–53.

Резюме

Исследовали электрофоретические спектры средне- и быстроподвижных форм эстераз листьев 20 сортов сои. Выявлено динамическое изменение количественных показателей изоформ фермента (удельный вес в спектре, экспрессивность) в зависимости от стадии онтогенеза растений. Выявлены различия экспрессивности отдельных изоформ эстеразы у скоро- и раннеспелых сортов сои.

Досліджували електрофоретичні спектри середньо- та швидко рухливих форм естераз листя 20 сортів сої. Виявлено динамічні зміни кількісних показників (питомої ваги в спектрі, експресивності) в залежності від стадії онтогенезу рослин. Спостерігаються розбіжності в експресивності окремих ізоформ естераз у швидко- та рано стиглих сортів сої.

The electrophoretical spectra of middle and fast leaf esterase forms in 20 varieties soybean were studied. The dynamic changes of quantity indexes (specific weight, expression) took place depending on different ontogenesis stages. There were differences in expression of some esterase isoforms in early and other varieties soybean.

КОВАЛЬЧУК М.В., ГУЛЬКО Т.П.

*Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,
Украина, 03143, Киев, ул. Заболотного, 150*

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ЛИНИЙ ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ

Использование животных в качестве биомodelей в медико-биологических исследованиях требует особенного внимания к чистоте линий. Для получения объективных и воспроизводимых результатов требуются не только стандартные условия проведения опыта, но и стандартизированный биологический материал. Использование генетически однородного материала, т.е. линейных или инбредных животных, их гибридов F₁, селективируемых аутбредных популяций, обеспечивает воспроизводимость результатов.

Каждая инбредная линия — это один закрепленный инбридингом генотип. Однако чистота линий, их гомозиготность, могут нарушаться как естественным мутационным процессом, так и вследствие технических ошибок. Генетический мониторинг дает возможность подтвердить или определить генетическую однородность инбредных линий, а также охарактеризовать аутбредные популяции. Помимо методов реципрокной изотрансплантации кожных лоскутов, проверки генотипов окраски, мандибулярных методов, анализа специфических изоферментов, выявления гетерозиготности по рецессивным летальным генам, или генам, детерминирующим морфологические признаки, в настоящее время наблюдается тенденция к накоплению данных по генотипированию по главному комплексу гистосовместимости [1, 2].

Признаком генов главного комплекса гистосовместимости является их экстраординарный высокий уровень полиморфизма. H2 локус генома мыши (главный комплекс гистосовместимости) содержит высокополиморфный микросателлит, включающий тандемные повторы (TR) из двух тетра nukлеотидных единиц, TGGA и GGCA, локализованных на 3' конце второго интрона гена *Eb*, экспрессирующем антигены второго класса. На основании длины и нуклеотидной последовательности микросателлита в 55 инбредных линиях мышей выявлено 11 TR аллелей. На линиях, несущих одинаковые и рекомбинантные H2 генотипы, подтверждена высокая стабильность TR аллелей [3, 4, 5].

Целью данного исследования было генотипирование линий лабораторных мышей по отдельным локусам главного комплекса гистосовместимости (H2), а также подбор животных для экспериментальной модели, где необходимо обеспечить генетическую стандартность, которая достигается использованием генетически контролируемых линейных животных. В основном, линии лабораторных мышей представлены гомозиготными животными и имеют уникальный гаплотип по H2 комплексу. ПЦР-генотипирование позволяет идентифицировать гомозиготные, гетерозиготные генотипы, а также по размерам и последовательностям ампликонов установить принадлежность к определенной линии [6].