

ХАРАКТЕРИСТИКА ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНИХ СПЕКТРІВ ЕСТЕРАЗ ЕКСПЛАНТАТІВ *Saussurea discolor* (Willd.) DC. ТА *Saussurea porcii* Degen

М. М. Марченко
А. Є. Шелифіст
Л. М. Чебан

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича

E-mail: larisa.cheban@mail.ru

Вивчено особливості розвитку *Saussurea discolor* та *S. porcii*, культивованих *in vitro* за умов різного якісного та кількісного вмісту в живильному середовищі ауксинів індоліацетату та індолілбутирату. Дослідженню підлягали катодні й анодні форми естераз експлантатів обох видів. Як катодним, так і анодним ізоформам ензиму притаманна низька електрофоретична рухливість. Доведено сталість спектра катодних естераз експлантатів обох досліджуваних видів незалежно від якісного та кількісного вмісту ауксину в живильному середовищі, що свідчить про можливість їх використання як генетичних маркерів.

Ключові слова: *Saussurea discolor*, *Saussurea porcii*, естераза, електрофоретичні спектри.

У сучасному світі у зв'язку з постійним зростанням антропогенного впливу, змінами кліматичних умов швидкими темпами збільшується кількість зникаючих видів. Перед загрозою зникнення опинилися *Saussurea discolor* (Willd.) DC. та *S. porcii* Degen — представники роду *Saussurea* DC. у флорі Буковинських Карпат, що останнім часом набули статусу «критично загрожуваний» вид [1, 2].

Проблему збереження та відтворення зникаючих видів можна успішно розв'язати, залучивши досягнення біотехнології, зокрема інтенсивне розмноження в культурі *in vitro* та подальшу реінтродукцію у місця природного зростання.

Поверненню в природне середовище підлягає генетично стабільний матеріал [3]. Цієї умови, на жаль, не завжди вдається дотримуватись у процесі культивування *in vitro*, насамперед через явище соматональної мінливості. З метою контролю генетичної стабільності культивованого матеріалу використовують метод генетичних маркерів, зокрема поліморфізму ензимів [4]. Відомо, що умови вирощування справляють значний вплив на спектр ізоензимів у рослин [5].

У попередніх дослідженнях нами було виявлено стабільність ізоензимного спектра пероксидаз експлантатів *S. discolor* та *S. porcii*, незалежно від гормонального складу живильного середовища і тривалості

культивування *in vitro*, що свідчить на користь підтримки генетичної стабільності рослинного матеріалу [6, 7].

Естерази [КФ. 3.1.1] — група ензимів, що гідролізують складні ефіри і присутні в усіх тканинах та органах рослин. За типом субстрату їх поділяють на специфічні та неспецифічні. Саме ізоензимний склад неспецифічних естераз використовують для встановлення ступеня генетичної мінливості культивованих рослин [8–12].

У доступній літературі відсутні дані про можливість використання неспецифічних естераз під час вивчення *in vitro* рослин роду *Saussurea*, тому метою даної роботи було дослідити електрофоретичні спектри естераз експлантатів *S. discolor* та *S. porcii* з метою їх використання як генетичних маркерів.

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження слугували експлантати *S. discolor* та *S. porcii*, культивовані *in vitro* на середовищах, що містили 1 мг/л 6-бензамінопурину (БАП) і різні концентрації індоліацетату (ІОА) (0,1/0,5 мг/л) та індолілбутирату (ІМБ) (0,01/0,05 мг/л). Основою для приготування середовищ було середовище Мурасіге–Скуга, в усіх випадках доповнене цистеїном [13].

Умови культивування

Для введення в культуру *in vitro* використовували насіння, зібране в місцях зрос-

тання природних популяцій. Насіння знезаражували розчином промислового препарату «Білизна» (ТУУ6-05743160.001-93) та 96% -м етиловим спиртом з додаванням TWEEN-80, після чого його тричі промивали стерильною дистильованою водою. Далі насіння переносили на живильне середовище, основою для приготування якого слугувало середовище Мурасіге–Скуга, доповнене цистеїном [13]. Експлантати отримували шляхом прямого морфогенезу з пазушних меристем.

Проростки, що формувалися впродовж першого пасажу, були пересаджені на середовище для індукції утворення конгломерату пагонів, доповнене 0,1 мг/л ІОК та 1 мг/л БАП. Після третього пасажу окремі пагони висаджували на середовища, які крім БАП містили ІОК (0,1/0,5 мг/л) чи ІМК (0,01/0,05 мг/л).

Рослини вирощували у кліматичній кімнаті з 16-годинним фотоперіодом та температурою повітря 22 °С. Тривалість пасажу становила 28 днів.

Умови проведення електрофорезу

Для отримання ензимного препарату наважку експлантатів (0,5 г) розтирали у фарфоровій ступці з 1 мл середовища для екстракції, що містило: 0,05 М трис-цитратний буфер, рН 7,5; 0,1% -й цистеїн; 0,1% -ну аскорбінову кислоту; 1% -й поліетиленгліколь; 6,84% -ну сахарозу [14]. Екстрагування здійснювали протягом 40 хв за постійного перемішування при температурі 4–6 °С, після чого суміш центрифугували при 5 000 g.

Розподіл катодних та анодних естераз проводили методом диск-електрофорезу в ПААГ (7% -му концентрувальному та 13% -му розділювальному гелях) у вертикальних блоках при температурі 4–6 °С в 0,01 М трис-гліциновому (рН 8,3) та 0,1 М трис-ацетатному (рН 4,0) буферах відповідно [15]. Як лідерний барвник використовували бромфеноловий синій та брильянтовий зелений. Зони естеразної активності виявляли гістохімічно в інкубаційному середовищі, що містило в 0,2 М фосфатному буфері (рН 6,0) α -нафтилоцтову кислоту та діазолій синій у цьому самому буфері [14]. Електрофорез проводили в 5-кратній повторності. Гелі аналізували за допомогою сканера Bio Rad 2000 (США) з програмним забезпеченням Gel Doc. Статистичну обробку отриманих результатів виконано із застосуванням програмного забезпечення Microsoft Excel.

Результати та обговорення

У роботі досліджували вплив умов культивування, зокрема гормональних факторів, на зміну спектрів катодних та анодних естераз двох представників роду *Saussurea*. Слід зазначити, що генетику цього роду зовсім не вивчено, тому описуючи ізоензимний склад, ми брали до уваги виключно фенотипи ізоестераз.

Електрофоретичне дослідження протеїнових препаратів *S. discolor* та *S. porcii* показало, що катодні естерази цих видів мають досить різноманітний якісний склад та низьку електрофоретичну рухливість. Так, для *S. discolor* було виявлено дев'ять компонентів з Rf_1 0,01, Rf_2 0,03, Rf_3 0,06, Rf_4 0,09, Rf_5 0,12, Rf_6 0,16, Rf_7 0,18, Rf_8 0,23, Rf_9 0,26 (рис. 1). Мажорними є компоненти з Rf_3 , Rf_4 , Rf_5 та Rf_8 . Мінімальна інтенсивність забарвлення характерна для смуг з Rf_7 та Rf_9 .

Спектр катодних естераз *S. porcii* представлений десятьма компонентами, електрофоретична рухливість яких становить відповідно 0,01; 0,03; 0,07; 0,09; 0,12; 0,15; 0,16; 0,18; 0,20; 0,22 (рис. 2). Серед них ізоформи з Rf_2 , Rf_7 , Rf_9 , та Rf_{10} є мажорними, а смуги з Rf_5 та Rf_6 — міноними.

Загалом катодні естерази обох досліджуваних видів мають значну подібність і відносно низьку електрофоретичну рухливість.

Здійснюючи порівняльний аналіз електрофореграм катодних естераз експлантатів *S. discolor* та *S. porcii*, вирощених на живильних середовищах, що відрізнялись якісним та кількісним вмістом ауксинів, ми не виявили змін їхнього ізоензимного спектру. Відмінності стосувалися лише інтенсивності забарвлення окремих смуг. Так, у разі збільшення концентрації обох гормонів, як і у випадку *S. discolor*, для *S. porcii* спостерігається збільшення інтенсивності забарвлення окремих компонентів спектра, особливо найповільніших.

Порівнюючи отримані електрофореграми, встановили, що *S. discolor* та *S. porcii* мають шість спільних ізоформ катодних естераз, електрофоретична рухливість яких становить 0,01; 0,03; 0,09; 0,12; 0,16 та 0,18.

Одержані результати дають підстави стверджувати існування стабільності якісного складу катодних естераз експлантатів *S. discolor* та *S. porcii* незалежно від умов вирощування. Виявлені відмінності стосуються тільки кількісного вмісту окремих ізоформ. Так само встановили сталість ізоензимного спектру неспецифічних естераз під час дослідження *in vitro* деяких сортів пшениці [16], кактуса [17, 18]; інтенсивність забарвлення їхніх ізоформ залежала лише від віку проростка та типу тканини.

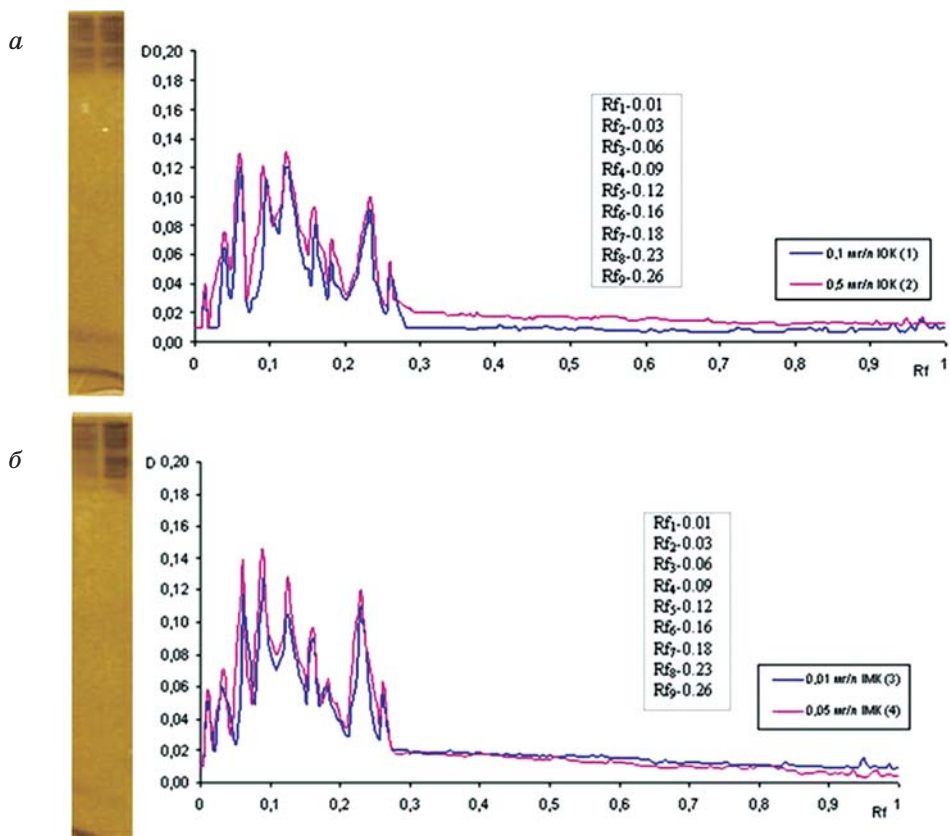


Рис. 1. Електрофоретичні спектри катодних естераз експлантатів *S. discolor*, культивованих у присутності ІОК (а) чи ІМК (б)

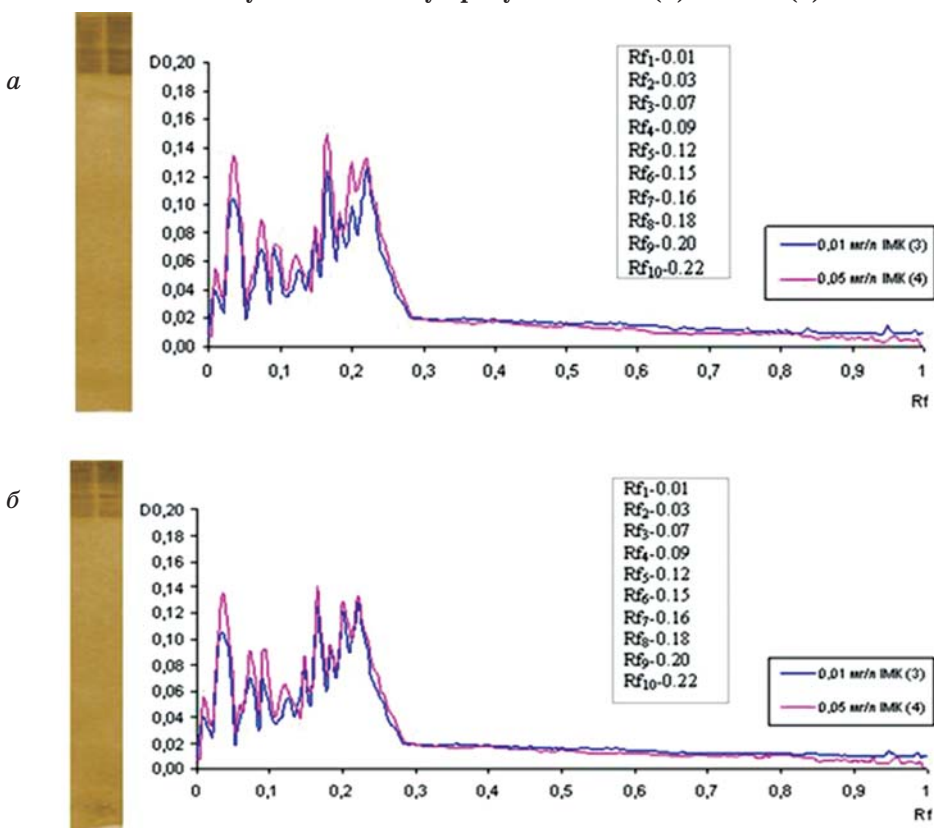


Рис. 2. Електрофоретичні спектри катодних естераз експлантатів *S. porcii*, культивованих у присутності ІОК (а) чи ІМК (б)

Анодні естерази експлантатів *S. discolor* та *S. porcii*, так само як і катодні, характеризуються низькою електрофоретичною рухливістю (рис. 3, 4). R_f найбільш швидкого компонента не перевищує 0,25. Окрім того, їм властива менша різноманітність.

Стосовно анодних естераз передусім слід зауважити, що на їхній якісний спектр суттєво впливає гормональний склад середовища. Як випливає з рис. 3, загальна кількість ізоформ анодних естераз для *S. discolor* залежно від гормонального складу живильного середовища коливається від двох до п'яти. Мажорними серед них є смуги з R_f 0,06 та 0,15, які присутні на всіх електрофореграмах цього виду. Мінорну ізоформу з R_f 0,20 виявлено лише за умов вирощування на середовищі з 0,1 мг/л ІОК чи 0,05 мг/л ІМК. Зі збільшенням концентрації ІОК у живильному середовищі зникають компоненти з R_f 0,18, 0,20, 0,25, тимчасом як зі зростанням концентрації ІМК, навпаки, з'являється ізоформа з R_f 0,20.

Для електрофоретичних спектрів анодних естераз листків *S. porcii* за тотожних умов культивування також встановлено якісні зміни (рис. 4.). Так, у них виявлено від п'яти до семи компонентів. У разі зростання кількості ІОК зникає компонент з R_f 0,12, водночас з'являється з R_f 0,09. Зі збільшенням

концентрації ІМК ідентифікуються нові смуги з R_f 0,12, 0,15, та 0,21, тоді як ізоформа з R_f 0,09 зникає. Будь-яких закономірностей у виникненні цих змін не виявлено.

Аналіз отриманих електрофореграм показав, що обов'язковими компонентами електрофоретичного спектра анодних естераз експлантатів *S. porcii* є ізоформи з R_f 0,02, 0,06 та 0,25.

Стосовно лабільних компонентів суміші встановлено, що в більшості випадків вони представлені ізоформами, яким властива однакова електрофоретична рухливість. Окрім відмінностей в якісному складі спектра, як і для катодних форм ензиму, виникають зміни кількісного характеру, про що свідчить збільшення чи зменшення інтенсивності забарвлення протеїнових смуг на електрофореграмі.

Хоча в більшості випадків ізоензимний спектр естераз, отриманих з різних тканин, залишається стабільним під час зміни стадії диференціації культивованих рослин і з переходом від диференціації до дедиференціації [5, 16, 18, 19], у нашому випадку спостерігалася зміна кількості ізоформ у разі зміни концентрації фітогормонів у живильному середовищі.

Отже, ізоензимні спектри анодних естераз *S. discolor* та *S. porcii* залежать як від кількісного, так і від якісного вмісту ауксинів у живильному середовищі. Це може свідчити, що саме

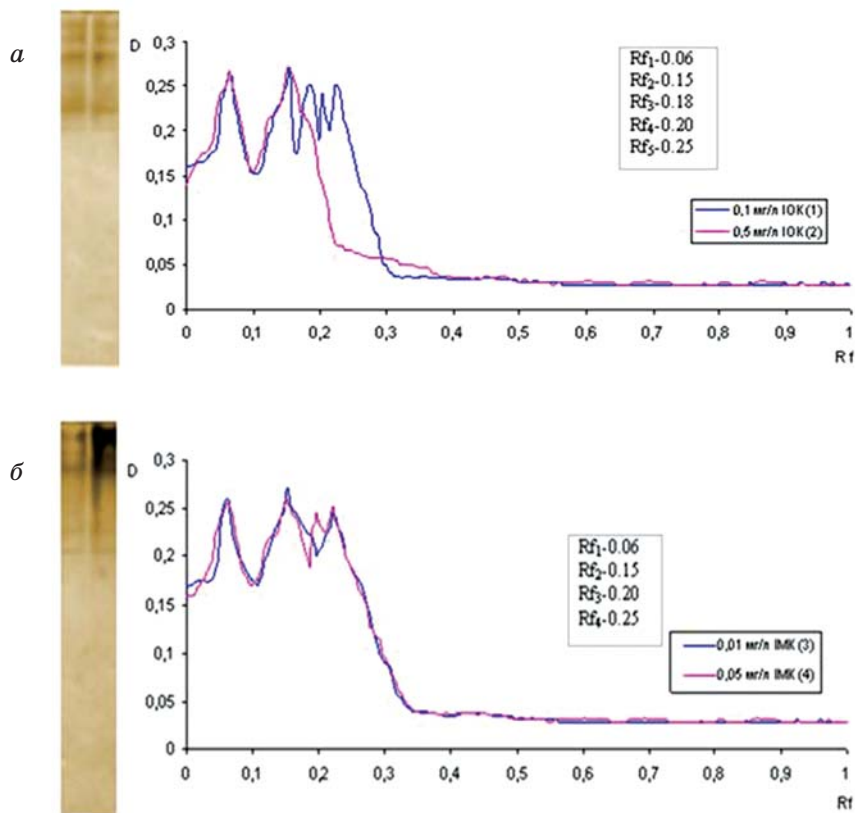


Рис. 3. Електрофоретичні спектри анодних естераз експлантатів *S. discolor*, культивованих у присутності ІОК (а) чи ІМК (б)

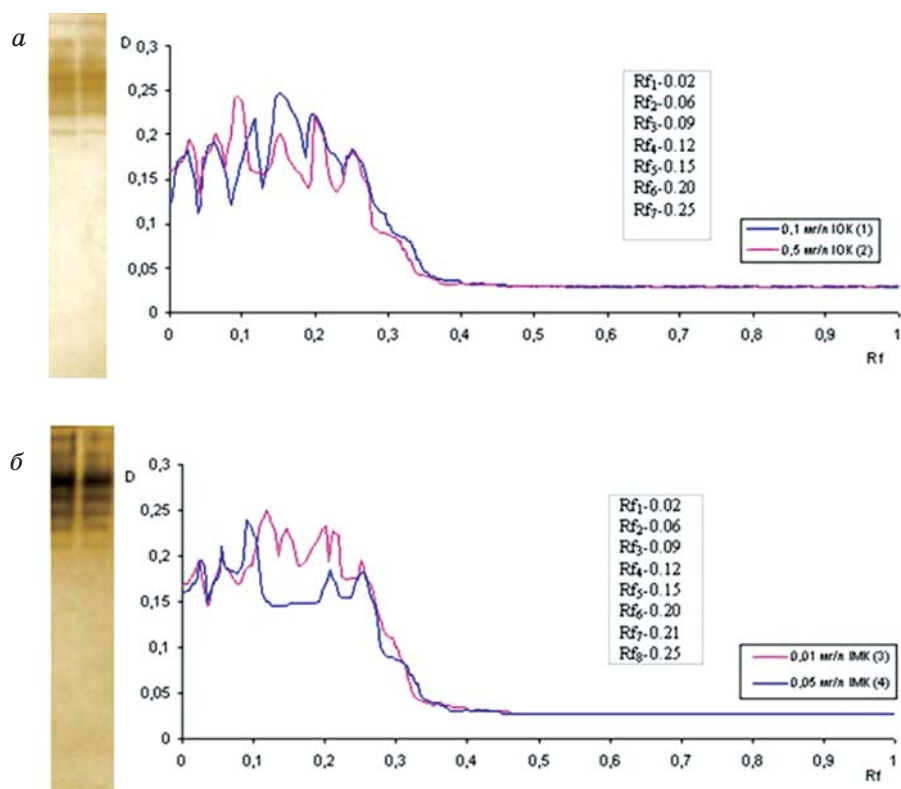


Рис. 4. Електрофоретичні спектри анодних естераз експлантатів *S. porcii*, культивованих у присутності ІОК (а) чи ІМК (б)

анодні естерази в рослин цих видів несуть функціональне навантаження у процесах адаптації до змін умов існування. Тому є підстави стверджувати, що як маркери, які дозволяють ідентифікувати соматональні варіанти, слід використовувати катодні ізоформи естераз листків *S. discolor* та *S. porcii*, оскільки зі зміною умов культивування вони характеризуються сталістю компонентного складу.

Таким чином, встановлено, що електрофоретичний спектр катодних естераз експлантатів *S. discolor* та *S. porcii* незалежно від умов культивування характеризується стабільністю і містить відповідно 9 і 10 компонентів з низькою електрофоретичною рухливістю. Це свідчить про можливість їх використання як генетичних маркерів. Спільними для обох видів є ізоформи з *Rf* 0,01; 0,03; 0,09; 0,12; 0,16.

Електрофоретичні спектри анодних естераз листків експлантатів *S. discolor* та *S. porcii* представлені ізоформами з низькою електрофоретичною рухливістю, що виявляють залежність від якісного та кількісного вмісту ауксинів у живильному середовищі.

Електрофоретичні спектри анодних естераз листків експлантатів *S. discolor* та *S. porcii* представлені ізоформами з низькою електрофоретичною рухливістю, що виявляють залежність від якісного та кількісного вмісту ауксинів у живильному середовищі.

ЛІТЕРАТУРА

1. Календарь Р. Н., Глазко В. И. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение // Физиол. биохим. культ. раст. — 2002. — Т. 34, № 4. — С. 279–284.
2. Конарев А. В. Молекулярная биология в познании генетических и морфогенетических процессов у растений. — СПб.: ВИР, 2002. — 51 с.
3. Косенко Л. Е., Кордюм Е. Л., Глазко В. И. Дифференциация морфологических форм *Sium latifolium* L. с помощью молекулярных маркеров // Биополимеры и клетка. — 2003. — Т. 19, № 5. — С. 451–456.
4. Кунах В. А. Геномная изменчивость соматических клеток растений // Там же. — 1997. — Т. 13, № 5. — С. 362–371.
5. Марченко М. М., Шелифіст А. Є., Чебан Л. М. Особливості введення в культуру *in vitro* *Saussurea porcii* Degen та *S. discolor* (Willd.) DC. // Зб. наук. пр. Чернівецького нац. ун-ту. Вип. 23: Біологія. — Чернівці: Рута, 2004. — 304 с.
6. Марченко М. М., Шелифіст А. Є., Чебан Л. М. Характеристика електрофоретичних спектрів пероксидаз та пероксидазної активності експлантатів *Saussurea discolor* (Willd.) DC., культивованих *in vitro* // Физиол. биохим. культ. раст. — 2007. — Т. 39, № 5. — С. 419–425.
7. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). — М.: Наука, 1981. — 288 с.
8. Сельдимирова О. А., Янбаева Ю. А., Зайцев Д. Ю. Изоферментные маркеры в исследовании

- изменчивости сортов яровой мягкой пшеницы, районированной в Башкортостане // Вестник ОГУ. — 2009. — № 6. — С. 337–339.
9. Чебан Л. Н., Шелифост А. Е., Марченко М. М. Характеристика электрофоретического спектра изоформ пероксидаз эксплантов *Saussurea porcii* Degen, культивируемых *in vitro* // Матер. межд. науч. конф. «Молекулярная генетика, геномика и биотехнология», 24–26 ноября 2004 г., Минск. — С. 197–199.
 10. Чеченева Т. Н. Изменчивость злаков в культуре *in vitro* и в процессе регенерации растений // Физиол. биохим. культ. раст. — 2006. — Т. 38, № 2. — С. 163–175.
 11. Чорней І. І., Буджак В. В., Термена Б. К. Нові відомості про поширення на Чернівеччині судинних рослин з «Червоної книги України» та їх охорона // Укр. бот. журн. — 2001. — Т. 58, № 1. — С. 78–83.
 12. Чупов В. С., Кудрякова Н. В. Электрофоретическая подвижность эстераз семян представителей семейства *Liliaceae* как показатель уровня их эволюционного развития // Бот. журн. — 1996. — Т. 81, № 2. — С. 47–54.
 13. Balen B., Krsnik-Rasol M. Isoenzymes of peroxidase and esterase related to morphogenesis in *Mammillaria gracillis* Pfeiff. tissue culture // J. Plant Physiology. — 2003. — V. 106. — P. 1401–1406.
 14. Balen B., Krsnik-Rasol M., Zadro I., Simeon-Rudolf V. Esterase activity and isoenzymes in relation to morphogenesis in *Mammillaria gracillis* Pfeiff. tissue culture // Acta Bot. Croat. — 2004. — V. 63, N 2. — P. 83–91.
 15. Carrilo-Costaneda G., Mata A. Succession of esterase and peroxidase isozymes associated with the *in vitro* tissue dedifferentiations and shoot induction // Biotech. Appl. — 2000. — V. 17. — P. 225–230.
 16. Collet S., Andre Collet M. Differential gene expression for isozymes in somatic mutants of *Vitis vinifera* L. (Vitaceae) // Biochem. Systemat. Ecol. — 2005. — V. 33. — P. 691–703.
 17. Saher Sh., Piqueras A., Hellin E., Olmos E. Pectin methyl esterases and pectins in normal and hyperhydric shoots of carnation cultured *in vitro* // Plant Physiol. Biochem. — 2005. — V. 43. — P. 155–159.
 18. Tasekovich L. Red List of Vascular Plants of the Carpathan Mountains. — Lviv: State Museum of Natural History, NAS of Ukraine, 2002. — 29 p.
 19. Zhang Y. Polymorphism at the esterase isozyme locus Est 10 associated with phylogenetic differentiation in rice // Genes. Genet. Syst. — 2003. — V. 78. — P. 285–290.

**ХАРАКТЕРИСТИКА
ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИХ СПЕКТРОВ
ЭСТЕРАЗ ЭКСПЛАНТАТОВ
Saussurea discolor (Willd.) DC.
И *Saussurea porcii* Degen**

М. М. Марченко
А. Е. Шелифост
Л. Н. Чебан

Черновицкий национальный университет
имени Юрия Федьковича

E-mail: larisa.cheban@mail.ru

Изучены особенности развития *Saussurea discolor* и *S. porcii*, культивируемых *in vitro* в условиях разного качественного и количественного содержания в питательной среде ауксинов индолилacetата и индолилбутирата. Осуществлен анализ электрофоретических спектров эстераз культивированных *in vitro* организмов. Как катодные, так и анодные изоформы энзимов характеризуются низкой электрофоретической подвижностью. Доказана стабильность спектра катодных эстераз эксплантатов обоих исследуемых видов независимо от качественного и количественного содержания ауксина в питательной среде, что свидетельствует о возможности их использования в качестве генетических маркеров.

Ключевые слова: *Saussurea discolor*, *Saussurea porcii*, эстераза, электрофоретические спектры.

**CHARACTERISTICS OF THE ESTERASE
ELECTROPHORETIC SPECTRA
OF EXPLANTS
Saussurea discolor (Willd.) DC.
AND *Saussurea porcii* Degen**

M. M. Marchenko
A. E. Shelifist
L. M. Cheban

Fedkovich Chernivtsy National University,

E-mail: larisa.cheban@mail.ru

The analyses of the electrophoretic spectra of *Saussurea discolor* and *S. porcii* esterases cultivated *in vitro* have been done. Both cathode and anode enzyme isoforms specified by low electrophoretic mobility. In contrast to the anode forms, it is proved spectrum stability of cathode esterase of explants for both studied species, regardless of qualitative and quantitative content of auxin in the culture media (0.1/0.5 mg/l IAA or 0.01/0.05 mg/l IBA). Thus acid esterase may be used as genetic markers.

Key words: *Saussurea discolor*, *S. porcii*, esterase, electrophoretic spectra.