

УДК 635.21:631.526.32:575

С.В. МОНАРХОВИЧ, Г.А. ЯКОВЛЕВА

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЕ ПРОФИЛИ БЕЛКОВ КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ

Институт картофелеводства НАН Беларуси

(Поступила в редакцию 10.03.2005)

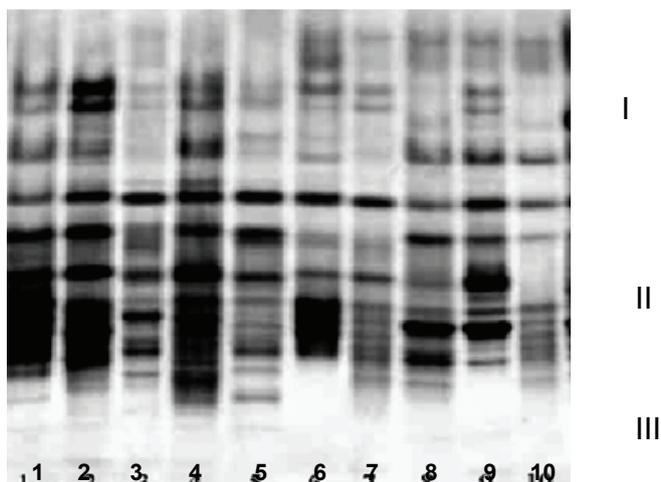
Идентификация сортов картофеля в Беларуси основана на морфологических признаках. Согласно методике УРОВО (Союз по защите сортов растений) [1], испытания отличимости, однородности и стабильности для картофеля учитывают 50 характерных признаков, относящихся как к растению в целом, так и к отдельным органам: световым росткам, стеблям, листьям, цветкам и клубням. Например, световые ростки описывают по 12, а лист — по 14 признакам. Морфологические признаки не надежны как критерии идентификации, так как подвержены влиянию условий выращивания и субъективности наблюдений. К тому же эти признаки не доступны одновременно для идентификации. Для полного описания всех признаков, согласно методике УРОВО, необходимо проведение пяти учетов: 1 — около 12 недель после закладки на проращивание; 2 — в стадию бутонизации; 3 — в стадию цветения; 4 — в стадию созревания; 5 — после уборки. Поэтому возникла необходимость в использовании более надежного, быстрого и эффективного инструмента различения сортов. С 70-х годов XX века для выявления межсортовых различий картофеля применяют белковые маркеры. Обычно используют аналитические методы электрофореза и изоэлектрофокусирования (ИЭФ) в различных гелях. Для картофеля наиболее обстоятельные исследования в этом направлении были проведены немецкими исследователями под руководством Н. Stegemann. Они показали, что из всех вариантов, включая ИЭФ, наиболее эффективным, экономичным и пригодным для сортовой идентификации картофеля является электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) водорастворимых белков клубней [2]. Запасные белки клубней закодированы в одном локусе на 8-й хромосоме. В этом локусе содержится 40—50 генов, которые могут обеспечить полиморфизм, достаточный для целей идентификации [3]. Немецкими учеными создан каталог европейских сортов картофеля, с использованием электрофореграмм нативных белков клубней картофеля и изозимов эстеразы в ПААГ [4]. Для сортовой идентификации помимо полиакриламидных используют также крахмальные и агарозные гели. Американские ученые для биохимической идентификации сортов картофеля Северной Америки использовали 13 изоферментных систем, выявленных при электрофоретическом разделении белков в крахмальном геле [5]. Белки клубней словенских сортов картофеля были проанализированы в денатурирующих условиях с додецилсульфатом натрия (SDS — электрофорез) [6].

Метод изоэлектрофокусирования также широко используется в мировой практике. Чешские ученые использовали методику ИЭФ в ПААГ для идентификации 40 сортов картофеля [7]. К. Jensen и др. классифицировали сорта картофеля с помощью ИЭФ белков клубней в ультратонком агарозном геле [8]. В России издан каталог сортов картофеля, с лазерными денситограммами спектров ИЭФ белков клубней в ПААГ [9]. Однако многие ученые [2, 3, 5] отмечают зависимость спектров белков от условий выращивания и хранения клубней.

Цель нашей работы — определение влияния различных факторов на сортоспецифичность спектров белков клубней десяти сортов картофеля, а именно: стадии хранения, условий года и места выращивания.

Материалы и методы исследования. Опыты проводили на белках, выделенных из паренхимы клубней картофеля 10 сортов: Лазурит, Архидея, Явар, Сантэ, Скарб, Орбита, Синтез, Альпинист, Луговской, Белорусский 3. Общую фракцию белков выделяли: 1) из клубней всех сортов, выращенных в разные годы (2000, 2001, 2002); 2) из клубней сортов Лазурит, Явар, Скарб, выращенных в различных почвенно-климатических условиях РБ (Минской, Могилевской, Витебской, Гродненской областях); 3) из клубней 10 сортов в разные периоды хранения (покой, окончание покоя и проращивание клубней). Белки выделяли в Трис-НСI-буфере рН 6,7 в при-

Рис. 1. Электрофореграмма белков клубней картофеля, 2002 г.: 1 — Белорусский 3; 2 — Синтез; 3 — Альпинист; 4 — Орбита; 5 — Луговской; 6 — Сантэ; 7 — Скарб; 8 — Явар; 9 — Архидея; 10 — Лазурит; I — зона медленных белков, II — зона средних по подвижности белков, III — зона быстрых белков; стрелкой обозначена полоса, характерная всем сортам



сутствии β-меркаптоэтанола. В любой части клубня делали сверлом высечку, часть, близкую к кожуре, удаляли. Навеску (до 1 г) растирали с буфером в соотношении 1:1 в охлажденной ступке. Полученный гомогенат центрифугировали в течение 10 мин при 13000 об/мин и +4°C. Надосадочную жидкость разливали в пробирки и тут же использовали или замораживали и хранили в морозильной камере при –20°C.

Белки электрофоретически разделяли в 7%-ном ПААГ в Трис-глициновом электродном буфере pH 8,3 в режиме постоянного тока при I=80mA, P=80W, E=800V на приборе фирмы Bio-Rad на 2 гелях одновременно. Полученные гели окрашивали 0,05%-ным раствором Coomassie Brilliant Blue R-250.

Для изучения влияния одного фактора белки выделяли из 3–5 клубней сорта в каждом опыте и электрофоретически разделяли не менее чем на трех гелях. Таким образом, повторяемость опыта была 9–15-кратная.

Результаты и их обсуждение. При разделении белков клубней 10 сортов картофеля (Лазурит, Явар, Архидея, Скарб, Сантэ, Орбита, Луговской, Синтез, Альпинист, Белорусский 3) на одном геле наблюдали четкую сортовую специфичность белковых спектров (рис. 1), которая сохранялась для всех клубней сорта. Влияние года на электрофоретические спектры общего белка изучали по профилям белков клубней 10 сортов урожая 2000, 2001, 2002 гг. Метеоусловия трех лет были различными. Вегетационный период 2000 г. характеризовался температурным фоном в пределах средних многолетних значений. Температура воздуха превысила средние многолетние значения на 2,3°C только в мае месяце. Количество осадков было ниже нормы (100% от средних многолетних значений) в мае (28%), июле (93%), августе (51%), сентябре (64%) и только в июне осадков выпало чуть выше нормы (109%). Вегетационный период 2001 г. характеризовался повышенным температурным фоном по всем месяцам, за исключением июля (-0,9°C к средним многолетним значениям), а также неравномерным выпадением осадков. Недостаток влаги наблюдали в мае (29%), августе (67%), сентябре (80%), переизбыток влаги был в июне (109%) и июле (193%). Весна и лето 2002 г. были засушливыми. Недостаток влаги наблюдался с мая по сентябрь, %: май — 43, июнь — 74, июль — 28, август — 88, сентябрь — 45, при температуре воздуха выше средних многолетних значений в мае (+2,4°C), июле (+3,9°C), августе (+3,2°C).

При сопоставлении треков одного и того же сорта на разных гелях, выполненных как с белками клубней урожая одного года, так и разных лет, наблюдали вариации по количеству белковых компонентов и по их электрофоретической подвижности (R_f — отношение длины пробега отдельного белкового компонента к длине геля). Так, значение R_f белка, присутствующего в виде интенсивно окрашенной полосы у всех сортов, варьировало на разных гелях от 0,304 до 0,393 относительных единиц (обозначена стрелкой на рис.1). С подобной проблемой сталкивались и другие исследователи [2, 7, 8]. Для сопоставления профилей белков на разных гелях используют трек одного образца, с которым сравнивают остальные или специально разработанные компьютерные программы, учитывающие искажения электрофоретических паттернов белков в виде смещения и растяжения [8]. Немецкие ученые при составлении европейского каталога сортов картофеля использовали белковый профиль сорта Маритта. В таблице представлены полученные в разные годы электрофорерграммы, в качестве стандарта выбран сорт Скарб.

Каждый гель условно разбили на три зоны: I — медленных белков (катодная часть геля); II — средних по подвижности белков; и III — быстрых белков (анодная часть геля) (рис.1

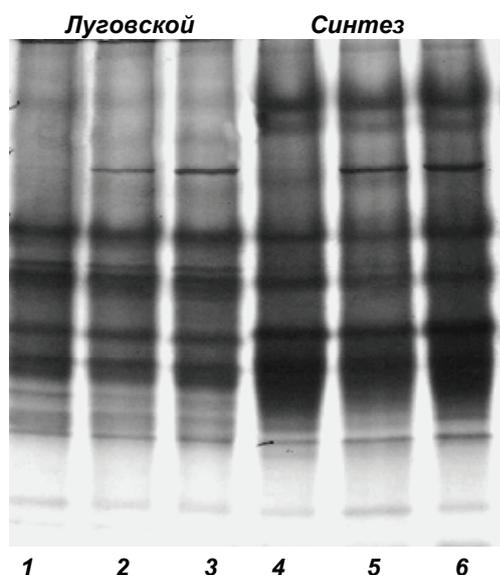
и табл.). В зоне медленных белков полосы (2—4) размыты. Полосы средней зоны (6—12) на наших гелях были, как правило, интенсивно окрашены и ярко выражены. Средняя зона включала 4 компонента, общих для 10 сортов, и 2—8 — различных. Отличия в количестве полос для сортов Явар и Архидея в зоне II, наблюдаемые на разных гелях, связаны с расщеплением одной из полос на две, которые настолько тесно примыкают друг к другу, что могут рассматриваться как одна. Зона быстрых белков содержит много слабо окрашенных минорных компонентов (0—4), которые визуальнo трудно определить. Все сорта отличала стабильность зон I и II независимо от года выращивания. Различия в паттернах белков в зависимости от года выращивания наблюдали только в зоне быстрых и трудно различимых минорных белков (на рис. 1 зона III).

Сравнительная характеристика паттернов белков клубней урожая 2000, 2001 и 2002 гг. для 9 сортов картофеля относительно сорта Скарб

Сорт	Количество полос в треках																	
	I — медленные белки						II — зона белков средней подвижности						III — быстрые белки					
	2000		2001		2002		2000		2001		2002		2000		2001		2002	
	всего	но-вые*	всего	новые	всего	новые	всего	новые	всего	новые	всего	новые	всего	новые	всего	новые	всего	новые
Скарб	3	К	3	К	3	К	9	К	9	К	9	К	2	К	1	К	3	К
Лазурит	4	1	4	1	4	1	6	1	6	0	6	1	3	1	1	0	4	1
Явор	4	1	4	1	4	1	6	1	7	1	6	1	2	1	1	0	3	0
Архидея	4	1	4	1	4	1	12	3	11	2	11	2	2	1	1	0	1	0
Сантэ	4	1	4	1	4	1	8	2	8	2	8	2	2	1	0	1	0	0
Орбита	4	1	4	1	4	1	8	1	8	1	8	1	4	2	4	3	3	1
Луговской	4	1	4	1	3	1	9	1	9	1	9	1	4	2	3	2	3	1
Альпинист	2	0	2	0	2	0	7	0	7	0	7	0	1	0	1	0	1	0
Синтез	3	0	3	0	3	0	7	1	7	1	7	1	3	1	3	2	3	0
Белорусский 3	4	1	4	1	4	1	8	2	8	2	8	2	4	2	4	3	2	1

*Новые — полосы, отличные от наблюдаемых у сорта Скарб, обозначенного К

Анализ электрофореграмм белков, выделенных в разные периоды хранения клубней, показал, что сорта в основном сохранили свои специфичные спектры. Белки были выделены из клубней 10 сортов в разные сроки хранения: период покоя, окончание периода покоя, период прорастания клубней. В профилях всех сортов на стадии окончания периода покоя в зоне медленных белков нами выявлена полоса, сохранявшаяся в треках белков проросших клубней, которой не было в паттернах белков покоящихся клубней. На рис. 2 приведены электрофореграммы белков клубней сортов картофеля Луговской и Синтез, выделенных в разные периоды хранения. Стрелкой обозначен белковый компонент, характерный для прорастающих клубней.

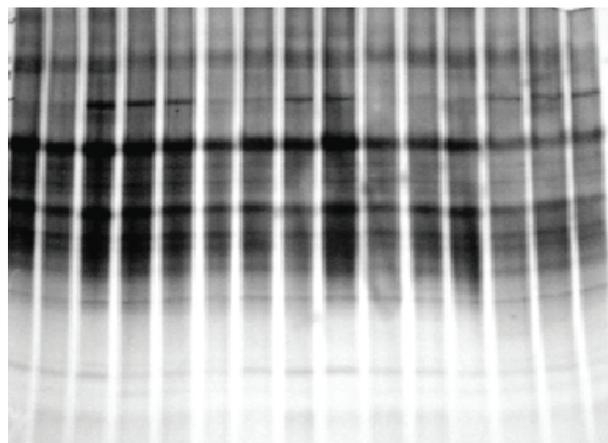


Для изучения влияния почвенно-климатических условий на профили белков были получены электрофореграммы трех сортов картофеля: Лазурит, Явар, Скарб, выращенных в 4 областях Беларуси (Минская — 2 разных участка, Могилевская, Гродненская и Витебская области) в 2001 г. Почвенно-климатические условия выращивания в данных областях были различными, особенно это касалось количества осадков. В вегетационный период 2001 г. количество выпавших осадков по отношению к норме составило, %: в Могилевской области — 51; в Витебской области — 96; в Гродненской области — 117; в Минской области — 198.

Рис. 2. Электрофореграмма белков клубней картофеля сортов Луговской и Синтез в разные периоды хранения: 1,4 — белки из клубней в период покоя, 2,5 — белки из клубней в период окончания покоя, 3,6 — белки из прорастающих клубней (ростки 1,5—2 см); стрелкой указана полоса, появляющаяся у клубней на стадии окончания покоя

Почвы также отличались по гранулометрическому составу (легкосуглинистая в Могилевской, супесчаная в Гродненской и средне-суглинистая в Витебской и Минской областях) и по показателям пахотного горизонта. При анализе электрофореграмм выявили, что для сорта Скарб все треки из 4 точек экологического испытания были идентичны (рис. 3), за исключением полосы, свойственной прорастающим клубням. У сортов Явар и Лазурит наблюдались отличия в профилях белков клубней, полученных из одного источника (данные не приведены), что могло быть результатом сортовой примеси.

Заключение. Результаты исследований подтвердили сортоспецифичность профилей белков клубней картофеля. В профилях белков клубней сортоспецифичны зоны медленных и средних по электрофоретической подвижности белков. При этом наибольшая дифференциация сортов наблюдается в зоне средних по подвижности белков. Каждый сорт картофеля сохраняет свой специфичный белковый профиль независимо от условий выращивания. Сорт картофеля может быть установлен по белковым спектрам клубней независимо от периода хранения, с учетом появления одной, одинаковой у всех сортов, полосы в период окончания покоя.



Могилев Витебск Гродно Минск 1 Минск 2

Рис. 3. Электрофореграммы белков клубней картофеля сорта Скарб, выращенных в различных почвенно-климатических условиях; стрелкой указана полоса, появляющаяся у клубней в период окончания покоя.

Литература

1. Guidelines for the conduct of tests for distinctness, homogeneity and stability/ UPOV-Potato/ Pomme de terre/ Kartoffel. TG/23/5. 1986. P. 11—21.
2. Stegmann H. // Proceedings of the ISTA Symposium on Biochemical Test for Cultivar Identification, Cambridge, 12—15 September 1983. / National Institute of Agricultural Botany. Zurich, Switzerland, 1984. P. 20—31.
3. Cooke R. J. // Potato Research. 1999. Vol. 42. P. 529—539.
4. Stegmann H., Loeschcke V. Index of European Potato Varieties // Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt, Berlin, 1976. Vol. 168. P. 1—217.
5. Douches D. S., Ludlam K. // Amer. Potato J. 1991. Vol. 68. P. 767—780.
6. Rogl S., Vranac S., Javornic B. // Res. Reports Biotechnical Faculty of the University of Ljubljana. 1996. Vol. 67. P. 49—54.
7. Poppr J., Hоla Z. // Rostl. Vyr. 1993. Vol. 39. N 11. P. 1057—1064.
8. Jensen K., Tygesen T.K., Kesmir C. et al. // Agric. Food Chem. 1997. Vol. 45. P. 158—161.
9. Сорта картофеля, возделываемые в Российской Федерации: Каталог. М., 1993.

S.V.MANARKHOVICH, G.A. YAKOVLEVA

INFLUENCE OF DIFFERENT FACTORS INTO ELECTROPHORESIS PROFILES OF POTATO TUBERS PROTEIN

Summary

Identification of potato varieties is important at all stages of selection and seed-growing. Results of studying of protein electrophoresis possibilities at identification of potato varieties have been presented. Protein patterns of potato tuber parenchyma were unique for every variety. Environmental factors don't influence onto profiles of potato tubers protein. Electrophoresis patterns of proteins can be used for sort identification independently from time of tubers storage at considering one strip appearing for growing tubers. The strip is identical for all varieties.