ՀԱՅԿԱԿԱՆ ՍՍՀ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԿԱԴԵՄԻԱ: ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР. БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ
т. XXVII, № 5, 1974

УДК 632.938:537.363:582.757

С. М. ЧАРЯН

НЕКОТОРЫЕ ДАННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БЕЛКОВ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА EUPHORBIACEAE В СВЯЗИ С СИСТЕМАТИКОЙ

В работе для уточнения ряда вопросов систематики семейств Euphorbiacea и Daphniphyllacea использованы методы иммуноэлектрофореза в гелях. На основании полученных данных доказана таксономическая обособленность семейства Daphniphyllacea, выявлены подсемейственные, родовые, трибальные, а также видовые отличия у представителей семейства Euphorbiaceae.

В настоящее время приобретает все большее значение сравнительная серология, особенно использование серологических методов изучения белков таксономических и генетических признаков [2, 15]. Ряд исследований в области систематики растений с использованием серологических методов был проведен Моритцем и его сотр. [10], которые уделяли большое внимание использованию новых методов серологического анализа (иммунодиффузии в гелях, количественной микропреципитации). Серологическое сравнение белков разных видов растений, особенно на уровне индивидуальных белковых фракций, позволяет судить, с одной стороны, о родственных отношениях между видами, с другой— об эволюции белковых комплексов той или иной систематической группы («протемонов» по терминологии Моритца), т. е. о приобретении новых белков и утрате старых, и даже о возникновении молекулярных различий у очень близких белков [5].

Серологическое исследование 15 видов бобовых проводилось Клозом и Турковой, которые изучали родственные отношения глобулинов семян этих видов [14], а также Хеммондом [12] (по лютиковым), Джонсоном (по магнолиевым) [13], которые показали применимость методов серологического анализа в исследованиях по сероботанике.

В настоящее время ведутся работы в области сравнительной серологии в США Бойденом и его сотр. По Бойдену [7], основным вопросом «сравнительной серологии» является различие и идентификация антигенов и установление их родства.

Материал и методика. Нами применялся метод иммуноэлектрофореза в модификации, предложенной Клозом и Клозовой [3, 4]. Иммуноэлектрофорез проводился в агарозо-крахмальном геле с подходящим буфером с соответствующим окрашиванием для изучения запасных белков. Агароза имеет ряд известных преимуществ—почти полное отсутствие эндоосмоса, значительная прозрачность геля, повышаемая добавлением гидролизованного крахмала.

Приготовление геля: 0,75% агарозу (лучше всего продукт производства Industria biologugum Francaise, можно также пользоваться агарозой марки Serva, ФРГ) и 2,5%

гидролизованный крахмал кипятится в боратфосфатном буфере в течение 7—8 мин с момента закипания раствора. Гель готовится непосредственно перед употреблением. Состав буфера: H_3BO_3— 25,99 г; ИоОН—2,40 г; KH_2PO_4—2,04 г; дист. вода—1 л; pH буфера—7,6.

Этот же буфер применяется для заполнения электродных кювет. Горячий гель разливается 2,4 мл пипеткой на стеклянные пластинки 5×5 см и после остывания помещается во влажную камеру. Стартовые лунки для антигенов и траншеи для антисывороткн вырезаются по шаблону. После удаления геля из лунок они заполняются антигеном. Электрофоретическое разделение белков происходит за 65 мин при 15 МА (на одну пластинку) и напряжении 20 в.

После разделения белков гель удаляется из продольных траншеек, и они заполняются антисывороткой. Диффузия протекает в течение 20—24 час. во влажной камере при комнатной температуре. После ее окончания, когда проявляются зоны специфических преципитатов, пластинки промываются в течение 2—4 мин в 0.80% растворе NaCl, затем заворачиваются в хроматографическую бумагу, как и после первой промывки, и высушиваются. Сухие пластинки, освобожденные от балластных белков, промываются и окрашиваются в растворе красителя следующего состава: 0,25 г Commassie brillians blue: Thiazin red 0,45 г; уксусная кислота—40,00 мл; дист. вода—300 мл. Окрашивание длится 30 мин. Избытки краски смываются в следующей смеси: C_2H_5OH—5 частей; уксусная кислота—1 часть; 0,3 глицерина—0,3%; дист. вода—5 частей.

После дифференциации пластинки сушатся в вертикальном положении. Нами также использовался метод гель-диффузии, предложенный Ухтерлони [16] с некоторыми модификациями. Этот метод очень удобен для исследования состава двух или нескольких суммарных антигенов разного происхождения. На стеклянные пластинки 5×5 см наносится 2,3 мл того же геля, что и при иммуноэлектрофорезе. По шаблону, предложенному Зильбером и Абелевым [1], вырезаются лунки и из них отстаивается гель. В большую среднюю лунку помещается иммунная сыворотка, а в боковые лунки—растворы антигенов. Антитела и молекулы антигенов диффундируют радиально в гель навстречу друг другу, и на местах встреч с антигенами образуются линии преципитации. Диффузия протекает в течение двух суток, затем пластинки промываются, сушатся и красятся точно также, как при иммуноэлектрофорезе. По расположению преципитационных линий можно судить о том, одинаковы ли два соседних антигена или нет.

Полное смыкание концов полос преципитации означает полную идентичность антигенов, т. е. реакцию идентичности, частичное слияние полос с образованием шпор—наличие двух разных антител к одному и тому же антигену, т. е. реакция частичной идентичности, пересечение полос преципитации—их полное антигенное различие—реакция неидентичности.

Объектом серологических исследований являлись представители специализированного семейства Euphorbiaceae, систематика и филогенетические связи которого не разработаны по сей день. Среди ученых нет единого мнения о месте этой группы растений в филогенетическом древе цветковых растений. Иммуноэлектрофоретическому анализу подверглись белки семян следующих представителей семейства Euphorbiaceae, относящихся к различным подсемействам, родам и трибам.

Securinega suffruticcsa Pall. п/сем. Phyllathotdeae
Phyllanthus grandifollus Linn. п/сем. Phyllanthoideae
Euphorbia macroclada Boiss. п/сем. Euphorbioideae
Euphorbia macroceras Fisch. п/сем. Euphorbioideae
Euphorbia virgata Waldst п/сем. Euphorbioideae
Ricinus communis Linn. п/сем. Euphorbioideae
Aleurites fordii Hemsl. п/сем. Euphorbioideae
Chrozophora tinctoria Muell. п/сем. Euphorbioideae
Daphniphyllum macropodium Miq. сем. Daphiphyllaceae
Euphorbia gerardiana Euphorbioideae

Материал по родам Euphorbia, Ricinus, Chrozophora был собран во время экспедиции по Армении (1963, 1969 гг.); по родам Daphniphyllum — на Черноморском побережье Кавказа, соответственно в совхозах «Южные культуры» и в Сухумском ботаническом саду; по родам Securinega, Phyllanthus—в Ленинградском ботаническом саду и тропической оранжерее ботанического института (1969).

Получение белковых антигенов из семян: после сбора семена хранились в сухом месте, далее освобождались от кожуры, и содержимое тщательно измельчалось в ступке. Полученная семенная мука обезжиривалась петролейным эфиром в специальной ванночке для холодной экстракции. Навеска обезжиренной муки (100 мг на 0,1 мл буфированного физиологического раствора) помещалась в центрифужную пробирку, хорошо смешиваясь, затем на несколько часов помещалась в холодильник, после чего центрифугировалась в течение 30 мин при g ‖ 15000, t —5°. Надосадочная жидкость отсасывалась и использовалась в качестве антигена в дальнейших опытах.

Получение иммунных сывороток. В качестве подопытных животных для получения иммунных сывороток использовались кролики. Для получения антисывороткн различной активности нами использовалась следующая схема иммунизации: первая инъекция—животному внутримышечно вводится равный объем антигена и адъюванта Фрейда [9], который использовался с целью продлить антигенное воздействие на организм и увеличить продукцию антител. Рекомендуется тщательно суспендировать эту смесь перед инъекцией. Через 10—12 дней после первой инъекции с адъювантом проводилась серия внутривенных инъекций; в ушную вену животному вводилось по 3—4 мг белка (через день). Всего было введено 45 мг белка.

По ходу иммунизации у кроликов бралась кровь по 2 мл на пробу титра антител. При наличии высокого титра после окончания иммунизации проводился полный отбор крови, которая центрифугировалась с целью освобождения отформенных элементов и лиофилизировалась для длительного хранения полученной сыворотки.

Придерживаясь данной схемы иммунизации, мы получили антисыворотку против суммарных белков, выделенных из семян Securinega suffruticosa.

Результаты и обсуждения. На иммуноэлектрофореграммах (рис. 1) показаны образцы белков семян, относящихся к различным родам, которые были исследованы одной антисывороткой против суммарных белков S. suffruticosa. Свойства белков исследуемых видов могут быть установлены при сравнении этих образцов (например, по числу зон). При более детальном изучении иммуноэлектрофоретических зон подобные сравнения могут помочь более подробному изучению таксономических связей. Например, используя антисыворотку S. suffruticosa против суммарных гомологических антигенов, мы получили 5 дуг преципитации (иммунофор. 1). На иммунофореграмме 1, вправо от стартовой лунки, видна одна интенсивно выраженная дуга, причем, эта дуга своей электрофоретической подвижностью и серологической идентичностью в какой-то мере похожа на дугу, образованную в результате гетерологической реакции (с той же антисывороткой) против суммарных белков Phyllantus gradifolius (иммунофор. 2). Видимое сходство свидетельствует о степени их родства. Для установления родственных взаимоотношений между указанными выше видами нами был применен метод двойной иммунодиффузии по Ухтерлони [16]. Образование так называемых «шпор» говорит о наличии как общих, так и частичных антигенов (см. 2 и 3 лунки). Эта реакция возникает в тех случаях, когда молекула одного из сравниваемых антигенов является носителем общих детерминантных групп, а молекула другого — носителем не только об-

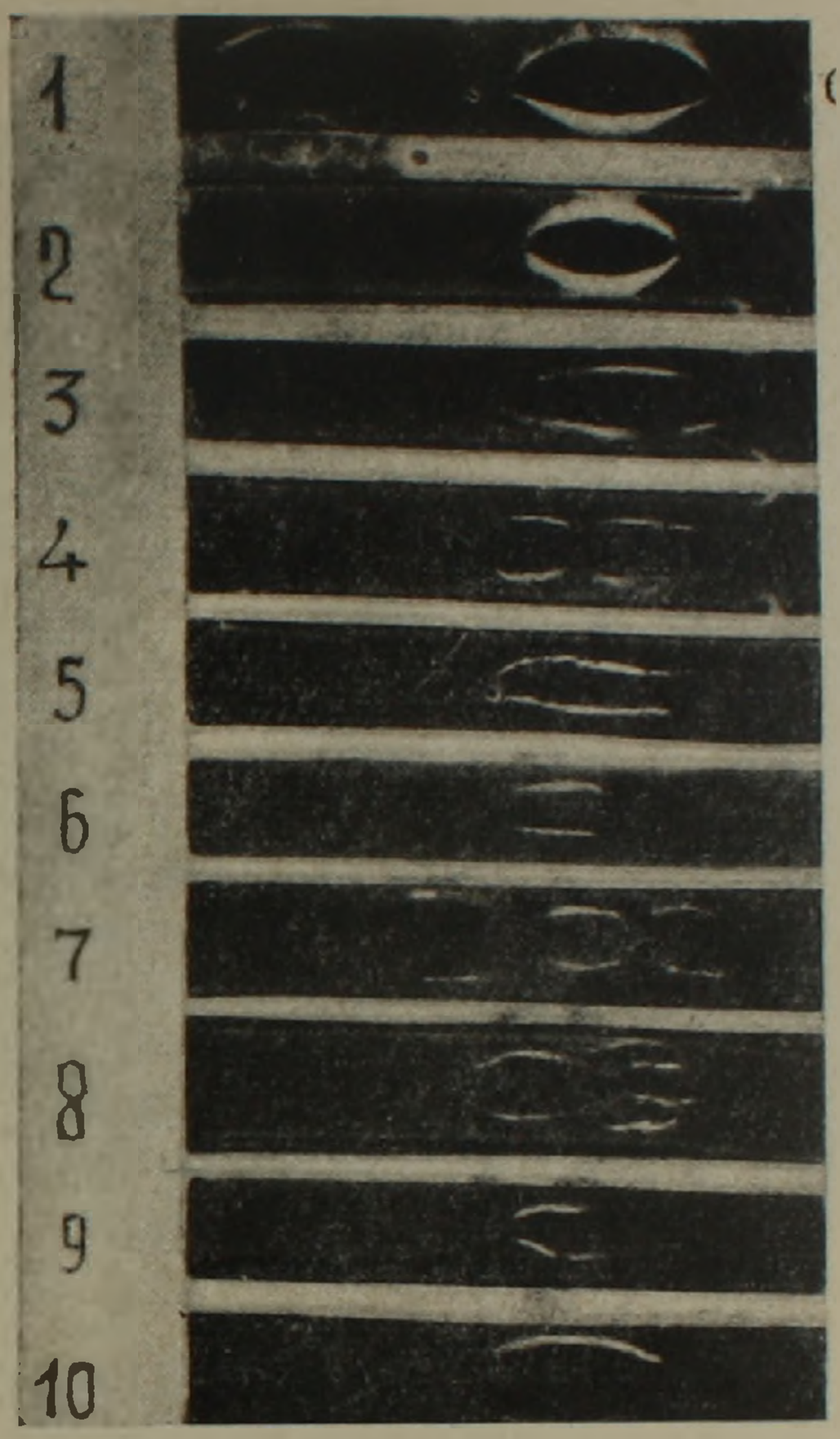

Рис. 1. Иммуноэлектрофореграмма белков семян представителей родов: Securinega, Phyllanthus, Euphorbia, Ricinus, Aleurites, Chrozophora, Daphniphyllum: 1 — S. suffruticosa, 2 — Ph. grandifolius, 3 — E. macroclada, 4 — E. macroceras, 5 — E. gerardiana, 6 — E. virgata, 7 — R. communis., 8 — A. fordii, 9 — Ch. tinctoria, 10 — D macropodium.

щих, но и специфических детерминантных групп. При различных концентрациях и соотношениях системы можно получить иную картину преципитации, поэтому важно проверить поведение системы в различных отведениях [1]. Таким образом, можно говорить о возможности родства между этими видами, относящимися к разным родам. В то же время родственная связь между ними вполне закономерна, так как эти роды относятся к одному и тому же подсемейству Phyllantoideae.

При сравнении же иммуноэлектрофореграмм четырех видов Euphorbia с гомологической реакцией (иммунофор. 1) мы не нашли каких-либо определенных связей. Однако при сравнении гетерологических реакций видно некоторое сходство дуг преципитаций. Особенно хорошо выражена иммуноэлектрофоретическая связь между E. macroceras и E. macroclada, у которых образуется по две хорошо выраженные дуги преципитации. Некоторая близость наблюдается при сравнении иммуноэлектрофореграмм 5, 6. У этих же представителей рода Euphorbia образуется по одной дуге преципитаций, хотя эти дуги в некоторой степени похожи на дуги первых двух представителей Euphorbia (вторая дуга от стартовой лунки) (иммунофор. 3,4). Линии преципитаций, образо-

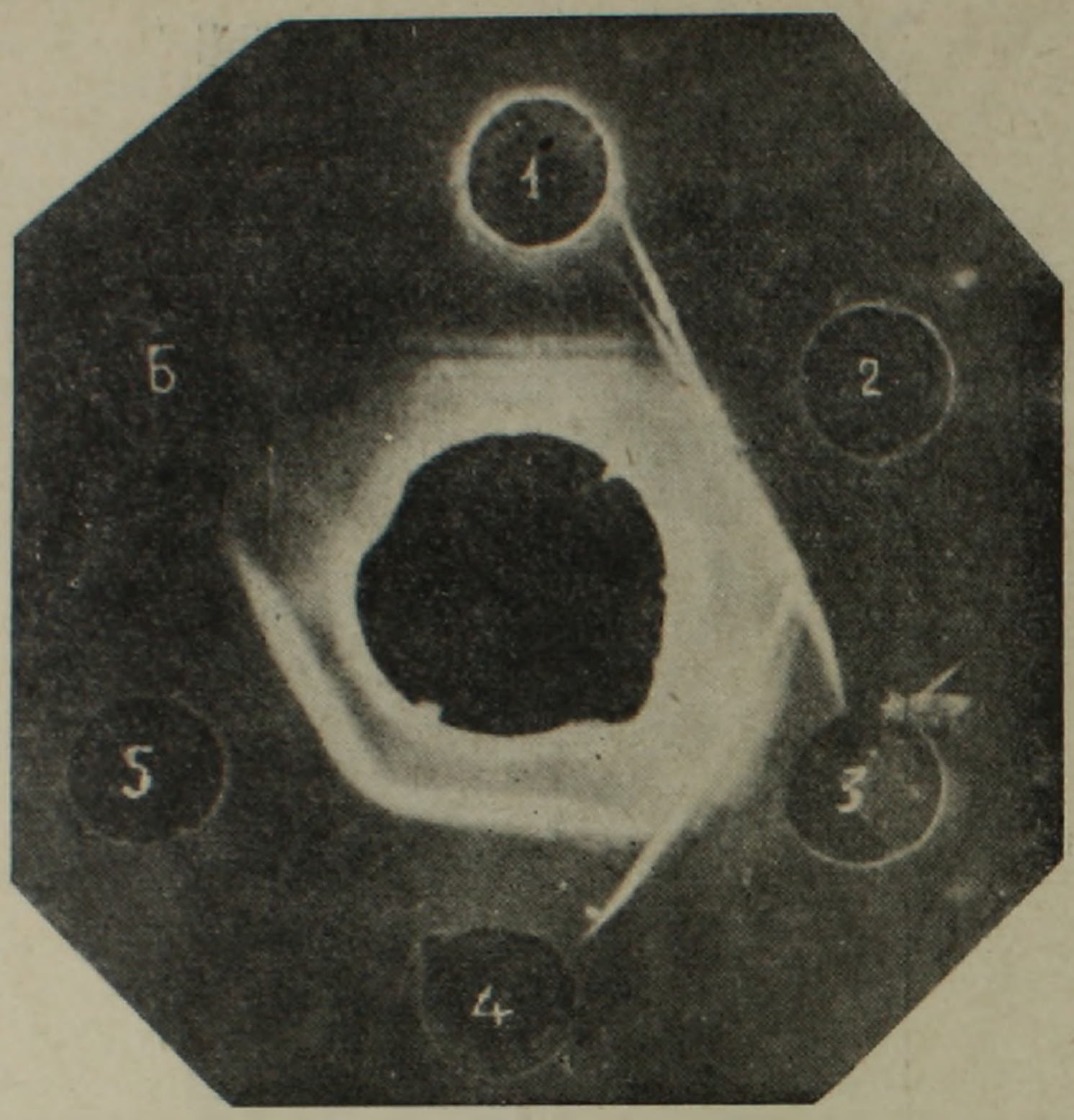

Рис. 2. Двойная иммунодиффузия по Ухтерлони.

ванные при иммунодиффузии, свидетельствуют о серологической идентичности E. macroceras и E. macroclada.. При описании методики было сказано, что при встречной диффузии между лунками, которые заполняются антигенами сравниваемых видов, образуются спектры преципитаций, которые смываются концами—«реакция идентичности» (на примере E. macroceras и E. macroclada, рис. 2, см. лунки 4, 5).

На иммуноэлектрофореграммах 7, 8, 9 соответственно с антигенами Ricinus communis, Aleurites fordii, Chrozophora tinctoria мы наблюдаем некоторую схожесть дуг преципитаций у первых двух представителей. У R. communis дуги 2, 3 (вправо от стартовой лунки) в некоторой степени похожи на дуги 1, 3 Aleurites fordii. Что же касается Ch. tinctoria, у которого образуется одна дуга, то ее можно сравнить с дугами у R. communis и A. fordii. Представители этих родов, по своим дугам преципитации близки представителям рода Eupdorbia а именно дуги 1, 3 у E. macroceras и дуги 1, 3 у E. macroclada частично соответствуют дугам 2, 3 R. communis и 1, 3 у A. fordii. Все эти представители относятся к подсемейству Euphorbioideae.

Это подтверждает правильность деления семейства Euphorbiaceae на подсемейства Euphorbioideae и Phyllauthoideae, что сделал Энглер [8] в свой системе. Эти данные вполне совпадают с нашими, полученными при помощи диск-электрофореза в гелях. Данные диск-электрофореза выявили незначительные различия между представителями рода Euphorbia и других родов, в частности Ricinus, Chrosophora и др. Этим же методом выявляются резкие различия данных родов от рода Phyllanthus.

Род Daphniphyllum отличается от изученных нами представителей молочайных. Некоторые систематики включали род Daphniphyllum в семейство Euphorbiaceae, а некоторые отделяли этот род в монотипное семейство Daphniphyllaceae. Суммарные белки, выделенные из семян Daphniphyllum macropodium, подвергли иммуноэлектрофорезу. Четко выраженная дуга (иммунофор. 10) отличается от вышеописанных представителей молочайных.

Таким образом, белковые комплексы, кроме видовых, родовых и подсемейственных отличий, хорошо характеризуют и трибальные отличия, а именно Ricinus, Euphorbia, Phyllanthus и др. являются представителями различных триб и подсемейств. Для более точного подтверждения вышеизложенных выводов в дальнейшем будет применен метод количественной преципитации, который является более объективным критерием при решении таксономических вопросов. Тем не менее, эти данные свидетельствуют о важности использования этих методов для решения вопросов систематики и родственных связей в таксонах различного ранга.

Ереванский государственный университет,
кафедра высших растений

Поступило 18.X 1972 г.

Ս. Մ. ՋԱՐՅԱՆ

EUPHORBIACEAE ԸՆՏԱՆԻՔԻ ՆԵՐԿԱՅԱՑՈՒՑԻՉՆԵՐԻ ՍՊԻՏԱԿՈՒՑՆԵՐԻ ԲՆՈՒԹԱԳՐՄԱՆ ՄԻ ՔԱՆԻ ՏՎՅԱԼՆԵՐ, ԿԱՊՎԱԾ ՆՐԱՆՑ ՍԻՍՏԵՄԱՏԻԿԱՅԻ ՀԵՏ

Ա մ փ ո փ ո ւ մ

Ուսումնասիրվել են Euphorbioidea *և* Phyllanthoideae *ենթաընտանիքների ներկայացուցիչները, ինչպես նաև* Daphniphyllaceae *ընտանիքից մեկ տեսակ։*

Իմմունաէլեկտրաֆորեզի տվյալների հիման վրա հաստատվում է Euphorbiaceae *ընտանիքի* Euphorbioideae *և* Phyllanthoideae *ենթաընտանիքների բաժանման նպատակահարմարությունը։ Վերջինս հաստատվում է նաև հեղուկում (դոնդողներում) դիսկ-էլեկտրաֆորեզի օգնությամբ ստացված տվյալներով։ Պարզվում է, որ սպիտակուցային կոմպլեքսները, բացի տեսակային և ցեղային տարբերություններից, բնութագրում են նաև տրիբային (ծնկային) տարբերությունները։*

Daphniphyllum *ցեղը, ըստ սպիտակուցային կոմպլեքսի, ցայտուն կերպով տարբերվում է* Euphorbiacea *ընտանիքի ներկայացուցիչներից և նրա առանձնացումը որպես հատուկ ընտանիք, լրիվ արդարացված է։*

ЛИТЕРАТУРА

1. *Зильбер Л. А., Абелев Г. И.* Вирусология и иммунология рака, М., 1962.
2. *Клоз И.* Физиология растений, 9, 4, 1962.

3. *Клоз И., Клозова Е.* Сельскохозяйственная биология, 1, 4, 1962.
4. *Клоз И., Клозова Е.* Личные сообщения, Л., 1972.
5. *Сафонов В.* Успехи биологической химии, 6, 315, 319, 1964.
6. *Тахтаджян А. Л.* Система и филогения цветковых растений, 252, 261, 1966.
7. *Boyden A.* Comparative Serology: Aims methods and result. Serol. meseumb bull. 20, 2, 1958.
8. *Engler A., Prantl K.* Dic natuürlichen Planzenfamilien, 1930.
9. *Freund J.* Amer. J. Clin. Pathol., 21, 645, 1951.
10. *Frouhne D., Moritz O., Jensen U.* Flora, 150, 333, 1961.
11. *Graber P., Williams C.* Bioch. biophys. acta, 10, 193, 1953.
12. *Hammond H.* Serolog. musseum bull. 14, 1, 3, 1955.
13. *Johnson M.* Serolog. musseum bull. 13, 1. 1954.
14. *Klose I., Tirkova V.* Biol. plantarum. 5, 29, 1963.
14. *Moritz O.* Taxonomic biochemistri and serology. 15, 275, 289, 1964.
16. *Ouchterlony O.* Acta pathol. microbol. scand. 32, 232, 1953.