

УДК 582.632.938

А. А. ЧАРЧОГЛЯН, К. А. ГАБРИЕЛЯН, Н. Г. БАЛАБАДЖЯН, Н. П. МЕСРОПЯН

ИММУНОЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЛКОВ
СЕМЯН НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ПОДТРИБЫ
CENTAUREINAE O. HOFFMAN

Метод иммуноэлектрофореза был применен для анализа и сравнения белковых комплексов семян представителей родов *Centaurea* L., *Aetheorappus* Cass., *Chartolepis* Cass., *Stizolophus* Cass., *Amberboa* (Pers.) Less. Для идентификации антигенных спектров семян использовалась антисыворотка, полученная против белков семян вида *Centaurea polypodiifolia* Boiss.

Современная систематика высших растений, являясь наукой синтетической, использует методы различных дисциплин для решения своих задач. В последнее время для изучения структурно-функциональных свойств белков большое значение приобретает метод иммуноэлектрофореза, впервые разработанный Грабарем и Вильямсом [1].

Работами ряда авторов было показано, что методы серологического анализа вполне применимы в систематике высших растений [3, 6, 9, 10, 12].

Целью настоящего исследования явилось использование данных иммуноэлектрофореза водорастворимых белков для выяснения филогенетических взаимоотношений как между видами рода *Centaurea* L., так и между близкими к нему родами.

Материал и методика. Объектом наших исследований явились водорастворимые белки семян представителей родов *Centaurea* L., *Aetheorappus* Cass., *Chartolepis* Cass., *Stizolophus* Cass., *Amberboa* (Pers.) Less. Семена были собраны во время экспедиций по АрмССР в течение 1973—1974 гг., а также получены из семенных отделов различных ботанических садов. Гербарные экземпляры собранных нами видов под соответствующими номерами хранятся в гербарии БИН АН АрмССР.

Для сравнения и идентификации антигенных спектров исследуемых видов была получена кроличья антисыворотка к суммарным белкам водорастворимой фракции семян *C. polypodiifolia*. Иммунизацию кроликов проводили по представленной схеме (таблица) [3]. С целью получения антигенов для иммунизации семянок, освобожденные от оболочки, обезжиривали ацетоном и петролейным эфиром при температуре 4°C. Затем 100 мг обезжиренных, растертых семян экстрагировали в 1 мл 0,01 М натрий фосфатном буфере, рН 7,3 в течение 12 час. в холодных условиях. Экстракт, содержащий водорастворимые белки, отделяли центрифугированием при 15000 об/мин и температуре 4°C. Таким же способом готовили растворы антигенов для постановки реакции преципитации при иммуноэлектрофорезе.

Иммуноэлектрофорез проводили в агарозо-крахмальном геле следующего состава: агароза (фирмы Beugange, Франция)—90 мг, крахмал гидролизованный—300 мг, борат-фосфатный буфер, рН 7,5—12 мл. Полученную смесь кипятили в водяной бане 7 мин, после чего горячий гель разливали по 2,4 мл на стеклянные пластинки размером 5×5 см. В застывшем геле по шаблону вырезали продольные траншеи для наложения антисыворотки и стартовые лунки для антигенов. Электрофорез длился 65 мин при постоян-

ном токе силой 15 мА на каждую пластинку. В качестве электродного буфера применяли борат-фосфатный буфер (рН 7,5, NaOH—2,4 г, H_3BO_3 —26 г, K_2HPO_4 —2,04 г, H_2O —до 1 л). По окончании электрофореза траншеи заполняли антисывороткой. Диффузия протекала во влажной камере в течение 20—24 час. После получения зон слепифических преципитатов пластинки с гелем окрашивали в смеси из красителей кумасси и тиазинового красного (кумасси—250 мг, тиазиновый красный—400 мг, ледяная уксусная кислота—10 мл, H_2O дист.—до 300 мл). Обесцвечивание геля проводили путем тщательной отмывки его в 7% CH_3COOH .

Результаты и обсуждение. Данные иммуноэлектрофореза представлены на рис. 1. С целью облегчения анализа антигенных спектров изу-

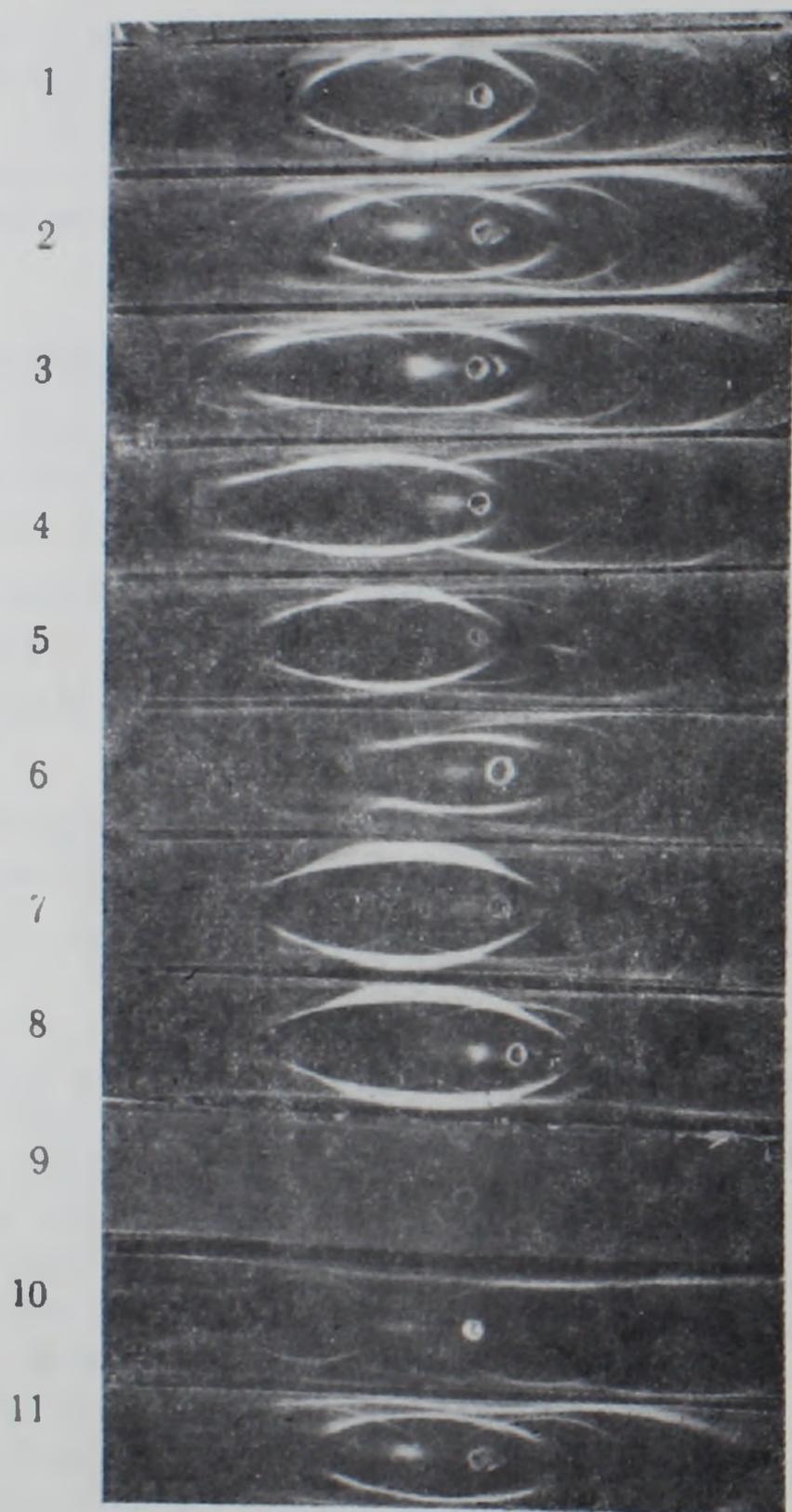


Рис. 1. Иммуноэлектрофореграммы белков семян некоторых представителей подтрибы *Centaureinae*. 1 — *Centaurea dealbata*. 2 — *C. scabiosa*. 3 — *polypodiifolia*. 4 — *C. kotschiana*. 5 — *C. ruthenica*. 6 — *C. karabaghensis*. 7 — *C. somchetica*. 8 — *Aetheopappus pulcherrimus*. 9 — *Amberboa moschata*. 10 — *Stizolophus balsamita*. 11 — *Chartolepis bleberstelati*.

чаемых видов идентичные преципитационные полосы в гомологичной и гетерологичных реакциях обозначены одной буквой (рис. 2). В гомологичной реакции преципитации при иммуноэлектрофорезе выявлено восемь преципитационных полос: a, b, c, d, e, f, q, l (рис. 1, 3). Антисы-

Таблица
 Схема иммунизации кроликов водорастворимыми белками семян
C. polyodiifolia с применением адъюванта Фрейнда

Инъекция	Способ иммунизации	Количество белка на 1 кролика, мг
1	внутримышечно с равным объемом полного адъюванта, интервал — 10 дней	10
2	внутривенно без адъюванта, интервал — 7 дней	5
3	подкожно без адъюванта, интервал — 3 дня	5
4	подкожно без адъюванта, интервал — 1 дня	3
5	подкожно без адъюванта, интервал — 30 дней	3
Второй цикл иммунизации		
1	внутривенно без адъюванта, интервал — 3 дня	3
2	внутривенно без адъюванта, интервал — 3 дня	3
3	внутривенно без адъюванта, интервал — 7 дней	3

Кровопускание

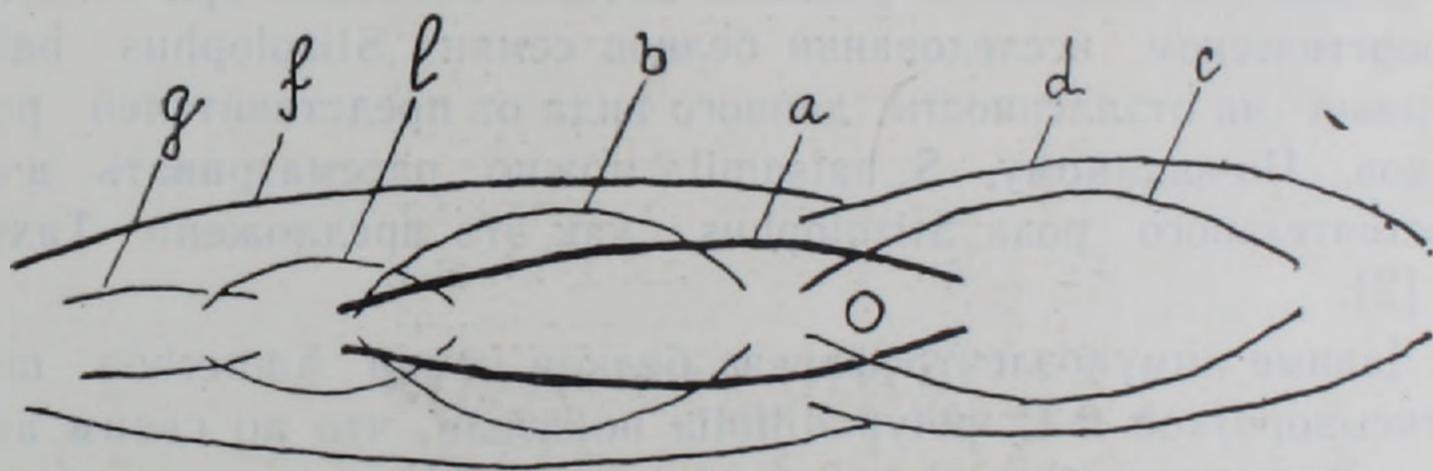


Рис. 2. Схема дуг иммуноэлектрофоретических реакций.

воротка к *C. polyodiifolia* с белковым комплексом семян *Centaurea dealbata* Willd. дала реакцию, в результате которой были обнаружены антигены a, b, c, d, e, g (рис. 1, 1). В реакции антиген-антитело при иммуноэлектрофорезе белков семян *Centaurea kotschiana* Neuff. обнаружены шесть полос преципитации: a, b, c, d, e, g (рис. 1, 4). Подобную реакцию с антисывороткой дают белки семян *Centaurea ruthenica* Lam., где также выявлены компоненты a, b, c, d, e, g. Однако следует отметить, что преципитационные полосы a, b, e выражены менее интенсивно, что, по-видимому, связано с меньшей концентрацией белковых компонентов в семенах вышеуказанного вида (рис. 1, 6). Иммуноэлектрофоретическое исследование белков семян видов *Aethorappus pulcherrimus* (Willd.) Cass. и *Chartolepis biebersteinii* Jueb. et Spach. выявило в них шесть антигенов: a, b, c, d, e, g (рис. 1, 38, 11). У этих видов компонент с остается на старте, в то время как в гомологичной реакции он сдвинут к катоду. С представителем под-

рода *Lopholoma* (Cass.) Dobroc, рода *Centaurea* *C. scabiosa* L. антисыворотка при иммуноэлектрофорезе дала шесть полос преципитации. В данном случае антиген b менее выражен (рис. 1, 2). Интересны в антигенном отношении белки семян *Stizolophus balsamita* (Lam.) Cass. et Takht., в которых, в отличие от представителей рода *Centaurea*, отсутствовал антиген a и обнаруживались слабовыраженные полосы b, c, d, g (рис. 1, 10). У белков семян *Amberboa moschata* (L.) DC. антисыворотка к *C. polyodiifolia* выявила следы преципитатов b, g (рис. 1, 3).

Результаты иммуноэлектрофоретического анализа белков семян позволили сделать предположение, что указанные виды рода *Centaurea* в серотаксономическом смысле стоят примерно на одном уровне относительно *Centaurea polyodiifolia* из подрода *Microlophus* (Cass.) Hayek. Несколько отдален вид *C. ruthenica* из подрода *Centaurea*. Тот факт, что антисыворотка к *C. polyodiifolia* выявила у белков семян видов *A. pulcherrimus* у *Ch. biebersteinii* такой же антигенный спектр, какой и у остальных представителей васильков, дает нам основание предположить, что названные виды стоят близко к роду *Centaurea*. Это подтверждает включение *A. pulcherrimus* и *Ch. biebersteinii* в род *Centaurea* L. [6, 7, 11].

Слабая интенсивность реакции антиген-антитело при иммуноэлектрофоретическом исследовании белков семян *Stizolophus balsamita* указывает на отдаленность данного вида от представителей рода васильков. По-видимому, *S. balsamita* можно рассматривать в объеме самостоятельного рода *Stizolophus*, как это предложено Тахтаджяном [2].

Данные иммуноэлектрофореза белков семян *Amberboa moschata* с антисывороткой к *C. polyodiifolia* показали, что по своим антигенным свойствам эти белки резко отличаются от антигенных спектров видов рода васильков. Этот факт отрицает мнение систематиков, включающих *A. moschata* в род *Centaurea* [5—7, 11].

Институт ботаники АН АрмССР

Поступило 25.XII 1975 г.

Ա. Ա. ՉԱՐՉՈՂՅԱՆ, Կ. Ա. ԳԱԲՐԻԵԼՅԱՆ, Ե. Զ. ԲԱՍՄԱԶՅԱՆ, Ե. Պ. ՄԵՍՐՈՊՅԱՆ

CENTAUREINAE O. HOFFMAN ԵՆԹԱՏՐԻԲԱՅԻ ՈՐՈՇ
ՆԵՐԿԱՅԱՑՈՒՑԻՉՆԵՐԻ ՍՊԻՏԱԿՈՒՑՆԵՐԻ ԻՄՈՒՆՈԷԼԵԿՏՐՈՖՈՐԵՏԻԿ
ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Իմունոէլեկտրաֆորեզի մեթոդը կիրառվել է *Centaurea*, *Chartolepis*, *Aetheorappus*, *Amberboa*, *Stizolophus* ցեղերի ներկայացուցիչների սերմիկների սպիտակուցային կոմպլեքսների անալիզի և համեմատման համար:

Վեր նշված ցեղերի սերմիկների անտիգենային սպեկտրների իզենտիֆիկացման համար օգտագործվել է *Centaurea polipodiifolia* սերմիկների սպեկտրներից ստացված հակասիճուկը:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Грабарь П., Буртен П. Иммуноэлектрофоретический анализ, М., 1963.
2. Тахтаджян А. Л. Флора Еревана, 329, 1945.
3. Чупов В. С. Бот. журн., 58, 2, 189--198, 1973.
4. Шмальгаузен. Флора Юго-Запада России, 328, 1886.
5. Шмальгаузен. Флора 2, 120, 1897.
7. De Candolle A. Prodröm., 6, 568, 574, 1837.
7. Hoffman O. Pflanzenfam., 4, 5, 330, 1893.
8. Kloz J., Klozova E., Turkova V. Biolog. plantar., 8, 3, 187--196, 1966.
9. Pickering J. L., Fairbrothers D. E. Amer. J. Bot. 57, 8, 988--992, 1970.
10. Vaughan J. G. Science progr. 56, 22, 205--222, 1968.
11. Willdenow. Sp. pl. 111, 3, 1803.
12. Ziegenfus T., Clarkson R. Can. J. Bot. 49, 11, 1951--1957, 1971.