

С.Н. Привалихин

НАСЛЕДОВАНИЕ ИЗОФЕРМЕНТОВ ЧЕТЫРЕХ ДЕГИДРОГЕНАЗ У ЕЛИ ЕВРОПЕЙСКОЙ (*PICEA ABIES* (L.) KARST)

Picea abies (L.) Karst, Украинские Карпаты, изоферменты дегидрогеназ, генетический контроль

Методы биохимической генетики все чаще используются для популяционно-генетических исследований растений [1, 2, 8, 12, 13]. Наибольшее распространение получил метод электрофоретического анализа изоферментов – молекулярных маркеров генотипа. Однако, прежде чем использовать изоферменты в популяционных исследованиях необходимо выяснить особенности их генетического контроля у изучаемого вида. Проанализировать тип наследования изоферментов у хвойных несложно, благодаря особенностям их половой репродукции. У представителей семейства *Pinaceae* Lindl. яйцеклетка и клетки, формирующие гаплоидную ткань эндосперма, имеют общее происхождение от одной мегаспоры. По этой причине изоферментный спектр эндоспермов соответствует тому, что имеется у материнского растения. У деревьев гетерозиготных по какому-либо ферментному локусу в гаплоидных эндоспермах выявляются продукты экспрессии сразу двух аллелей этого локуса, которые в соответствии с менделевскими закономерностями при моногенном типе наследования, в урожае их семян должны сегрегировать в соотношении 1:1. Следовательно, электрофоретический анализ водных экстрактов ткани эндоспермов позволяет изучать гаплотипы материнских гамет и по сегрегации аллельных вариантов устанавливать генотип дерева, а также сцепление изучаемых локусов без проведения специальных скрещиваний [1, 9, 12, 13]. Выяснив тип наследования изоферментов, можно проводить широкомасштабные исследования генетической изменчивости вида в пределах его ареала, определять особенности генетической структуры популяций, их подразделенность и эколого-географическую дифференциацию. Ель европейская (*Picea abies* (L.) Karst) – основная лесообразующая порода Украинских Карпат ранее уже была фрагментарно изучена на основе анализа аллозимной изменчивости [4, 5]. Более полные сведения о популяционно-генетической организации ели европейской в пределах естественного ареала Украинских Карпат необходимы для разработки селекционных программ и практических рекомендаций по сохранению ценного генофонда этого вида, создания научно обоснованных подходов к рациональной эксплуатации насаждений ели, что очень важно, особенно, в условиях интенсивного лесопользования.

Цель данной работы – установить при помощи изоферментного анализа генетический контроль 4 ферментных систем *Pabies* для дальнейшего их использования в популяционно-генетических исследованиях этого вида в Украинских Карпатах.

Материалом для исследований послужили семена, собранные в августе-сентябре 2002 г. с 80 деревьев ели европейской 80-120 летнего возраста, произрастающих в двух природных популяциях Ивано-Франковской области. До анализа семена хранились при температуре 4°C. Для электрофореза использовали экстракты эндоспермов (мегагаметофитов) семян, методика приготовления которых позаимствована из работ Я.В. Пирко, И.И. Коршикова [12, 13].

Электрофоретическое разделение ферментов проводили в вертикальных пластинках 7,5%-ного полиакриламидного геля с рН разделяющего геля – 8,9 и трис-глициновым электродным буфером с рН 8,3 [11]. Гистохимическое выявление зон ферментативной активности в гелях осуществляли по общепринятым методикам с небольшими модификациями [3, 6]. Для

Таблица. Сегрегация аллельных вариантов в эндоспермах гетерозиготных деревьев ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.) в Украинских Карпатах

Генотип дерева	Количество изученных деревьев	Соотношение аллелей	χ^2 -тест
Gdh ^{1,00/0,88}	4	20:10	3,33
Mdh-3 ^{1,00/1,07}	14	94:57	9,07**
Mdh-4 ^{1,00/0,80}	1	4:3	0,14
Mdh-4 ^{1,00/1,17}	20	107:62	11,98***
Adh-1 ^{1,00/0,96}	5	18:20	0,10
Adh-1 ^{1,00/1,05}	6	23:24	0,02
Adh-2 ^{1,00/0,92}	3	9:15	1,5
Fdh ^{1,00/1,06}	3	22:17	0,64
Fdh ^{1,00/null}	1	10:5	1,66
Fdh ^{1,00/0,76}	1	9:8	0,06

Примечание: достоверное нарушение сегрегации аллелей - **при P<0,01, *** - P< 0,001

обозначения ферментов, локусов, аллелей использовали систему С. Пракаша [17]. С целью установления генотипа дерева анализировали не менее семи семян.

В ходе проведенных исследований у ели европейской четырех дегидрогеназ выявлено 17 аллельных вариантов. Их схематическое изображение представлено на рисунке.

Глутаматдегидрогеназа (GDH, К.Ф. 1.4.1.2). При гистохимическом окрашивании проявляется в виде двух зон активности, кодируемых одним локусом. Быстро мигрирующая зона окрашивается очень слабо, нестабильно и в дальнейшем не анализировалась. Медленно мигрирующая зона выглядит в виде тонкой, хорошо окрашиваемой полосы. Локус Gdh представлен двумя аллелями Gdh^{1,00} и Gdh^{0,88} (табл., см. рис.). Две зоны активности фермента в эндоспермах семян выявлены Ю.П.Алтуховым с соавт. (1986) в популяции *P. abies* в Костромской обл. [1]. К. Лундквист (1979) у ели европейской наблюдал один локус Gdh, о чем упоминается в работе У. Лагеркрантц и др. [16]. Одна зона активности, кодируемая одним локусом, обнаружена в эндоспермах у ели сибирской (*Picea obovata* Ledeb.) [10], а также у других видов хвойных [2, 8, 15].

Малатдегидрогеназа (MDH, К.Ф. 1.1.1.37). На электрофоретической пластинке отмечено много зон активности фермента, которые в целом контролируются четырьмя локусами: Mdh-1, Mdh-2, Mdh-3, Mdh-4. Идентифицировать все локусы оказалось достаточно сложно, поэтому для анализа использовали только три, Mdh-2, Mdh-3 и Mdh-4, проявляющиеся на электрофореграммах наиболее четко. Локус Mdh-2 был мономорфным, Mdh-3 представлен двумя аллелями: Mdh-3^{1,07}, Mdh-3^{1,00}, а Mdh-4 - тремя аллелями: Mdh-4^{1,00}, Mdh-4^{1,16}, Mdh-4^{0,80*} (здесь и далее редкие аллели обозначены знаком *). У *Pinus rigida* Mill. Гуриес и Ледиг (1978) были обнаружены две зоны активности этого фермента [14].

По данным А.Я. Ларионовой [10], у видов рода *Picea*, как правило, идентифицируется три, а у видов родов *Pinus*, *Larix*, *Pseudotsuga* - четыре локуса, кодирующие малатдегидрогеназу. Три локуса - Mdh-A, Mdh-B и Mdh-C - отмечены у *Abies alba* Mill. при исследовании насаждений в Германии и Швейцарии [15], при этом для анализа использовали только два из них - Mdh-A

и Mdh-C. У многих видов хвойных при анализе экстрактов эндоспермов семян продукты локусов Mdh-2 и Mdh-3 на электрофореграммах образуют гибридный гетеродимер, формируя трехполосный спектр, напоминающий гетерозиготный генотип димерного фермента [10].

Алкогольдегидрогеназа (ADH, К.Ф. 1.1.1.1). На гелевых пластинках фермент проявлялся в виде двух зон активности, которые контролируются двумя локусами Adh-1 и Adh-2. Локус Adh-1 был представлен тремя аллелями: Adh-1^{1.05}, Adh-1^{1.00} и Adh-1^{0.96}; а Adh-2 – двумя аллелями: Adh-2^{1.00}, Adh-2^{0.92}. Необходимо отметить, что Г.Г. Гончаренко и В.В. Потенко (1991), анализируя генетическую изменчивость и дифференциацию популяций видов ели сибирской и европейской, идентифицировали у них только один локус этого фермента при использовании для этих целей электрофорез в крахмальном геле [5]. Две зоны активности алкогольдегидрогеназы, контролируемые двумя различными локусами, описаны и у других видов хвойных [2, 8, 10, 12, 13].

Формиатдегидрогеназа (FDH, К.Ф. 1.2.1.2). При окрашивании на гелевых пластинках наблюдали одну зону активности фермента, кодируемую локусом Fdh. В изучаемых популяциях *P. abies* обнаружено четыре аллельных варианта Fdh^{null*}, Fdh^{1.00}, Fdh^{1.06*}, Fdh^{0.76*}. У других видов хвойных FDH проявляется в виде одной зоны активности [2, 8, 12, 13].

Проведенный анализ сегрегации обнаруженных аллельных вариантов у гетерозиготных деревьев в целом подтверждает их моногенный тип наследования. Нарушение сегрегации аллелей было выявлено в локусах Mdh-3 и Mdh-4. Полученные нами данные еще раз свидетельствуют о том, что нарушение сегрегации аллелей регулярно наблюдается при анализе наследования изоферментов у хвойных. У представителей семейства *Pinaceae* на территории Украины доля случаев нарушения сегрегации аллелей среди изученных гетерозиготных генотипов составила: у *Pinus cembra* L. – 0% [13], *Pinus mugo* Turra – 14% [12], *Pinus sylvestris* L. – 20% [7]. Как правило, это может быть вызвано нарушением мейоза во время гаметогенеза, хромосомными перестройками, естественным отбором и другими факторами [2], однако обсуждение этого явления выходит за рамки данной работы.

В результате проведенных исследований изучен генетический контроль четырех дегидрогеназ ели европейской. Четкое электрофоретическое разделение получено для белковых продуктов 7 генных локусов изучаемых ферментных систем. Из изученной совокупности локусов, Mdh-2 в исследованных популяциях *P. abies* оказался мономорфным. Обнаруженные редкие аллели встречались только у гетерозиготных генотипов. Анализ сегрегационных аллелей у гетерозиготных растений в целом подтвердил их моногенную природу наследования, поэтому выявленные аллозимные варианты можно использовать для изучения генетической структуры, уровня дифференциации и подразделенности популяций ели европейской в Украинских Карпатах.

1. Алтухов Ю.П., Крутовский К.В., Гафаров Н.И. и др. Аллозимный полиморфизм в природной популяции ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst). Сообщение 1. Системы полиморфизма и механизмы их генного контроля // Генетика. – 1986. – 22, № 8 – С. 2135–2151.
2. Белоконь Ю.С., Политов Д.В., Белоконь М.М., Крутовский К.В. // Генетический контроль изоферментов сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) из Зауралья // Генетика. – 1995. – 31, № 11. – С. 1521–1528.
3. Гончаренко Г.Г., Падутов В.Е., Потенко В.В. Руководство по исследованию древесных видов методом электрофоретического анализа изоферментов. – Гомель: Б.и., 1989. – 164 с.
4. Гончаренко Г.Г., Потенко В.В. Изменчивость и дифференциация у ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst) в популяциях Украины, Белоруссии и Латвии // Докл. АН СССР. – 1990. – 314, № 2 – С. 492–496.
5. Гончаренко Г.Г., Потенко В.В. Параметры генетической изменчивости и дифференциации в популяциях ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.) и ели сибирской (*Picea obovata* Ledeb.) // Генетика. – 1991. – 27, № 10. – С. 1759 – 1772.
6. Корочкин Л. И., Серов О. Л., Пудовкин А. И. и др. Генетика изоферментов – М: Наука, 1977. – 275 с.
7. Коршиков И. И. Адаптация растений к условиям техногенно загрязненной среды. – К.: Наук. думка, 1996. – 272 с.

8. Коршиков И.И., Морозова Н.Н., Пирко Я.В. Генетический контроль изоферментов пихты белой (*Abies alba* Mill.) Украинских Карпат // Цитология и генетика. - 2003. - 37, № 3. - С. 36-40.
9. Крутовский К.В., Политов Д.В., Алтухов Ю.П. Генетическая изменчивость сибирской кедровой сосны (*Pinus sibirica* Du Tour.) Сообщение I. Механизмы генного контроля изоферментных систем // Генетика. - 1987 - 23, № 12. - С. 2216-2228.
10. Ларионова А.Я. Наследование аллозимных вариантов у ели сибирской (*Picea obovata* Ledeb.) // Генетика. - 1995. - 31, № 9. - С. 1261-1267.
11. Маурер Г. Диск - электрофорез. - М: Мир, 1971. - 247 с.
12. Пирко Я.В. Генетичне різноманіття ізоферментів сосни гірської (*Pinus mugo* Turra) в природних популяціях Українських Карпат // Цитология и генетика. - 2000. - 34, № 5. - С. 55-60.
13. Пирко Я.В., Коршиков И. И. Генетический контроль изоферментов сосны кедровой европейской (*Pinus cembra* L.) Украинских Карпат // Цитология и генетика. - 2001. - 35, № 4. - С. 33-37.
14. Guries R.P., Ledig F.T. Inheritance of some polymorphic isoenzymes in pitch pine (*Pinus rigida* Mill.) // Heredity. - 1978. - 40, № 1. - P. 27-32.
15. Hussendurfer Erwin, Konnerth Monica, Bergmann Fritz. Inheritance and linkage of isozyme variants of silver fir (*Abies alba* Mill.) // Forest Genetics. - 1995. - 2, №1. - P. 29-40.
16. Lagercrantz U., Ryman N., Stöhl G. Protein loci in diploid tissue of Norway spruce (*Picea abies* K.): description and interpretation of electrophoretic variability patterns // Hereditas. - 1988. - 108. - P. 149-158.
17. Prakash S., Lewontin R. C., Hubby J. L. A molecular approach to the study of genic variation in central, marginal and isolated populations of *Drosophila pseudoobscura* // Genetics. - 1969. - 61. - P. 841-858.

Донецкий ботанический сад НАН Украины

Получено 09.04.2004

УДК 581.169:577.158:582.475.2

НАСЛЕДОВАНИЕ ИЗОФЕРМЕНТОВ ЧЕТЫРЕХ ДЕГИДРОГЕНАЗ У ЕЛИ ЕВРОПЕЙСКОЙ (*PICEA ABIES* (L.) KARST)

С.Н. Привалихин

Донецкий ботанический сад Национальной Академии Наук Украины

Изучен генетический контроль ферментов глутаматдегидрогеназы (GDH), малатдегидрогеназы (MDH), формиатдегидрогеназы (FDH), алкогольдегидрогеназы (ADH) у ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.) из 2 природных популяций Украинских Карпат. Чёткое электрофоретическое разделение получено для продуктов 7 локусов. Анализ сегрегации аллелей гетерозиготных деревьев подтверждает моногенное наследование обнаруженных аллельных вариантов.

UDK 581.169:577.158:582.475.2

INHERITANCE OF ISOENZYMES OF FOUR DEHYDROGENASES IN NORWAY SPRUCE (*PICEA ABIES* (L.) KARST)

S.N. Privalikhin

Donetsk Botanical Gardens of the National Academy of Sciences of Ukraine

Genetic control of enzymes of glutamatedehydrogenase (GDH), malate dehydrogenase (MDH), formiatdehydrogenase (FDH), alcoholdehydrogenase (ADH) has been studied in Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst) from 2 natural populations of Ukrainian Carpathians. Distinct electrophoretic separation has been obtained for products of 7 loci. The analysis of allele segregation of heterozygous trees confirms monogenic inheritance of the allele variants revealed.