

Е.В.Чемерис

## ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ИЗОФЕРМЕНТОВ СОСНЫ ЧЕРНОЙ АВСТРИЙСКОЙ (*PINUS NIGRA* ARN.) ИЗ ИНТРОДУКЦИОННОГО НАСАЖДЕНИЯ

*Pinus nigra* Arn., интродукция, изоферменты, сегрегация аллелей

Успешность интродукции зависит не только от степени соответствия экологических и фитоценологических особенностей интродуцируемого вида к новым природно-климатическим условиям, но и от репрезентативности исходной выборки растений, т.е. от полноты представленных генотипов, а также от того, насколько основные параметры генетического разнообразия искусственного насаждения будут близки к таковым природных популяций [14]. Особую опасность потери генетического разнообразия вида таят в себе пионерные малочисленные интродукционные насаждения, параметры генетической изменчивости которых до последнего времени не оценивались. При последующем семенном размножении это может привести к развитию инбредной депрессии. Для изучения генетических аспектов интродукции растений активно привлекаются методы популяционной генетики, позволяющие с определенной точностью и за короткий промежуток времени получать информацию о генетическом разнообразии и структуре исходных популяций и интродукционных насаждений [9].

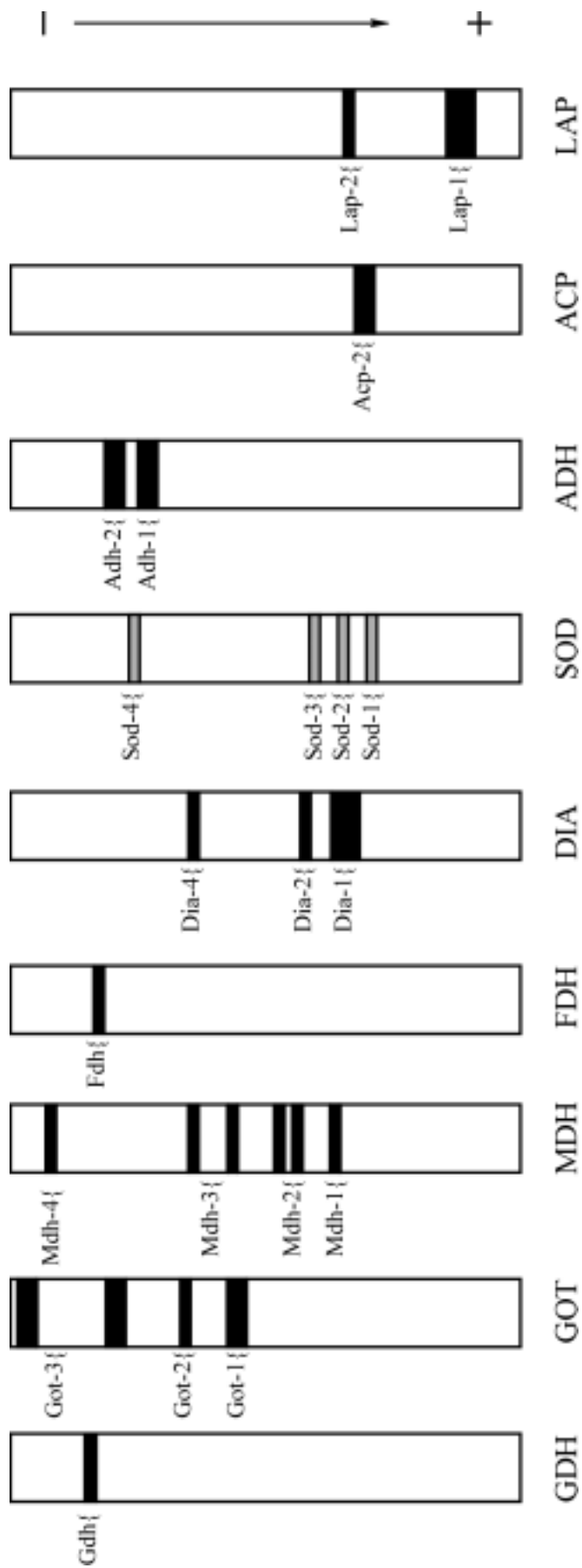
С этих позиций наиболее изученной является сосна крымская (*Pinus pallasiana* D. Don), которая часто используется для озеленения промышленных городов [12]. Параметры генетической изменчивости в насаждениях близкородственного ей вида – сосны черной австрийской (*Pinus nigra* Arn.), являющейся перспективным видом для размножения в степной зоне Украины, до настоящего времени не исследовались [13].

Для изучения генетической структуры природных популяций и искусственных насаждений различных видов в качестве биохимических маркеров наиболее часто используют изоферменты. Первый этап применения изоферментов в таком анализе предусматривает установление их генетического контроля [1].

В связи с этим, целью работы было установление генетического контроля 9 ген-ферментных систем сосны черной австрийской, проходящей длительное интродукционное испытание в дендрарии Донецкого ботанического сада НАН Украины (ДБС).

Материалом для исследований служили семена *P. nigra*, собранные с 30 деревьев. Электрофорез ферментов проводили в пластинках 7,5% полиакриламидного геля (рН=8,9) триглициновым электродным буфером (рН=8,3). Для установления генотипа дерева по каждому аллозимному локусу анализировали 6–8 эндоспермов семян. Гистохимическое окрашивание зон ферментативной активности глутаматдегидрогеназы (GDH, К.Ф. 1.4.1.2.), глутаматоксалоацетаттрансаминазы (GOT, К.Ф. 2.6.1.1.), диафоразы (DIA, К.Ф. 1.6.4.3.), малатдегидрогеназы (MDH, К.Ф. 1.1.1.37.), супероксиддисмутазы (SOD, К.Ф. 1.15.1.1), форматдегидрогеназы (FDH, К.Ф. 1.2.1.2.), алкогольдегидрогеназы (ADH, К.Ф. 1.1.1.1), кислой фосфатазы (ACP, К.Ф. 3.4.11.1.), лейцинаминопептидазы (LAP, К.Ф. 3.4.11.1) проводили по общепринятым методикам [6, 7]. Ферменты, локусы и аллели обозначали согласно номенклатуре S. Prakash et al. [23].

В ходе проведенного анализа 9 ген-ферментных систем сосны черной австрийской выявлено 42 аллозимных варианта и 54 генотипа. Схематическое изображение наиболее часто встречающихся аллелей *P. nigra* приведено на рисунке.



**Рисунок.** Электрофоретические спектры девяти ферментных систем наиболее часто встречающихся аллелей *Pinus nigra* Агр.

Таблица. Сегрегация аллозимов в мегагаметофитах гетерозиготных деревьев *Pinus nigra* Arn.

Генотип	Количество деревьев	Соотношение аллелей	$\chi^2$
Gdh <sup>1.00/1.12</sup>	1	3:3	0.00
Got-2 <sup>1.00/1.12</sup>	14	47:53	0.36
Got-3 <sup>1.00/1.50</sup>	7	28:23	0.49
Mdh-3 <sup>0.86/1.00</sup>	10	31:46	2.92
Mdh-4 <sup>1.00/1.20</sup>	7	26:28	0.07
Mdh-4 <sup>0.90/1.00</sup>	3	12:9	0.43
Adh-1 <sup>0.00/1.00</sup>	1	2:6	2.00
Adh-1 <sup>1.00/1.05</sup>	4	15:9	1.50
Dia-1 <sup>1.00/1.15</sup>	15	47:61	1.81
Dia-1 <sup>0.90/1.00</sup>	1	5:3	0.50
Dia-1 <sup>0.90/1.15</sup>	1	3:5	0.50
Dia-2 <sup>1.00/1.10</sup>	4	18:12	1.20
Dia-2 <sup>0.90/1.00</sup>	2	8:5	0.69
Dia-4 <sup>1.00/1.10</sup>	11	44:28	3.56
Dia-4 <sup>0.90/1.10</sup>	2	4:12	4.0*
Dia-4 <sup>0.90/1.00</sup>	1	4:3	0.14
Lap-1 <sup>1.00/1.05</sup>	5	18:10	2.29
Lap-2 <sup>1.00/1.05</sup>	1	3:3	0.00
Acp-2 <sup>1.00/1.02</sup>	7	32:28	0.27
Acp-2 <sup>0.97/1.00</sup>	2	5:11	2.25
Acp-2 <sup>0.00/1.00</sup>	1	6:2	2.00
Sod-4 <sup>1.00/1.08</sup>	2	5:6	1.67
Sod-4 <sup>0.00/1.00</sup>	1	1:5	2.67

**Глутаматдегидрогеназа.** При гистохимическом окрашивании на гелевых пластинках проявляется одна зона активности, контролируемая одним локусом – Gdh, что характерно для многих представителей рода *Pinus* L., таких как, *P. pallasiana* [12], *P. sylvestris* L. [11], *P. banksiana* Lamb. [21], *P. contorta* Dougl. [22], *P. taeda* L. [19]. Этот локус у сосны черной австрийской представлен двумя аллелями – Gdh<sup>1.00</sup> и Gdh<sup>1.12</sup>, причем аллель 1.12 был редким и встречался с низкой частотой – 0,017.

**Глутаматоксалоацетаттрансаминаза.** Изоферментный спектр GOT представлен на гелевых пластинках четырьмя зонами активности, контролируемых тремя локусами – Got-1, Got-2 и Got-3. Наиболее быстро мигрирующая зона активности, контролируемая локусом Got-1 оказалась мономорфной, представлена единственным аллелем Got-1<sup>1.00</sup>. Локусы Got-2, Got-3 имели равное количество аллелей – два – Got-2<sup>1.00</sup>, Got-2<sup>1.12</sup> и Got-3<sup>1.00</sup>, Got-3<sup>1.50</sup>. Необходимо отметить, что такое же количество локусов было обнаружено и у таких видов, как *P. mugo* Turra. [15], *P. sylvestris* [11, 8, 17], а также у близкого к *P. nigra* вида – *P. pallasiana* [16].

**Диафораза.** На электрофоретической пластинке отмечено четыре зоны активности, которые контролируются четырьмя локусами – Dia-1, Dia-2, Dia-3 и Dia-4. До четырех зон активности наблюдалось и у *P. pallasiana* [12], *P. mugo* [15], *P. sylvestris* [8]. Зона активности фермента, кодируемая локусом Dia-3, при гистохимическом окрашивании проявлялась нестабильно, поэтому в дальнейшем не анализировалась. В остальных локусах выявлено по три аллеля: в локусе Dia-1 – Dia-1<sup>0.90</sup>, Dia-1<sup>1.00</sup>, Dia-1<sup>1.15</sup>, в локусе Dia-2 – Dia-2<sup>0.90</sup>, Dia-2<sup>1.00</sup>, Dia-2<sup>1.10</sup> и в локусе Dia-4 – Dia-4<sup>0.90</sup>, Dia-4<sup>1.00</sup> и Dia-4<sup>1.10</sup>. Интересно отметить, что такие же аллельные варианты были зафиксированы у *P. mugo* в природных популяциях Украинских Карпат [15].

**Малатдегидрогеназа.** При гистохимическом окрашивании отмечено много зон активности этого фермента, которые кодируются четырьмя локусами – Mdh-1, Mdh-2, Mdh-3 и Mdh-4, из которых два Mdh-1 и Mdh-2 были мономорфными. В локусе Mdh-3 выявлено два аллеля – Mdh-3<sup>0.86</sup>, Mdh-3<sup>1.00</sup>, а в Mdh-4 – три – Mdh-4<sup>0.90</sup>, Mdh-4<sup>1.00</sup>, Mdh-4<sup>1.20</sup>. У сосны черной, как и у *P. sylvestris* [3, 8], *P. mugo* [15], *P. pallasiana* [16] между локусами Mdh-2 и Mdh-3 проявляется межлокусный гетеродимер.

**Супероксиддисмутаза.** На гелевых пластинках представлена четырьмя зонами активности, которые кодируются четырьмя локусами – Sod-1, Sod-2, Sod-3 и Sod-4. Такое же количество локусов выявлено и у *P. nigra*, произрастающей в дендрарии Никитского ботанического сада [18]. До четырех зон активности обнаружено также у *P. sylvestris* [8, 11], *P. mugo* [15, 18], *P. pallasiana* [18]. У сосны черной австрийской все локусы, кроме Sod-4 оказались инвариантными и были представлены одним аллелем – 1.00. Локус Sod-4 был представлен тремя аллелями – Sod-4<sup>0.00</sup>, Sod-4<sup>1.00</sup> и Sod-4<sup>1.08</sup>. Полиморфизм по данному локусу ранее отмечен у *P. sylvestris* [11] и у *P. pallasiana* [12]. В то же время А.В. Шурхал и др. [18] отметили мономорфное состояние всех четырех локусов SOD у *P. nigra* в дендрарии Никитского ботанического сада.

**Формиатдегидрогеназа.** Данный фермент проявляется у *P. nigra* в виде одной зоны активности, кодируемой локусом Fdh-1, который был представлен единственным аллелем – Fdh-1<sup>1.00</sup>. Одна зона, кодируемая единственным локусом, обнаружена и у *P. sylvestris*, *P. pallasiana*, *P. mugo* [10, 15].

**Алкогольдегидрогеназа.** Локализуется на геле в виде двух зон активности, контролируемых двумя локусами. Локус Adh-1 был полиморфным, представленным тремя аллелями – Adh-1<sup>0.00</sup>, Adh-1<sup>1.00</sup> и Adh-1<sup>1.05</sup>, в то время как локус Adh-2 – мономорфным. Две зоны активности этого фермента обнаружены также и у других видов рода *Pinus*, таких как *P. sylvestris* [4, 8], *P. pallasiana* [12].

**Кислая фосфатаза.** У сосны черной австрийской, как и у многих других видов хвойных, проявляется 4–5 зон активности, но для анализа использовали только одну, которая проявлялась очень четко. Эта зона активности контролируется локусом *Asp-2* и представлена тремя аллелями – *Asp-2*<sup>0.00</sup>, *Asp-2*<sup>0.97</sup> и *Asp-2*<sup>1.00</sup>. Один четко дифференцированный локус кислой фосфатазы выявлен также у *P. sylvestris* [17] и *P. pallasiana* [12].

**Лейцинаминопептидаза.** При окрашивании гелевых пластинок проявлялось две зоны активности фермента, которые контролируются локусами *Lap-1* и *Lap-2*. Данные локусы были представлены аллелями: *Lap-1*<sup>1.00</sup>, *Lap-1*<sup>1.05</sup> и *Lap-2*<sup>1.00</sup>, *Lap-2*<sup>1.05</sup>. Два локуса, кодирующие синтез LAP, обнаружены и у других видов семейства *Pinaceae* Lindl. [5, 12, 17].

В результате проведенных исследований изучено 9 ферментных систем, кодируемых 21 генным локусом, восемь из которых (*Sod-1*, *Sod-2*, *Sod-3*, *Got-1*, *Mdh-1*, *Mdh-2*, *Fdh* и *Adh-2*) были мономорфными. Анализ сегрегации аллелей гетерозиготных деревьев подтверждает тот факт, что выявленные варианты наследуются как моногенные признаки (табл.). Только в локусе *Dia-4* обнаружено достоверное отличие от ожидаемого соотношения аллелей 1 : 1. Более высокая частота нарушений сегрегации аллелей ранее зафиксирована и у других видов хвойных [2, 8, 20], что связано с мейотическими нарушениями, гаметическим дрейфом, эмбриональным или гаметическим отбором [2]. Выявленные аллозимные варианты можно использовать как генные маркеры при изучении генетической структуры искусственных насаждений и природных популяций *P. nigra* с целью познания приспособительных микроэволюционных изменений данного вида в новых условиях среды, а также при выяснении филогенетических связей с другими видами рода *Pinus* L.

1. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. – 2-е изд. – М.: Наука, 1989. – 328 с.
2. Алтухов Ю.П., Крутовский К.В., Гафаров Н.И., Духарев В.А., Морозов Г.П. 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. 2135–2154.
3. 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.
4. Гончаренко Г.Г., Силин А.Е., Падутов В.Е. Исследование генетической структуры и уровня дифференциации у *Pinus sylvestris* L. в центральных и краевых популяциях Восточной Европы и Сибири // Генетика. – 1993. – 29, № 12. – С. 2019–2038.
5. Гончаренко Г.Г., Падутов В.Е., Силин А.Е., Чернодубов А.Н., Исаков Ю.Н., Камалова И.И. Генетическая структура популяций сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) и сосны меловой (*Pinus cretacea* Kalen.) и их таксономические взаимоотношения // Докл. АН СССР. – 1991. – 319, № 5. – С. 1230–1234.
6. Гончаренко Г.Г., Падутов В.Е., Потенко В.В. Руководство по исследованию хвойных видов методом электрофоретического анализа изоферментов. – Гомель: Б. и., 1989. – 162 с.
7. Корочкин Л.И., Серов О.Л., Пудовкин А.И. и др. Генетика изоферментов. – М.: Наука, 1977. – 275 с.
8. Коршиков И.И. Адаптация растений к техногенно загрязненной среде. – К.: Наук. думка, 1996. – 238 с.
9. Коршиков И.И., Бычков С.А., Терлыга Н.С. К проблеме генетического представительства вида при интродукции // Доп. НАН України. – 2001. – № 10 – С. 162–165.
10. Коршиков И.И., Великоридько Т.И., Терлыга Н.С., Бычков С.А., Пирко Я.В., Калафат Л.А., Скидан Е.М., Тунда С.Н., Чемерис Е.В., Фоменко Г.Е. Генетический полиморфизм формиадегидрогеназы у пяти представителей рода *Pinus* L. // Вісн. Дніпропетровського ун-ту. Біологія. Екологія. – 2000. – Вип. 8. – с. 44–49.
11. Коршиков И.И., Духарев В.А., Котова А.А., Рябоконь С.М., Михеенко И.П. Аллозимный полиморфизм локусов GOT, GDH и SOD у сосны обыкновенной в условиях техногенно загрязненной среды // Цитология и генетика. – 1991. – 25, № 6. – С. 60–64.
12. Коршиков И.И., Терлыга Н.С. Генетическая изменчивость сосны крымской в природных популяциях Крыма и искусственных насаждениях Кривбасса // Цитология и генетика. – 2000. – 34, № 6. – С. 21–29.
13. Коршиков И.И., Терлыга Н.С., Бычков С.А. Генетическая изменчивость сосны крымской (*Pinus pallasiana* D.Don) вдоль высотного профиля в Горном Крыму // Допов. НАН України. – 2000. – № 2. – С. 157–161.
14. Некрасов В.И. Естественный и искусственный отбор в интродукции древесных растений // Лесоведение. – 1991. – № 1. – С. 63–66.
15. 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.

16. Терлыга Н.С. Адаптивная изменчивость сосны крымской (*Pinus pallasiana* D. Don) в насаждениях Кривбасса: Автореф. дис.... канд. биол. наук. – Киев, 1999. – 19 с.
17. Шигапов Э.Х., Бахтиярова Р.М., Янбаев Ю.А. Генетическая изменчивость и дифференциация природных популяций сосны обыкновенной (*Pinus silvestris* L.) // Генетика. – 1995. – 31, № 10. – С. 1386–1393.
18. Шурхал А.В., Подогаз А.В., Животовский Л.А. Филогенетический анализ рода *Pinus* по аллозимным локусам, генетическая дифференциация подродов // Генетика. – 1991. – 27, № 5. – С. 1193–1205.
19. Adams W.T., Joly R.J. Genetics of allozyme variants in lobboly pine // Heredity. – 1980. – 71, № 1. – P. 33.
20. Cheliak W., Morgan K. Dancik B. et al. Segregation of allozymes in megagametophytes of viable seeds from a natural population of jack pine, *Pinus banksiana* Lamb. // Theor. Appl. Genet. – 1984. – 69, № 2. – P. 145–151.
21. Dancik B.P., Yeh F.C.-H. Allozyme variability and evolution of logepole pine (*Pinus contorta* var. *latifolia*) and jack pine (*Pinus banksiana*) in Alberta // Canad. J. Genet. Cytol. – 1983. – 25, № 1. – P. 57–60.
22. Guries R.P., Ledig F.T. Genetic diversity and population structure in pitch pine (*Pinus rigida* Mill) // Evolution. – 1982. – 36, № 2. – P. 387–394.
23. Prakash S., Lewontin R.C., Hubby T.L. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. 4. Patterns of genic variation in central, marginal and isolated populations of *Drosophila pseudoobscura* // Genetics (US). – 1969. – V. 61. – P. 841–858.

ДБС НАН Украины

Получено 05.02.2002

УДК 575.113:634.948:582.475 (477.60)

Генетический контроль изоферментов сосны черной австрийской (*Pinus nigra* Arn.) из интродукционного насаждения / Чемерис Е.В. // Промышленная ботаника. – 2002. – Вып. 2. – С. 162–167.

Изучен генетический контроль 9-ти ферментных систем у 30 деревьев *Pinus nigra* Arn. из интродукционного насаждения Донецкого ботанического сада НАН Украины при помощи электрофоретического разделения изоферментов в вертикальных гелевых пластинках полиакриламидного геля. Приведено подробное описание электрофоретических спектров GOT, GDH, MDH, DIA, SOD, ADH, FDH, ACP и LAP, кодируемых 21 локусом. Исследование сегрегации аллелей подтверждает моногенное наследование обнаруженных аллозимных вариантов.

Табл. 1. Рис. 1. Библиогр.: 23

UDC 575.113:634.948:582.475 (477.60)

Genetic control of isozymes of *Pinus nigra* Arn. from an introduction stand / Chemeris E.V. // Industrial botany. – 2002. – V. 2. – P. 162–167.

The genetic control of 9 enzymous systems of 30 *Pinus nigra* Arn. trees from an introduction stand of the Donetsk botanical gardens of the National Academy of Sciences of Ukraine has been studied using electrophoretic division of isozymes in polyacrylamide gel vertical plates. The detailed description of electrophoretic spectra GOT, GDH, MDH, DIA, SOD, ADH, FDH, ACP and LAP encoded by 21 loci is presented. The analysis of alleles segregation in heterozygous trees on the whole confirms the monogenic character of inheriting the allozymous variants found.

Table. 1. Pic. 1. Bibliog.: 23.