

И.И. КОРШИКОВ, Н.Н. МОРОЗОВА, Я.В. ПИРКО

Донецкий ботанический сад НАН Украины  
E-mail: herb@herb.dn.ua

## ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ИЗОФЕРМЕНТОВ ПИХТЫ БЕЛОЙ (*ABIES ALBA* MILL.) УКРАИНСКИХ КАРПАТ



*Изучен генетический контроль ферментов GOT, GDH, DIA, MDH, ME, SOD, FDH, ADH, ACP, LAP в мегагаметофитах семян пихты белой (Abies alba Mill.) из четырех природных популяций Украинских Карпат. Четкое электрофоретическое разделение получено для продуктов 21 локуса. Анализ сегрегации аллелей гетерозиготных деревьев подтверждает моногенное наследование обнаруженных вариантов.*

© И.И. КОРШИКОВ, Н.Н. МОРОЗОВА, Я.В. ПИРКО, 2003

**Введение.** Изучение популяционно-генетической изменчивости основных лесообразующих пород Украинских Карпат остается одной из актуальных задач в познании объема генного разнообразия хозяйственно ценных видов, а также выявления негативных генетических процессов, связанных с чрезмерной вырубкой лесов. Ранее нами было изучено генетическое разнообразие и дифференциация *Pinus mugo* Turta [1], *Pinus cembra* L.[2] и *Pinus sylvestris* L. [3] в данном регионе. В то же время генетическая изменчивость третьей по занимаемым площадям после ели и бука породы — пихты белой (*Abies alba* Mill.), произрастающей преимущественно в диапазоне высот 300–900 м над уровнем моря [4–6], остается недостаточно исследованной. В Западной Европе в настоящее время уделяется много внимания изучению генетического разнообразия этого вида [7–14].

Современный ареал *A. alba* ограничен горами средней, южной и западной Европы. Для Альп, Апеннин, Карпат и Балкан характерен сплошной ареал этого вида, а для Пиринеев и Центрального массива — островной [6]. Украинские Карпаты являются восточной границей распространения пихты белой. Как порода океанического климата, *A. alba* требовательна к воздушной влаге и почве, произрастая преимущественно во влажных экотопах [5, 6].

Пихта белая из всех карпатских лесообразователей отличается относительно слабой морфологической изменчивостью, что существенно затрудняет анализ структуры ее популяций. Использование изоферментов в качестве генетических маркеров дает возможность получить ценную информацию о процессах, протекающих в популяциях [15], а также изучить генетическое разнообразие и дифференциацию популяций исследуемого вида. Однако для этого предварительно необходимо идентифицировать аллельные варианты и изучить механизмы их генного контроля. Уникальная система размножения хвойных позволяет делать это без особых трудностей путем анализа сегрегации аллельных продуктов гаплоидных эндоспермов гетерозиготных деревьев [16].

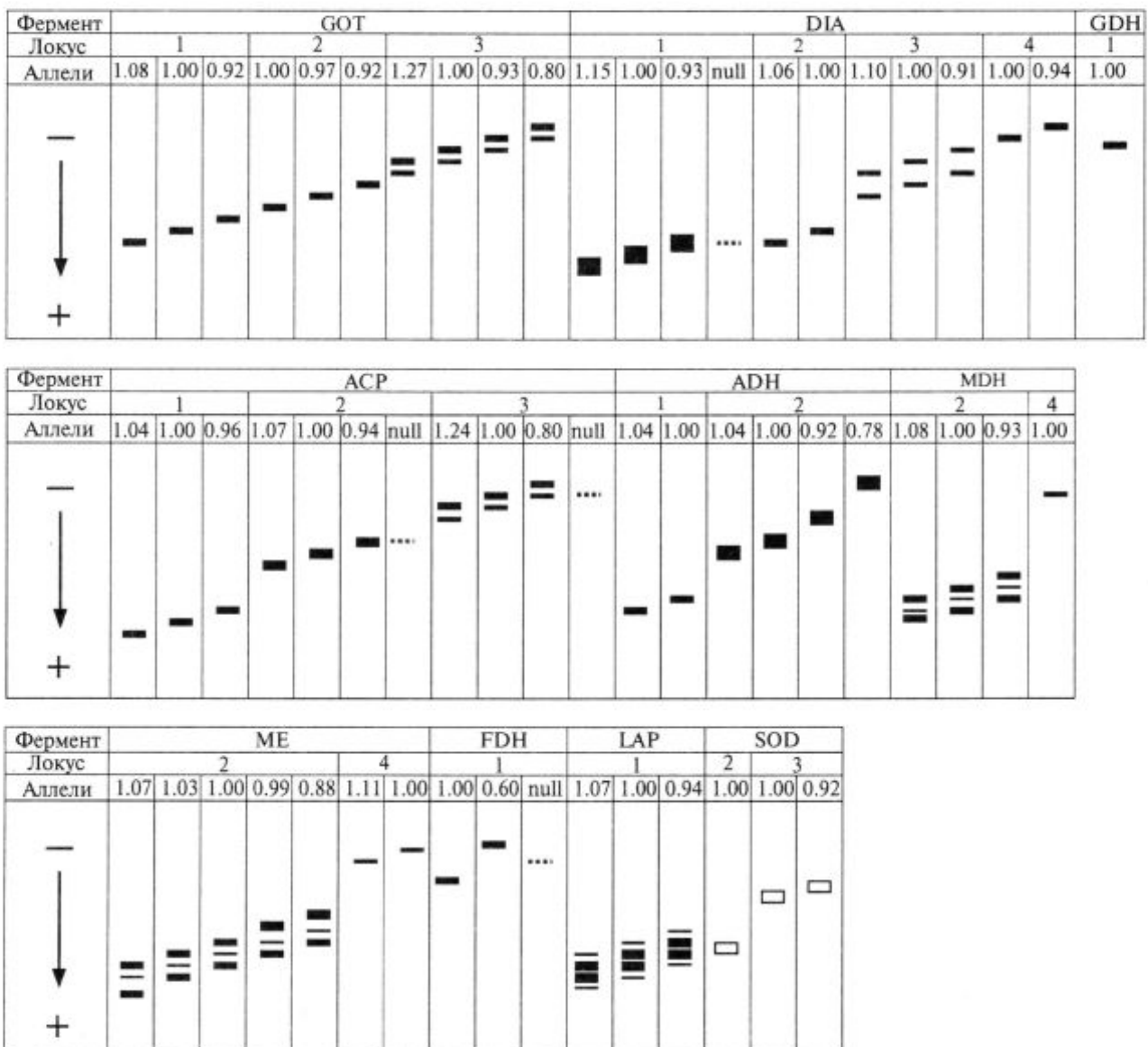
Целью настоящей работы было установить при помощи изоферментного анализа генетический контроль десяти ген-ферментных систем *A. alba* для дальнейшего их использования в популяционно-генетических исследованиях этого вида в Украинских Карпатах.

**Материалы и методы.** Объектом исследований были 163 дерева пихты белой, возраст которых составлял от 110 до 180 лет. Семена, собранные в четырех природных популяциях *A. alba* во Львовской и Ивано-Франковской областях, до анализов хранили в холодильнике. Для электрофореза использовали экстракты эндоспермов (мегагаметофитов) семян, методика приготовления которых описана нами ранее [1, 2].

Электрофоретическое разделение ферментов проводили в вертикальных пластинках 7,5%-ного полиакриламидного геля с pH разделяющего геля 8,9 и трис-глициновым электродным буфе-

ром с pH 8,3 [17]. Гистохимическое выявление зон ферментативной активности в гелях осуществляли по общепринятым методикам с небольшими модификациями [18, 19]. Для обозначения ферментов, локусов, аллелей использовали систему С. Пракаша [20]. Для установления генотипа дерева анализировали не менее шести семян.

**Результаты исследований и их обсуждение.** В ходе проведенных исследований десяти ферментных систем пихты белой выявлено 59 аллельных вариантов. Их схематическое изображение представлено на рисунке.



Схематическое изображение аллельных вариантов 21 локуса пихты белой (*Abies alba* Mill.)

Сегрегация аллозимных вариантов в эндоспермах гетерозиготных деревьев *Abies alba* Mill. в Украинских Карпатах

Генотип дерева	Число изучаемых деревьев	Соотношение аллелей	$\chi^2$
Got-1 <sup>1.08/1.00</sup>	1	4 : 2	0,33
Got-1 <sup>1.00/0.92</sup>	3	12 : 9	0,21
Got-2 <sup>1.00/0.97</sup>	8	38 : 23	1,84
Got-2 <sup>1.00/0.92</sup>	1	5 : 2	0,64
Got-3 <sup>1.27/1.00</sup>	41	159 : 159	0,00
Got-3 <sup>1.00/0.80</sup>	5	20 : 18	0,05
Got-3 <sup>1.27/0.80</sup>	1	5 : 3	0,25
Got-3 <sup>1.00/0.93</sup>	2	12 : 4	2,00
Got-3 <sup>0.80/0.93</sup>	1	4 : 4	0,00
Dia-1 <sup>1.15/1.00</sup>	4	18 : 13	0,40
Dia-1 <sup>1.00/0.93</sup>	8	37 : 22	1,91
Dia-1 <sup>null/1.00</sup>	1	4 : 4	0,00
Dia-2 <sup>1.06/1.00</sup>	2	8 : 8	0,00
Dia-3 <sup>1.10/1.00</sup>	13	38 : 52	1,09
Dia-3 <sup>1.00/0.91</sup>	3	12 : 10	0,09
Dia-4 <sup>1.00/0.94</sup>	12	49 : 35	1,17
Mdh-2 <sup>1.08/1.00</sup>	2	6 : 10	0,50
Mdh-2 <sup>1.00/0.93</sup>	10	42 : 35	0,32
Me-2 <sup>1.07/1.00</sup>	6	17 : 28	1,34
Me-2 <sup>1.00/0.88</sup>	7	35 : 21	1,75
Me-2 <sup>1.00/0.95</sup>	1	3 : 5	0,25
Me-4 <sup>1.11/1.00</sup>	2	11 : 5	1,13
Acp-1 <sup>1.04/1.00</sup>	22	77 : 83	0,11
Acp-1 <sup>1.00/0.96</sup>	9	40 : 29	0,88
Acp-2 <sup>1.07/1.00</sup>	77	288 : 316	1,18
Acp-2 <sup>null/1.00</sup>	1	5 : 34	0,25
Acp-2 <sup>1.00/0.94</sup>	2	8 : 7	0,03
Acp-2 <sup>1.07/0.94</sup>	1	1 : 6	1,79
Acp-3 <sup>1.24/1.00</sup>	57	208 : 237	0,94
Acp-3 <sup>1.24/0.80</sup>	15	51 : 61	0,45
Acp-3 <sup>1.00/0.80</sup>	26	119 : 85	2,83
Acp-3 <sup>null/1.24</sup>	1	2 : 6	1,00
Adh-1 <sup>1.04/1.00</sup>	61	295 : 264	0,84
Adh-2 <sup>1.00/0.78</sup>	54	197 : 218	0,53
Adh-2 <sup>1.00/1.04</sup>	16	70 : 50	1,67
Adh-2 <sup>1.00/0.92</sup>	1	3 : 3	0,00
Adh-2 <sup>1.04/0.78</sup>	1	5 : 3	0,25
Fdh <sup>1.00/0.60</sup>	2	7 : 9	0,13
Fdh <sup>null/1.00</sup>	2	9 : 3	1,50
Lap-1 <sup>1.07/1.00</sup>	10	26 : 53	4,60*
Lap-1 <sup>1.00/0.94</sup>	2	6 : 8	0,14
Sod-3 <sup>1.00/0.92</sup>	1	6 : 2	1,00

Примечание. Стандартные значения  $\chi^2$  для уровня значимости: 0,05–3,84; 0,01–6,64; 0,001–10,83. \*Нарушение сегрегации аллелей достоверно для уровня значимости 0,05.

Глутаматоксалоацетаттрансаминаза (GOT, К.Ф.2.6.1.1). Данный фермент на гелевых пластинках проявлялся в виде четырех зон активности, которые кодируются тремя генными локусами — Got-1, Got-2, Got-3. Локус Got-1 у изучаемого вида оказался слабополиморфным и был представлен тремя аллелями — Got-1<sup>1.00</sup>, Got-1<sup>1.08\*</sup>, Got-1<sup>0.92\*</sup>, причем последние два в популяциях встречались с низкой частотой, не превышающей 0,05, поэтому были отнесены к категории редких. (здесь и далее редкие аллели обозначены знаком \*). В локусе Got-2 так же, как и в локусе Got-1, обнаружено три аллеля — Got-2<sup>1.00</sup>, Got-2<sup>0.97\*</sup>, Got-2<sup>0.92\*</sup>. Локус Got-3, как и у большинства видов хвойных, проявлялся в виде двух синхронно мигрирующих зон активности. В изучаемом локусе выявлено четыре аллельных варианта — Got-3<sup>1.27</sup>, Got-3<sup>1.00</sup>, Got-3<sup>0.80\*</sup>, Got-3<sup>0.93\*</sup>. Необходимо отметить, что такое же число локусов было отмечено у *A. nebrodensis* [7] и *A. fraseri* [8], а также у *A. alba* из других частей ее природного ареала [9, 10].

Глутаматдегидрогеназа (GDH, К.Ф.1.4.1.2). При гистохимическом окрашивании была выявлена одна зона активности фермента, контролируемая одним мономорфным локусом — Gdh. Аналогичная картина отмечена при исследовании *A. balsamea* [11], *A. lasiocarpa* [12] и *A. pinsapo* [13].

Диафораз (DIA, К.Ф.1.6.4.3). Изоферментный спектр DIA на гелевых пластинках проявлялся в виде пяти зон активности, которые кодируются четырьмя генными локусами — Dia-1, Dia-2, Dia-3, Dia-4. Быстро мигрирующая зона, кодируемая локусом Dia-1, представлена четырьмя аллелями — Dia-1<sup>1.15\*</sup>, Dia-1<sup>1.00</sup>, Dia-1<sup>0.93\*</sup>, Dia-1<sup>null\*</sup>; Dia-2 — двумя аллелями — Dia-2<sup>1.06\*</sup>, Dia-2<sup>1.00</sup>. Локусы Dia-1, Dia-2 на гелях проявлялись одиночными зонами активности фермента, в то время как Dia-3, как и Got-3 — двумя одновременно мигрирующими. В локусе Dia-3 выявлено три аллельных варианта — Dia-3<sup>1.00</sup>, Dia-3<sup>0.91\*</sup>, Dia-3<sup>1.10</sup>, а в локусе Dia-4 так же, как и локусе Dia-2, было обнаружено два аллеля — Dia-4<sup>1.00</sup> и Dia-4<sup>0.94</sup>.

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. Однако идентифицировать на гелях все локусы оказалось достаточно сложно, поэтому для анализа использовали только два, Mdh-2 и Mdh-4, проявляющиеся наиболее четко.

Локус Mdh-2 был представлен тремя аллелями — Mdh-2<sup>1.08\*</sup>, Mdh-2<sup>1.00</sup>, Mdh-2<sup>0.93\*</sup>, а Mdh-4 оказался мономорфным с одним единственным аллелем Mdh-4<sup>1.00</sup>. Три локуса — Mdh-A, Mdh-B и Mdh-C — отмечены при исследовании насаждений пихты белой в Германии и Швейцарии [14], при этом для анализа использовали только два — Mdh-A и Mdh-C.

**Малик-энзим (ME, К.Ф. 1.1.1.40).** При специфическом окрашивании ME, как и в случае с MDH, на электрофореграммах проявлялось много зон активности. Наиболее стабильными из них оказались зоны, контролируемые локусами Me-2 и Me-4. Локус Me-2 на гелевой пластинке был представлен в виде трех зон активности с пятью аллелями — Me-2<sup>1.07\*</sup>, Me-2<sup>1.03\*</sup>, Me-2<sup>1.00</sup>, Me-2<sup>0.95\*</sup>, Me-2<sup>0.88\*</sup>. В локусе Me-4 выявлено два аллеля — Me-4<sup>1.11\*</sup> и Me-4<sup>1.00</sup>.

**Супероксиддисмутаза (SOD, К.Ф. 1.15.1.1).** На гелевых пластинках отмечено четыре зоны активности фермента, которые кодируются четырьмя генными локусами — Sod-1, Sod-2, Sod-3, Sod-4. Локусы Sod-1 и Sod-4 у пихты белой проявлялись нестабильно, поэтому в дальнейшем не анализировались. Локус Sod-2 оказался мономорфным, а Sod-3 представлен двумя аллельными вариантами — Sod-3<sup>1.00</sup> и Sod-3<sup>0.92\*</sup>.

**Алкогольдегидрогеназа (ADH, К.Ф. 1.1.1.1).** Проявлялась на гелях в виде двух зон активности, которые контролируются двумя локусами — Adh-1 и Adh-2. Локус Adh-1 был представлен двумя аллелями — Adh-1<sup>1.04</sup> и Adh-1<sup>1.00</sup>, а локус Adh-2 четырьмя аллелями — Adh-2<sup>1.04</sup>, Adh-2<sup>1.00</sup>, Adh-2<sup>0.92\*</sup>, Adh-2<sup>0.88</sup>.

**Формиатдегидрогеназа (FDH, К.Ф. 1.2.1.2).** При окрашивании на гелевых пластинках наблюдалась одна зона активности, кодируемая локусом Fdh. В изучаемых популяциях *A. alba* обнаружено три аллельных варианта — Fdh<sup>null\*</sup>, Fdh<sup>1.00</sup>, Fdh<sup>0.60\*</sup>.

**Кислая фосфатаза (ACP, К.Ф. 3.1.3.2).** При гистохимическом окрашивании на гелевых пластинках видно до пяти четких зон активности, кодирование которых осуществляется тремя генными локусами — Asp-1, Asp-2, Asp-3. В отличие от Asp-2, спектр которого однополосный, локусы Asp-1 и Asp-3 были представлены двумя синхронно мигрирующими зонами активности. В локусе Asp-1 выявлено три аллельных варианта (Asp-1<sup>1.04</sup>, Asp-1<sup>1.00</sup>, Asp-1<sup>0.96\*</sup>), в Asp-2 — четыре (Asp-2<sup>1.07</sup>, Asp-2<sup>1.00</sup>, Asp-2<sup>0.94\*</sup>, Asp-2<sup>null\*</sup>), а в Asp-3

также четыре аллеля (Asp-3<sup>1.24</sup>, Asp-3<sup>1.00</sup>, Asp-3<sup>0.80</sup> и Asp-3<sup>null\*</sup>).

**Лейцинаминопептидаза (LAP, К.Ф. 3.4.11.1).** У пихты белой при электрофоретическом анализе на гелевых пластинках проявлялось пять зон активности фермента. Из них первые четыре были синхронно мигрирующими и контролировались локусом Lap-1, а пятая зона, проявлявшаяся нестабильно и только при чрезмерной нагрузке фермента субстратом, — локусом Lap-2. В локусе Lap-1 у данного вида идентифицировано три аллеля — Lap-1<sup>1.07</sup>, Lap-1<sup>1.00</sup>, Lap-1<sup>0.94</sup>. Две зоны активности LAP, кодируемые локусами Lap-1 и Lap-2, были выявлены у *A. alba* при изучении этого вида в Польше [9], Германии и Швейцарии [14].

В результате проведенных исследований изучен генетический контроль десяти ферментных систем пихты белой. Четкое электрофоретическое разделение получено для белковых продуктов 21 генного локуса. Из изученной совокупности локусов, три — Gdh, Mdh-4 и Sod-2 — оказались мономорфными во всех исследованных популяциях. Обнаруженные редкие аллели встречались в подавляющем большинстве случаев у гетерозиготных генотипов. Гомозиготы по редким аллелям установлены только для генотипов Dia-2<sup>1.06/1.06</sup>, Asp-2<sup>null/null</sup> и Me-2<sup>1.03/1.03</sup>. Анализ сегрегации аллельных вариантов гетерозиготных деревьев этого вида подтверждает то, что выявленные варианты наследуются как моногенные признаки (таблица). Нарушение сегрегации аллелей было выявлено лишь у одного, гетерозиготного по локусу Lap-1, дерева. У ранее изученных нами коренных представителей семейства *Pinaceae* Lindl. доля случаев нарушения сегрегации аллелей среди изученных гетерозиготных генотипов составила у *Pinus cembra* L. — 0 % [2], *P. mugo* Turra — 14 % [1], *P. sylvestris* L. — 20 % [21], *P. pityusa* Stev. — 42 % [22]. Таким образом, выявленные аллозимные варианты можно использовать для исследования генетической структуры, уровня дифференциации и подразделенности популяций пихты белой в Украинских Карпатах.

**SUMMARY.** Genetic control of GOT, GDH, DIA, MDH, ME, SOD, FDH, ADH, ACP, LAP enzymes has been studied in the seed megagametophytes of Silver fir (*Abies alba* Mill.) from four natural populations of the Ukrainian Carpathian mountains. The distinct electrophoretic division has been obtained for the 21 loci products. The analysis of allele segregation in the heterozygous trees confirms monogenic inheritance of the revealed variants.

**РЕЗЮМЕ.** Досліджено генетичний контроль ферментів GOT, GDH, DIA, MDH, ME, SOD, FDH, ADH, ACP, LAP в мегагаметофітах насінин ялиці білої (*Abies alba* Mill.) з чотирьох природних популяцій Українських Карпат. Чітке електрофоретичне розділення отримано для продуктів 21 локуса. Аналіз сегрегації алелів гетерозиготних дерев підтверджує моногенне наслідування виявлених варіантів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Пирко Я.В. Генетичне різноманіття ізоферментів сосни гірської (*Pinus mugo* Turta) в природних популяціях Українських Карпат // Цитология и генетика. — 2000. — 34, № 5. — С. 55–60.
2. Пирко Я.В., Коршиков И.И. Генетический контроль исоферментов сосны кедровой европейской (*Pinus cembra* L.) Украинских Карпат // Цитология и генетика. — 2001. — 35, № 4. — С. 33–37.
3. Пирко Я.В., Коршиков И.И. Генетическая структура, изменчивость и дифференциация популяций *Pinus sylvestris* L. в Украинских Карпатах и Расточье // Цитология и генетика. — 2001. — 35, № 6. — С. 28–33.
4. Кондратюк Є.М. Дикоростучі хвойні України. — К., 1960. — 120 с.
5. Швиденко А.И. Белая пихта на Буковине. — Ужгород : Карпати, 1967. — 90 с.
6. Смаглюк К.К. Аборигенні хвойні лісоутворювачі. — Ужгород : Карпати, 1972. — 112 с.
7. Ducci F., Proietti R., Favre J.-M. Allozyme assessment of genetic diversity within the relic Sicilian fir *Abies nebrodensis* (Lojac.) Mattei // Ann. For. Sci. — 1999. — 56. — P. 345–355.
8. Diebel K.E., Feret P.P. Isozyme variation within the Fraser fir (*Abies fraseri* (Pursh) Poir.) population on Mount Rogers, Virginia: lack of microgeographic differentiation // Silvae Genet. — 1991. — 40, № 2. — P. 79–85.
9. Mejnartowicz L. Polymorphism at the LAP and GOT loci in *Abies alba* Mill. populations // Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. sci. biol. — 1979. — 27, № 12. — P. 1063–1070.
10. Moller K. Genetische Untersuchungen bei der Tanne mit Hilfe von Enzym-Genmarkern // Allg. Forstzeit. — 1986. — 97, № 3. — P. 60–61.
11. Neale D.B., Adams W.T. Inheritance of isozyme variants in seed tissues of balsam fir (*Abies balsamea*) // Can. J. Bot. — 1981. — 59. — P. 1285–1291.
12. Shea K.L. Segregation of allozyme loci in megagametophytes of Engelmann spruce and subalpine fir // Genome. — 1988. — 30. — P. 103–107.
13. Pascual L., Garcia F.G., Perfectti F. Inheritance of isozyme variants in seed tissues of *Abies pinsapo* Boiss. // Silvae Genet. — 1993. — 42. — P. 285–376.
14. Hussendörfer E., Konnert M., Bergmann F. Inheritance and linkage of isozyme variants of Silver fir (*Abies alba* Mill.) // Forest Genet. — 1995. — 2, № 1. — P. 29–40.
15. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. — М.: Наука, 1983. — 279 с.
16. Алтухов Ю.П., Крутовский К. В., Гафаров Н.И. и др. Аллозимный полиморфизм в природной популяции ели европейской *Picea abies* (L.) Karst. Сообщ. 1. Системы полиморфизма и механизмы их генного контроля // Генетика. — 1986. — 22, № 8. — С. 2135–2151.
17. Маурер Г. Диск-электрофорез. — М.: Мир, 1971. — 247 с.
18. Корочкин Л.И., Серов О.Л., Пудовкин А. И. и др. Генетика исоферментов. — М.: Наука, 1977. — 275 с.
19. Гончаренко Г.Г., Падутов В.Е., Потенко В.В. Руководство по исследованию древесных видов методом электрофоретического анализа исоферментов. — Гомель : Бел. НИИЛХ, 1989. — 164 с.
20. 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.
21. Коршиков И.И. Адаптация растений к условиям техногенно загрязненной среды. — Киев : Наук. думка, 1996. — 272 с.
22. Коршиков И.И., Скидан Е.М., Коба В.П. Генетический контроль аллозимов у сосны пицундской (*Pinus pityusa* Stev.) природных популяций Крыма // Цитология и генетика. — 2002. — 36, № 1. — С. 26–31.

Поступила 27.07.02