

С.Н. ПРИВАЛИХИН, И.И. КОРШИКОВ,
Н.Н. ПИРКО, Т.И. ВЕЛИКОРИДЬКО, Я.В. ПИРКО

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

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ИЗОФЕРМЕНТОВ ЕЛИ ЕВРОПЕЙСКОЙ (*PICEA ABIES* (L.) KARST.) УКРАИНСКИХ КАРПАТ



У ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.) из девяти природных популяций Украинских Карпат изучен генетический контроль изоферментов GOT, GDH, DIA, MDH, SOD, FDH, ADH, ACP, LAP с помощью электрофоретического разделения в 7,5%-ном полиакриламидном геле и анализа изменчивости их изоформ у 346 деревьев. Четко установлен 71 аллельный продукт 20 генных локусов. Анализ сегрегации выявленных аллельных вариантов подтверждает их моногенное наследование.

© С.Н. ПРИВАЛИХИН, И.И. КОРШИКОВ, Н.Н. ПИРКО,
Т.И. ВЕЛИКОРИДЬКО, Я.В. ПИРКО, 2006

Введение. Знания генетической структуры популяций, внутри- и межпопуляционной изменчивости хозяйственно ценных видов растений в пределах природных ареалов или основных его частей необходимы для разработки научно обоснованных мероприятий по их рациональному использованию и эффективному воспроизводству. Особенно важны такие сведения в отношении мало тронутых человеком популяций, еще сохраняющих эволюционно сложившуюся адаптивную структуру популяционного генофонда вида [1]. Основываясь на этом, ранее нами были проведены исследования генетической изменчивости хвойных видов-эдикаторов лесных экосистем Украинских Карпат — сосны горной (*Pinus mugo* Turra) [2], сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) [3] и пихты белой (*Abies alba* Mill.) [4]. В отношении ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.) — основной лесобразующей породы Украинских Карпат — на восточной границе ее природного ареала такие исследования выполнялись фрагментарно [5, 6]. В других частях ареала этого вида активно изучали генетическую структуру, подразделенность и дифференциацию популяций с использованием изоферментов в качестве генетических маркеров [7–9]. Описание наследования изоферментов предвещает их применение в анализе популяционно-генетической изменчивости вида [7, 10, 11].

Цель работы — установление генетического контроля девяти ферментных систем *P. abies* для последующего использования аллозимов в популяционно-генетических исследованиях этого вида в Украинских Карпатах.

Материалы и методы. Объектом исследований были 346 деревьев ели европейской из девяти природных популяций на заповедных территориях Львовской, Закарпатской и Ивано-Франковской областей. В ходе самостоятельных экспедиций в популяциях *P. abies* были собраны семена с наиболее старых деревьев, возраст которых варьировал от 80 до 200 лет. Для электрофореза использовали экстракты из эндоспермов (мегагаметофитов) семян, методика приготовления которых описана нами ранее [11, 12]. Электрофоретическое разделение ферментов проводили в вертикальных пластинках 7,5%-ного полиакриламидного геля с pH разделяющего геля 8,9 и трис-глициновым электродным буфером с pH 8,3 [13].

Гистохимическое выявление зон ферментативной активности в гелях осуществляли по общепринятым методикам с небольшими модификациями [14]. Обозначение ферментов, локусов, аллелей проводили по общепринятой системе Пракаша [15]. Символом null обозначены нулевые аллели. Аллельные варианты лейцинаминопептидазы, которые выявлялись в виде двух фракций, получили двойные цифровые символы — 1.00/0.94. Для установления генотипа дерева в электрофоретическом разделении ферментов использовали не менее шести семян. Аллельный характер наблюдаемых электрофоретических вариантов был установлен с помощью анализа их расщепления у гаплоидных эндоспермов гетерозиготных деревьев. Полученные сегрегационные соотношения одинаковых изосимных фенотипов гетерозиготных деревьев суммировали и проверяли стандартным методом χ^2 на соответствие ожидаемому менделевскому соотношению 1:1.

Результаты исследований и их обсуждение. В ходе проведенного электрофоретического исследования девяти ферментных систем у *P. abies* Украинских Карпат выявлено 71 аллельных вариантов. Их схематическое изображение приведено на рисунке.

Глутаматоксалоацетаттрансаминаза (GOT, К.Ф. 2.6.1.1). Данный фермент проявлялся на гелевых пластинках в виде четырех зон активности, которые кодируются тремя локусами — Got-1, Got-2, Got-3. Локус Got-1 был представлен двумя аллелями Got-1^{1.00} и Got-1^{null}, причем последний аллель в общей выборке анализируемых деревьев встречался с низкой частотой, не превышающей 0,05, поэтому был отнесен к категории редких (здесь и далее редкие аллели обозначены знаком*). В локусах Got-2 и Got-3 выявлено по три аллеля соответственно: Got-2^{1.13}, Got-2^{1.00}, Got-2^{null} и Got-3^{1.13}, Got-3^{1.00}, Got-3^{0.85}. Четыре зоны активности GOT, кодируемые тремя отдельными локусами, выявлены Алтуховым и соавт. [7] в популяции *P. abies* в Костромской обл. Ларионовой [10] были описаны три зоны ферментативной активности GOT у ели сибирской (*Picea obovata* Ledeb).

Глутаматдегидрогеназа (GDH, К.Ф. 1.4.1.2). При гистохимическом окрашивании GDH

проявлялся в виде двух зон активности. Быстро мигрирующая зона окрашивалась очень слабо, нестабильно и в дальнейшем не анализировалась. Медленно мигрирующая зона имела вид тонкой, хорошо окрашиваемой полосы. У *P. abies* локус Gdh представлен двумя аллелями — Gdh^{1.00} и Gdh^{0.88}. Две зоны активности этого фермента в эндоспермах семян выявлены в популяции *P. abies* в Костромской обл. [7]. Одна зона активности, кодируемая одним локусом, обнаружена в эндоспермах у *P. obovata* [10].

Диафороза (DIA, К.Ф. 1.6.4.3). Электрофоретический спектр данного фермента у *P. abies* представлен четырьмя зонами активности, которые контролируются локусами Dia-1, Dia-2, Dia-3, Dia-4. В локусе Dia-1 выявлены пять аллелей: Dia-1^{1.06}, Dia-1^{1.04}, Dia-1^{1.00}, Dia-1^{0.95}, Dia-1^{null}; в Dia-2 — четыре аллеля: Dia-2^{1.11}, Dia-2^{1.07}, Dia-2^{1.00}, Dia-2^{null}. Локусы Dia-3 и Dia-4 были представлены тремя аллелями: Dia-3^{1.10}, Dia-3^{1.00}, Dia-3^{0.93} и Dia-4^{1.07}, Dia-4^{1.00}, Dia-4^{0.79} соответственно. Три локуса этого фермента наблюдали у *P. abies* и *P. obovata* [6], а также у ели Глена (*Picea glehnii* Mast.) [16].

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 представлен двумя аллелями Mdh-2^{1.16}, Mdh-2^{1.00}; Mdh-3 — четырьмя аллелями: Mdh-3^{1.07}, Mdh-3^{1.00}, Mdh-3^{0.80}, Mdh-3^{null}; в Mdh-4 было выявлено три аллеля: Mdh-4^{1.16}, Mdh-4^{1.00}, Mdh-4^{0.80}.

Супероксиддисмутаза (SOD, К.Ф. 1.15.1.1). На гелевых пластинках отмечено две зоны активности фермента, которые кодируются двумя генными локусами — Sod-3 и Sod-4. Локус Sod-4 оказался мономорфным во всех изучаемых популяциях, а у локуса Sod-3 обнаружен полиморфизм, детерминируемый аллелями Sod-3^{1.00} и Sod-3^{0.96}.

Алкогольдегидрогеназа (ADH, К.Ф. 1.1.1.1). Этот фермент на гелевых пластинках проявлялся в виде двух зон активности, которые

Фермент	GOT										GDH		MDH							
	1					2					1		3				4			
	1.00	null	1.13	1.00	0.85	1.13	1.00	1.00	0.85		1.00	0.88	1.07	1.00	0.80	null	1.16	1.00	0.80	
Локус	—																			
Аллели	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Фермент	DIA										SOD							
	1					2					3				4			
	1.06	1.04	1.00	0.95	null	1.11	1.07	1.00	1.00	0.93	1.10	1.00	0.93	0.79	1.00	0.96	1.00	1.00
Локус	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Аллели	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Фермент	ACP										ADH								
	2					3					1				2				
	1.04	1.00	0.97	0.94	0.89	null	1.16	1.00	0.96	null	1.05	1.00	0.96	null	1.05	1.00	0.96	0.74	
Локус																			
Алели																			
—																			—
→																			—
+	==	==	==	==	==		—	—	—		—	—	—		—	—	—	—	—

Фермент	LAP										FDN						
	1					2					2						
	1.05	1.02	1.00	0.97	0.95	1.00 0.94	null	1.06	1.00	0.96	null	1.25	1.08	1.00	0.76	null	
Локус																	
Алели																	
—																	
→																	
+	—	—	—	—	—	==		—	—	—		—	—	—	—		

Схематическое изображение и обозначение электрофоретических аллельных вариантов 20 локусов ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.)

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

Генотип деревя	Количество изученных деревьев	Соотношение аллелей	χ^2
Got-1 ^{1.00/mul}	1	7 : 8	0,07
Got-2 ^{1.13/1.00}	38	234:238	0,03
Got-2 ^{1.00/mul}	5	24:21	0,20
Got-3 ^{1.12/1.00}	166	752:741	0,08
Got-3 ^{1.00/0.85}	3	12:12	0
Gdh-1 ^{1.00/0.88}	23	116:103	0,77
Dia-1 ^{1.04/1.00}	2	20:15	0,71
Dia-1 ^{1.00/1.00}	4	22:25	0,19
Dia-1 ^{1.00/0.95}	5	22:24	0,09
Dia-1 ^{mul/1.00}	1	4:4	0
Dia-2 ^{1.11/1.00}	1	5:2	1,29
Dia-2 ^{1.07/1.00}	4	9:23	6,13*
Dia-2 ^{1.00/mul}	6	42:33	1,08
Dia-3 ^{1.00/1.00}	72	273:345	8,39**
Dia-3 ^{1.00/0.93}	5	18:18	0
Dia-4 ^{1.07/1.00}	94	366:492	18,50**
Dia-4 ^{1.00/0.79}	10	48:36	1,71
Mdh-2 ^{1.16/1.00}	3	10:19	2,79
Mdh-3 ^{1.07/1.00}	55	253:292	2,79
Mdh-3 ^{1.00/mul}	4	22:17	0,64
Mdh-3 ^{1.00/0.81}	1	9:7	0,25
Mdh-4 ^{1.16/1.00}	58	164:312	46,02***
Mdh-4 ^{1.00/0.80}	6	27:19	1,39
Fdh-1 ^{1.25/1.00}	1	5:10	1,67
Fdh-1 ^{1.00/1.00}	10	66:57	0,66
Fdh-1 ^{1.00/0.76}	2	14:9	1,09
Fdh-1 ^{mul/1.00}	1	5:10	1,67
Acp-2 ^{1.04/1.00}	16	68:107	8,69**
Acp-2 ^{1.00/0.97}	60	290:274	0,45
Acp-2 ^{1.00/0.94}	68	353:308	3,06
Acp-2 ^{0.97/0.94}	17	87:85	0,02
Acp-2 ^{1.00/mul}	1	9:7	0,25
Acp-2 ^{0.97/mul}	1	4:4	0
Acp-2 ^{0.97/0.89}	1	5:3	0,50
Acp-3 ^{1.16/1.00}	2	8:8	0
Acp-3 ^{1.00/0.96}	3	21:10	3,90*
Acp-3 ^{1.00/mul}	7	41:48	0,55
Lap-1 ^{1.00/0.95}	9	58:53	0,23
Lap-1 ^{1.02/0.97}	1	15:9	1,50
Lap-1 ^{1.05/1.00}	1	9:5	1,14
Lap-1 ^{1.05/1.00}	12	57:71	1,53
Lap-1 ^{1.00/0.97}	63	330:300	1,43
Lap-1 ^{1.00/1.00}	15	61:60	0,01
Lap-1 ^{mul/1.00}	2	20:11	2,61
Lap-1 ^{1.00/mul}	2	7:14	2,33
Lap-1 ^{1.05/0.97}	5	25:14	3,10
Lap-1 ^{1.02/1.00}	11	39:62	5,24*

Продолжение таблицы

Генотип деревя	Количество изученных деревьев	Соотношение аллелей	χ^2
Lap-1 ^{1.02/1.00}	1	6 : 2	2,00
Lap-1 ^{0.95/1.00}	1	5 : 2	1,29
Lap-1 ^{0.97/1.00}	2	7 : 9	0,25
Lap-1 ^{0.97/0.95}	3	16:19	0,26
Lap-2 ^{1.00/1.00}	117	588:648	2,91
Lap-2 ^{1.00/0.96}	1	4:3	0,14
Lap-2 ^{1.00/0.96}	6	26:20	0,78
Lap-2 ^{1.00/mul}	5	26:32	0,62
Adh-1 ^{1.05/1.00}	23	94:118	2,72
Adh-1 ^{1.00/0.96}	37	188:169	1,01
Adh-1 ^{1.00/mul}	1	8:6	0,29
Adh-2 ^{1.05/1.00}	2	4:9	1,14
Adh-2 ^{1.00/0.74}	5	32:33	0,02
Adh-2 ^{1.00/0.96}	4	26:14	3,60
Sod-3 ^{1.00/0.96}	4	22:11	3,67

Примечание. Различия достоверны: * при $P < 0,95$; ** при $P < 0,99$, *** при $P < 0,999$.

контролируются локусами Adh-1 и Adh-2. Для обоих локусов установлено четыре аллеля — Adh-1^{1.05}, Adh-1^{1.00}, Adh-1^{0.96}, Adh-1^{mul*} и Adh-2^{1.05*}, Adh-2^{1.00}, Adh-2^{0.96*}, Adh-2^{0.74*}. У *P. abies* и *P. obovata* при использовании электрофореза в крахмальном геле идентифицирован только один locus этого фермента [5, 6].

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 пять аллельных вариантов — Fdh^{1.25*}, Fdh^{1.08*}, Fdh^{1.00}, Fdh^{0.76*}, Fdh^{mul*}.

Кислая фосфатаза (ACP, К.Ф. 3.1.3.2). На гелевых пластинках наблюдали от трех до шести зон активности этого фермента, кодирование которых в целом осуществляется тремя локусами — Acp-1, Acp-2, Acp-3. Однако идентифицировать на гелях все локусы оказалось достаточно сложно, поэтому для анализа использовали только два, наиболее четко проявляющиеся — Acp-2 и Acp-3. Acp-2 у *P. abies* представлен двумя синхронно мигрирующими зонами активности. В локусе Acp-2 у данного вида идентифицировано шесть аллелей: Acp-2^{1.04}, Acp-2^{1.00}, Acp-2^{0.97}, Acp-2^{0.94}, Acp-2^{0.89*}, Acp-2^{mul*}, а в Acp-3 — четыре аллеля: Acp-3^{1.16}, Acp-3^{1.00}, Acp-3^{0.96*}, Acp-3^{mul*}.

Лейцинаминопептидаза (LAP, К.Ф. 3.4.11.1). У *P. abies* на гелевых пластинках проявлялись две зоны активности LAP, которые контролируются двумя локусами: Lar-1 и Lar-2. Для локуса Lar-1 установлено семь аллелей: Lar-1^{1.05}, Lar-1^{1.02*}, Lar-1^{1.00}, Lar-1^{0.97}, Lar-1^{0.95}, Lar-1^{1.00/0.94}, Lar-1^{mult*}, для локуса Lar-2 — четыре: Lar-2^{1.06}, Lar-2^{1.00}, Lar-2^{0.96*}, Lar-2^{mult*}. Подобный наблюдаемому изоферментный спектр LAP описан у *P. abies* [5], *P. obovata* [10], а также у *P. glehnii* [16].

Анализ сегрегации обнаруженных аллельных вариантов у гетерозиготных деревьев в целом подтверждает моногенный тип их наследования (таблица). У 7 из 62 выявленных гетерозиготных генотипов отмечено отклонение в сегрегации аллелей от ожидаемого менделевского соотношения 1:1, что составляет 11,3 % от числа выявленных гетерогенных генотипов. Такое количество генотипов со смещенной сегрегацией — обычная норма для природных популяций хвойных [7, 12].

Таким образом, в результате электрофоретического разделения и анализа изменчивости изоферментов девяти ферментных систем у 346 деревьев *P. abies* установлена их генетическая структура по 20 генным локусам для этого вида. Такое количество локусов, соответствующее требованиям международного стандарта в популяционной генетике, обеспечит нам в дальнейшем достоверный анализ особенностей генетической структуры, уровня подразделенности и дифференциации *P. abies* в пределах ареала в Украинских Карпатах.

Авторы выражают глубокую признательность акад. М.А. Голубцу, проф. К.А. Малиновскому, проф. И.И. Царику, руководству и сотрудникам природного заповедника «Горганы», национальных природных парков «Карпатский», «Сколевские Бескиды», «Синевир», а также администрации Осмолодского гослесхоза за оказанное содействие при сборе семенного материала для проведения популяционно-генетических исследований этого вида в Украинских Карпатах.

SUMMARY. Genetical control of the enzymes GOT, GDH, DIA, MDH, SOD, FDH, ADH, ACP and LAP has been studied in nine natural Carpathian populations of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) using polyacrylamide gel electrophoresis and analysis of isozyme variability

in 346 trees. Seventy one allele products of 20 gene loci have been clearly established. Segregation analysis of the revealed allele variants confirms their monogenic inheritance.

РЕЗЮМЕ. У ялини європейської (*Picea abies* (L.) Karst.) з дев'яти природних популяцій Українських Карпат вивчено генетичний контроль ізоферментів GOT, GDH, DIA, MDH, SOD, FDH, ADH, ACP, LAP за допомогою електрофоретичного розділення в 7,5%-ному поліакриламідному гелі та аналізу мінливості їх ізоформ у 346 дерев. Чітко встановлено 71 алельний продукт 20 генних локусів. Аналіз сегрегації виявлених алельних варіантів підтверджує їх моногенне успадкування.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алтухов Ю.П., Корочкин Л.И., Рычков Ю.Г. Наследственное биохимическое разнообразие в процессах эволюции и индивидуального развития // Генетика. — 1996. — 32, № 11. — С. 1450—1473.
2. Коршиков И.И., Пирко Я.В. Генетическая изменчивость и дифференциация болотных и суходольных популяций сосны горной (*Pinus mugo* Turra.) в высокогорье Украинских Карпат // Генетика. — 2002. — 38, № 9. — С. 1235—1241.
3. Коршиков И.И., Калафат Л.А., Пирко Я.В., Великоридько Т.И. Популяционно-генетическая изменчивость сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в основных лесорастительных районах Украины // Генетика. — 2005. — 41, № 2. — С. 216—228.
4. Коршиков И.И., Пирко Н.Н., Пирко Я.В. Генетическая изменчивость и дифференциация популяций *Abies alba* Mill. в Украинских Карпатах // Генетика. — 2005. — 41, № 3. — С. 356—365.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Goncharenko G.G., Zadeika I.V., Birgelis J.J. Genetic structure, diversity and differentiation of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst) in natural populations of Latvia // Forest Ecol. and Management. — 1995. — 72. — P. 31—38.
9. Lewandowski A., Burczyk J. Allozyme variation of *Picea abies* in Poland // Scand. J. For. Res. — 2002. — 17. — P. 487—494.

10. Ларионова А.Я. Наследование аллозимных вариантов у ели сибирской (*Picea obovata* Ledeb.) // Генетика. — 1995. — **31**, № 9. — С. 1261—1267.
11. 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.
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. Davis B.J. Disc electrophoresis. 2. Method and application to human serum proteins // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 1964. — **121**. — P. 404—427.
14. Корочкин Л.И., Серов О.Л., Пудовкин А.И. и др. Генетика изоферментов. — М.: Наука, 1977. — 275 с.
15. 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.
16. Гончаренко Г.Г., Потенко В.В. Генетическая структура, изменчивость и дифференциация популяций ели Глена (*P. glehnii* Mast.) на о. Сахалин // Докл. АН СССР. — 1991. — **321**, № 3. — С. 606—611.

Поступила 15.08.05