УДК 575.174.015.3 (477.8)

С.М. Приваліхін, І.В. Макогон

ГЕНЕТИЧНИЙ КОНТРОЛЬ ІЗОФЕРМЕНТНИХ СИСТЕМ *PICEA ABIES* (L.) KARST. В УКРАЇНСЬКОМУ ПОЛІССІ

Picea abies (L.) Karst., Українське Полісся, ізоферменти, генетичний контроль

Зростаюча експлуатація природних ресурсів, забруднення навколишнього середовища та інші несприятливі чинники приводять до скорочення природних ареалів та порушення оптимального співвідношення внутрішньо- та міжпопуляційної компонент генної різноманітності видів [3]. Це може позначитися на демографічній динаміці і генетичній структурі наступних поколінь, особливо у маргінальних, ізольованих, з обмеженою чисельністю популяціях рослин [4]. До видів, що потребують негайного вивчення, відноситься й ялина європейська (*Picea abies* (L.) Karst.) в Українському Поліссі.

Зручним і точним методом вивчення генетичної мінливості лісоутворюючих видів хвойних виявився електрофоретичний аналіз ізоферментів [2–5, 10, 13–15]. Першим етапом будь-якого популяційно-генетичного дослідження на основі аналізу даних алозимної мінливості є встановлення генетичного контролю ферментних систем [1, 2, 4, 6–9, 11]. Оскільки мегагаметофіт хвойних є гаплоїдною тканиною, що бере свій початок від гаплоїдної мегаспори, то алельні варіанти в мегагаметофітах дерев, гетерозиготних за будь-яким локусом, повинні сегрегувати в співвідношенні 1:1 [1, 4, 8, 9]. Це дозволить, спостерігаючи на електрофореграмах розщеплення ізоферментів, без додаткових схрещувань встановити характер успадковування ферментних систем [1, 7–9].

Мета роботи – встановити генетичний контроль дев'яти ген-ферментних систем ялини європейської Українського Полісся за допомогою ізоферментного аналізу для подальшого використання їх в популяційно-генетичних дослідженнях цього виду.

Об'єктом дослідження була ізольована рівнинна природна популяція *Picea abies* в Українському Поліссі, пробна площа (2 га) закладена в Любомирському лісництві Рівненської області. Насіння було зібрано з 33 дерев, вік яких склав більше 80 років. Для аналізу використовували не менше 7–8 мегагаметофітів насіння кожної рослини. Методику приготування екстрактів з мегагаметофітів і електрофоретичного розділення ізоферментів у вертикальних пластинках 7,5 %-ного поліакриламідного гелю та гістохімічне виявлення зон ферментативної активності детально описано нами раніше [10]. Для позначення ферментів, локусів, алелів використовували номенклатуру С. Пракаша [16]. Ступінь відповідності фактичних співвідношень ізоферментів очікуваним аналізували за допомогою критерію χ^2.

Під час проведеного дослідження 33 дерев природної популяції *P. abies* в Українському Поліссі було встановлено 46 алельних варіантів 20 алозимних локусів 9 ферментних систем.

Алкогольдегідрогеназа (ADH, К.Ф. 1.1.1.1). Цей фермент на гелевих пластинках проявлявся у вигляді двох зон активності, що контролюються двома локусами Adh-1 і Adh-2 (рис. 1, рис. 2, А). В локусі Adh-1 виявлено два алельних варіанта: Adh-$1^{1,05}$ и Adh-$1^{1,00}$. Мінливість зони, що контролюється локусом Adh-2 було обумовлено трьома алелями: Adh-$2^{1,05}$, Adh-$2^{1,00}$, Adh-$2^{0,96}$. Два локуси алкогольдегідрогенази описано у *P.abies* в Українських Карпатах [10]. При проведенні електрофорезу в крохмальному гелі у *P. abies* та *P. obovata* Ledeb. аналізували лише один локус [2], проте при достатньому навантаженні субстратом можна виявити зону Adh-2 [7].

© С.М. Приваліхін, І.В. Макогон

Глутаматоксалоацетаттрансаміназа (GOT, К.Ф.2.6.1.1.). При гістохімічному забарвленні спостерігали чотири зони активності ферменту, що кодуються трьома локусами: Got-1, Got-2, Got-3 (див. рис. 1, рис. 2, Б). Для локусів Got-1 та Got-2, які представлені поодинокими смугами активності, визначено по 2 алеля, відповідно: Got-$1^{1,05}$ та Got-$1^{1,00}$, Got-$2^{1,05}$, Got-$2^{1,00}$. Локус Got-3 виявлявся у вигляді двох синхронно мігруючих зон активності. В цьому локусі також відмічено два алеля: Got-$3^{1,13}$, Got-$3^{1,00}$. Таку ж кількість локусів було описано в інших частинах природного ареалу *P. abies* [11, 14, 15].

Фермент	GOT						GDH		MDH							
Локус	1		2		3		1		2	3				4		
Алелі	1,05	1,00	1,05	1,00	1,13	1,00	1,00	0,88	1,00	1,10	1,07	1,00	0,80	1,16	1,00	0,80

Фермент	ACP						ADH				
Локус	2			3			1		2		
Алелі	1,00	0,97	0,94	1,00	0,96	null	1,05	1,00	1,05	1,00	0,96

Фермент	LAP								FDH
Локус	1					2			
Алелі	1,05	1,00	0,97	0,95	null	1,06	1,00	0,96	1,00

Фермент	DIA								SOD	
Локус	1	2		3		4			3	4
Алелі	1,00	1,00	null	1,00	0,93	1,07	1,00	0,79	1,00	1,00

Рис. 1. Схематичне зображення алельних варіантів 20 локусів *Picea abies* (L.) Karst.

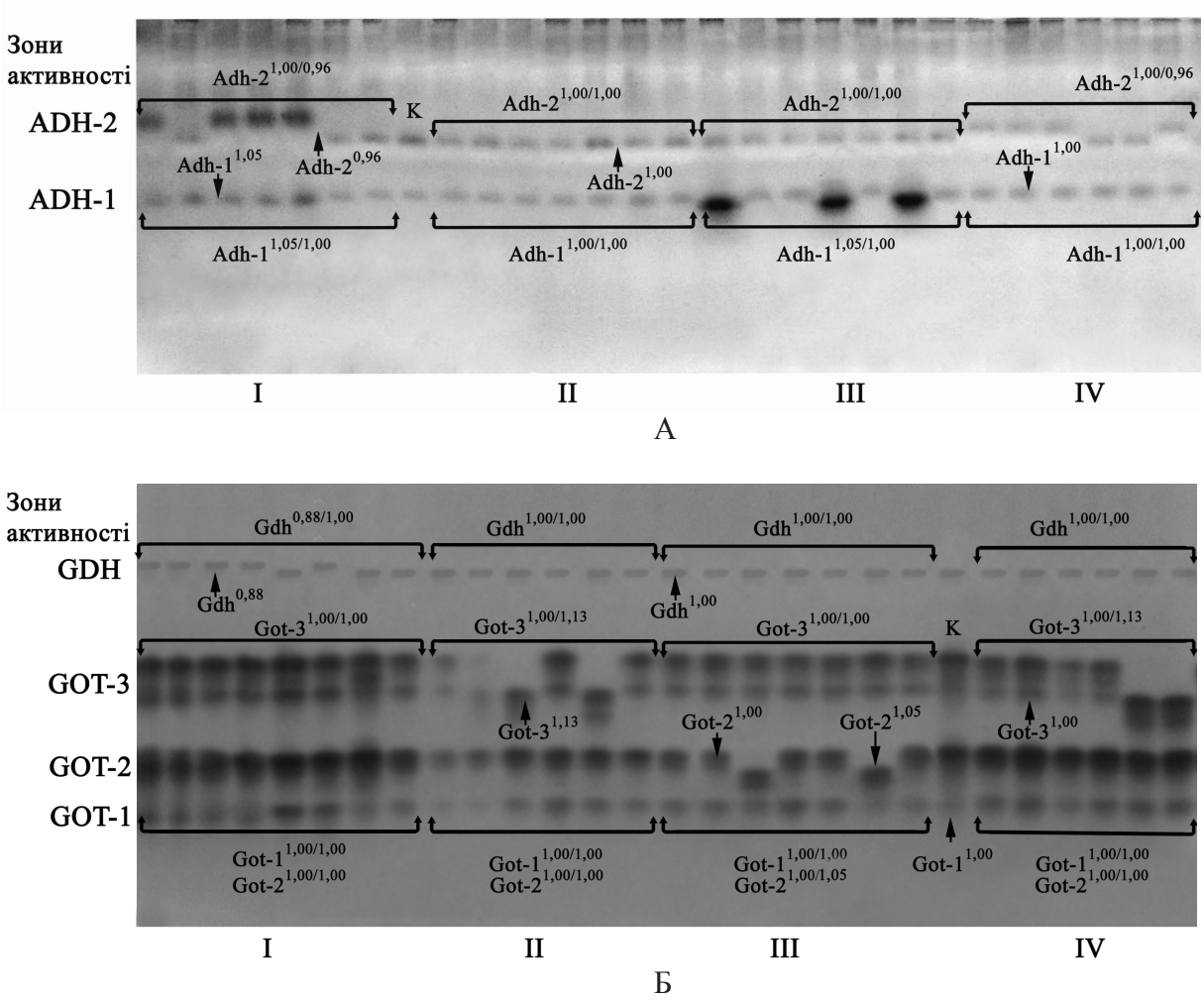
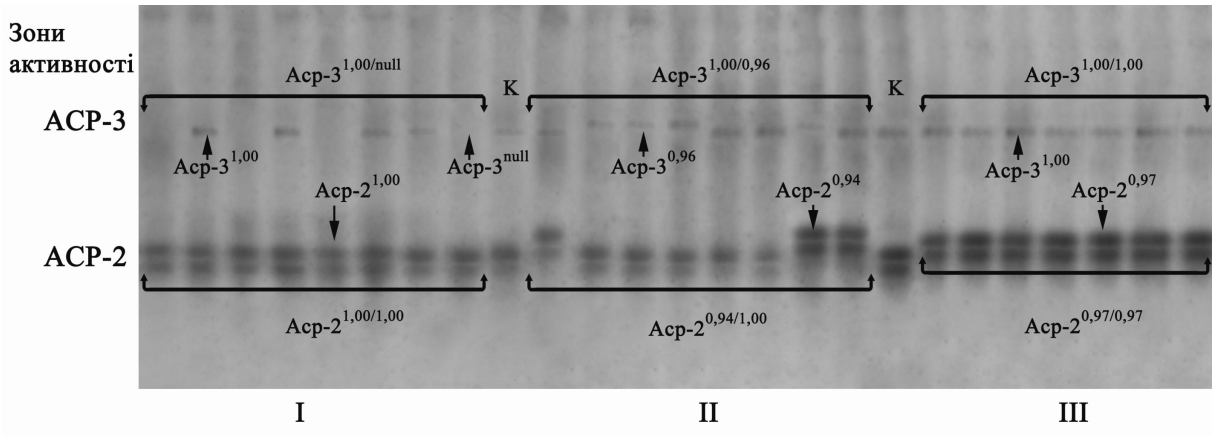


Рис. 2. Електрофореграми ферментних систем *Picea abies* (L.) Karst.:
А – алкогольдегідрогенази (ADH), Б – глутаматдегідрогенази (GDH) та глутаматоксалоацетаттрансамінази (GOT). I-IV – генотипи одного дерева (наприклад, Adh-$1^{1,05/1,00}$ або Got-$3^{1,13/1,00}$), позначення алелів наведено за системою С. Пракаша [16].

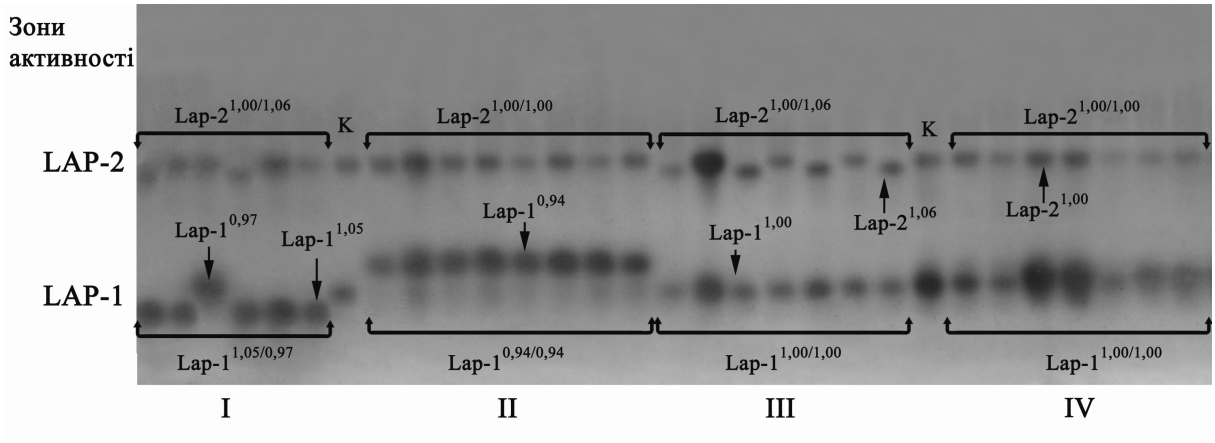
Форміатдегідрогеназа (FDH, К.Ф. 1.2.1.2). На гелевих пластинках спостерігали одну зону активності ферменту, яка кодується локусом Fdh (див. рис.1). Локус Fdh виявився мономорфним у вивчених рослин *P. abies* Українського Полісся. В популяціях *P. abies* Українських Карпат нами було виявлено п'ять алелів, проте чотири з них зустрічалися в дев'яти популяціях з частотою менше 5 % і були віднесені до рідкісних [5].

Глутаматдегідрогеназа (GDH, К.Ф 1.4.1.2). Даний фермент проявляється у вигляді однієї зони активності, що кодується одним локусом Gdh (див. рис. 1, рис. 2, Б – зона активності глутаматдегідрогенази вище за глутаматоксалоацетаттрансаміназу, тому ці ферментні системи проявляли на одному гелі). У *P. abies* в Українському Поліссі було визначено 2 алеля: $Gdh^{1,00}$ та $Gdh^{0,88}$. В популяціях *P. abies* на території Українських Карпат та у інших місцях зростання в межах природного ареалу цього виду також фіксують по 2 алеля у локусі Gdh [2, 5, 10, 13].

Кисла фосфатаза (ACP, К.Ф. 3.1.3.2.). При гістохімічному забарвленні на гелевих пластинках спостерігали від трьох до шести зон активності цього ферменту (див. рис. 1, рис. 3, А) . Однак для аналізу використовували два локуси, які найкраще виявляються – Acp-2 та Acp-3. Локус Acp-2 був представлений двома синхронно мігруючими смугами. В цьому локусі виявлено три алеля: Acp-$2^{1,00}$, Acp-$2^{0,97}$ та Acp-$2^{0,94}$.



А



Б

Рис. 3. Електрофореграми ферментних систем *Picea abies* (L.) Karst.:
А – кислої фосфатази (ACP) та Б – лейцинамінопептидази (LAP). I-IV – генотипи одного дерева (наприклад, Acp-$2^{0,94/1,00}$ або Lap-$2^{1,00/1,06}$), позначення алелів приведено за системою С. Пракаша [16].

У популяціях *P. abies* Українських Карпат локус Acp-2 виявився одним з наймінливіших серед 20 вивчених локусів [5]. В локусі Acp-3 в Українському Поліссі у *P. abies* також ідентифіковано три алеля – Acp-$3^{1,00}$, Acp-$3^{0,96}$, Acp-2^{null}. К.В. Крутовський та Ф. Бергманн у *P. abies* та *P. obovata* аналізували лише один локус Acp [14], а Р. Джианіні [13] з співавторами у *P. abies* – два.

Супероксиддисмутаза (SOD, К.Ф. 1.15.1.1). На електрофоретичній пластинці відмічено дві зони активності ферменту, які кодуються двома генними локусами – Sod-3, Sod-4 (див. рис. 1). Обидва локуси виявилися мономорфними у цій частині ареалу *P. abies*. В інших частинах ареалу ці локуси також були або слабополіморфними, або мономорфними [5, 10].

Діафораза (DIA, К.Ф. 1.6.4.3). Електрофоретичний спектр даного ферменту у *P.abies* представлений чотирма зонами активності, які контролюються локусами: Dia-1, Dia-2, Dia-3, Dia-4 (див. рис. 1). Локус Dia-1 в популяції Українського Полісся виявився мономорфним, а Dia-2 слабополіморфним з алелями Dia-$2^{1,00}$ та Dia-2^{null}. Локуси Dia-3 та Dia-4 представлені двома та трьома алелями відповідно: Dia-$3^{1,00}$, Dia-$3^{0,93}$ та Dia-$4^{1,07}$, Dia-$4^{1,00}$, Dia-$4^{0,79}$. Г.Г. Гончаренко з співавторами у представників роду *Picea* A. Dietr. також спостерігали до чотирьох зон активності, однак для аналізу використовували лише три локуси цього ферменту [2].

Лейцинамінопептидаза (LAP, К.Ф. 3.4.11.1.). На гелях проявлялися дві мінливі зони активності лейцинамінопептидази, які контролюються окремими локусами Lap-1 та Lap-2 (див. рис. 1, рис. 3, Б). «Швидка» зона, що кодується локусом Lap-1, представлена у *P.abies* п'ятьма алельними варіантами: Lap-$1^{1,05}$, Lap-$1^{1,00}$, Lap-$1^{0,97}$, Lap-$1^{0,95}$ та Lap-1^{null}. Мінливість «повільної» зони, що контролюється локусом Lap-2, обумовлена трьома алелями: Lap-$2^{1,06}$, Lap-$2^{1,00}$ и Lap-$2^{0,96}$. Подібний ізоферментний спектр LAP описаний у *P. abies* з інших частин ареалу [2, 10, 13], *P. obovata* [2, 7] та *P. glehnii* Mast. [2], а також у більшості інших видів хвойних [4, 10], виняток становлять *Pinus cembra* L. [9], *Pinus sibirica* Du Tour [6], у яких виявлено три зони активності ферменту.

Малатдегідрогеназа (MDH, К.Ф. 1.1.1.37). У *P. abies* цей фермент має складний електрофоретичний спектр, тому що кодується декількома окремими генами (див. рис. 1). Чітке розділення ізоферментів дозволило ідентифікувати на електрофореграмах 4 алозимні локуси, з яких для аналізу використовували локуси Mdh-2, Mdh-3, Mdh-4. Локус Mdh-2 виявився мономорфним, а Mdh-3 мав чотири алеля: Mdh-$3^{1,10}$, Mdh-$3^{1,07}$, Mdh-$3^{1,00}$, Mdh-$3^{0,80}$. Локус Mdh-4 був представлений трьома алелями: Mdh-$4^{1,16}$, Mdh-$4^{1,00}$, Mdh-$4^{0,80}$. В інших популяціях *P. abies* на території Українських Карпат також ідентифіковано 4 локуси цього гену, з яких в аналізі використовували три [10, 11].

Аналіз сегрегації виявлених алельних варіантів у гетерозиготних дерев в цілому підтверджує моногенний тип їх успадкування. У 2 з 26 виявлених гетерозиготних генотипів відмічено порушення сегрегації алелів від очікуваного менделівського співвідношення 1:1, що складає 7,7 % від кількості виявлених генотипів. Порушення сегрегації в популяціях хвойних відбувається у окремо взятих дерев [1, 2, 12]. Зокрема, в роботі В.Челяка з співавторами [12], присвяченої вивченню сегрегації алозимів у *Pinus banksiana* Lamb., показано, що порушення сегрегації варіює для одних і тих же дерев в різні роки збору насіння і залежно від ярусу крони дерева, з якого збиралися шишки.

Таким чином, отримане чітке електрофоретичне розділення алельних продуктів 20 локусів дозволяє використовувати їх в якості маркерів для дослідження генетичної структури, підрозділеності та диференціації *P. abies* в межах ареалу в Українському Поліссі.

Матеріали статті отримані за дослідженнями згідно з проектом науково-дослідних робіт молодих учених НАН України "Особливості генетичної структури та системи схрещування природних популяцій ялини європейської (*Picea abies* (L.) Karst.) в Українському Поліссі та Карпатах" (№ ДР 0107U007097). Автори висловлюють подяку Ліснічук А.М. – зам. директора Кременецького ботанічного саду за зібраний матеріал *P. abies* в Українському Поліссі.

1. *Алтухов Ю.П.* Аллозимный полиморфизм в природной популяции ели европейской *Picea abies* (L.) Karst. Сообщение 1. Системы полиморфизма и механизмы их генного контроля / Ю.П. Алтухов, К.В. Крутовский, Н.И. Гафаров и др. // Генетика. – 1986. – 22, № 8. – С. 2135–2151.
2. *Гончаренко Г.Г.* Популяционная и эволюционная генетика елей Палеарктики / Г.Г. Гончаренко, В.Е. Падутов. – Гомель: Изд-во Ин-та леса НАН Беларуси, 2001. – 197 с.
3. *Динамика* популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / Ю.П. Алтухов, Е.А. Салменкова, О.Л. Курбатова и др. – М.: Наука, 2004. – 619 с.
4. *Коршиков И.И.* Популяционно-генетические проблемы дендротехногенной интродукции (на примере сосны крымской) / И.И. Коршиков, Н.С. Терлыга, С.А. Бычков. – Донецк: ООО «Лебедь», 2002. – 328 с.
5. *Коршиков И.И.* Популяционно-генетическая структура ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.) в Украинских Карпатах / И.И. Коршиков, С.Н. Привалихин // Генетика. – 2007. – 43, № 12. – С. 1627–1636.
6. *Крутовский К.В.* Генетическая изменчивость сибирской кедровой сосны *Pinus sibirica* Du Tour. Сообщение I. Механизмы генного контроля изоферментных систем / К.В. Крутовский, Д.В. Политов, Ю.П. Алтухов // Генетика. – 1987. – 23, № 12. – С. 2216–2228.

7. *Ларионова А. Я.* Наследование аллозимных вариантов у ели сибирской (*Picea obovata* Ledeb.) / А. Я. Ларионова // Генетика. – 1995. – 31, № 9. – С. 1261–1267.
8. *Пірко Я.В.* Генетичне різноманіття ізоферментів сосни гірської (*Pinus mugo* Turra) в природних популяціях Українських Карпат / Я.В. Пірко // Цитология и генетика. – 2000. – 34, № 5. – С. 55–60.
9. *Пирко Я.В.* Генетический контроль изоферментов сосны кедровой европейской (*Pinus cembra* L.) Украинских Карпат / Я.В. Пирко, И.И. Коршиков // Цитология и генетика. – 2001. – 35, № 4. – С. 33–37.
10. *Привалихин С.Н.* Популяционно-генетическое разнообразие ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.) в Украинских Карпатах: дис. …канд. биол. наук: 03.00.15 / Привалихин Сергей Николаевич. – Донецк, 2008. – 195 с.
11. *Привалихин С.Н.* Генетический контроль изоферментов ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.) Украинских Карпат / С.Н. Привалихин, И.И. Коршиков, Н.Н. Пирко и др. // Цитология и генетика. – 2006. – 40, № 2. – С. 20–26.
12. *Cheliak W.* Segregation of allozymes in megagametophytes of viable seeds from a natural population of jack pine, Pinus banksiana Lamb. / W. Cheliak, K. Morgan, B. Dancik et al. // Theor. Appl. Genet. – 1984. – 69, № 2. – P. 145 – 151.
13. *Giannini R.* Allozyme variation in Italian population of *Picea abies* (L.) Karst. / R. Giannini, M. Morgante, G.G. Vendramin // Silvae Genetica. – 1991. – 40, № 3–4. – P. 160–166.
14. *Krutovski K.V.* Introgresive hybridization and phylogenetic relationships between Norway, *Picea abies* (L.) Karst., and Siberian *P. obovata* Ledeb., spruce species studies by isozyme loci / K.V. Krutovski, F. Bergmann // Heredity. – 1995. – 74, № 5. – P. 464–480.
15. *Lewandowski A.* Allozyme variation of *Picea abies* in Poland / A. Lewandowski, J. Burczyk // Scand. J. For. Res. – 2002. – 17. – P. 487–494.
16. *Prakash S.* A molecular approach to the study of genic variation in central, marginal and isolated populations of *Drosophila pseudoobscura* / S. Prakash, R.C. Lewontin, J.L. Hubby // Genetics. – 1969. – 61. – P. 841–858.

Донецький ботанічний сад НАН України Отримано 09.07.2008

УДК 575.174.015.3 (477.8)

ГЕНЕТИЧНИЙ КОНТРОЛЬ ІЗОФЕРМЕНТНИХ СИСТЕМ *PICEA ABIES* (L.) KARST. В УКРАЇНСЬКОМУ ПОЛІССІ

С.М. Приваліхін, І.В. Макогон

Донецький ботанічний сад Національної академії наук України

Вивчено генетичний контроль ферментів *GOT, FDH, ACP, GDH, ADH, SOD, DIA, LAP, MDH* в мегагаметофітах насіння *Picea abies* (L.) Karst. з природної популяції в Українському Поліссі. Отримано чітке електрофоретичне розділення для алельних продуктів 20 локусів. Дослідження сегрегації алелів гетерозиготних дерев в цілому підтверджує моногенне успадкування виявлених алозимних варіантів.

UDC 575.174.015.3 (477.8)

GENETIC CONTROL OF *PICEA ABIES* (L.) KARST. ISOENZYME SYSTEMS IN IN UKRAINIAN POLISSIA

S.N. Privalikhin, I.V. Makogon

Donetsk Botanical Gardens, Nat. Acad. Sci. of Ukraine

Genetic control of *GOT, FDH, ACP, GDH, ADH, SOD, DIA, LAP, MDH* enzymes has been studied in the seed megagametophytes of *Picea abies* (L.) Karst. from natural populations in Ukrainian Polissia. Efficient electrophoretic separation has been determined for allele products at 20 loci. Segregation analysis of the revealed allele variants on the whole confirms their monogenic inheritance.