

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ИЗОФЕРМЕНТОВ СОСНЫ КОХА В ГОРНОМ КРЫМУ

И.И. КОРШИКОВ¹, доктор биологических наук;
Т.И. ВЕЛИКОРИДЬКО¹, кандидат биологических наук;
В.П. КОБА², доктор биологических наук;
Д.Ю. ПОДГОРНЫЙ²,
Л.А. КАЛАФАТ¹,
Е.М. ГОРЛОВА¹

¹Донецкий ботанический сад НАН Украины, г. Донецк

²Никитский ботанический сад – Национальный научный центр

Введение

Сосна Коха (*Pinus kochiana* Klotzsch ex C. Koch), распространенная в Горном Крыму и на Кавказе, не имеет отчетливо выраженных морфологических отличий от евросибирской сосны обыкновенной (*P. sylvestris* L.). По этой причине к 70-м годам XX века для этой крымско-кавказской сосны было предложено 8 видовых названий и 17 наименований меньшего ранга [3]. Л.Ф. Правдин [10] в своей классической монографии по внутривидовой изменчивости и систематике сосны обыкновенной выделил *P. kochiana* как ранг подвида *P. sylvestris*. Е.Г. Бобров [3], проведя анализ палеогеографического прошлого Эвксинской ботанико-географической провинции, охватывающей Горный Крым, Западное Закавказье, Северную Анталию и причерноморскую Болгарию, приходит к выводу, что крымско-кавказская сосна связана больше с южноевропейской сосной, а не с бореальной евросибирской. Правда в плейстоцене кавказская сосна была поглощена пришедшей с севера таежной сосной. Однако во второй половине голоцена создавались более благоприятные условия для расселения кавказской сосны, которая начала вытеснять бореальную, образуя с ней интрогрессивные гибриды. В результате этого произошло замещение евросибирской бореальной *P. sylvestris* и преобладающим видом стала *P. kochiana*. Учитывая сложную и, по мнению многих исследователей, неоднозначную историю происхождения эвксинской сосны *P. kochiana*, следует отметить, что данный объект представляет значительный интерес для геносистематических исследований.

Перспективным и широко используемым методом геносистематики хвойных является сравнительный анализ электрофоретически разделяемых белков ферментной природы изучаемых таксонов. Биологические особенности размножения хвойных (формирование женского гаметофита или мегагаметофита, митотически произошедшего от одной гаплоидной мегаспоры [11]) позволяют установить генетический контроль изоферментов у голосеменных. У гетерозиготных деревьев по отдельным

локусам аллели в мегагаметофитах должны сегрегировать в соотношении 1:1 [1]. Расщепление однотипных аллелей одного локуса у гетерозиготных по нему деревьев в популяциях одного вида также должно происходить в соответствии 1:1. На этом и основан анализ генетического контроля изоферментов у хвойных.

Задачей нашей работы являлось проведение анализа генетического контроля изоферментов 9 ферментных систем у *P. kochiana* с целью дальнейшего расширения популяционно-генетического изучения данного вида в Горном Крыму и выяснения его геносистематических связей с *P. sylvestris*.

Объекты и методы исследований

Объектом исследований были 59 деревьев *P. kochiana* из двух природных популяций Горного Крыма, расположенных на высоте 1350 м н.у.м. В популяциях *P. kochiana* были собраны семена с деревьев, возраст которых варьировал от 80 до 200 лет. Для электрофореза использовали экстракты в трис-глициновом буфере с добавками из 7-8 эндоспермов (мегагаметофитов) семян каждого растения. Методика приготовления экстрактов и электрофоретического разделения изоферментов в вертикальных пластинках 7,5 %-ного полиакриламидного геля, гистохимическое выявление зон ферментативной активности, подробно описана нами ранее [5, 8, 9]. Аллельный характер наблюдаемых электрофоретических вариантов был установлен с помощью анализа их расщепления у гаплоидных эндоспермов гетерозиготных деревьев. Полученные сегрегационные соотношения одинаковых изозимных фенотипов гетерозиготных деревьев суммировались и проверялись стандартным методом χ^2 на соответствие ожидаемому менделевскому соотношению 1:1.

Результаты и обсуждение

В результате проведенного электрофоретического исследования девяти ферментных систем у сосны Коха выявлено 43 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. В изучаемых популяциях локус Got-1 оказался мономорфным. В локусе Got-2 и Got-3 выявлено по два аллеля, соответственно: Got-2^{1,12}, Got-2^{1,00} и Got-3^{1,50}, Got-3^{1,00}. Эти же аллели Got-2, Got-3 ранее нами были выявлены у *P. sylvestris* в природных популяциях степной и лесостепной зон, Полесья и Украинских Карпатах [7]. В природных популяциях *P. sylvestris* на Украине [7], в центральных и краевых популяциях восточной Европы и Сибири [4], Зауралья [2], Латвии, Германии и Южного Урала [12] локус

Got-1 был слабополиморфным, а для высокополиморфного локуса Got-2 обнаружено соответственно 5, 4, 6, 8 аллелей. В указанных географических районах и странах в популяциях *P. sylvestris* локус Got-3 был представлен 4-7 аллелями. У близкородственной реликтовой сосны меловой (*Pinus sylvestris* L. var. *cretacea* Kalenicz. ex Kom.), занимающей ограниченный природный ареал на меловых отложениях правого берега р. Северский Донец на севере Донецкой области, локус Got-1 оказался мономорфным, а для локуса Got-2 и Got-3 установлено соответственно 2 и 3 аллеля [6].

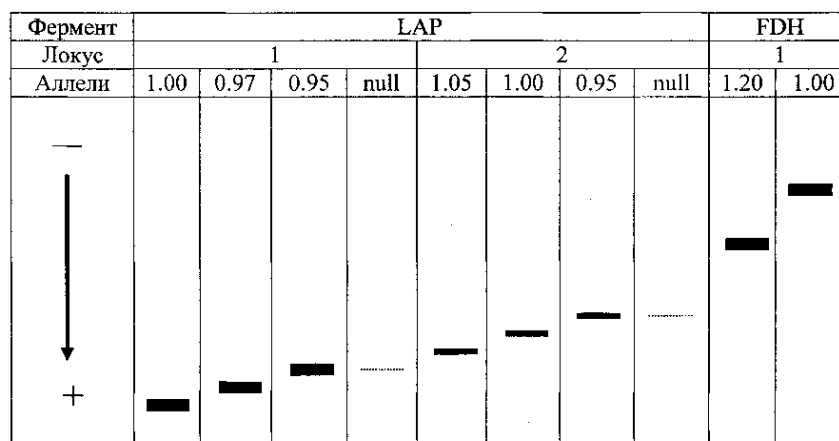
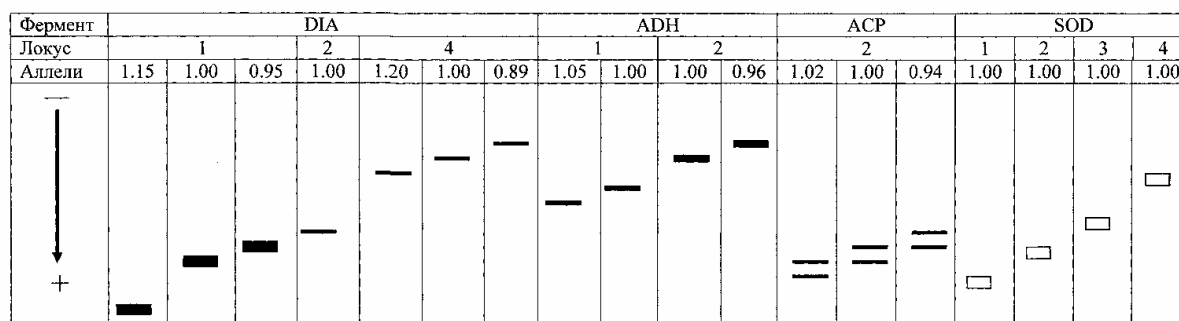
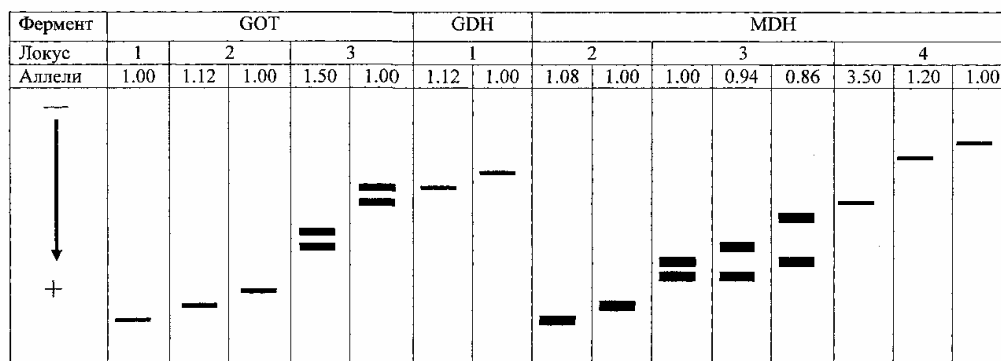


Рис. Схематичное изображение аллельных вариантов 20 локусов сосны Коха (*Pinus kochiana* Klotzsch ex C. Koch).

Глутаматдегидрогеназа (GDH, К.Ф. 1.4.1.2). При гистохимическом окрашивании проявляется одна зона активности фермента, которая контролируется одним локусом с двумя аллелями Gdh-1^{1.12} и Gdh-1^{1.00}. Эти же аллели обнаружены в украинских степных, лесостепных, полесских и реликтовых карпатских популяциях *P. sylvestris* [7], а также в донбасской популяции *P. sylvestris* L. var. *cretacea* [6]. В других частях ареала *P. sylvestris* описано три аллеля этого локуса [2, 4, 12].

Алкогольдегидрогеназа (ADH, К.Ф. 1.1.1.1). Локализуется на геле в виде двух зон, которые контролируются двумя локусами: Adh-1 и Adh-2. Для обоих локусов установлено по два аллеля: Adh-1^{1.02*}, Adh-1^{1.00} и Adh-2^{1.10*}, Adh-2^{1.00}. Аллели Adh-1^{1.02*} и Adh-2^{1.10*} в общей выборке анализируемых деревьев встречались с низкой частотой, не превышающей 0,05, поэтому были отнесены к категории редких (здесь и далее редкие аллели обозначены знаком *). Такие же аллели этих локусов обнаружены в украинских популяциях *P. sylvestris*, однако их представительство было большим: пять для Adh-1 и четыре для Adh-2 [7]. Три аллеля у обеих локусов выявлено у *P. sylvestris* L. var. *cretacea* [6]. От 2 до 4 аллелей локуса Adh-1 обнаружено в популяциях *P. sylvestris* на территории Латвии, Беларуси, Украины и России. Локус Adh-2 в этих популяциях представлен 3-5 аллелями [2, 4].

Диафораза (DIA, К.Ф. 1.6.4.3). Электрофоретический спектр данного фермента у *P. kochiana* представлен четырьмя зонами активности, которые контролируются четырьмя локусами: Dia-1, Dia-2, Dia-3 и Dia-4. Зона активности фермента, контролируемая локусом Dia-3, при гистохимическом окрашивании проявлялась нестабильно, поэтому в дальнейшем не анализировалась. В локусе Dia-1 обнаружено три аллеля: Dia-1^{1.15}, Dia-1^{1.00} и Dia-1^{0.90}. Вторая зона активности, контролируемая локусом Dia-2, оказалась мономорфной. Наиболее медленная зона – локус Dia-4 характеризуется наличием трех аллелей: Dia-4^{1.10}, Dia-4^{1.00} и Dia-4^{0.89}. В украинских популяциях *P. sylvestris* установлено для локуса Dia-1 шесть, для локуса Dia-2 и Dia-4 по три аллеля [7]. У *P. sylvestris* L. var. *cretacea* выявлено по три аллеля в локусах Dia-1, Dia-2 и два аллеля в локусе Dia-4 [6].

Малатдегидрогеназа (MDH, К.Ф. 1.1.1.37). Изоферментный спектр MDH состоит из множества полос, которые в целом кодируются четырьмя локусами: Mdh-1, Mdh-2, Mdh-3 и Mdh-4. Локус Mdh-1 проявлялся нестабильно, поэтому в дальнейшем он не анализировался. Локус Mdh-2 был представлен двумя аллелями Mdh-2^{1.08*}, Mdh-2^{1.00}, Mdh-3 – тремя аллелями: Mdh-3^{1.00}, Mdh-3^{0.94*}, Mdh-3^{0.86}, как и Mdh-4: Mdh-4^{3.50}, Mdh-4^{1.20}, Mdh-4^{1.00}. У *P. sylvestris* в локусе Mdh-1 и Mdh-2 выявлено 2-3 аллеля, Mdh-3 – 2-10 аллелей и Mdh-4 – 4-5 аллелей [2, 4, 7, 12]. Два аллеля установлено в локусе Mdh-2 у *P. sylvestris* var. *cretacea*, а в локусах Mdh-3 и Mdh-4 их было соответственно 4 и 5 [6].

Лейцинаминопептидаза (LAP, К.Ф. 3.4.11.1). У P. kochiana данный фермент проявлялся в виде двух зон активности, которые контролируются двумя локусами: Lap-1 и Lap-2. Оба локуса представлены четырьмя аллелями: Lap-1^{null*}, Lap-1^{1.05*}, Lap-1^{1.00}, Lap-1^{0.95} и Lap-2^{null*}, Lap-2^{1.05*}, Lap-2^{1.00} и Lap-2^{0.95}. Эти же аллели обнаружены в украинских популяциях *P. sylvestris* и *P. sylvestris* var. *cretacea* [6, 7]. В других частях ареала *P. sylvestris* в локусе Lap-1 обнаружено 3-4 аллеля, а в локусе Lap-2 – пять аллелей [2, 4, 12].

Таблица

Сегрегация аллельных вариантов в эндоспермах гетерозиготных деревьев *Pinus kochiana* Klotzsch ex С. Koch в Горном Крыму

Генотип дерева	Количество изученных деревьев	Соотношение аллелей	χ^2
Got-2 ^{1.12/1.00}	26	81:93	0,83
Got-3 ^{1.50/1.00}	26	84:92	0,36
Gdh-1 ^{1.12/1.00}	20	73:61	1,07
Dia-1 ^{1.00/0.90}	26	101:111	0,47
Dia-1 ^{1.15/0.90}	2	6:8	0,29
Dia-1 ^{1.15/1.00}	3	11:9	0,20
Dia-4 ^{1.10/1.00}	7	27:21	0,75
Dia-4 ^{1.00/0.89}	1	4:3	0,14
Mdh-2 ^{1.08/1.00}	7	19:30	2,47
Mdh-3 ^{1.00/0.86}	25	90:82	0,37
Mdh-3 ^{1.00/0.94}	1	2:5	1,29
Mdh-3 ^{0.94/0.86}	2	9:4	1,92
Mdh-4 ^{3.50/1.00}	4	11:16	0,93
Mdh-4 ^{3.50/1.20}	1	4:3	0,14
Mdh-4 ^{1.20/1.00}	8	24:31	0,89
Fdh-1 ^{1.20/1.00}	4	15:20	0,71
Асп-2 ^{1.02/1.00}	2	4:10	2,57
Асп-2 ^{1.00/0.94}	27	89:87	0,02
Lap-1 ^{1.05/1.00}	2	4:10	2,57
Lap-1 ^{1.00/0.95}	21	75:67	0,45
Lap-1 ^{1.00/null}	2	2:10	5,33 ¹
Lap-2 ^{1.05/1.00}	3	7:15	2,91
Lap-2 ^{1.00/0.95}	11	44:40	0,19
Lap-2 ^{1.00/null}	1	2:4	0,67
Adh-1 ^{1.02/1.00}	9	30:30	0,00
Adh-2 ^{1.00/0.95}	7	22:19	0,22

Примечание. Различия достоверны при $P < 0,95$.

Кислая фосфатаза (ACP, К.Ф. 3.1.3.2). На гелевых пластинках наблюдается до пяти зон активности этого фермента, однако, для анализа использовали только одну зону, которая проявлялась наиболее четко. Локус *Asp P. kochiana* представлен тремя аллелями: $Asp^{1.02*}$, $Asp^{1.00}$ и $Asp^{0.94}$. В популяциях *P. sylvestris* и *P. sylvestris* var. *cretacea* на территории Украины выявлено по четыре аллеля [6, 7]. В Зауралье в популяциях *P. sylvestris* локус *Asp* представлен пятью аллелями [2], а в популяциях этого вида на территории Германии, Латвии и России – шестью аллелями [12].

Формиатдегидрогеназа (FDH, К.Ф. 1.2.1.2). При окрашивании гелевых пластинок проявляется одна зона активности, которая кодируется одним локусом – *Fdh*. Этот локус *P. kochiana* представлен двумя аллелями: $Fdh-1^{1.20}$ и $Fdh-1^{1.00}$. В украинских популяциях *P. sylvestris* и *P. sylvestris* var. *cretacea* выявлено соответственно 4 и 3 аллеля этого локуса [6, 7]. В других частях ареала *P. sylvestris* за пределами Украины описано 4-6 аллелей локуса *Fdh* [2, 12].

Супероксиддисмутаза (SOD, К.Ф. 1.15.1.1). На электрофореграммах была представлена четырьмя мономорфными зонами активности, которые соответствуют локусам: *Sod-1*, *Sod-2*, *Sod-3* и *Sod-4*. Четыре зоны активности фермента, которые кодируются четырьмя локусами, обнаружены нами и в украинских популяциях *P. sylvestris* и *P. sylvestris* var. *cretacea* [6, 7]. Однако в них локус *Sod-4* был слабополиморфным и представлен двумя аллелями.

В результате проведенных исследований изучена изменчивость изоферментов девяти ферментных систем, которые у *P. kochiana* в популяциях Горного Крыма контролируются 20 генными локусами. Шесть локусов – *Got-1*, *Dia-2*, *Sod-1*, *Sod-2*, *Sod-3* и *Sod-4* в этих популяциях *P. kochiana* были мономорфными. Анализ сегрегации обнаруженных аллелей у гетерозиготных деревьев в целом подтверждает моногенный тип их наследования (табл. 1). Только у одного из 26 выявленных гетерозиготных генотипов отмечено нарушение сегрегации аллелей от ожидаемого менделевского соотношения 1:1, что составляет 3,8 % от общего количества генотипов. Такое и большее (до 25 %) количество генотипов со смещенной сегрегацией обычная норма для природных популяций хвойных [1, 8]. Исследуемые аллозимные локусы имеют моногенный тип наследования и могут быть использованы для изучения генетической структуры, подразделенности и дифференциации популяций *P. kochiana* в пределах природного ареала этого вида, а также для выяснения генетического сходства и различий с другими видами рода *Pinus* L.

Выводы

1. В результате электрофоретического разделения и анализа изменчивости изоферментов 9 ферментных систем у 59 деревьев *P.*

kochiana установлен их генетический контроль по 19 генным локусам для этого вида.

2. В исследуемых двух популяциях *P. kochiana* в Горном Крыму не обнаружено видоспецифичных аллелей и их представительство в целом по всем локусам у этого таксона заметно меньше, чем в популяциях широкоареальной *P. sylvestris*.

Список литературы

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. – Т. 22, № 8. – С. 2135 – 2151.

2. Белоконь Ю.С., Политов Д.В., Белоконь М.М. и др. Генетический контроль изоферментов сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) из Зауралья // Генетика. – 1995. – Т. 31, №11. – С. 1521–1528.

3. Бобров Е.Г. Лесообразующие хвойные СССР. – Л.: Наука, 1978. – 189 с.

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. – Т. 29, № 12. – С. 2019–2037.

5. Корочкин Л.И., Серов О.Л., Пудовкин А.И. и др. Генетика изоферментов – М: Наука, 1977. – 275 с.

6. Коршиков И.И., Тунда С.М. Популяційно-генетична різноманітність сосни крейдяної // Доповіді НАН України. – 2004. – №7. – С. 182–186.

7. Коршиков И.И., Калафат Л.А., Пирко Я.В. и др. Популяционно-генетическая изменчивость сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в основных лесорастительных районах Украины // Генетика. – 2005. – Т. 41, № 2. – С. 216–228.

8. Пирко Я.В. Генетичне різноманіття ізоферментів сосни гірської (*Pinus mugo* Turra) в природних популяціях Українських Карпат // Цитология и генетика. – 2000. – Т. 34, № 5. – С. 55 – 60.

9. Пирко Я.В., Коршиков И.И. Генетический контроль изоферментов сосны кедровой европейской (*Pinus cembra* L.) Украинских Карпат // Цитология и генетика. – 2001. – Т. 35, № 4. – С. 33 – 37.

10. Правдин Л.Ф. Сосна обыкновенная. Изменчивость, внутривидовая систематика и селекция. – М.: Наука, 1964. – 192 с.

11. Рейвн П., Эверт Р., Айкхорн С. Современная ботаника: Пер. с англ. В 2-х т. – М.: Мир, 1990. – Т. 1. – 348 с.

12. Шигапов З.Х., Бахтиярова Р.М., Янбаев Ю.А. Генетическая изменчивость и дифференциация природных популяций сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) // Генетика. – 1995. – Т. 31, № 10. – С. 1386–1393.

Genetic control of *Pinus kochiana* Klotzsch ex C.Koch isozymes in the Crimean Mountains

Korshikov I.I., Velikoridko T.I., Koba V.P., Podgorny D. Yu., Kalafat L.A., Gorlova E.M.

Variability of nine enzymes: GOT, GDH, DIA, MDH, SOD, FDH, ADH, ACP, LAP isozymous spectra has been analyzed using electrophoresis. Enzymes were extracted from seed megagametophytes of 59 trees from two *Pinus kochiana* Klotzsch ex C.Koch natural populations in the Crimean Mountains. Their genetic control has been determined, 43 alleles of 20 gene loci have been identified. Mendel heterozygotes allele segregation analyses testifies to their monogenous inheritance.