

И.И. КОРШИКОВ, А.В. НИКОЛАЕВА

Донецкий ботанический сад НАН Украины,

83059 Донецк-59, пр-т Ильича, 110

E-mail: herb@herb.dn.ua

**ГЕНЕТИЧЕСКИЙ
КОНТРОЛЬ АЛЛОЗИМОВ
У МОЖЖЕВЕЛЬНИКА ВЫСОКОГО
(*JUNIPERUS EXCELSA* ВИБ.)
В КРЫМУ**



*Изучен генетический контроль девяти ферментных систем у охраняемого вида можжевельника высокого (*Juniperus excelsa* Vieb.) из природной популяции Горного Крыма. В результате электрофоретического разделения изоферментов, экстрагируемых из гаплоидных эндоспермов семян, идентифицированы 16 локусов, из которых 14 оказались полиморфными (*Gdh*, *Got-1*, *Mdh-1*, *Mdh-2*, *Mdh-3*, *Acp-1*, *Acp-2*, *Acp-3*, *Lap-1*, *Dia-1*, *Fdh*, *Sod-1*, *Sod-2*, *Sod-3*). Анализ сегрегации аллелей гетерозиготных деревьев подтверждает их моногенное наследование.*

© И.И. КОРШИКОВ, А.В. НИКОЛАЕВА, 2007

Введение. Формирование природоохранной стратегии для видов, находящихся под угрозой исчезновения, требует оценки генетического разнообразия в еще уцелевших популяционных системах. Это одна из основных задач новой научной дисциплины – природоохранной генетики [1, 2]. В этом контексте из семи занесенных в «Червону книгу України» [3] видов хвойных лесообразующих популяционно-генетическое разнообразие изучено только для сосны меловой (*Pinus sylvestris* L. var. *cretacea* Kalenicz. ex Kom.) [4].

Популяционная численность охраняемого реликтового средиземноморского вида – можжевельника высокого (*Juniperus excelsa* Vieb.), произрастающего на южных склонах Горного Крыма от мыса Айя до Карадага, постоянно сокращается из-за вырубок, строительства и избыточной рекреационной нагрузки. К тому же этот вид на северном пределе природного распространения слабо возобновляется вследствие низких урожаев семян и их плохого качества [5]. Последнее, возможно, следствие инбридинга, так как в Крыму *J. excelsa* расселяется небольшими группами, а также одиночными растениями на крутых щебенисто-каменистых приморских склонах до высоты 400 м над уровнем моря. Изучение популяционно-генетического разнообразия *J. excelsa* в пределах естественного ареала в Крыму интересно в двух аспектах: выяснения особенностей генетической структуры маргинальных слабо возобновляемых популяций и в связи с проблемами искусственного воспроизводства или восстановления тех популяций, структура которых уже нарушена.

Без особых затруднений популяционно-генетическое разнообразие хвойных видов можно определить, если в качестве молекулярных маркеров генотипа использовать изоферменты. Именно изоферменты широко применяют для определения генетической структуры, подразделенности и дифференциации популяций многих видов хвойных в пределах их естественных ареалов, а также для мониторинга генетических процессов [1, 2, 6]. Первый этап таких исследований предусматривает установление генетического контроля изоферментов у анализируемого вида. Для хвойных по причине особенности репродуктивного цикла эта задача решается успешно и без каких-либо предварительных скрещиваний. Наличие гаплоидно-

го эндосперма в их семенах, произошедшего путем митоза из одной гаплоидной мегаспоры, позволяет анализировать у материнского дерева сегрегационные отношения аллелей одного локуса непосредственно по эндоспермам, гаплотипы которых соответствуют гаплотипам яйцеклетки [6].

Цель работы — установление генетического контроля изоферментов девяти ферментных систем *J. excelsa* из природной популяции Горного Крыма.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужили семена, собранные нами в 2004—2005 гг. с 30 деревьев *J. excelsa*, произрастающих в буферной зоне государственного заповедника «Мыс Мартьян» (пгт Никита, Крым). Для электрофореза использовали экстракты ферментов из эндоспермов семян. Однако одной из особенностей семян представителей семейства *Cupressaceae* Rich. Ex Bartl. является то, что зародыш в покоящихся семенах плохо определяется визуально, что усложняет процесс его изъятия из семени и приводит к вероятности попадания белков диплоидной ткани зародыша в анализируемый экстракт. Решением указанной проблемы для *J. excelsa* является предварительное замачивание надрезанных семян в дистиллированной воде, при их набухании зародыши легко отделяются от эндоспермов. Кроме того, шишкоягоды *J. excelsa* характеризовались очень высокой пустосемянностью — при обработке 30 шишкоягод одного растения иногда удавалось получить только 5 полноценных семян.

Электрофоретическое разделение ферментов проводили в вертикальных пластинках 7,5%-ного полиакриламидного геля с рН разделяющего геля 8,9 и трис-глициновым электродным буфером рН 8,3 [7]. Гистохимическое проявление зон ферментативной активности на гелевых образцах осуществляли по общепринятым методикам с небольшими модификациями [8]. Для обозначения ферментов, локусов, аллелей использовали систему Пракаша [9]. У большинства растений анализировали ферменты из эндоспермов не менее чем 7 семян, а у деревьев с высокой пустосемянностью — все имеющиеся полнозернистые семена. Полученные сегрегационные отношения аллозимов гаплоидных эндоспермов суммировали для каждой гетеро-

зиготы и проверяли на соответствие ожидаемому соотношению 1 : 1 стандартным критерием χ^2 .

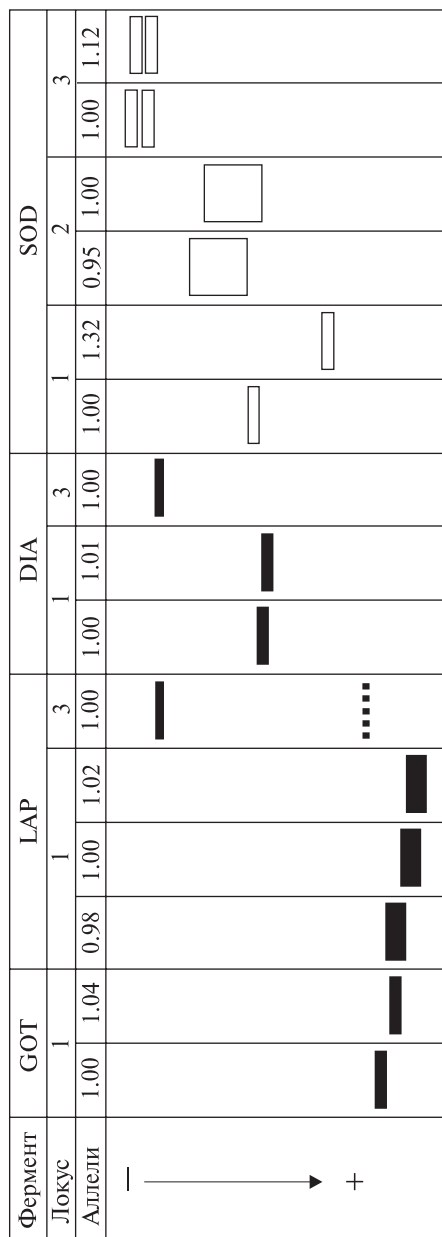
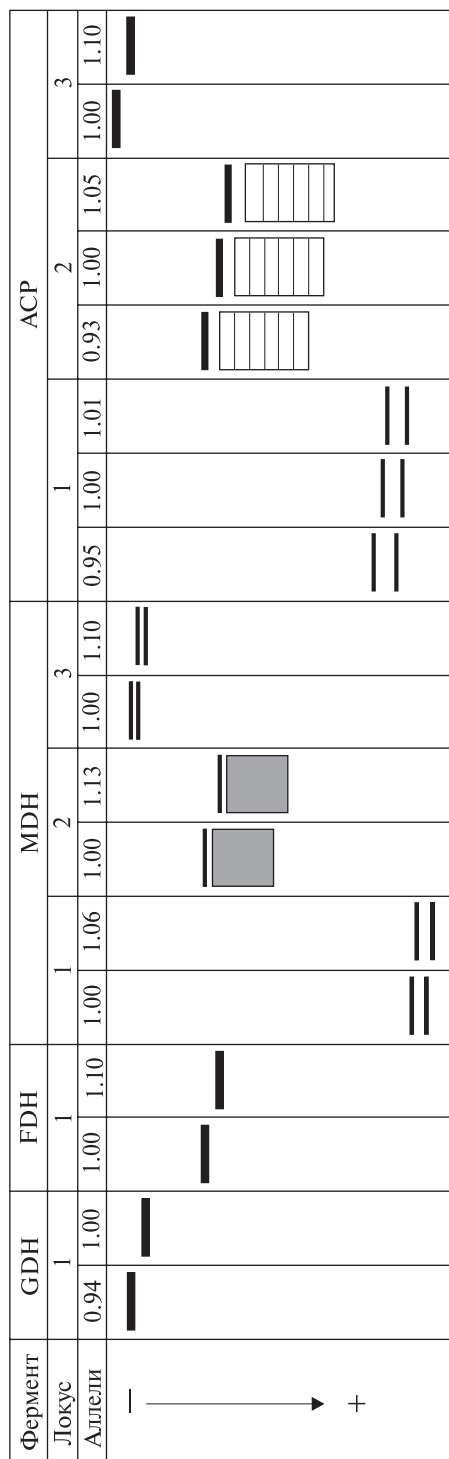
Результаты исследований и их обсуждение. В ходе проведенного электрофоретического анализа девяти ферментных систем *J. excelsa* интерпретировано 16 локусов и идентифицировано для них 33 аллельных варианта. Их схематическое изображение представлено на рисунке.

Глутаматдегидрогеназа (GDH, К.Ф. 1.4.1.2). Проявляется на гелевых пластинках при окрашивании в виде одной изменчивой зоны активности, контролируемой одним локусом Gdh. Выявлено два аллеля этого локуса — Gdh^{1.00}, Gdh^{0.94}. У другого вида — *Juniperus phoenicea* L. в популяциях на территории Испании и Португалии также обнаружен один локус GDH и два аллеля этого локуса [10]. В Турции один локус Gdh-A с 2—4 аллелями установлен в популяциях *Cupressus sempervirens* L. [11].

Формиатдегидрогеназа (FDH, К.Ф. 1.2.1.2). На электрофореграммах этот фермент проявляется в виде одной полиморфной зоны активности. В изученной популяции *J. excelsa* для локуса Fdh описано два аллельных варианта — Fdh^{1.10} и Fdh^{1.00}.

Эстераза (EST, К.Ф. 3.1.1.1) локализуется на геле в четырех зонах активности. Однако только одна зона имеет четкий стабильный спектр, пригодный для генетического анализа. У *J. excelsa* локус Est оказался мономорфным. У *Austrocedrus chilensis* (анализ зародышевых корешков) наблюдали до трех зон активности фермента, при этом в локусе Est-1 отмечены два аллеля, а локус Est-2 кодировался тремя аллелями. Инвариантным у данного вида был локус Est-3 [12].

Глутаматоксалоацетаттрансаминаза (GOT, К.Ф. 2.6.1.1). На гелевых пластинках фермент проявлялся в виде двух зон активности. Медленно мигрирующая зона окрашивалась очень слабо, нестабильно и в дальнейшем ее не анализировали. Быстро мигрирующая зона кодируется одним локусом Got-1, представленным двумя двухполосными аллельными вариантами Got-1^{1.04} и Got-1^{1.00}. В эндоспермах семян *Juniperus phoenicea* [13] и *Austrocedrus chilensis* (D. Don) двух популяций в Патагонии (Аргентина) [13] также идентифицирован один локус GOT. В другой работе, где в анализе применяли зародышевые корешки *A. chilensis*, описано три зоны активности GOT, кодируемые тремя



Схематическое изображение и обозначение электрофоретических аллельных вариантов 16 локусов можжевельника высокого (*Juniperus excelsa* Vieb.)

мономорфными локусами [12]. В хвое *Metasequoia glyptostroboides* из центральных районов Китая выявлен один локус GOT, который оказался мономорфным [14].

Лейцинаминопептидаза (LAP, 3.4.11.1). При окрашивании обнаружены три зоны активности этого фермента, контролируемые тремя локусами — Lar-1, Lar-2, Lar-3. Наиболее стабильное окрашивание давали самая «быстрая» и самая «медленная» зоны. Локус Lar-2 проявлялся нечетко и нерегулярно. В связи с этим в дальнейшем его не использовали в анализе. Локус Lar-1 оказался полиморфным и имел три аллельных варианта — Lar-1^{1.02}, Lar-1^{0.98} и Lar-1^{1.00}, а локус Lar-3 был мономорфным. У двух видов рода *Cupressus* L. — *C. sempervirens* [11] и *C. dupreziana* идентифицирован один локус LAP, представленный пятью и четырьмя аллельными вариантами соответственно [15].

Диафороза (DIA, К.Ф. 1.6.4.3). Электрофоретический спектр этого фермента представлен тремя зонами активности, кодируемыми тремя локусами — Dia-1, Dia-2, Dia-3. Однако локус Dia-2 проявлялся слабо и только при достаточно большой нагрузке субстратом, поэтому в дальнейшем его не анализировали. В локусе Dia-1 идентифицировали три аллеля — Dia-1^{1.06}, Dia-1^{0.95} и Dia-1^{1.00}, а локус Dia-3 был мономорфным.

Малатдегидрогеназа (MDH, К.Ф. 1.1.1.37). На электрофореграммах проявляется много зон активности этого фермента. Идентифицировано три локуса — Mdh-1, Mdh-2, Mdh-3. Первый и третий локусы представлены двумя аллелями (Mdh-1^{1.06} и Mdh-1^{1.00}; Mdh-3^{1.10} и Mdh-3^{1.00} соответственно). Локус Mdh-2 проявляется в виде двух размытых зон, которые сливаются вместе, образуя одно пятно. В указанном локусе установлено два аллеля — Mdh-2^{1.13} и Mdh-2^{1.00}. Такое же число локусов обнаружено при исследовании эндоспермов *Austrocedrus chilensis*, однако все они были мономорфными [13]. По два локуса указанного фермента описаны для других представителей семейства *Cupressaceae* — *Juniperus phoenicea*, *Metasequoia glyptostroboides*, *Cupressus sempervirens* [10, 11, 14]. При этом у *C. sempervirens* оба локуса MDH были полиморфны и представлены двумя аллелями [11].

Кислая фосфатаза (ACP, К.Ф. 3.1.3.2). Спектр ACP эндоспермов семян *J. excelsa* довольноно

Сегрегация аллельных вариантов в эндоспермах гетерозиготных деревьев *Juniperus excelsa* Bieb. и природной популяции Горного Крыма

Генотип дерева	Число гетерозигот	Соотношение аллелей	χ^2 -тест (1 : 1)
Gdh-1 ^{0.94/1.00}	10	40:27	2,52
Got-1 ^{1.04/1.00}	15	50:38	1,64
Mdh-1 ^{1.06/1.00}	7	21:12	2,45
Mdh-2 ^{1.13/1.00}	17	66:47	3,19
Mdh-3 ^{1.10/1.00}	14	56:30	7,86 **
Acp-1 ^{1.01/1.00}	9	32:20	2,77
Acp-1 ^{0.95/1.00}	5	17:13	0,53
Acp-2 ^{0.93/1.00}	16	75:54	3,42
Acp-2 ^{1.05/1.00}	6	33:26	0,83
Acp-2 ^{1.05/0.93}	1	4:3	0,14
Acp-3 ^{1.10/1.00}	21	77:42	10,29 **
Lap-1 ^{1.02/1.00}	4	15:14	0,03
Lap-1 ^{0.98/1.00}	16	56:66	0,82
Dia-1 ^{1.06/1.00}	14	36:28	1,00
Fdh-1 ^{1.10/1.00}	2	8:2	3,60
Sod-1 ^{1.32/1.00}	10	18:33	4,41*
Sod-2 ^{0.95/1.00}	16	51:35	2,98
Sod-3 ^{1.12/1.00}	18	28:19	1,72

Примечание. Достоверное нарушение сегрегации при * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001.

сложен и состоит из множества полос. Однако для анализа использовали только три зоны активности, кодирование которых осуществляется тремя локусами — Acp-1, Acp-2 и Acp-3. Все локусы оказались полиморфными. В локусах Acp-1 и Acp-2 выявлено по три аллельных варианта (Acp-1^{1.01} и Acp-1^{0.95}, Acp-1^{1.00} и Acp-2^{0.93}, Acp-2^{1.05}, Acp-2^{1.00} соответственно), а в локусе Acp-3 — два (Acp-3^{1.00} и Acp-3^{1.10}). При анализе ACP экстрактов хвои *Metasequoia glyptostroboides* установлено два мономорфных локуса [14].

Супероксиддисмутаза (SOD, К.Ф. 1.15.1.1). На гелевых пластинках отмечены три зоны активности этого фермента, которые кодируются локусами Sod-1, Sod-2, Sod-3. Все три локуса оказались полиморфными, диаллельными: Sod-1^{1.32}, Sod-1^{1.00}; Sod-2^{0.95}, Sod-2^{1.00}; Sod-3^{1.12}, Sod-3^{1.00}.

Таким образом, для *J. excelsa* из природной популяции Горного Крыма проведен электрофоретический анализ изменчивости изоферментов девяти ферментных систем и диагностировано 16 генных локусов. Из изученной совокупности локусов в исследуемой популяции

два — Dia-3, Lap-3 — оказались мономорфными. В целом аллельные варианты 15 гетерозиготных генотипов сегрегируют в соотношении, близком к 1 : 1, а у трех — с достоверным нарушением (таблица). Доля этих генотипов составляла 16,7 %. Нарушение сегрегации аллелей — довольно часто встречающееся явление в природных популяциях многих видов хвойных [16, 17] и связано, как правило, с мейотическими нарушениями, сцеплением летелей, гаметическим драйвом, хромосомными перестройками, гаметическим и эмбриональным отбором [1]. Может встречаться у 25 % генотипов [18]. Полученные нами данные подтверждают, что аллельные продукты 16 локусов наследуются у *J. excelsa* как моногенные признаки и их можно использовать в качестве молекулярных маркеров для исследования генетической структуры, подразделенности и дифференциации природных популяций *J. excelsa* в Крыму.

SUMMARY. Genetical control of nine enzyme systems has been studied in preserved juniper species (*Juniperus excelsa* Vieb.) of the natural population of the mountain Crimea. Isozymes were extracted from the haploid seed endosperms and separated electrophoretically. As a result 16 loci have been identified. Fourteen of them were polymorphic (14 — Gdh, Got-1, Mdh-1, Mdh-2, Mdh-3, Acp-1, Acp-2, Acp-3, Lap-1, Dia-1, Fdh, Sod-1, Sod-2, Sod-3). Analysis of the allele segregation of the heterozygous trees confirmed their monogenic inheritance.

РЕЗЮМЕ. Вивчали генетичний контроль дев'яти ферментних систем у ялівцю високого (*Juniperus excelsa* Vieb.) з природної популяції Гірського Криму. В результаті електрофоретичного розділення ферментів, що екстрагуються з гаплоїдних ендоспермів насіння, ідентифікували 16 локусів, з яких 14 виявились поліморфними (Gdh, Got-1, Mdh-1, Mdh-2, Mdh-3, Acp-1, Acp-2, Acp-3, Lap-1, Dia-1, Fdh, Sod-1, Sod-2, Sod-3). Аналіз сегрегації алелів гетерозиготних дерев підтверджує їх моногенне наслідування.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. — 3-е изд. — М.: Академкнига, 2003. — 431 с.
2. 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.
3. Червона книга України : Рослинний світ / Під ред.

- Ю.Р. Шеляг-Сосонко та ін. — К.: УЕ, 1996. — 608 с.
4. Коршиков И.И., Тунда С.М. Популяційно-генетична різноманітність сосни крейдяної // Доп. НАН України. — 2004. — № 7. — С. 182—186.
5. Григоров А.Н. Семеношение и качество семян можжевельника высокого в Крыму // Бюл. Гос. Никит. бот. сада. — 1979. — Вып.3(40). — С. 10—13.
6. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / Под ред. Ю.П. Алтухова. — М.: Наука, 2004. — 619 с.
7. Davis B.J. Disk electrophoresis. 2. Methods and applications to human serum proteins // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1964. — 121. — P. 67—65.
8. Корочкин Л.И., Серов О.Л., Пудовкин А.И. и др. Генетика изоферментов. — М.: Наука, 1977. — 275 с.
9. Prakash S., Lewontin R.C., Hubby J.L. A molecular approach to the study of genetic variation in central, marginal and isolated populations of *Drosophila pseudoobscura* // Genetics. — 1969. — 61. — P. 841—858.
10. Lewandowski A., Samocko J. Inheritance and linkage of allozymes in *Juniperus phoenicea* L. (Cupressaceae) // Acta soc. bot. pol. — 2000. — 69, № 3. — P. 201—205.
11. Raddi S., Sumer S. Genetic diversity in natural *Cupressus sempervirens* L. populations in Turkey // Biochem. system. and ecol. — 1999. — 27. — P. 799—814.
12. Ferreyra L.L., Latino A., Calderon A., Gardenal C.N. Allozyme polymorphism in *Auaastrocedrus chilensis* (D. Don) florin and Boutelje from Patagonia, Argentina // Silvae Genet. — 1996. — 45, № 2/3. — P. 61—64.
13. Pastorino M.J., Gallo L.A. Linkage relationships as a useful tool to state interspecific gene homology: case study with isozyme loci in *Auaastrocedrus chilensis* (Cupressaceae) // Silvae Genet. — 2001. — 50, № 5/6. — P. 233—239.
14. Kuser J.E., Sheely D.L., Hendricks D.R. Genetic variation in two *ex situ* collections of the rare *Metasequoia glyptostroboides* (Cupressaceae) // Silvae Genet. — 1997. — 46, № 5. — P. 258—264.
15. Pichot C., Fady B. Lack of mother tree alleles in zymograms of *Cupressus dupreziana* A-Camus embryos // Ann. Forest Sci. — 2000. — 57. — P. 17—22.
16. 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.
17. Rudin D., Ekberg I. Linkage studies in *Pinus sylvestris* L. — using macrogametophyte allozymes // Silvae Genet. — 1978. — 27. — P. 1—12.
18. Коршиков И.И., Терлыга Н.С., Бычков С.А. Популяционно-генетические проблемы дендротехногенной интродукции (на примере сосны крымской). — Донецк : Лебедь, 2002. — 328 с.

Поступила 25.04.06