

И.И. Коршиков, А.В. Николаева, Л.А., Калафат, А.В. Егорова, Т.А. Иваничко

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ АЛЛОЗИМОВ У МОЖЖЕВЕЛЬНИКА КОЛЮЧЕГО (*JUNIPERUS OXYCEDRUS* L.) В КРЫМУ

Juniperus oxycedrus, изоферменты, генетический контроль, Крым

Введение

Уникальные лесные сообщества Горного Крыма – можжевельниковые редколесья в последние четверть века подвергаются возрастающей прямой и опосредованной антропогенной нагрузке. Площади этих редколесий постоянно сокращаются, а в связи с аномальными летними засухами существенно снижаются и темпы естественного возобновления природных популяций, в частности, можжевельника колючего (*Juniperus oxycedrus* L.). Этот вид в Крыму находится на северном пределе своего естественного распространения. Неблагоприятные условия в период цветения растений, а также их удаленность друг от друга в редколесьях могут способствовать развитию процессов инбридинга. Сохранение генетического разнообразия популяционных систем можжевельниковых в Крыму становится реальной проблемой, так как именно популяционное разнообразие определяет потенциал адаптации и эволюции вида. Изучение популяционно-генетического разнообразия *J. oxycedrus* 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, 5]. Первый этап таких исследований предусматривает установление генетического контроля изоферментов у анализируемого вида. Для хвойных по причине особенностей репродуктивного цикла эта задача решается успешно и без каких-либо предварительных скрещиваний. Наличие гаплоидного 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 [5].

Цель работы – установление генетического контроля изоферментов 9 ферментных систем *J. oxycedrus* из природных популяций Горного Крыма.

Объекты и методика

Материалом для исследования послужили семена, собранные нами в 2008–2009 гг. с 30 деревьев *J. oxycedrus* в популяциях «Агармыш» (район Старого Крыма) и «Байдарская долина». Для электрофореза использовали экстракты ферментов из эндоспермов семян. 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 данной проблемы для *J. oxycedrus* является предварительное замачивание надрезанных семян в дистиллированной воде, при их набухании зародыши легко отделяются от эндоспермов.

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 [10]. Гистохимическое проявление зон ферментативной активности на гелевых пластинках осуществляли по общепринятым методикам с небольшими модификациями [6]. Для обозначения ферментов, локусов, аллелей использовали систему С. Пракаша [16]. У большинства растений анализировали ферменты из эндоспермов не менее чем 7 семян, а у деревьев с высокой пустосемянностью – все имеющиеся полнозернистые семена. Аллельный характер обнаруженных в процессе электрофореза вариантов ферментов устанавливали на основании изучения их сегрегации среди гаплоидных эндоспермов семян деревьев. В соответствии с менделевскими закономерностями при моногенном наследовании у деревьев, гетерозиготных по какому-либо локусу, аллельные варианты ферментов (аллозимы) должны сегрегировать в соотношении 1:1 [1]. Полученные сегрегационные отношения аллозимов гаплоидных эндоспермов суммировали для каждой гетерозиготы и проверяли на соответствие ожидаемому соотношению 1:1 стандартным критерием χ^2 .

Результаты исследований и их обсуждение

В ходе электрофоретического анализа 9 ген-ферментных систем в эндоспермах семян *J. oxycedrus* было выявлено 18 локусов. Схема расположения локусов приведена на рисунке.

Глутаматоксалоацетаттрансаминаза (GOT, 2.6.1.1). При гистохимическом окрашивании гелевых пластинок обнаружено две зоны активности фермента, два локуса – Got-1 и Got-2. Оба локуса оказались мономорфными. Один локус и два аллеля (Got-1^{1.04} и Got-1^{1.00}) обнаружены у *J. excelsa* в популяциях Крыма. Также идентифицирован один локус GOT в эндоспермах семян *Juniperus phoenicea* L. [13] и *Austrocedrus chilensis* (D. Don) двух популяций в Патагонии (Аргентина) [14]. В другой работе, где в анализе применяли зародышевые корешки *A. chilensis*, описано три зоны активности GOT, кодируемые тремя мономорфными локусами [11]. В хвое *Metasequoia glyptostroboides* из центральных районов Китая выявлен один локус GOT, который оказался мономорфным [12].

Глутаматдегидрогеназа (GDH, 1.4.1.2). На гелях проявляется одна изменчивая зона активности фермента, контролируемая одним локусом – Gdh. Было обнаружено два его аллельных варианта Gdh^{0.94} и Gdh^{1.00} в популяции Агармыш, а в популяции Байдарская долина этот фермент мономорфен. Один локус и два аллеля этого локуса обнаружены у *J. excelsa* [9] и у другого вида – *J. phoenicea* [13]. Один локус Gdh–A с 2–4 аллелями установлен в популяциях *Cupressus sempervirens* L. в Турции [17].

Формиатдегидрогеназа (FDH, 1.4.1.2). На электрофореграммах эндоспермов семян *J. oxycedrus* фермент проявляется в виде одной мономорфной зоны активности Fdh. У *J. excelsa* в популяциях на территории м. Мартьян (пгт Никита, Крым) также обнаружен один локус Fdh и два его аллельных варианта [9]. Однако, у *J. excelsa*, произрастающего на м. Айя, было выявлено три аллельных варианта: Fdh^{0.97}, Fdh^{1.00} и Fdh^{1.10} [10].

Малатдегидрогеназа (MDH, 1.1.1.37). На электрофореграммах отмечено много зон активности фермента. Идентифицировано три локуса – Mdh-1, Mdh-2 и Mdh-3. Локус Mdh-1 проявлялся не стабильно, поэтому в дальнейших исследованиях не использовали. Локус Mdh-2 представлен двумя аллелями (Mdh-2^{1.00}, Mdh-2^{1.13}), а локус Mdh-3 – тремя (Mdh-3^{0.90}, Mdh-3^{1.00}, Mdh-3^{1.10}). Три локуса обнаружено при исследовании эндоспермов *J. excelsa* [9] с 2–3 аллелями и у *Austrocedrus chilensis*, однако все они были мономорфными [14]. По два локуса данного фермента описаны для других представителей семейства Cupressaceae – *Juniperus phoenicea*, *Metasequoia glyptostroboides*, *Cupressus sempervirens* [12, 13, 17]. При этом у *C. sempervirens* оба локуса MDH были полиморфны и представлены двумя аллелями [17].

Супероксиддисмутаза (SOD, 1.15.1.1). Электрофоретический спектр этого фермента представлен тремя зонами активности, которые кодируются локусами Sod-1, Sod-2 и Sod-3. Локусы представлены следующими аллелями: Sod-1^{1.00}, Sod-1^{1.32}, Sod-2^{0.95}, Sod-2^{1.00}, Sod-2^{1.05}, Sod-3^{0.95}, Sod-3^{1.00} и Sod-3^{1.05}. Три диаллельных локуса обнаружено *J. excelsa* [9].

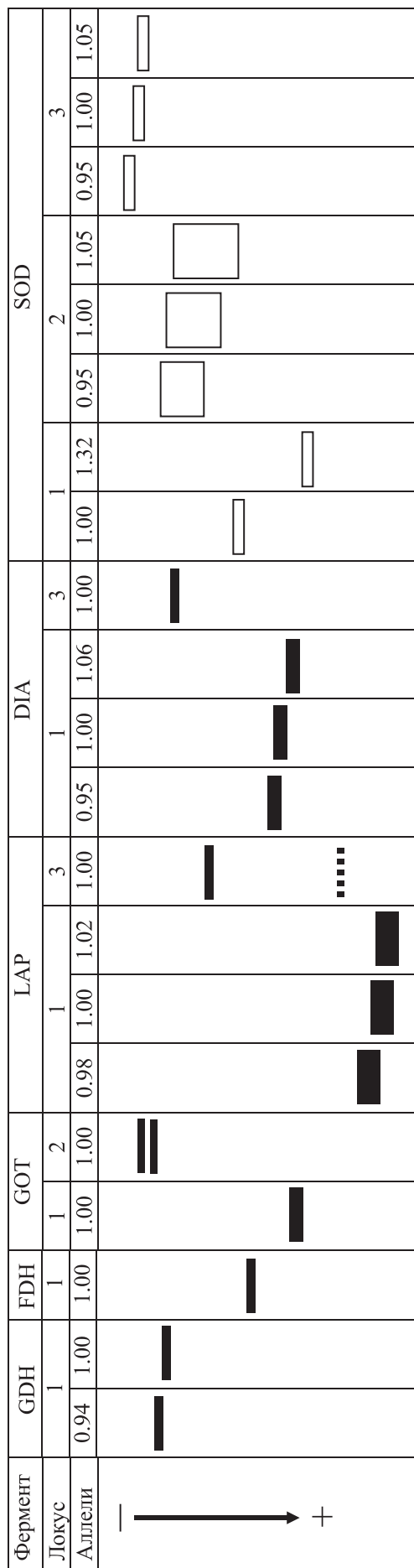
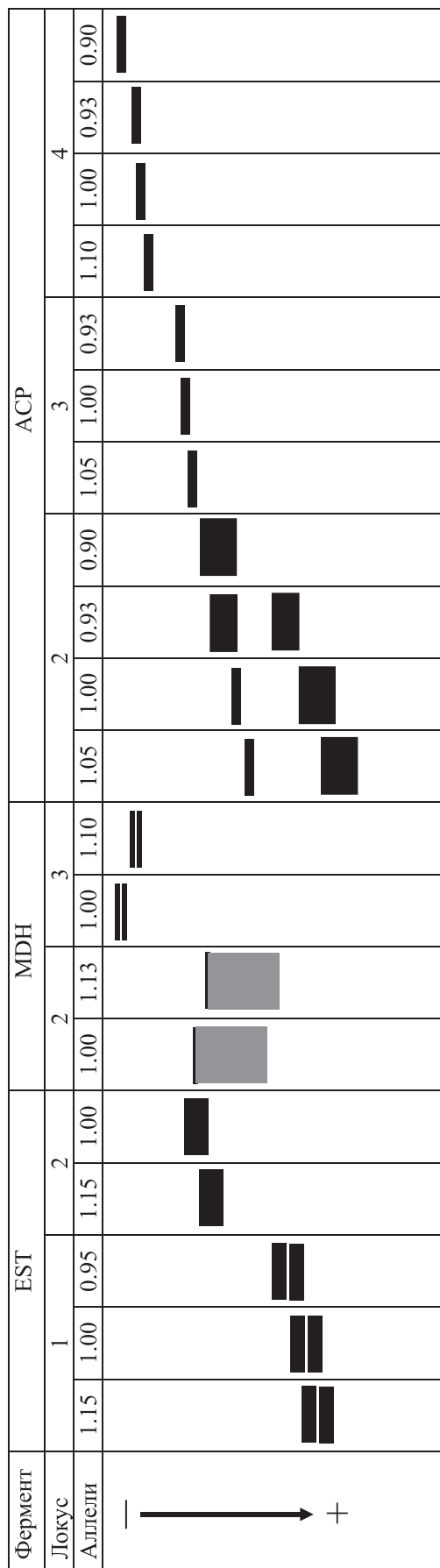


Рис. Схематическое изображение и обозначение электрофоретических аллельных вариантов 18 локусов можжевельника коллочного (*Juniperus oxycedrus* L.)

Эстераза (EST, 3.1.1.1). При окрашивании гелевых пластин наблюдали проявление четырех зон активности. Однако стабильное окрашивание давали только две зоны. В связи с этим в дальнейшем их и использовали в анализе. Локус Est-1 представлен тремя аллелями (Est-1^{1.15}, Est-1^{1.00}, Est-1^{0.95}), а локус Est-2 – двумя (Est-2^{1.15}, Est-2^{1.00}). У *J. excelsa* обнаружен один локус Est, который оказался мономорфным [9]. При анализе зародышевых корешков у *Austrocedrus chilensis* 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 [11].

Диафораза (DIA, 1.6.4.3). Спектр DIA эндоспермов семян представлен тремя зонами активности, которые кодируются тремя локусами: Dia-1, Dia-2 и Dia-3. Но локус Dia-2 проявлялся нечетко и нерегулярно, поэтому в дальнейшем его не анализировали. У *J. oxycedrus* для локуса Dia-1 описано три аллельных варианта – Dia-1^{0.95}, Dia-1^{1.00} и Dia-1^{1.06}, локус Dia-3 оказался мономорфным. Такое же количество локусов и аллелей отмечено и у *J. excelsa* [9].

Лейцинаминопептидаза (LAP, 3.4.11.1). При окрашивании наблюдали проявление трех зон активности. Обнаружено три локуса: Lap-1, Lap-2 и Lap-3. Локус Lap-2 проявлялся довольно слабо и в дальнейшем его не использовали в анализе. Локус Lap-1 оказался полиморфным и имел три аллельных варианта Lap-1^{0.98}, Lap-1^{1.00}, Lap-1^{1.02}, локус Lap-3 был мономорфным, также как и у *J. excelsa* [9]. У двух видов рода *Cupressus* L: *C. sempervirens* [17] и *C. dupreziana* A. Camus [15] идентифицирован один локус LAP, представленный пятью и четырьмя аллельными вариантами соответственно.

Таблица. Сегрегация аллельных вариантов в эндоспермах гетерозиготных деревьев *Juniperus oxycedrus* L. в природных популяциях Горного Крыма

Генотип дерева	Число гетерозигот	Соотношение аллелей	χ^2 -тест
Gdh-1 ^{0.94/1.00}	8	1:7	4,5*
Sod-1 ^{0.70/1.00}	17	6:11	1,5
Sod-2 ^{0.95/1.00}	12	5:7	0,3
Sod-2 ^{1.00/1.05}	15	10:5	1,7
Sod-3 ^{0.95/1.00}	6	3:3	0
Sod-3 ^{1.00/1.05}	11	6:5	0,1
Mdh-2 ^{0.87/1.00}	105	62:43	3,4
Mdh-3 ^{0.90/1.00}	38	18:20	0,1
Mdh-3 ^{1.00/1.05}	33	17:16	0,1
Dia-1 ^{0.95/1.00}	56	31:25	0,6
Lap-1 ^{0.98/1.00}	55	24:31	0,9
Lap-1 ^{1.00/1.02}	7	5:2	1,3
Acp-2 ^{0.90/1.00}	34	20:14	1,1
Acp-2 ^{0.93/1.00}	20	16:4	7,2**
Acp-2 ^{1.00/1.05}	21	11:10	0,1
Acp-3 ^{0.90/0.93}	8	5:3	0,5
Acp-3 ^{0.93/1.00}	49	22:27	0,5
Acp-3 ^{1.10/1.10}	71	35:36	0,1
Est-1 ^{0.95/1.00}	126	83:53	6,6**
Est-1 ^{1.00/1.15}	21	13:8	1,2
Est-2 ^{1.00/1.15}	33	22:11	3,7

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

Кислая фосфатаза (АСР, 3.1.3.2). Спектр этого фермента довольно сложен и имеет несколько полос. Для анализа нами были взяты три четкие зоны активности, кодирование которых осуществлялось тремя генными локусами (Аср-2, Аср-3 и Аср-4) Локусы Аср-2 и Аср-4 имели по четыре аллельных варианта (Аср-2^{0.90}, Аср-2^{0.93}, Аср-2^{1.00}, Аср-2^{1.05} и Аср-4^{0.90}, Аср-4^{0.93}, Аср-4^{1.00}, Аср-4^{1.10}), а локус Аср-3 – три (Аср-3^{0.93}, Аср-3^{1.00}, Аср-3^{1.05}). У *J. excelsa* в локусе Аср-2 обнаружено три аллельных варианта, а в локусе Аср-3 – два [9]. При анализе АСР экстрактов хвои *Metasequoia glyptostroboides* установлено два мономорфных локуса [12].

Таким образом, для *J. oxycedrus* из природных популяций Горного Крыма проведен электрофоретический анализ изменчивости изоферментов 9 ферментных систем и диагностировано 18 генных локусов. Из изученной совокупности локусов в исследуемой популяции пять – Got-1, Got-2, Dia-3, Fdh, Lap-3 – оказались мономорфными. В целом аллельные варианты 15 гетерозиготных генотипов сегрегируют в соотношении близком к 1:1, а у 3-х – с достоверным нарушением (табл.). Доля этих генотипов составляла 14,3 %. Нарушение сегрегации аллелей довольно часто встречающееся явление в природных популяциях многих видов хвойных [3, 18] и связано, как правило, с мейотическими нарушениями, сцеплением леталей, гаметическим драйвом, хромосомными перестройками, гаметическим и эмбриональным отбором [1] и может встречаться у 25% генотипов [7]. Полученные нами данные подтверждают, что аллельные продукты 18 локусов наследуются у *J. oxycedrus* как моногенные признаки и их можно использовать в качестве молекулярных маркеров для исследования генетической структуры, подразделенности и дифференциации природных популяций *J. oxycedrus* в Крыму.

1. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях / Юрий Петрович Алтухов. – 3-е изд. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2003. – 431 с.
2. Алтухов Ю.П. Наследственное биохимическое разнообразие в процессах эволюции и индивидуального развития / Ю.П. Алтухов, Л.И. Корочкин, Ю.Г. Рычков // Генетика. – 1996. – 32, № 11. – С. 1450–1473.
3. Генетический контроль изоферментов сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) из Зауралья / Ю.С. Белоконь, Д.В. Политов, М.М. Белоконь, К.В. Крутовский // Генетика. – 1995. – 31, № 11. – С. 1521–1528.
4. Григоров А. Н. Семеновое и качество семян можжевельника высокого в Крыму / А.Н. Григоров // Бюл. Гос. Никитского ботан. сада. – 1979. – Вып. 3 (40). – С. 10–13.
5. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / Под ред. Ю.П. Алтухова. – М.: Наука, 2004. – 619 с.
6. Корочкин Л.И. Генетика изоферментов / Л.И. Корочкин, О.Л. Серов, А.И. Пудовкин и др. – М: Наука, 1977. – 275 с.
7. 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.
8. Коршиков И.И. Генетический полиморфизм можжевельника высокого (*Juniperus excelsa* Bieb.) в Горном Крыму / И.И. Коршиков, А.В. Николаева, Т.А. Иваничко, А.И. Репецкая // Промислова ботаника: стан та перспективи розвитку: Матер. V міжнар. наук. конф. – 2007. – С. 228–230.
9. Коршиков И.И. Генетический контроль аллозимов у можжевельника высокого (*Juniperus excelsa* Bieb.) в Крыму / И.И. Коршиков, А.В. Николаева // Цитология и генетика. – 2007. – Т. 41, № 4. – С. 15–20.
10. Davis B.J. Disk electrophoresis. II. Methods and application to human serum proteins / B.J. Davis // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 1964. – V. 121. – P. 404–427.
11. Ferreyra L.L. Allozyme polymorphism in *Auastrocedrus chilensis* (D. Don) florin and Boutelje from Patagonia, Argentina / L.L. Ferreyra, A. Latino, A. Calderon, C.N. Gardenal // Silvae Genetica. – 1996. – Vol. 45, № 2–3 – P. 61–64.
12. Kuser J. E. Genetic variation in two *ex situ* collections of the rare *Metasequoia glyptostroboides* (Cupressaceae) / J.E. Kuser, D.L. Sheely, D.R. Hendricks // Silvae Genetica. – 1997. – Vol. 46, № 5 – P. 258–264.
13. Lewandowski A. Inheritance and linkage of allozymes in *Juniperus phoenicea* L. (Cupressaceae) / A. Lewandowski, J. Samocko // Acta societatis botanicorum poloniae. – 2000. – Vol. 69, № 3 – P. 201–205.
14. Pastorino M.J. Linkage relationships as a useful tool to state interspecific gene homology: case study with isozyme loci in *Auastrocedrus chilensis* (Cupressaceae) / M.J Pastorino, L.A. Gallo // Silvae Genetica – 2001. – Vol. 50, № 5–6. – P. 233–239.
15. Pichot C. Lack of mother tree alleles in zymograms of *Cupressus dupreziana* A-Camus embryos / C. Pichot, B. Fady // Annals of Forest Science. – 2000. – Vol. 57. – P. 17–22.

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. – Vol. 61. – P. 841–858.
17. Raddi S. Genetic diversity in natural *Cupressus sempervirens* L. populations in Turkey / S. Raddi, S. Sumer // *Biochemical systematics and ecology*. – 1999. – Vol. 27. – P. 799–814.
18. Rudin D. Linkage studies in *Pinus sylvestris* L. – using macro gametophyte allozymes / D. Rudin, I. Ekberg // *Silvae Genetica*. – 1978. – Vol. 27. – P. 1–12.

Донецкий ботанический сад НАН Украины

Получено 05.08.2011

УДК 575.113:582.477.6(477.75)

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ АЛЛОЗИМОВ У МОЖЖЕВЕЛЬНИКА КОЛЮЧЕГО
(*JUNIPERUS OXYCEDRUS* L.) В КРЫМУ

И.И. Коршиков, А.В. Николаева, Л.А. Калафат, А.В. Егорова, Т.А. Иваничко

Донецкий ботанический сад НАН Украины

Изучен генетический контроль 9 ферментных систем у можжевельника колючего (*Juniperus oxycedrus* L.) из природных популяций Горного Крыма. В результате электрофоретического разделения изоферментов, экстрагируемых из гаплоидных эндоспермов семян, идентифицированы 18 локусов, из которых 13 (Gdh, Mdh-2, Mdh-3, Acp-2, Acp-3, Acp-4, Lap-1, Dia-1, Sod-1, Sod-2, Sod-3, Est-1, Est-2) полиморфные. Анализ сегрегации аллелей подтверждает их моногенное наследование у гетерозигот.

УДК 575.113:582.477.6(477.75)

GENETIC CONTROL OF ALLOZYMES OF THE JUNIPER PRICKLY
(*JUNIPERUS OXYCEDRUS* L.) IN THE CRIMEA

I.I. Korshikov, A.V. Nikolaeva, L.A. Kalafat, A.V. Yegorova, T.A. Ivanichko

Donetsk Botanical Garden, National Academy of Sciences of Ukraine

Genetic control of 9 enzyme systems of the juniper prickly (*Juniperus oxycedrus* L.) from natural populations of the Crimean Mountains has been studied. After electrophoretic separation of isoenzymes extracted from haploid endosperms of seeds 18 loci have been identified. Thirteen of them (Gdh, Mdh-2, Mdh-3, Acp-2, Acp-3, Acp-4, Lap-1, Dia-1, Sod-1, Sod-2, Sod-3, Est-1, Est-2) are polymorphic. The analysis of the allele segregation confirms their monogenic inheritance in heterozygotes.