

Е.Н. Виноградова¹, Л.А. Калафат¹, Н.А. Виноградова²

АЛЛОЗИМНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ НАСАЖДЕНИЙ *ACER PLATANOIDES* L. Г. ДОНЕЦКА

Acer platanoides L., эмиссии автотранспорта, повреждаемость, изоферменты

Введение

Наряду с эмиссиями промышленных предприятий, техногенная нагрузка на окружающую среду в индустриальных регионах усугубляется воздействием выхлопных газов. Наибольший уровень загрязнения выбросами автотранспорта наблюдается в крупных промышленных городах. Так, в 2010 году в Донецке на долю промышленных предприятий приходилось 5,8% общеобластного объема эмиссий, а на долю выхлопных газов – 26,7% [13]. Произрастающие вдоль автомагистрали насаждения древесных растений играют важную роль в оптимизации окружающей среды, однако их листовой аппарат нередко повреждается эмиссиями автотранспорта. В уличных насаждениях г. Донецка одним из наиболее широко представленных видов является клен остролистный (*Acer platanoides* L.), доля которого составляет 44% от общего количества деревьев рода *Acer* L. и 8% – от общего количества древесных растений [10]. Отдельные представители данного вида, произрастающие в аллейных посадках вдоль городских автомагистралей, значительно различаются между собой по жизненному состоянию, оцениваемому по уровню поврежденности листьев. При этом наши наблюдения на протяжении нескольких вегетационных периодов показали, что индивидуальная чувствительность растений *A. platanoides* к эмиссиям автотранспорта меняется мало [9]. Различия в устойчивости размножаемых семенным путем растений, произрастающих в одинаковых экологических условиях, зависят от особенностей генотипа и проявляются в результате взаимодействия наследственных факторов со средой [12, 14, 17]. Вероятно, разная чувствительность к эмиссиям автотранспорта растений *A. platanoides* обусловлена их внутривидовой генотипической неоднородностью.

Фенотипическими признаками, наиболее тесно отражающими генотипические особенности древесных растений, являются множественные молекулярные формы ферментов [3]. В этой связи удобным методом изучения генетической структуры как природных популяций, так и насаждений является электрофоретический анализ изоферментов [1, 2]. Генотипические особенности древесных растений в первую очередь отражает индивидуальная изменчивость ферментов листовых зачатков их терминальных почек, поскольку изоэнзимный состав листовых зачатков в период органического покоя растений, до начала активного внутрипочечного роста, относительно стабилен и слабо зависит от воздействия внешних факторов [3, 5, 17, 18].

Цель исследований – установить с помощью изоферментного анализа генотипические вариации девяти ген-ферментных систем *A. platanoides* в насаждениях вдоль городских автомагистралей для дальнейшего их использования в изучении генетических особенностей растений данного вида, различающихся по устойчивости к воздействию эмиссий автотранспорта.

© Е.Н. Виноградова, Л.А. Калафат, Н.А. Виноградова

Объекты и методика исследований

Материалом для исследований служили листовые зачатки *A. platanooides*. Вегетативные почки собирали в феврале 2013 года с 41 одновозрастного дерева (40–45 лет), произрастающих в аллеиной посадке вдоль крупной городской автомагистрали г. Донецка. Гомогенизацию почек осуществляли в 2–3 каплях экстрагирующего буфера – 0,05 М Трис-НСl (рН 8,0), содержащего поливинилпирролидон Х-50 (3%), трилон Б (0,02%) и β-меркаптоэтанол (0,05%). Разделение ферментов проводили методом диск-электрофореза в вертикальных пластинах 7,5%-ного полиакриламидного геля с рН разделяющего геля 8,9 [15]. Гистохимическое выявление зон ферментативной активности проводили по общепринятым методикам для следующих ферментных систем: *алкогольдегидрогеназа* (ADH, К.Ф. 1.1.1.1), *формиатдегидрогеназа* (FDH, К.Ф. 1.2.1.2), *глутаматдегидрогеназа* (GDH, К.Ф. 1.4.1.2), *глутаматоксалоацетаттрансаминаза* (GOT, К.Ф. 2.6.1.1), *диафороза* (DIA, К.Ф. 1.8.1.4), *кислая фосфатаза* (ACP, К.Ф. 3.1.3.2), *лейцинаминопептидаза* (LAP, К.Ф. 3.4.11.1), *малатдегидрогеназа* (MDH, К.Ф. 1.1.1.37), *супероксиддисмутаза* (SOD, 1.15.11) [4]. Аллели обозначали арабскими цифрами, возрастающими по мере уменьшения электрофоретической подвижности их аллозимов.

Результаты исследований и их обсуждение

Алкогольдегидрогеназа. При гистохимическом окрашивании фермент проявляется в виде одной зоны активности, которая, по-видимому, кодируется одним локусом Adh. Данный локус у изученных растений *A. platanooides* оказался мономорфным. Аналогичная картина выявлена М. Русанен с соавт. [17, 18] при анализе генетической структуры *A. platanooides* в Финляндии и Х.Х. Садыковым – на Южном Урале [5, 11].

Формиатдегидрогеназа. На гелевых пластинах также наблюдали одну зону активности фермента, которая, вероятно, кодируется одним локусом Fdh. Локус Fdh у растений *A. platanooides* также оказался инвариантным. При популяционно-генетическом исследовании *A. platanooides* на Южном Урале также выявлен один мономорфный локус данного фермента [11].

Глутаматдегидрогеназа. На электрофоретической пластинке глутаматдегидрогеназа проявляется в виде одной зоны активности, которая, по всей видимости, представляет один локус Gdh. У исследуемых растений *A. platanooides* локус Gdh представлен 2 аллельными вариантами: А1 и А2, из которых преобладающим является аллель А2 (относительная частота 0,79) (рис. 1). Ю.А. Янбаевым с соавт. у *A. platanooides* на Южном Урале выявлен один мономорфный локус Gdh [5].

Глутаматоксалоацетаттрансаминаза. Электрофоретический спектр данного фермента у *A. platanooides* представлен одной зоной активности, которая, предположительно, находится под контролем двух генных локусов: Got-A и Got-B, аллели которых частично перекрываются, что усложняет их идентификацию (рис. 2). Оба локуса представляют собой одно или трехполосные структуры, соответствующие гомо- и гетерозиготам соответственно. Локусы Got-A и Got-B оказались самыми изменчивыми из изученных локусов *A. platanooides*, каждый из них представлен 3 аллельными вариантами. В локусе Got-A наиболее часто встречаются аллели А2 и А3 (с относительной частотой 0,39 и 0,34 соответственно). В локусе Got-B преобладающим является аллель В1 (с относительной частотой 0,59), часто встречается также аллель В2 (относительная частота 0,37). Гетерозигота 13 локуса Got-A частично перекрывается гомозиготой 11 и гетерозиготой 12 локуса Got-B и гетерозигота 13 локуса Got-B частично перекрывается гомозиготой 33 локуса Got-A.

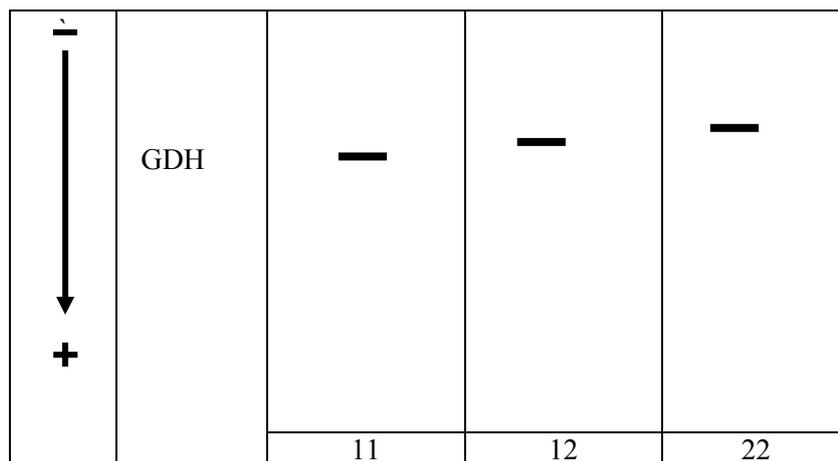


Рис. 1. Схематическое изображение электрофоретических вариантов фенотипов глутаматдегидрогеназы *Acer platanoides* L.: здесь и далее цифрами обозначена интерпретация фенотипов в качестве гомозиготных (11, 22) и гетерозиготных (12) генотипов

Fig.1. Schematic representation of electrophoretic options of phenotypes of glutamatedehydrogenase in *Acer platanoides* L.: from now on figures stand for interpretation of phenorhythm types as homozygous (11, 22) and heterozygous (12) genotypes

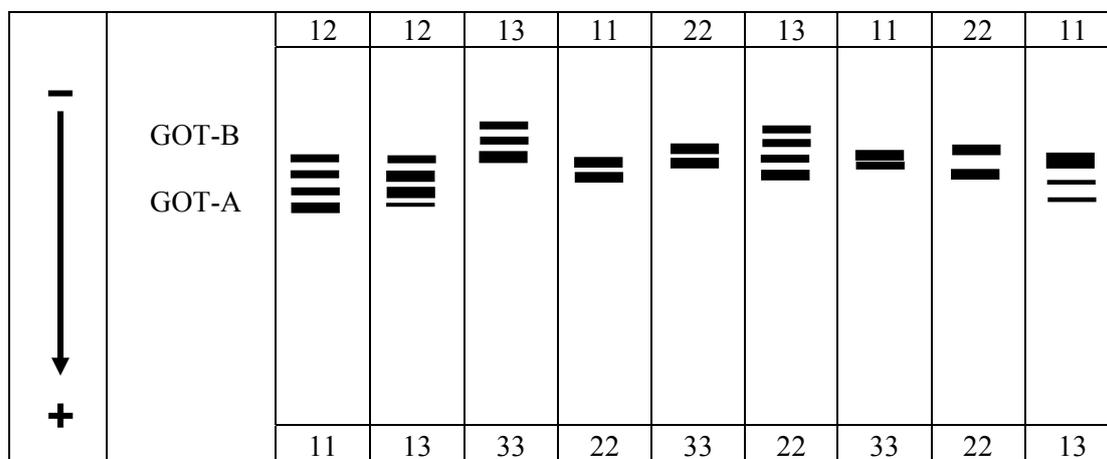


Рис 2. Схематическое изображение основных электрофоретических вариантов фенотипов глутаматоксалоацетаттрансаминазы *Acer platanoides* L.

Fig.2. Schematic representation of electrophoretic options of phenotypes of glutamateoxaloacetatetransaminase in *Acer platanoides* L.

Интерпретацию аллельных вариантов локусов, кодирующих глутаматоксалоацетаттрансаминазу, проводили по интенсивности окрашенных полос согласно М. Русанен с соавт., также выявившими у *A. platanoides* на территории Финляндии одну зону активности данного фермента, которая кодируется двумя частично перекрывающимися локусами, в каждом из которых выявлено по три

аллельных варианта [17]. Ю.А. Янбаевым с соавт. у *A. platanoides* на Южном Урале выявлено три локуса, кодирующих данный фермент. Между полиморфными Got-1 и Got-3, представленными тремя и пятью аллелями соответственно, проявлялся инвариантный локус Got-2 [5].

Диафораза. При гистохимическом окрашивании у *A. platanoides* выявлено две зоны активности DIA, которые, вероятно, представляют два локуса: Dia-A и Dia-B (рис. 3). Локус Dia-A у изучаемых растений оказался мономорфным, локус Dia-B – полиморфным, с тремя аллельными вариантами: B1, B2 и B3. Предоминантный аллель B2 встречался с относительной частотой 0,82. При исследовании особенностей генетического контроля *A. platanoides* на Южном Урале выявлена одна зона активности диафоразы, контролируемая локусом Dia, у которого идентифицировано три аллеля [5].

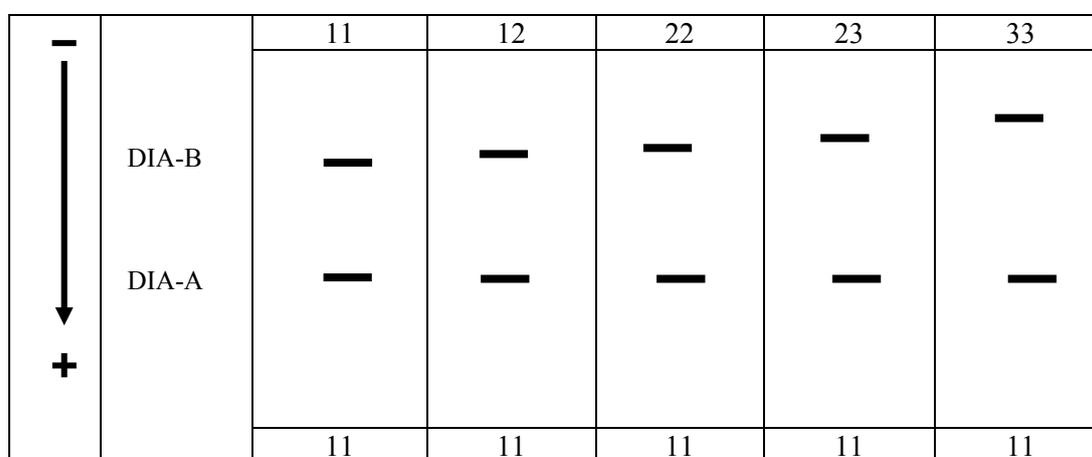


Рис. 3. Схематическое изображение электрофоретических вариантов фенотипов диафоразы *Acer platanoides* L.

Fig.3. Schematic representation of electrophoretic options of phenotypes of diaphorase in *Acer platanoides* L.

Кислая фосфатаза. При гистохимическом окрашивании на гелевых пластинках выявляется две – три зоны активности данного фермента (рис. 4).

Самая быстрая зона, предположительно контролируемая локусом Asp-A, была инвариантной. Вторая зона активности, контролируемая локусом Asp-B, оказалась полиморфной, представленной тремя аллельными вариантами: B1, B2 и B3 (см. рис. 4). Относительная частота предоминантного аллеля B2, проявляющегося на электрофореграмме в виде двойной полосы, 0,74. Наши данные согласуются с полученными при исследовании генетической структуры вида на Южном Урале, где также выявлено два локуса кислой фосфатазы. Первый, более быстрый локус, был мономорфным, во втором отмечено три аллеля [5].

	ACP-B	11	12	22	23	33
	ACP-A					
		11	11	11	11	11

Рис.4. Схематическое изображение электрофоретических вариантов фенотипов кислой фосфатазы *Acer platanoides* L.

Fig.4. Schematic representation of electrophoretic options of phenotypes of acid phosphatase in *Acer platanoides* L.

Лейцинаминопептидаза. Электрофоретический спектр этого фермента у *A. platanoides* представлен двумя зонами активности, которые по-видимому, представляют два генных локуса: Lap-A и Lap-B (рис. 5).

	LAP-B	22	22	22	22	22	22	22	00	23	23	23	23
	LAP-A												
		11	12	22	13	23	33	00	22	22	13	23	00

Рис. 5. Схематическое изображение электрофоретических вариантов фенотипов лейцинаминопептидазы *Acer platanoides* L.

Fig.5. Schematic representation electrophoretic options of phenotypes of the leucine aminopeptidase in *Acer platanoides* L.

В «быстрой» зоне, которая кодируется локусом Lap-A, идентифицировано четыре аллельных варианта: A1, A2, A3 и нулевой. Относительная частота преобладающего аллеля A2 составляет 0,63. «Медленная» зона, контролируемая локусом Lap-B, слабополиморфна, помимо основного аллеля B2 (с относительной частотой 0,90), выявлено еще два: B3 и нулевой, встречающиеся с низкой частотой

(0,05). При электрофоретическом разделении лейцинаминопептидазы у *A. platanoides* на территории Финляндии также выявлено два локуса, из которых полиморфным оказался только более быстрый локус, представленный тремя алелями [17].

Супероксиддисмутаза. На гелевых пластинках супероксиддисмутаза проявляется в виде четырех зон активности, которые, по-видимому, кодируются тремя локусами: Sod-A, Sod-B и Sod-C. Локус Sod-B проявляется двумя расположенными рядом паттернами. Все локусы супероксиддисмутазы у анализируемых растений оказались инвариантными. Проведенный ранее анализ изоферментного состава супероксиддисмутазы *A. platanoides* насаждений города Донецка выявил три стабильных локуса, идентифицированных у всех анализируемых растений, и два минорных, проявившихся только у отдельных деревьев [3].

Малатдегидрогеназа. Электрофоретический спектр данного фермента *A. platanoides* достаточно сложен, представлен несколькими зонами активности, которые, по-видимому, контролируются четырьмя локусами: Mdh-A, Mdh-B, Mdh-C и Mdh-D. „Быстрая” зона, кодируемая локусом Mdh-A, проявлялась слабо и нестабильно, поэтому для анализа не использовалась. Локус Mdh-B, проявляющийся в виде двойной полосы, представлен тремя аллельными вариантами: B1, B2 и B3, с относительной частотой преобладающего аллеля B2 0,81 (рис. 6). Полиморфным также оказался локус Mdh-C, у которого идентифицировано три аллеля: C1, C2 и нулевой. Относительная частота преобладающего аллеля C2 составляет 0,79. Локус Mdh-D, контролирующей самую медленную зону, был инвариантным. На территории Южного Урала у *A. platanoides* также выявлено четыре локуса Mdh, из которых полиморфными оказались локусы Mdh-2 и Mdh-3 [5]. Четыре локуса малатдегидрогеназы идентифицировано и для других видов рода *Acer*, в частности, для *A. pseudoplatanus* [16].

	Mdh-C	22	12	22	12	22	00	11
	Mdh-D	—	—	—	—	—	—	—
	Mdh-C	—	—	—	—	—	—	—
	Mdh-B	==	==	==	==	==	==	==
	Mdh-B	12	12	22	22	23	22	22

Рис. 6. Схематическое изображение электрофоретических вариантов фенотипов малатдегидрогеназы *Acer platanoides* L.

Fig.6. Schematic representation of electrophoretic options of phenotypes of malatedehydrogenase in *Acer platanoides* L.

Выводы

В результате электрофоретического анализа изоферментов девяти ферментных систем листовых зачатков *A. platanoides* аллейных насаждений вдоль городской

автомагистрали выявлено 17 генных локусов. Из изученной совокупности локусов 8 оказались мономорфными (Adh, Fdh, Dia-A, Mdh-D, Asp-A, Sod-A, Sod-B, Sod-C) и 9 – полиморфными (Gdh, Mdh-B, Mdh-C, Asp-B, Lap-A, Lap-B, Dia-B, Got-A, Got-B). Выявленные локусы могут быть использованы для изучения генотипических особенностей растений *A. platanoides*, различающихся по устойчивости к воздействию эмиссий автотранспорта.

1. **Алтухов Ю.П.** Генетические процессы в популяциях / Ю.П. Алтухов. – 3-е изд. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2003. – 431 с.
Altukhov, Yu.P., *Genetichskiye protsessy v populyatsiyakh* (Genetic processes in populations), Moscow: Akademkniga, 2003.
2. **Алтухов Ю.П.** Наследственное биохимическое разнообразие в процессах эволюции и индивидуального развития / Ю.П. Алтухов, Л.И. Корочкин, Ю.Г. Рычков // Генетика. – 1996. – Т. 32, № 11. – С. 1450–1473.
Altukhov, Yu.P., Korochkin, L.G., and Rychkov, Yu.G., Hereditary biochemical variety of evolutionary processes and individual development, *Genetika* (Genetics), 1996, vol. 32, no 11, pp. 1450–1473 .
3. **Взаимодействие** растений с техногенно загрязнённой средой / [И.И. Коршиков, В.С. Котов, И.П. Михеенко и др.]. – К.: Наук. думка. – 1995. – 190 с.
Korshikov, I.I., Kotov, V.S., Mikheenko, I.P., Ignatenko, A.A., and Chernyshova, L.V., *Vzaimodeystvie rasteniy s tekhnogenno zagryaznyonnoy sredoy* (Plant interaction with technogenic pollution of the environments), Kiev: Naukova dumka, 1995.
4. **Генетика** изоферментов / [Л.И. Корочкин, О.Л. Серов, А.И. Пудовкин и др.]. – М.: Наука, 1977. – 275 с.
Korochkin, L.G., Serov, O.L., and Pudovkin, A.I., *Genetika izofermentov* (Genetics of isoenzymes), Moscow: Nauka, 1977.
5. **Генетическое** разнообразие популяций лесных древесных растений. Клен остролистный / [Ю.А. Янбаев, Х.Х. Садыков, Р.М. Ганиев, Д.М. Габитова] // Генетические аспекты сохранения биологического разнообразия: коллект. мон. / Отв. ред. к.б.н. Ю.А. Янбаев, к.с.-х. н М.И. Косарев, рец. проф. С.И. Янтурин. – Уфа.: БГУ, 2000. – С. 33–48.
Yanbayev, U.A., Sadykov, H.H., Ganiev, R.M., and Gabitova, D.M., Genetic diversity of populations of forest woody plants. Norway maple, in *Geneticheskie aspekty sokhraneniya biologicheskogo raznoobraziya* (Genetic aspects of biodiversity conservation), Yanbayev, U.A., Ed., Ufa: BGU, 2000, pp. 33–48.
6. **Динамика** популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / Под ред. Ю.П. Алтухова. – М.: Наука, 2004. – 619 с.
Dinamika populyatsionnykh genofondov pri antropogennykh vozdeistviyakh (Population dynamics of gene pools under anthropogenic impacts), Altukhov, Yu.P., Ed., Moscow: Nauka, 2004.
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.
Korshikov, I.I., Terlyga, N.S., and Bychkov, S.A., *Populyatsionno-geneticheskie problemy dendrotekhnogennoy introduksii (na primere sosny krymskoy)*, Population genetic problems of dendrotechnogenic introduction (by the example of Crimean pine), Donetsk: Lebed, 2002.
8. **Коршиков И.И.** Адаптация растений к условиям техногенно загрязнённой среды / Иван Иванович Коршиков. – К.: Наук. думка, 1996. – 237 с.
Korshikov, I.I., *Adaptatsiya rasteniy k usloviyam tekhnogenno zagryaznyonnoy sredy* (Plant adaptation to conditions of technogenic polluted environment), Kiev: Naukova Dumka, 1996.
9. **Коршиков И.И.** Изменение физиолого-биохимических показателей листьев различающихся по устойчивости к выхлопным газам деревьев *Acer platanoides* L. и *Acer*

- pseudoplatanus* L. в насаждениях вдоль автомагистрали / И.И. Коршиков, Е.Н. Виноградова // Промышленная ботаника. – 2005. – Вып. 5. – С. 75–84.
- Korshikov, I.I.**, and Vinogradova, Ye.N., Changing the physiological and biochemical indices of leaves differing in resistance to exhaust gases in *Acer platanoides* L. and *Acer pseudoplatanus* L. in plantations along the motorway, *Prom. bot. (Industrial Botany)*, 2005, vol. 5, pp. 75–84.
10. **Поляков А.К.** Интродукция древесных растений в условиях техногенной среды / Алексей Константинович Поляков; под общей редакцией А.З. Глухова; Донецкий ботанический сад НАН Украины. – Донецк: «Ноулидж» (Донецкое отделение), 2009. – 268 с.
- Polyakov, A.K.**, *Introduktsiya drevesnykh rasteniy v usloviyakh tekhnogennoy sredy* (Introduction of woody plants in man-made environment), Donetsk: Noulig, 2009.
11. **Садыков Х.Х.** Популяционная структура клена остролистного (*Acer platanoides* L.) на Южном Урале: автореф. дис. на соискание учен. степени канд. биол. наук: спец. 03.00.05 «Ботаника» / Харис Хажинурович Садыков. – Уфа, 2000. – 21 с.
- Sadykov, H.H.**, Population structure of maple (*Acer platanoides* L.) in the Southern Urals: *Extended abstract of Cand. Sc. (Bot.) Dissertation*, Ufa, 2000.
12. **Теребова Е.Н.** Индивидуальная изменчивость метаболических показателей ассимиляционного аппарата сосны обыкновенной в условиях промышленного загрязнения / Е.Н. Теребова, Н.А. Галибина, Т.А. Сазонова // Лесоведение. – 2003. – № 1. – С. 73–78.
- Terebova, E.N.**, Galibina, N.A., and Sazonova, T.A., Individual variation in metabolic parameters of the assimilation apparatus of Scots pine under industrial pollution, *Lesovedenie (Forestry)*, 2003, no 1, pp. 73–78.
13. **Чайка Л.В.** Аналіз впливу автотранспорту на стан атмосферного повітря міста Донецька / Л.В. Чайка, А.С. Николаєнко // Об'єднання заради життя: збірка доповідей національного екологічного форуму «Екологія промислового регіону» (м. Донецьк, 23–24 травня 2012 р.). – Донецьк, 2012. – С. 58–59.
- Chayka, L.V.**, and Nikolaenko, A.S., An analysis of transport effects on air in the city of Donetsk in *Obyednannya zaradi zhyttya: zbirka dopovidey natsionalnogo ekologichnogo foruma «Ekologiya promyslovogo regionu»* (Association for life: Proc. Nat. Environ. Forum 'Ecology of Industrial Region' (Donetsk, May 23–24, 2012), Donetsk, 2012, pp. 58–59.
14. **Black-Samuelsson, S.**, and Eriksson, G., Effects of nitrogen stress on adaptive genetic variation in *Acer platanoides* L. and *Betula pendula* Roth., *Forest Genetics*, 2002, vol. 9, no. 1, pp. 71–86.
15. **Davis, B.J.**, Disk electrophoresis. II. Methods and application to human serum proteins, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1964, vol. 121, pp. 404–427.
16. **Konnert, M.**, Ruetz, W., and Fromm, M., Genetic variation in *Acer pseudoplatanus* L. inheritance of isozyme variants, *Forest Genetics*, 2001, vol. 8, no. 1, pp. 25–37.
17. **Rusanen, M.**, Vakkari, P., and Blom, A., Evaluation of the Finnish gene-conservation strategy for Norway maple (*Acer platanoides* L.) in the light of allozyme variation, *Forest Genetics*, 2000, vol. 7, no 3, pp. 155–165.
18. **Rusanen, M.**, Vakkari, P., and Blom, A., Genetic structure of *Acer platanoides* and *Betula pendula* in northern Europe, *Can. J. For. Res.*, 2003, vol. 33, pp. 1110–1115.

Донецкий ботанический сад НАН Украины,
Донецкий национальный университет

Получено 20.05.2014

УДК 575.113:581.19:634.942

АЛОЗИМНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ НАСАДЖЕНЬ *ACER PLATANOIDES* L. М. ДОНЕЦЬКА

О.М. Виноградова¹, Л.О. Калафат¹, Н.О. Виноградова²

¹Донецький ботанічний сад НАН України

²Донецький національний університет

Вивчено алозимну мінливість 9 ферментних систем (FDH, GDH, ADH, MDH, GOT, ACP, SOD, DIA, LAP) клена гостролистого (*Acer platanoides* L.) у алейних насадженнях уздовж міської автомагістралі. У результаті електрофоретичного розділення ізоферментів з листових зачатків ідентифіковано 17 локусів, серед яких 9 були поліморфними (Gdh, Mdh-B, Mdh-C, Acp-B, Lap-A, Lap-B, Dia-B, Got-A, Got-B).

Acer platanoides L., емісії автотранспорту, пошкоджуваність, ізоферменти

UDC 575.113:581.19:634.942

ALLOZYME POLYMORPHISM OF *ACER PLATANOIDES* L. IN THE STANDS IN THE CITY OF DONETSK

Ye.M. Vinogradova¹, L.A. Kalafat¹, N.A. Vinogradova²

¹Donetsk Botanical Garden, National Academy of Sciences of Ukraine

²Donetsk National University

Allozyme variation of 9 enzyme systems (FDH, GDH, ADH, MDH, GOT, ACP, SOD, DIA, LAP) was studied in Norway maple (*Acer platanoides* L.) allelic stands along a city highway. Based on the electrophoretic separation of isozymes in sheet rudiments we identified 17 loci, among which 9 were polymorphic (Gdh, Mdh-B, Mdh-C, Acp-B, Lap-A, Lap-B, Dia-B, Got-A, Got-B).

Acer platanoides L., transport emissions, susceptibility, isozymes