

УДК 575.174.2:633.936

Гаплоидные мегагаметофиты хвойных как тест-система для выявления нулевых вариантов в генах, ответственных за синтез ключевых ферментов

Г.Г. Гончаренко, А.А. Сурков, Т.В. Азявчикова

Введение

Одной из важных характеристик популяционно-генетической структуры является соотношение частот встречаемости активных и так называемых нулевых аллелей. Ноль-аллели возникают под воздействием как природных, так и техногенных факторов и приводят к утрате активности фермента или к полному подавлению синтеза полипептида. Поскольку даже гетерозиготы по нулевым аллелям имеют только 50% активности соответствующего фермента – отрицательное влияние этих аллелей на биологическое состояние особей очевидно и было показано на *Drosophila* (O'Braen, McIntire, 1972) и на человеке (Griffiths et al., 1999).

Одним из наиболее оптимальных методов выявления нулевых аллелей остается электрофоретический анализ изоферментов (Mukai, Coccerhem, 1977; Voelker et al., 1979; Tsuno, 1981; Allendorf et al, 1982), поскольку он даёт возможность определить все 100% мутаций, приводящие к нарушению функции ферментов (нулевые аллели).

Наиболее удобным объектом для определения насыщенности популяций нулевыми аллелями являются хвойные. У всех хвойных растений яйцеклетка и клетки, формирующие гаплоидную ткань эндосперма (мегагаметофита), имеют общее происхождение от одной мегаспоры. Гаплоидный геном эндосперма идентичен гаплоидному геному яйцеклетки и в этом случае имеется возможность выявлять нулевые аллельные варианты непосредственно при анализе тканей эндоспермов, без использования специальных скрещиваний (Алтухов и др., 1983; Гончаренко и др., 1991).

Целью нашего исследования была разработка методов изоферментного анализа, позволяющих выявлять нулевые аллели (мутации) на гаплоидных эндоспермах ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.), сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) и пихты белой (*Abies alba* Mill.), формирующих хвойные леса Восточной Европы.

Материалы и методы

Для разработки методов использовался семенной материал: 942 деревьев ели европейской, собранных с 27 природных популяций расположенных на территории Беларуси, России, Украины, Латвии и Эстонии, 895 деревьев сосны обыкновенной из 29 популяций Беларуси, России, Украины и Латвии, 220 деревьев пихты белой из 7 популяций Беларуси, Украины и Польши. Месторасположение проанализированных природных популяций *Picea abies*, *Pinus sylvestris* и *Abies alba* подробно описано в наших предыдущих публикациях (Гончаренко, 1999; 2002а,б; Гончаренко и др., 1999; Гончаренко, Савицкий, 2000). Семена хвойных были собраны с каждого дерева отдельно в течении сезонов 1989 – 1998 годов и до электрофореза хранились при температуре 0 – 5 °С.

Каждый эндосперм перед электрофорезом отделялся от зародыша и гомогенизировался в 100 мкл экстрагирующего раствора, который имеет следующий состав: 1 мл тритона X-100, 0.2 мл β-меркаптоэтанола в 100 мл бидистиллированной воды. Электрофорез проводился в вертикальных и горизонтальных камерах в 13-14%-ном крахмальном геле при 0 – 5 °С и параметрах описанных нами ранее (Гончаренко и др., 1989; 1991; Гончаренко, Силин, 1997; Гончаренко, 1999; 2002б).

Результаты и обсуждение

В поисках оптимальных условий электрофоретического анализа изоферментов было апробировано несколько буферных систем. Для 19 ферментов, использовавшихся в нашей работе, наилучшие результаты получены в 3 системах.

Ферменты аспаратаминотрансфераза (ААТ, К.Ф. 2.6.1.1.), алкогольдегидрогеназа (АДН, К.Ф. 1.1.1.1.), глутаматдегидрогеназа (ГДН, К.Ф. 1.4.1.2.), лейцинаминопептидаза (ЛАР, К.Ф. 3.4.11.1.), сорбитолдегидрогеназа (СДН, К.Ф. 1.1.1.14.), гексокиназа (HK, К.Ф. 2.7.1.1.), фосфоглюкомутаза (PGM, К.Ф. 2.7.5.1.), малик-энзим (ME, К.Ф. 1.1.1.40.), пептидаза (PEP, К.Ф. 3.4.13.11.) и флуоресцентная эстераза (FE, К.Ф. 3.1.1.2.) анализировались в трис-ЭДТА-боратной системе (рН 8,6), для приготовления которой использовали основной раствор следующего состава: 0.9 М трис, 0.5 М борная кислота, 0.02 М ЭДТА Na₂. Затем этот раствор разбавлялся в 5, 7 и 20 раз для катодного, анодного и гелевого буферов соответственно. Кроме того, в катодный буфер добавляли 0.2 М MgCl₂. Электрофорез велся в течение 4-5 часов при параметрах тока 400 В и 60 мА.

Электрофоретическая разгонка пяти ферментов – аконитазы (АСО, К.Ф. 4.2.1.3.), малатдегидрогеназы (МДН, К.Ф. 1.1.1.37), 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (6-PGD, К.Ф. 1.1.1.44.), глюкозофосфатизомеразы (GPI, К.Ф. 5.3.1.9.) и кислой фосфатазы (АСРН, К.Ф. 3.1.3.2.) проводилась в трис-цитратной системе (рН 6,2), электродный буфер которой состоял из следующих компонентов: 0.223 М трис, 0,086 М лимонная кислота. Гелевый буфер готовили путем разведения 35 мл электродного раствора до 1 л дистиллированной водой. В этой системе электрофорез, длился 4-4,5 часа при параметрах тока 280-300 В и 35-40 мА.

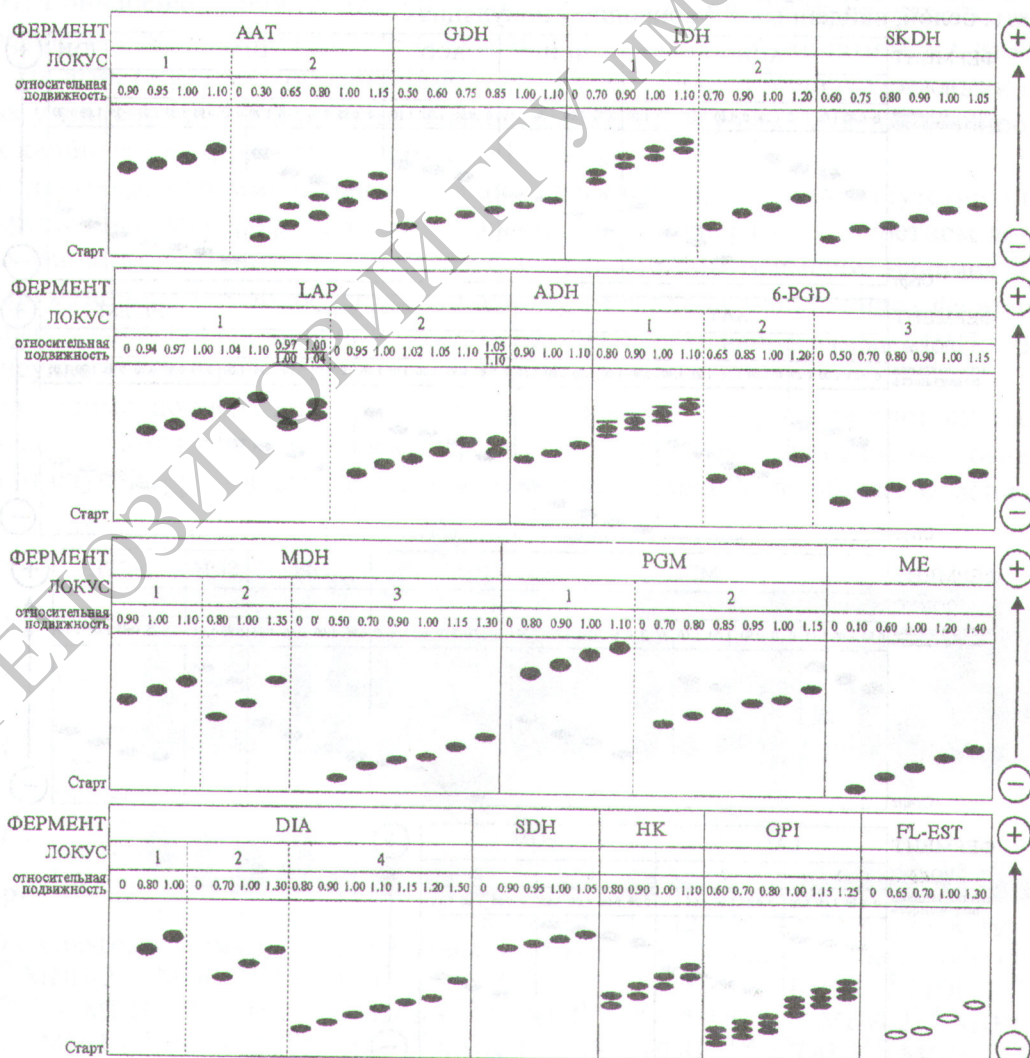


Рис. 1. Схематическое изображение и обозначение электрофоретических аллельных вариантов 25 локусов ели европейской найденных в 27 природных популяциях

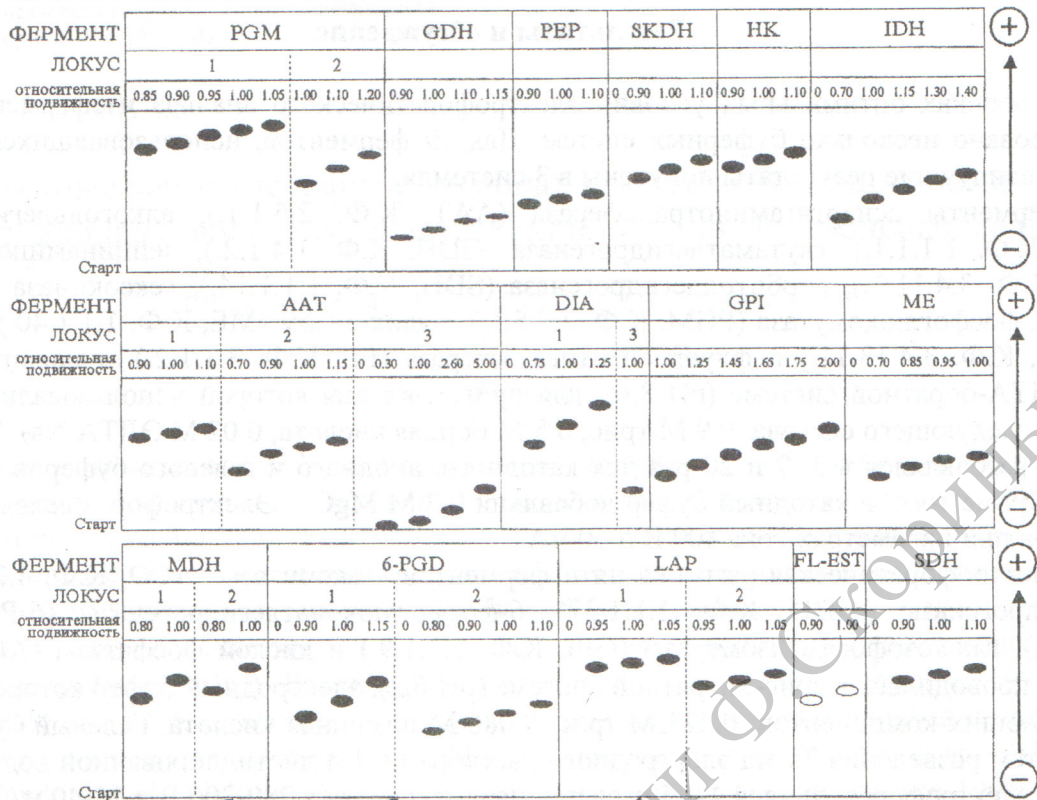


Рис. 2. Схематическое изображение и обозначение электрофоретических аллельных вариантов 22 локусов пихты белой, найденных в 7 природных популяциях

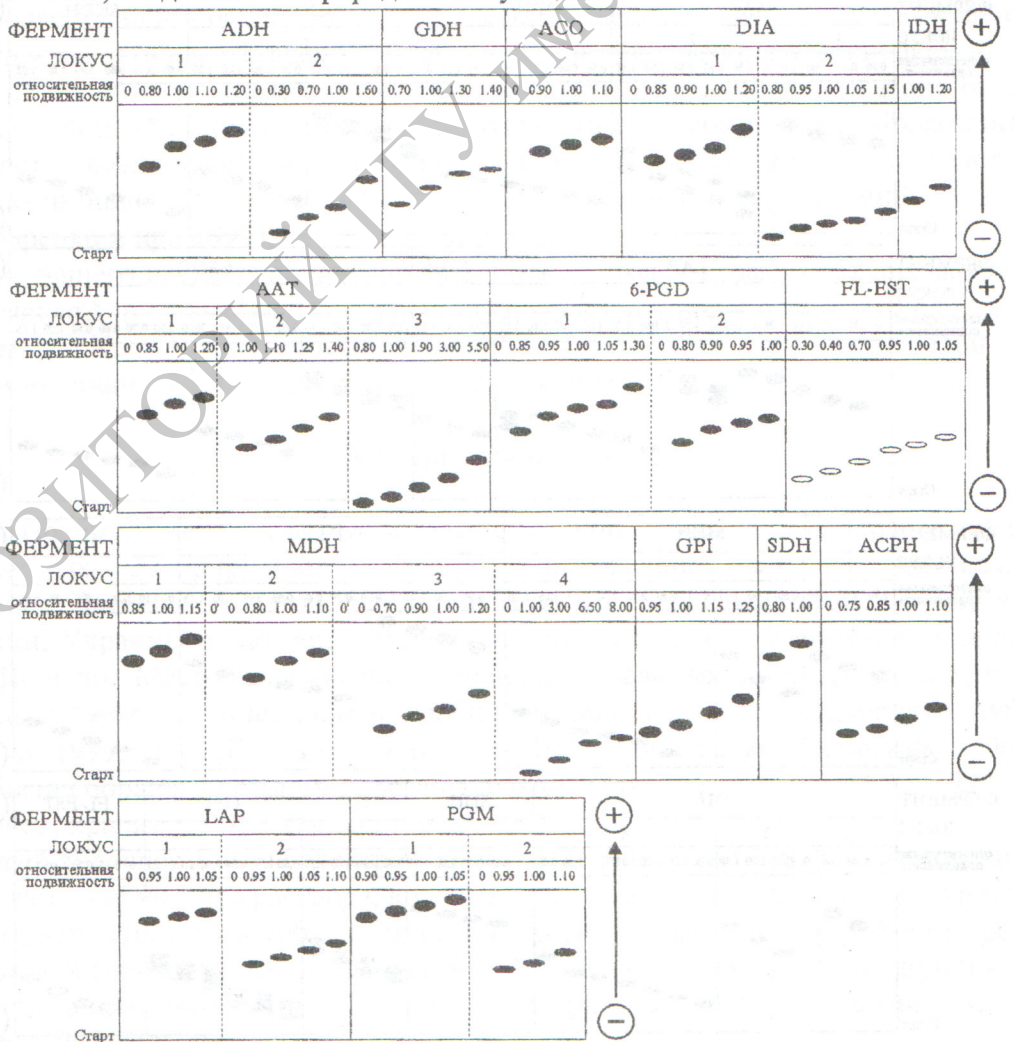


Рис. 3. Схематическое изображение и обозначение электрофоретических аллельных вариантов 24 локусов сосны обыкновенной, найденных в 29 природных популяциях

Трис-цитрат-трис-НСI прерывистая буферная система использовалась для анализа изоцитратдегидрогеназы (IDH, К.Ф. 1.1.1.42.), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (G-6-PD, К.Ф. 1.1.1.49.), шикиматдегидрогеназы (SKDH, К.Ф. 1.1.1.25.) и диафоразы (DIA, К.Ф. 1.6.4.3.). Гелевый буфер этой системы состоял из 0.1 М трис-НСI (рН 8.0), в то время как электродный (рН 6.2) включал в себя 0.223 М трис и 0.086 М лимонную кислоту. Электрофорез велся 3-4 часа при параметрах тока 280 В, 75-80 мА.

В трис-цитратной и трис-цитрат-трис-НСI буферных системах нужные значения рН достигались с помощью NaOH.

По окончании электрофореза крахмальный блок разрезался на горизонтальные пластины с последующим гистохимическим окрашиванием по ранее описанным прописям с небольшими нашими модификациями (Гончаренко и др., 1989). Обозначение найденных аллелей дано по номенклатуре Пракаша (Prakash et al., 1969). Наиболее часто встречающийся в данном локусе аллель получал цифровой символ 1.00. Остальные аллели обозначались в соответствии с их электрофоретической подвижностью относительно аллеля 1.00.

В ходе электрофоретического исследования 15 ген-ферментных систем для *Picea abies*, 14 ген-ферментных систем для *Pinus sylvestris* и 15 ген-ферментных систем для *Abies alba* было установлено что: 99 электрофоретических вариантов, выявленных у ели европейской, находятся под генетическим контролем 25 структурных генов; 108 электрофоретических вариантов, выявленных у сосны обыкновенной, находятся под генетическим контролем 24 локусов; 48 аллельных вариантов, выявленных у пихты белой, находятся под контролем 22 локусов. Все этапы генетического контроля ген-ферментных систем *Picea abies*, *Pinus sylvestris* и *Abies alba* использованных нами в этой работе подробно описаны ранее (Гончаренко, Силин, 1997; Гончаренко, 1999; 2002а,б; Гончаренко, Савицкий, 2000; Гончаренко и др., 2002). Электрофоретическое расположение всех найденных аллелей схематически изображено на рис. 1-3. На этих рисунках хорошо видно, что нулевые аллели обнаружены нами по ряду локусов как у ели европейской и сосны обыкновенной, так и у пихты белой в природных насаждениях хвойных на территории Восточной Европы.

На электрофореграмме нулевые варианты легко типизируются по отсутствию гистохимически окрашенных электрофоретических фракций у эндосперма в конкретном локусе на фоне гистохимически активных ферментных спектров. Четким примером наличия нулевых аллелей у двух гаплоидных эндоспермов по одному из локусов, кодирующих фермент малатдегидрогеназу у сосны обыкновенной, может служить электрофореграмма MDH, представленная на рисунке 4.

Необходимо подчеркнуть еще один важный момент, характеризующий тест-систему, который заключается в том, что электрофорез в крахмальном геле позволяет отличать нулевые мутации от случайного попадания в анализ погибших семян. У погибшего семени отсутствие

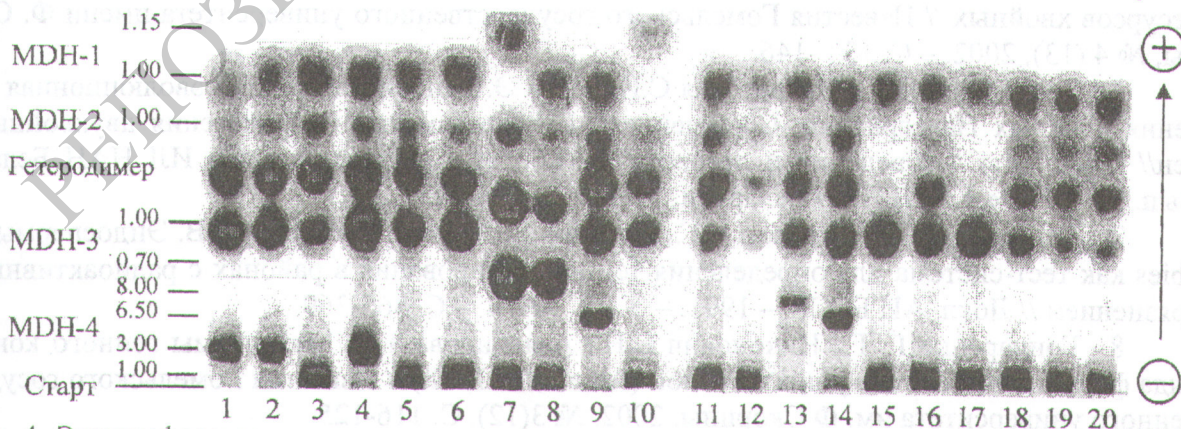


Рис. 4. Электрофореграмма малатдегидрогеназы из гаплоидных эндоспермов *P. sylvestris* 1, 2, 4 – MDH-1^{1.00} MDH-2^{1.00} MDH-3^{1.00} MDH-4^{3.00}; 3, 5, 6, 11, 12, 16, 18-20 – MDH-1^{1.00} MDH-2^{1.00} MDH-3^{1.00} MDH-4^{1.00}; 7 – MDH-1^{1.15} MDH-2^{1.00} MDH-3^{0.70} MDH-4^{1.00}; 8 – MDH-1^{1.00} MDH-2^{1.00} MDH-3^{0.70} MDH-4^{1.00}; 9, 14 – MDH-1^{1.00} MDH-2^{1.00} MDH-3^{1.00} MDH-4^{6.50}; 13 – MDH-1^{1.00} MDH-2^{1.00} MDH-3^{1.00} MDH-4^{8.00}; 15, 17 – MDH-1^{1.00} MDH-2⁰ MDH-3^{1.00} MDH-4^{3.00}.

электрофоретических продуктов будет наблюдаться по всем проанализированным локусам, в то время как при нуль-мутации электрофоретический спектр других изоферментов не претерпевает изменений. В этом легко убедиться, еще раз обратившись к рис. 4. У эндоспермов на дорожках 15 и 17, показавших нуль-мутацию по Mdh-2, локусы Mdh-1, Mdh-3, Mdh-4 (как и все другие локусы) полностью активны.

Таким образом, разработанные методы электрофоретического анализа, использующиеся в тест-системе, дают возможность относительно легко и четко типировать нулевые варианты (ноль-аллели), приводящие к утрате активности фермента или к полному подавлению синтеза полипептида в гаплоидных эндоспермах хвойных, что позволяет определить степень насыщенности природных популяций нулевыми аллелями. Кроме того, поскольку геном эндосперма хвойных идентичен геному яйцеклетки, это помогает в первом приближении оценить степень влияния различных видов загрязнений на последующие поколения.

Работа выполнялась в рамках программ ГПОФИ "Радиация и антропоэкология" и программ по преодолению последствий катастрофы на ЧАЭС и поддержана различными научными грантами, такими как ISF "RW 2000", "RW 2300". Авторы выражают благодарность сотрудникам Института леса Национальной АН Беларуси за помощь в проведении генетических исследований.

Abstract

The purpose of our research was development of methods of the isoenzyme analysis for revealing zero mutations on haploid endosperm of European fir-trees, an ordinary pine and white firs forming coniferous forests of the Eastern Europe.

Литература

1. Алтухов Ю.П., Духарев В.А., Живоатовский Л.А. Отбор против редких электрофоретических вариантов белка и темпы спонтанного мутационного процесса в популяциях // Генетика. – 1983. – т.19. – N 2. – С. 264-276.
2. Гончаренко Г.Г. Геносистематика и эволюционная филогения лесообразующих хвойных Палеарктики // Минск: Техналогія, 1999. – 188 с.
3. Гончаренко Г.Г. Генетическая структура пихты белой в Беловежской пуще и других популяциях северо-восточной части ареала // Весці НАН Беларусі, 2002а. – № 3. – С. 31-37.
4. Гончаренко Г.Г. Геносистематика и эволюционная филогения хвойных Палеарктики. Сообщение III. Геносистематика и филогения елей // Известия Гомельского государственного университета имени Ф. Скорины, 2002. – № 3 (12). – С. 81-115.
5. Гончаренко Г.Г. Методический подход к исследованию популяционно-генетических ресурсов хвойных // Известия Гомельского государственного университета имени Ф. Скорины, № 4 (13), 2002. – С. 134-146.
6. Гончаренко Г.Г., Ивановская С.И., Нево Э. Геносистематика и эволюционная филогения хвойных Палеарктики. Сообщение I. Геносистематика и филогения двухвойных сосен // Проблемы лесоведения и лесоводства: сборник научных трудов ИЛ НАН Беларуси. Вып. 50. – Гомель: ИЛ НАН Беларуси, 1999. – С. 106-145.
7. Гончаренко Г.Г., Кривко В.Г., Потенко В.В., акад. Хотылева Л.В. Эндоспермы *Picea abies* как тест-система для определения темпов мутирования в районах с радиоактивным загрязнением // Докл. АН БССР. – 1991. – Т. 35. – № 4. – С. 365-369.
8. Гончаренко Г. Г., Никонович С.Н., Азявчикова Т.В. Механизмы генного контроля ряда ферментных систем у пихты белой (*Abies alba* Mill.) // Известия Гомельского государственного университета им. Ф.Скорины. 2002. № 3(12). С. 116-125.
9. Гончаренко Г.Г., Падутов В.Е., Потенко В.В. Руководство по исследованию хвойных видов методом электрофоретического анализа изоферментов // Гомель, Госкомитет СССР по лесу, 1989. -164с.
10. Гончаренко Г.Г., Савицкий Б.П. Популяционно-генетические ресурсы пихты белой

в Беларуси // Гомель: ИЛ НАН Беларуси, 2000. – 122 с.

11. Гончаренко Г.Г., Силин А.Е. Популяционная и эволюционная генетика сосен Восточной Европы и Сибири // Минск: Тэхналогія, 1997. – 192с.

12. Allendorf F.W., Knudsen K.L., Blake G.M. Frequencies of null alleles at enzyme loci in natural populations of ponderosa and red pine // Genetics. – 1982. – V.100. – P. 497-504.

13. Griffiths et al. Modern genetic analysis // Freeman and company. N. York, 1999. – 675p.

14. Mukai T., Cockerham C.C. Spontaneous mutation rates of isozyme genes in *Drosophila melanogaster* // PNAS, 1977. – V. 74. – №6. – P. 2514-2517.

15. O'Brien S., McIntyre R. Genetics and biochemistry of enzymes and specific proteins of *Drosophila*. In Ashburner, M., and Wright, T. (eds.), *The Genetics and Biology of Drosophila* // Academic Press, New York, 1978. – V.2a. – P. 395-551.

16. Prakash S., Lewontin R. C., Hubby J. L. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. IV. Patterns of genic variation in central, marginal and isolated populations of *Drosophila pseudoobscura* // Genetics, 1969. – V. 61. – P. 841-858.

17. Tsuno K. Studies on mutation at esterase loci in *Drosophila virilis* I. Spontaneous mutation rate and newly arisen variants // Japanese Journal of Genetics, 1981. – V.56. – P. 155-174.

18. Volker R.A., Schaffer H.E., Mukai T. Spontaneous allozyme mutations in *Drosophila melanogaster*: rate of occurrence and nature of the mutants // Genetics, 1980. – V.94. – P. 961-968.

Гомельский государственный
университет им. Ф. Скорины

Поступило 18.02.03

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ имени Ф. Скорины