

УДК 575.1:630\*165:630\*174

## Механизмы генного контроля ряда ферментных систем у пихты белой (*Abies alba* Mill.)

Г.Г.Гончаренко, С.Н.Никонович, Т.В.Азьявчикова

### Введение

Пихта белая в основном произрастает в горных районах Европы, включая Карпаты, Альпы, Балканские горы, Апеннины, Пиренеи. На севере граница распространения этого вида проходит ориентировочно по 52° с. ш., а на юге пихта белая доходит до Северной Греции и Южной Италии (Маценко, 1964; Liu, 1971; Vidaković, 1991). На северо-востоке ареала имеются несколько изолированных островных популяций в Волынской и Ровенской областях (Украина) и в Беловежской пуще (Беларусь) (Маценко, 1964; Швиденко, 1985; Крылов и др., 1986). *A. alba* образует чистые и смешанные (преимущественно с елью и буком) насаждения на высотах от 400 до 2000 метров над уровнем моря и очень редко спускается на равнину, как, например, в Беловежье. Площадь лесов с господством пихты достигает 5.5 млн. га (Крылов и др., 1986).

Несмотря на то, что *Abies alba* является одной из главных пород темнохвойных горных лесов Европы работ, посвящённых исследованию популяционных генофондов этого вида с использованием современных генетических методов анализа изоферментов или фрагментов ДНК, крайне недостаточно. Для непосредственного перехода к решению задач, связанных с анализом популяционно-генетических ресурсов, необходимо провести генетическую детерминацию полученных на электрофореграммах ферментных спектров. Иными словами, на первой стадии исследования нужно четко установить какие аллели кодируют каждую фракцию. Следует отметить, что электрофоретический анализ изоферментов пихты белой в той или иной степени уже проводился в различных лабораториях в предыдущие годы (Schroder, 1989; Fady, Conkle, 1992; Longauer, 1994; Mejnartowicz et al., 1994; Hussendorfer et al., 1995; Гончаренко, Падутов, 1995; Гончаренко, 1999). Однако наборы используемых ферментных систем и их генетическая интерпретация в работах различных авторов несколько отличались, что в определенной степени затрудняет сопоставление и использование полученных ранее результатов.

В связи с этим корректная генетическая детерминация является необходимым первым этапом для последующих популяционно-генетических исследований пихты белой.

### Материалы и методы

Электрофоретический анализ материала 220 деревьев из семи восточно-европейских природных популяций *A. alba* проводился нами по 15 ген-ферментным системам в 13-14% крахмальном геле с использованием трех буферных систем: А) трис-ЭДТА-боратная, рН 8.6; В) трис-цитрат, рН 6.2/трис-НСl, рН 8.0; С) трис-цитрат, рН 6.2. Все параметры электрофоретического фракционирования, а также экстракция и гистохимическое выявление ферментов подробно приведены нами ранее (Гончаренко и др., 1989; Goncharenko et al., 1992; Гончаренко, 1999; Гончаренко, Савицкий, 2000). Название ферментов, кодовый номер согласно изданию "Номенклатура ферментов" (1979), предпочитаемая для анализа буферная система, а также количество используемых локусов приведены в табл. 1.

В качестве экспериментального материала при электрофоретическом фракционировании служили ткани гаплоидных эндоспермов и диплоидных зародышей. Для определения генотипа каждого дерева проводился анализ 8-20 эндоспермов, которые выбирались случай-

Таблица 1. Ферменты, их кодовый номер, буферные системы и количество локусов, использованные для анализа популяций пихты белой

Фермент	Аббревиатура	Код	Буфер	Локусы
Аспартаминотрансфераза	AAT	2.6.1.1.	A, B	3
Гексокиназа	HK	2.7.1.1.	A	1
Глутаматдегидрогеназа	GDH	1.4.1.2.	A	1
Глюкозофосфатизомераза	GPI	5.3.1.9.	B, C	1
Диафораза	DIA	1.6.4.3.	B	2
Изоцитратдегидрогеназа	IDH	1.1.1.42.	B	1
Лейцинаминопептидаза	LAP	3.4.11.1.	A, B	2
Малатдегидрогеназа	MDH	1.1.1.37.	B, C	2
Малик-энзим	ME	1.1.1.40	A	1
Фосфоглюкомутаза	PGM	2.7.5.1.	A	2
Флюоресцентная эстераза	FL-EST	3.1.1.2.	A, B	1
6-Фосфоглюконатдегидрогеназа	6-PGD	1.1.1.44.	B, C	2
Сорбитолдегидрогеназа	SDH	1.1.1.14.	A	1
Пептидаза	PEP	3.4.13.11.	A	1
Шикиматдегидрогеназа	SKDH	1.1.1.25.	B	1

но из набора семян полученного как минимум из пяти шишек, собранных из различных частей кроны дерева. Так как вероятность ошибки в определении гетерозиготного дерева рассчитывается из соотношения  $P=0,5^{n-1}$  (где n-количество проанализированных эндоспермов), то даже при анализе 8 эндоспермов ошибка составляет менее 1%.

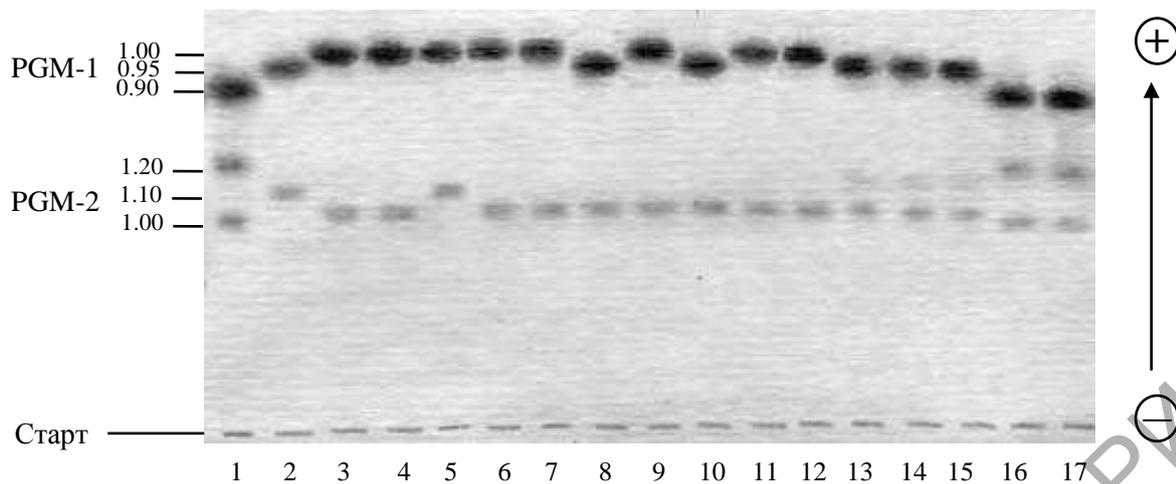
Обозначение выявленных электрофоретических вариантов дано по общепринятой номенклатуре Пракаша с соавторами (Prakash et al., 1969), в соответствии с которой наиболее часто встречающийся электроморф по каждому локусу у *A. alba* и кодирующий его аллель обозначались символом 1.00, а все другие аллельные варианты обозначены цифровыми символами в зависимости от их электрофоретической подвижности относительно 1.00. Например,  $Idh^{1.30}$  – ген аллозима, подвижность которого на 30% быстрее  $Idh^{1.00}$ .

### Результаты и обсуждение

Аллельный характер вариантов, найденных нами у пихты белой, был установлен на основании анализа их расщепления у гаплоидных эндоспермов гетерозиготных деревьев. В силу законов мейоза гетерозиготное по какому-либо ферментному локусу дерево должно образовывать гаплоидные эндоспермы, несущие альтернативные электрофоретические аллельные варианты в соотношении 1:1. Дополнительный анализ диплоидных зародышей и в ряде случаев зимних почек, чей электрофоретический спектр у гетерозиготных деревьев должен быть представлен двумя различными аллельными вариантами, также использовался для подтверждения генетической природы найденных электрофоретических вариантов у пихты белой.

Ниже приводится описание 15 ген-ферментных систем *A. alba*, которые проанализированы нами в данной работе.

**Фосфоглюкомутаза.** Фосфоглюкомутаза пихты белой на электрофореграммах была представлена двумя зонами активности - PGM-1 и PGM-2. При этом интенсивно окрашивающаяся, быстро мигрирующая зона PGM-1, в гаплоидных тканях выявлялась в виде одной фракции, тогда как медленная PGM-2 зачастую двумя. В ходе анализа материала пихты белой из восточноевропейских природных популяций удалось обнаружить по два электрофоретических различных варианта в каждой зоне. Эти варианты, обозначенные нами в соответствии с их электрофоретической подвижностью PGM-1<sup>0.95</sup> и PGM-1<sup>1.00</sup>, а также PGM-2<sup>1.00</sup> и PGM-2<sup>1.10</sup> хорошо видны на фореграмме, которая представлена на рис. 1.

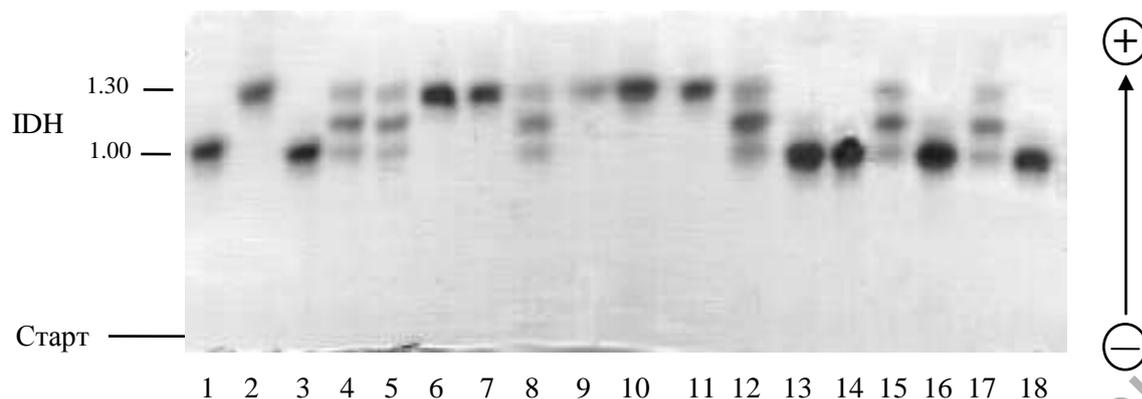


**Рис. 1.** Электрофореграмма фосфоглюкомутазы из эндоспермов *A. alba* (дорожки 2-15) и *A. sibirica* (дорожки 1, 16, 17): 1, 16, 17 — PGM-1<sup>0.90</sup> PGM-2<sup>1.20</sup>; 2 — PGM-1<sup>0.95</sup> PGM-2<sup>1.10</sup>; 3, 4, 6, 7, 9, 11, 12 — PGM-1<sup>1.00</sup> PGM-2<sup>1.00</sup>; 5 — PGM-1<sup>1.00</sup> PGM-2<sup>1.10</sup>; 8, 10, 13-15 — PGM-1<sup>0.95</sup> PGM-2<sup>1.00</sup>

Аллельный характер, найденных вариантов был установлен на основе их расщепления в гаплоидных эндоспермах гетерозиготных деревьев. Суммарные данные расщепления по всем гетерозиготным деревьям приведены в табл. 2. Как следует из таблицы электрофоретические варианты PGM-1 расщепляются в отношении 54:79, а PGM-2 в отношении 242:202, что в целом соответствует ожидаемому 1:1 (табл. 2) и указывает на генетическую природу обнаруженных вариантов. При анализе диплоидных тканей гетерозиготных образцов на фореграммах всегда присутствовали оба электроморфа, тем самым также подтверждая аллельный характер найденных вариантов. Следует добавить, что изменение подвижности фракций PGM-1 никогда не затрагивало подвижность фракций PGM-2, и наоборот. Таким образом, полученные результаты однозначно свидетельствуют о двухлокусном контроле ферментной системы фосфоглюкомутазы у пихты белой, причем каждый локус экспрессируется независимо от другого и имеет по два кодоминантных аллеля.

Два изменчивых локуса PGM у *A. alba* и некоторых других видов пихт Палеарктики были описаны ранее рядом исследователей (Mejnartowicz et al., 1994; Hussendorfer et al., 1995; Гончаренко, Падутов, 1995; Гончаренко, 1999).

**Изоцитратдегидрогеназа.** Данный фермент выявлялся на фореграммах двумя зонами активности. При этом быстро мигрирующая зона окрашивалась слабо и непостоянно и в дальнейшем анализе нами не учитывалась. Электрофоретический спектр основной зоны изоцитратдегидрогеназы в гаплоидных тканях *A. alba* представлен одиночными четкокрасоченными фракциями с различной электрофоретической подвижностью: IDH<sup>1.00</sup> и IDH<sup>1.30</sup>. В нескольких гаплоидных образцах одного дерева было отмечено отсутствие ферментативной активности, что указывает на наличие так называемого нулевого варианта IDH<sup>0</sup>, форма фермента которого не способна осуществлять химическую реакцию. Анализ расщепления трех выявленных вариантов подтвердил их аллельный характер наследования, поскольку соотношение во всех случаях соответствовало менделевскому 1:1 (табл. 2). Как хорошо видно на рис. 2 электрофоретический спектр в образцах диплоидных тканей, гетерозиготных по ферментативно активным аллельным вариантам у пихты белой представлен тремя фракциями. Причем, характер экспрессии фракций всегда соответствовал биномиальному 1:2:1. В случае димерной структуры фермента верхняя и нижняя фракции являются альтернативными гомодимерами, каждый из которых состоит из двух одинаковых субъединиц фермента, а промежуточная, с более интенсивной окраской, возникает при взаимодействии двух разных субъединиц и является гетеродимером количество которого всегда в два раза больше чем гомодимера. Выявленный нами трехфракционный спектр и биномиальный характер экспрессии подтверждают имеющиеся данные (Schroder, 1989; Hussendorfer et al., 1995) о димерной структуре молекулы фермента изоцитратдегидрогеназа у *A. alba*.



**Рис. 2.** Электрофореграмма изоцитратдегидрогеназы из зародышей *A. alba*: 1, 3, 13, 14, 16, 18 —  $IDH^{1.00/1.00}$ ; 2, 6, 7, 9-11 —  $IDH^{1.30/1.30}$ ; 4, 5, 8, 12, 15, 17 —  $IDH^{1.00/1.30}$

Необходимо отметить, что полиморфизм по локусу, кодирующему основную зону изоцитратдегидрогеназы был выявлен также в других работах посвященных генетическим исследованиям пихты белой (Longauer, 1994; Гончаренко, Падутов, 1995; Гончаренко, 1999). В тоже время ряд исследователей учитывают еще один полиморфный локус *Idh*, и таким образом используют два локуса *Idh-1* и *Idh-2* в ходе генетического анализа популяций (Schroder, 1989; Breitenbach-Dorfer et al., 1992; Mejnartowicz et al., 1994; Hussendorfer et al., 1995).

**Аспартаминотрансфераза.** При гистохимическом окрашивании гелей на аспартаминотрансферазу было выявлено три зоны ферментативной активности обозначенные нами ААТ-1, ААТ-2 и ААТ-3. Наименее подвижная зона ААТ-3 в отличие от других всегда проявлялась двумя фракциями. Изменение подвижности в каждой из зон не влияло на подвижность электрофоретических вариантов других зон, что указывает на самостоятельность ААТ-1, ААТ-2 и ААТ-3. В ходе исследований популяций пихты белой по всем зонам был обнаружен полиморфизм. Быстрая и средняя зоны имели по два электрофоретических варианта: ААТ-1<sup>0.90</sup>, ААТ-1<sup>1.00</sup> и ААТ-2<sup>0.90</sup>, ААТ-2<sup>1.00</sup> соответственно. В медленной зоне было обнаружено три варианта: ААТ-3<sup>1.00</sup>, ААТ-3<sup>2.60</sup> и ААТ-3<sup>5.00</sup>. Анализ расщепления электрофоретических вариантов подтвердил их генетическую детерминацию (табл.2). Три полиморфных локуса, кодирующих данную ген-ферментную систему, также были описаны рядом авторов (Hussendorfer et al., 1995; Longauer, 1994). Гетерозиготные по какому-либо из локусов зародыши на фореграмме выявлялись тремя фракциями, что соответствует димерной структуре активной молекулы ААТ. Димерная структура аспартаминотрансферазы определена и для других представителей рода *Abies* (Neale, Adams, 1981; Shea, 1988; Pascual et al., 1993).

**Лейцинаминопептидаза.** Лейцинаминопептидаза на электрофореграммах выявлялась двумя зонами активности с четко очерченными фракциями. Изменение подвижности зон происходило асинхронно, что указывает на их независимость. По обеим зонам, обозначенным нами как LAR-1 и LAR-2, в изученных популяциях был выявлен полиморфизм. При этом было найдено по три электрофоретических варианта: LAR-1<sup>0.95</sup>, LAR-1<sup>1.00</sup>, LAR-1<sup>1.05</sup> и LAR-2<sup>0.95</sup>, LAR-2<sup>1.00</sup>, LAR-2<sup>1.05</sup>. Генетический анализ гаплоидных (табл. 2) образцов показал, что все выявленные нами варианты являются аллельными продуктами двух локусов, хотя наблюдалось небольшое отклонение от ожидаемого соотношения 1:1 в сочетаниях вариантов 0.95:1.00, 1.00:1.05 у LAR-1 и 1.00:1.05 у LAR-2 (табл. 2). В гетерозиготных образцах диплоидных тканей LAR-1 и LAR-2 всегда были представлены двумя электрофоретическими аллельными вариантами. Двухфракционный спектр лейцинаминопептидазы в гетерозиготных образцах диплоидных тканей указывает на мономерную структуру данного фермента.

Необходимо подчеркнуть, что в ряде работ, посвященных исследованию пихты белой с использованием изоферментов, также были описаны два изменчивых локуса, кодирующих лейцинаминопептидазу (Mejnartowicz, 1996; Mejnartowicz et al., 1994; Hussendorfer et al., 1995).

Таблица 2. Расщепление электрофоретических аллельных вариантов у гетерозиготных деревьев *A. alba*

Локус	сочетание	расщепление	$\chi^2$	локус	сочетание	расщепление	$\chi^2$
<b>Idh</b>	0/1.00	3:5	0.50	<b>Hk</b>	1.00/1.10	15:15	0.00
	1.00/1.30	377:411	1.47		<b>Me</b>	0.95/1.00	187:261
<b>Skdh</b>	1.00/1.10	6:2	2.00	<b>Lap-1</b>	0.95/1.00	107:140	4.41*
<b>6-Pgd-1</b>	0.90/1.15	3:5	0.50		0.95/1.05	4:8	1.33
	1.00/1.15	457:513	3.23		1.00/1.05	42:23	5.55*
<b>6-Pgd-2</b>	0.80/1.00	36:40	0.21	<b>Lap-2</b>	0.95/1.00	159:138	1.48
<b>Gpi</b>	1.00/1.25	25:23	0.08		0.95/1.05	9:15	1.50
<b>Fe</b>	0.90/1.00	3:5	0.50		1.00/1.05	153:108	7.76**
<b>Aat-1</b>	0.90/1.00	5:7	0.33	<b>Gdh</b>	1.00/1.10	10:8	0.22
<b>Aat-2</b>	0.90/1.00	10:14	0.67	<b>Mdh-2</b>	0.80/1.00	42:40	0.05
<b>Aat-3</b>	1.00/2.60	102:111	1.03	<b>Dia-1</b>	0/1.00	26:10	7.11**
	1.00/5.00	5:3	0.50	<b>Pep</b>	0.90/1.00	43:48	0.27
<b>Pgm-1</b>	0.95/1.00	54:79	4.70*		1.00/1.05	5:13	3.56
<b>Pgm-2</b>	1.00/1.10	242:202	3.60				

\* Уровень значимости <0.05, \*\* — < 0.01, \*\*\* — < 0.001

**Глюкозофосфатизомераза.** Данный фермент выявлялся на фореграммах двумя зонами ферментативной активности. Быстро мигрирующая зона окрашивалась диффузно, и была исключена из дальнейшего анализа. Медленно мигрирующая зона была представлена двумя трехфракционными электрофоретическими вариантами  $GPI^{1.00}$  и  $GPI^{1.25}$ , причем последний вариант был найден только в одной популяции, а во всех остальных насаждениях полиморфизм отсутствовал. Анализ расщепления вариантов в гаплоидных тканях гетерозиготных образцов не показал достоверного отклонения от ожидаемого соотношения 1:1, что четко указывает на аллельный характер их наследования. Дополнительные исследования диплоидных тканей также подтвердили как генетическую природу найденных вариантов, так и димерную структуру глюкозофосфатизомеразы у пихты (Neale, Adams, 1981; Jacobs et al., 1984; Pascual et al., 1993; Fady, Conkle, 1992; Hussendorfer et al., 1995). Следует отметить, что все перечисленные авторы используют для популяционно-генетического анализа два локуса, кодирующих ген-ферментную систему GPI.

**Глутаматдегидрогеназа.** Глутаматдегидрогеназа на электрофореграммах выявлялась в виде одной зоны активности с четко очерченными тонкими фракциями. В ходе анализа восточно-европейских природных популяций *A. alba* нам удалось обнаружить два различных электрофоретических варианта по GDH. Электрофореграмма, демонстрирующая выявленные нами варианты в гаплоидных эндоспермах пихты белой, представлена на рис. 3. Проведенный генетический анализ показал, что данный фермент у пихты белой кодируется одним локусом с кодоминантными аллелями  $Gdh^{1.00}$  и  $Gdh^{1.10}$  (табл. 2). На электрофореграммах индивидуальные спектры гетерозиготных зародышей представляют собой одну диффузную зону, что, по видимому, соответствует мультимерной структуре фермента глутаматдегидрогеназа, которая была выявлена и у других видов хвойных (Adams, Joly, 1980; Cheliak, Pitel, 1984; Cheliak et al., 1985; Ernst et al., 1987; Fady, Conkle, 1992; Гончаренко и др., 1989).

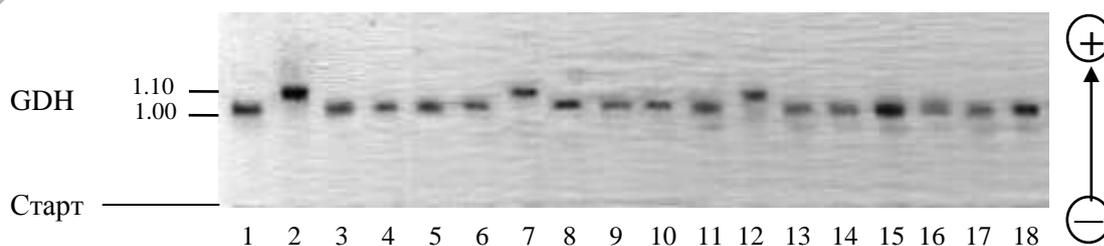


Рис. 3. Электрофореграмма глутаматдегидрогеназы из эндоспермов *A. alba*: 1, 3-6, 8-11, 13-18 —  $GDH^{1.00}$ ; 2, 7, 12 —  $GDH^{1.10}$

**6-Фосфоглюконатдегидрогеназа.** Данный фермент из эндоспермов *A. alba* выявлялся на геле двумя зонами. Каждый вариант быстро мигрирующей зоны выявлялся в виде трехфракционного спектра, в то время как варианты медленной зоны были представлены единичными четко очерченными фракциями. В ходе исследования материала деревьев *A. alba* нам удалось обнаружить три различных электрофоретических варианта в быстрой зоне — 6-PGD-1<sup>0,90</sup>, 6-PGD-1<sup>1,00</sup>, 6-PGD-1<sup>1,15</sup> и два в медленной — 6-PGD-2<sup>0,80</sup>, 6-PGD-2<sup>1,00</sup>.

Наблюдаемое расщепление найденных вариантов 6-фосфоглюконат-дегидрогеназы в эндоспермах гетерозиготных деревьев не отличалось от ожидаемого 1:1 (табл. 2). Это указывает на генетическую природу выявленных нами вариантов. Необходимо отметить, что изменение подвижности в каждой из зон 6-фосфоглюконатдегидрогеназы носило асинхронный характер, тем самым подчеркивая двухлокусный контроль данной ферментной системы у пихты белой.

Наличие двух локусов 6-Pgd у *A. alba* было описано широким кругом исследователей (Bergmann, Kownatzski, 1987; Schroder, 1989; Breitenbach-Dorfer et al., 1992; Hussendorfer et al., 1995; Longauer, 1994). Два локуса, кодирующих 6-фосфоглюконатдегидрогеназу было выявлено также у палеарктических пихт *Abies pinsapo* Boiss., *A. nordmanniana* (Stef.) Spach., *A. nephrolepis* Maxim., *A. semenovii* B. Fedtsch., *A. sibirica* Ledeb. (Pascual et al. 1993; Гончаренко, Падутов, 1995; Гончаренко, 1999), и неоарктической *A. fraseri* (Pursh) Poir. (Jacobs et al., 1984). В тоже время в ряде работ, посвященных изучению таких видов пихт, как *A. balsamea* (L.) Mill. и *A. borisii-regis* Mattf. отмечается наличие только одного локуса 6-Pgd (Neale, Adams, 1981; Fady, Conkle, 1992).

**Малатдегидрогеназа.** При гистохимическом окрашивании гелей на малатдегидрогеназу было выявлено две основные зоны ферментативной активности. Быстро мигрирующая анодная зона, обозначенная нами как MDH-1, в изученных популяциях оказалась мономорфной. В медленной катодной зоне было обнаружено два электрофоретических варианта: MDH-2<sup>0,80</sup> и MDH-2<sup>1,00</sup>. Анализ расщепления электрофоретических вариантов подтвердил их генетическую детерминацию (табл. 2). Гетерозиготные по данному локусу зародыши на фореграмме выявлялись тремя фракциями, что соответствует димерной структуре ферментативно активной молекулы MDH.

Следует подчеркнуть, что в отличие от елей и двухвойных сосен, где анализ MDH не вызывает особых затруднений (Гончаренко и др., 1989; 1992; Гончаренко, Потенко, 1991а,б; 1992; Goncharenko et al., 1994; 1995; Гончаренко, 1999) малатдегидрогеназа у пихт является одной из наиболее сложных для интерпретации ген-ферментных систем, поскольку имеется определенное перекрытие между электрофоретическими аллельными вариантами обеих основных зон. Кроме того, на фореграммах можно видеть еще одну слабоокрашенную зону MDH, которая также располагается в районе перекрытия двух основных зон. По-видимому, этот момент является главной причиной того, что различные авторы используют неодинаковое количество локусов Mdh при генетическом анализе *A. alba*.

Например, в работе Лонгауера (Longauer, 1994) также как и в наших исследованиях у *A. alba* (Гончаренко, Падутов, 1995; Гончаренко, 1999), учитываются два структурных гена кодирующих малатдегидрогеназу. Некоторые авторы описывают три локуса Mdh у этого вида (Breitenbach-Dorfer et al., 1992; Hussendorfer et al., 1995). Интересно, что и в других исследованиях по различным видам пихт имеются разногласия касающиеся количества генов, кодирующих данную ферментную систему. Так, Кормутак и Янг (Kormutak, Yang, 1998) при популяционно-генетическом анализе дальневосточных пихт учитывают три локуса, в то время как ряд исследователей при изучении северо-американских и азиатских представителей рода *Abies* используют только два гена (Neale, Adams, 1981; Гончаренко, Падутов, 1995; Гончаренко, 1999).

**Флюоресцентная эстераза.** Данный фермент на электрофореграммах выявлялся только при освещении ультрафиолетовым светом в виде одной основной четкой флюоресцирующей зоны, обозначенной нами как FL-EST. Полиморфизм по флюоресцентной эстеразе удалось обнаружить только в одной из всех проанализированных популяций. Причем, было найдено

только два электрофоретических варианта: FL-EST<sup>0.90</sup> и FL-EST<sup>1.00</sup>. Анализ расщепления вариантов в гаплоидных тканях гетерозиготных деревьев не показал достоверного отклонения от ожидаемого соотношения 1:1, что четко указывает на аллельный характер их наследования (табл. 2). Выявленный нами трехфракционный спектр в гетерозиготных зародышах говорит о димерной структуре молекулы фермента флюоресцентная эстераза у *A. alba*.

Нельзя не отметить тот факт, что Мейнартовичу при анализе 8 польских насаждений *A. alba* не удалось обнаружить полиморфизм по гену (Fle), кодирующему флюоресцентную эстеразу (Mejnartowicz, 1996). Отсутствие данных по FL-EST в других работах, посвященных генетическим исследованиям пихты белой, не позволяет нам более обстоятельно провести сравнительный анализ этой ген-ферментной системы у данного вида.

**Шикиматдегидрогеназа.** При гистохимическом окрашивании гелей на шикиматдегидрогеназу была выявлена одна зона ферментативной активности, представленная двумя вариантами: SKDH<sup>1.00</sup> и SKDH<sup>1.10</sup>. Анализ расщепления электрофоретических вариантов подтвердил их генетическую детерминацию (табл. 2). Необходимо подчеркнуть, что в большинстве проанализированных популяций присутствовал лишь основной аллель — SKDH<sup>1.00</sup>, в то время как альтернативный — SKDH<sup>1.10</sup> встретился нам только в одном насаждении.

Довольно низкая вариабельность этого локуса, или полное отсутствие изменчивости в популяциях *A. alba* также были описаны еще рядом авторов (Bergmann, Kownatzski, 1987; Schroder, 1989; Hussendorfer et al., 1995).

**Гексокиназа.** Гексокиназа на электрофореграммах выявлялась в виде одной зоны активности со слабоокрашенными тонкими фракциями. В ходе анализа восточноевропейских природных популяций *A. alba* нам удалось обнаружить полиморфизм по НК, который был представлен двумя электрофоретическими вариантами: НК<sup>1.00</sup> и НК<sup>1.10</sup>. Из таблицы 2 хорошо видно, что расщепление этих вариантов в гаплоидных тканях гетерозиготных деревьев соответствует ожидаемому соотношению 1:1. В целом проведенный генетический анализ показал, что гексокиназа у пихты белой кодируется одним локусом с кодоминантными аллелями Hk<sup>1.00</sup> и Hk<sup>1.10</sup>.

Следует отметить, что нам не удалось обнаружить в научной литературе какой-либо информации о ферментной системе гексокиназа у пихты белой.

**Сорбитолдегидрогеназа.** Данный фермент выявлялся в виде трех зон активности. Электрофоретический спектр основной, быстро мигрирующей зоны был представлен одиночными четко очерченными фракциями. Окраска двух медленно мигрирующих зон (данные зоны выявлялись также при гистохимическом окрашивании на алкогольдегидрогеназную активность) зачастую носила диффузный характер, что послужило поводом к исключению этих зон из дальнейших исследований. Во всех исследованных нами популяциях пихты белой, зона сорбитолдегидрогеназы оказалась мономорфной, т.е. была представлена только одним электрофоретическим вариантом SDH<sup>1.00</sup>. Хотелось бы отметить, что у *A. nordmanniana*, близкородственного к *A. alba* вида, полиморфизм по этому локусу крайне низок, в то время как у сибирской и дальневосточных пихт изменчивость данного гена определенно высока (Гончаренко, 1999).

**Малик-энзим.** При гистохимическом окрашивании гелей на малик-энзим была обнаружена одна зона ферментативной активности. Электрофоретический спектр выявленной зоны в гаплоидных тканях *A. alba* представлен одиночными четкоокрашенными фракциями с различной электрофоретической подвижностью: ME<sup>1.00</sup> и ME<sup>0.95</sup>. В некоторых гаплоидных образцах у ряда деревьев было отмечено отсутствие ферментативной активности, что указывает на наличие так называемого нулевого варианта ME<sup>0</sup>, форма фермента которого не способна осуществлять химическую реакцию. Проведенный генетический анализ гаплоидных образцов показал, что все выявленные нами варианты являются аллельными продуктами одного гена, хотя наблюдалось отклонение от ожидаемого соотношения 1:1 в сочетании вариантов Me<sup>0.95</sup> и Me<sup>1.00</sup> (табл. 2).

**Диафораза.** Диафораза у пихты белой выявлялась тремя основными зонами ферментативной активности. Быстро мигрирующая зона была представлена одиночными интенсивно окра-

шенными фракциями. В исследованных популяциях по DIA-1 обнаружено два электрофоретических варианта: DIA-1<sup>1.00</sup> и ферментативно неактивный — DIA-1<sup>0</sup>. В ходе анализа расщепления выявленных вариантов в гаплоидных образцах наблюдалось отклонение от ожидаемого соотношения 1:1 (табл. 2). Средняя зона зачастую окрашивалась слабо и непостоянно, и в дальнейших исследованиях нами во внимание не принималась. Медленно мигрирующая зона во всех проанализированных насаждениях оказалась мономорфной по варианту DIA-3<sup>1.00</sup>.

Хотелось бы отметить, что диафореза является достаточно сложной для интерпретации ген-ферментной системой. Это связано с тем, что субстраты, применяющиеся для гистохимического окрашивания DIA, могут быть использованы и некоторыми другими ферментными системами. Так, в работе Хассендорфера с соавторами (Hussendorfer et al., 1995) проводился сравнительный анализ полученных электрофореграмм диафорезы, менадионредуктазы и NADH-дегидрогеназы. Менадионредуктаза выявлялась пятью зонами ферментативной активности, диафореза — четырьмя, а NADH-дегидрогеназа — тремя (Hussendorfer et al., 1995). Было показано, что быстрая зона диафорезы (DIA-A) и вторая быстро мигрирующая зона менадионредуктазы (MNR-B) детерминируются одним и тем же геном (Dia-A или Mnr-B). Расположение и очертание трех медленных зон как у DIA, так и у MNR по данным немецких исследователей полностью совпадали со структурой и расположением зон NADH-дегидрогеназы (Hussendorfer et al., 1995).

Полиморфизм по локусу, кодирующему зону MNR-B, или DIA-A для представителей рода *Abies* также описан рядом авторов (Bergmann, Kownatzski, 1987; Fady, Conkle, 1992; Longauer, 1994). В работе Мейнартовича, посвященной изучению восточноевропейских популяций пихты белой, данный локус (обозначенный, как Men2) оказался мономорфным, хотя автор отмечает наличие трех аллелей по этому гену в популяциях пихты белой, произрастающих в западной части ее ареала (Mejnartowicz, 1996).

**Пептидаза.** Данный фермент выявлялся на электрофореграммах тремя основными зонами активности, при использовании в качестве субстратов дипептидов Leu-Тур, Gly-Leu и трипептида Leu-Gly-Gly. Быстро мигрирующая слабоокрашенная зона была идентична LAP-1. Проявление средней зоны зачастую носило непостоянный характер, и из дальнейших исследований она была исключена. Медленно мигрирующая зона была представлена тремя электрофоретическими вариантами: PEP<sup>0.90</sup>, PEP<sup>1.00</sup> и PEP<sup>1.05</sup>. Анализ расщепления вариантов в гаплоидных тканях гетерозиготных образцов не показал достоверного отклонения от ожидаемого соотношения 1:1 (табл. 2), что указывает на аллельный характер их наследования. Отсутствие литературных данных по ген-ферментной системе пептидазы у *A. alba* не позволило провести сравнительный анализ полученных нами результатов с данными из других источников.

В целом, в ходе электрофоретического исследования 15 ген-ферментных систем в восточноевропейских популяциях *A. alba* удалось выявить 48 четко различающихся электрофоретических вариантов. В результате проведенного нами всестороннего генетического анализа было установлено, что 48 найденных вариантов у пихты белой находятся под генетическим контролем 22-х независимых локусов.

Подводя итог данной работы, следует подчеркнуть, что 22 гена, кодирующих спектр ферментов из различных метаболических цепей, являются вполне надежной, хорошо функционирующей базой для решения широкого спектра задач, связанных с анализом популяционно-генетических ресурсов у пихты белой.

Работа выполнялась в рамках программ Госкомитета СССР по лесу, Национальной АН Беларуси и международного проекта “Сохранение биологического разнообразия лесов Беловежской пуши”, поддержана различными научными грантами, такими как ISF “RW 2000”, “RW 2300”, GEF 05/28621-BY, № Б99Р-143 БРФФИ. Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории генетики Института леса НАНБ и биологического факультета Гомельского госуниверситета, а также аспирантам и стажерам из стран бывшего Советского

Союза и Польши, которые оказывали содействие на различных этапах генетических исследований.

### Abstract

Inheritance of 15 enzyme systems were investigated by horizontal starch gel electrophoresis in endosperms, embryos and buds of *Abies alba* Mill. The 22 loci were found to code for isozymes of the enzyme systems studied. The segregation data of allozymes in endosperms (megagametophytes) of heterozygous mother trees revealed simple Mendelian inheritance for these enzymes.

The zymogram patterns and number of controlling loci identified in *A. alba* were compared with those of other *Abies* species.

### Литература

1. Гончаренко Г.Г. Геносистематика и эволюционная филогения лесобразующих хвойных Палеарктики. Минск: Тэхналогія, 1999. 188 с.
2. Гончаренко Г. Г., Падутов А.Е. Генетическая структура, таксономические и филогенетические взаимоотношения у пихт СНГ// Докл. АН России. 1995. Т. 342. № 1. С. 122–126.
3. Гончаренко Г. Г., Падутов В. Е., Потенко В. В. Руководство по исследованию хвойных видов методом электрофоретического анализа изоферментов. Гос. ком. СССР по лесу. Гомель: Полеспечать, 1989. 164 с.
4. Гончаренко Г. Г., Потенко В. В. Параметры генетической изменчивости и дифференциации в популяциях ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.) и ели сибирской (*Picea obovata* Ledeb.)// Генетика. 1991а. Т. 27. № 10. С. 1759–1772.
5. Гончаренко Г. Г., Потенко В. В. Генетическая структура, изменчивость и дифференциация популяций ели Глена (*P. glehnii* Mast.) на о. Сахалин// Докл. АН СССР. 1991б. Т. 321. № 3. С. 606–611.
6. Гончаренко Г. Г., Потенко В. В. Изменчивость и дифференциация у ели аянской (*Picea ajanensis* Fisch.) в природных популяциях о. Сахалин и юга Хабаровского края// Докл. АН России. 1992. Т. 325. № 4. С. 838–844.
7. Гончаренко Г. Г., Потенко В. В., Абдыганыев Н. Изменчивость и дифференциация в природных популяциях ели Тянь-шаньской *Picea schrenkiana* Fisch. et Mey.// Генетика. 1992. Т. 28. № 11. С. 83–95.
8. Гончаренко Г. Г., Савицкий Б.П. Популяционно-генетические ресурсы пихты белой в Беларуси: Гомель: ИЛ НАНБ, 2000. 122 с.
9. Крылов Г. В., Марадудин И. И., Михеев Н. И., Козакова Н. Ф. Пихта. М.: Агропромиздат, 1986. 239 с.
10. Маценко А. Е. Пихты восточного полушария/ Флора и систематика высших растений. Вып. 13. (Труды Ботанического института имени В. Л. Комарова. Серия I). М.; Л.: Наука, 1964. С. 3–103.
11. Номенклатура ферментов. М.: ВИНТИ, 1979. 320 с.
12. Швиденко А. И. Ареал *Abies alba* (Pinaceae) на юго-западе СССР// Бот. жур. 1985. Т. 70. № 6. С. 802–805.
13. Adams W.T., Joly R.J. Genetics of allozyme variants in loblolly pine// Heredity. 1980. V. 71. P. 33-40.
14. Bergmann F., Kownatzki D. The genetic variation pattern of silver fir (*Abies alba*) in Europe monitored from enzyme gene loci/ Paule L., Korpel S. (eds) 5. IUFRO-Tannensymposium. Zvolen: Hochschule für Forstwirtschaft und Holztechnologie. 1988. P. 21–26.
15. Breitenbach-Dorfer M., Pinsker W., Hacker R., Muller F. Clone identification and clinal allozyme variation in populations of *Abies alba* from the Eastern Alps (Austria)// Pl. Syst. Evol. 1992. V. 181. P. 109–120.
16. Cheliak W. M., Pitel J. A. Techniques for Starch Gel Electrophoresis of Enzymes from Forest Tree Species. Ottawa: Canadian Forestry Service, 1984. 49 p.

17. *Cheliak W.M., Pitel J.A., Murray G.* Population structure and mating system of white spruce// *Can. J. For. Res.* 1985. V. 15. P. 301-308.
18. *Ernst S.G., Keathley D.E., Hanover J.W.* Inheritance of isozymes in seed and bud tissues of blue and Engelmann spruce // *Genome.* 1987. V. 29. P. 239-246.
19. *Fady B., Conkle M. T.* Segregation and linkage of allozymes in seed tissues of the hybrid Greek fir *Abies borisii-regis* Mattfeld.// *Silvae Genet.* 1992. V. 41. P. 273-278.
20. *Goncharenko G. G., Padutov V. E., Silin A. E.* Population structure, gene diversity, and differentiation in natural populations of Cedar pines (*Pinus* subsect. *Cembrae*, Pinaceae) in the USSR// *Pl. Syst. Evol.* 1992. V. 182. P. 121-134.
21. *Goncharenko G. G., Silin A. E., Padutov V. E.* Allozyme variation in natural populations of Eurasian pines. III. Population structure, diversity, differentiation and gene flow in central and isolated populations of *Pinus sylvestris* L. in Eastern Europe and Siberia// *Silvae Genet.* 1994. V. 43. P. 119-132.
22. *Goncharenko G. G., Silin A. E., Padutov V. E.* Intra- and interspecific genetic differentiation in closely related pines from *Pinus* subsection *Sylvestres* (Pinaceae) in the former Soviet Union// *Pl. Syst. Evol.* 1995a. V. 194. P. 39-54.
23. *Hussendorfer E., Konnert M., Bergmann F.* Inheritance and linkage of isozyme variants of silver fir (*Abies alba* Mill.)// *Forest Genetics.* 1995. V. 2. P. 29-40.
24. *Jacobs B. F., Werth C. R., Guttman S. I.* Genetic relationships in *Abies* (fir) of eastern United States: an electrophoretic study// *Can. J. Bot.* 1984. V. 62. P. 609-616.
25. *Kormutak A., Yang J. C.* The genetics and embryology of Taiwan Fir (*Abies kawakamii* (Hayata) Ito)// *Taiwan J. For. Sci. Monograph* 1. 1998. V. 13. 78 p.
26. *Liu T. S.* A Monograph of Genus *Abies*. Taipei, Taiwan, 1971. 608 p.
27. *Longauer R.* Genetic differentiation and diversity of european silver fir in eastern part of its natural range// *Proc. of the 7 IUFRO Weststannen-Symposium, Okologie und Waldbau der Weisstanne, 31.10- 3. 11. 1994. Altensteig.* 1994. P. 155-163.
28. *Mejnartowicz L.* Cisovka — the relic population of *Abies alba* and its relationship to man-made silver-fir stands in Bialowieza primeval forest// *Acta Soc. Bot. Poloniae.* 1996. V. 65. No. 3-4. P. 319-328
29. *Mejnartowicz L., Lewandowski A., Bergmann F.* Genetic structure and variation of the European silver-fir populations at man-made range disjunction/ *Proc. of the 7 IUFRO Tannensymposium der WP S.1.01-08, Okologie und Waldbau der Weisstanne, 31. 10-3. 11. 1994. Altensteig.* 1994. P. 118-127.
30. *Neale D. B., Adams W. T.* Inheritance of isozyme variants in seed tissues of balsam fir (*Abies balsamea*)// *Can. J. Bot.* V. 59. P. 1285-1291.
31. *Pascual L., Garcia F. J., Perfectti F.* Inheritance of isozyme variants in seed tissues of *Abies pinsapo* Boiss.// *Sylv. Gen.* 1993. V. 42. P. 285-376.
32. *Prakash S.* Genetic divergence in closely related sibling species *Drosophila pseudoobscura*, *Drosophila persimilis* and *Drosophila miranda*// *Evolution.* 1977. V. 31. P. 14-23.
33. *Schroeder S.* Isozyme polymorphisms in silver fir (*Abies alba* Mill.)// *Silvae Genet.* 1989. V. 38. P. 130-133.
34. *Shea K. L.* Segregation of allozyme loci in megagametophytes of Engelmann spruce and subalpine fir// *Genome.* 1988. V. 30. P. 103-107.
35. *Vidaković M.* Conifers Morphology and Variation. Zagreb: Grafički zavod Hrvatske, 1991. 765 p.