

УДК 575.174.015.3:582.475.2

## ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ИЗОФЕРМЕНТОВ ЕЛИ СИБИРСКОЙ (*PICEA OBOVATA* LEDEB.) В ПРИЕНИСЕЙСКОЙ СИБИРИ

А. Н. Кравченко, А. Я. Ларионова

Институт леса им. В. Н. Сукачева, Сибирское отделение РАН, г. Красноярск  
E-mail: albina@ksc.krasn.ru

Методом горизонтального электрофореза в крахмальном геле исследован генетический контроль MDH, SKDH, 6-PGD, IDH, PEP-CA, GOT, FDH, LAP, PGI, PGM, SOD, GDH в мегагаметофитах семян ели сибирской (*Picea obovata* Ledeb.) из трех природных популяций Приенисейской Сибири. Хорошее электрофоретическое разделение получено для аллельных продуктов 22 локусов. Четыре локуса (*Got-1*, *Sod-1*, *Pgm-1*, *Mdh-1*) оказались мономорфными, остальные (*Mdh-2*, *Mdh-3*, *Skdh-1*, *Skdh-2*, *6-Pgd-2*, *6-Pgd-3*, *Idh-2*, *Pepca*, *Got-2*, *Got-3*, *Fdh*, *Lap-1*, *Lap-2*, *Pgi-1*, *Pgi-2*, *Pgm-2*, *Sod-2*, *Gdh*) были полиморфны. Анализ сегрегации выявленных у ели сибирской аллозимных вариантов подтверждает их моногенное наследование.

**Ключевые слова:** ель сибирская, генетический контроль, ферменты, локус, аллель.

### ВВЕДЕНИЕ

С открытием изоферментов и разработкой методов их электрофоретического разделения появились широкие возможности для изучения генетического разнообразия хвойных, являющихся в силу известных причин (продолжительный период жизни, позднее вступление в репродуктивную фазу и т. д.) наиболее сложным объектом для генетического анализа. Использование изоферментов в качестве биохимических маркеров генов позволило в сравнительно короткий срок получить данные о генетической структуре, уровнях внутри- и межпопуляционного разнообразия, степени генетической дифференциации популяций большого числа видов хвойных. В значительной степени этому способствовал и тот факт, что у хвойных, благодаря уникальной системе размножения (гаплоидный эндосперм), выявление аллельных вариантов ферментов не вызывает особых трудностей, поскольку нет необходимости в проведении специальных скрещиваний и анализа потомств в поколениях. Достаточно лишь изучить сегрегацию выявленных в эндоспермах (мегагаметофитах) вариантов ферментов у гетерозиготных деревьев. При моногенном наследовании аллельные варианты будут сегрегировать в соотношении 1:1.

Генетическое разнообразие ели сибирской (*Picea obovata* Ledeb.), занимающей обширный ареал, простирающийся от Кольского полуострова и Заволжья по всей Сибири (кроме Крайнего Севера) до побережья Охотского моря (Бобров,

1978), изучено недостаточно полно. Проведенные до настоящего времени исследования охватывают лишь незначительную часть ареала вида (Гончаренко, Потенко, 1991а; Ларионова, 1995; Krutovskii, Bergmann, 1995; Янбаев и др., 1997; Путенихин и др., 2005; Шигапов, 2005). Это не позволяет оценить генетический потенциал вида в целом, степень его внутривидовой дифференциации.

В задачи настоящей работы входило изучение генетического контроля электрофоретического разнообразия 12 ферментных систем ели сибирской из Приенисейской Сибири с целью выявить изоферментные маркеры структурных генов для генетико-популяционных исследований этого вида в регионе.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили семена, собранные с 86 деревьев в трех выборках ели сибирской, расположенных в разных районах ее естественного произрастания на территории Красноярского края (Туруханский, Енисейский, Большемурагинский). Семена предварительно замачивали в дистиллированной воде в течение 24 ч. Затем мегагаметофиты семян отделяли от зародышей и твердых оболочек семян и гомогенизировали отдельно в 1–2 каплях экстрагирующего буфера: 0,05 М Трис-НСl рН 7,7, содержащего дитиотрейтол (0,06%), трилон Б (0,02%) и β-меркаптоэтанол (0,05%). Продолжительность экстракции 1 ч. У каждого дерева анализировали не менее 6 мегагаметофитов.

Разделение экстрактов проводили методом горизонтального электрофореза в 13%-ном крах-

мальном геле в течение 6 ч при температуре 5°C, силе тока 40 мА, напряжении 170 В в трех буферных системах: I – морфолин-цитратной, pH 7,0 (Clayton, Tretiak, 1972), II – трис-цитратной, pH 8,5 / гидроокись лития-боратной, pH 8,1 (Ridgway et al., 1970), III – трис-ЭДТА-боратной, pH 8,6 (Корочкин и др., 1977). Составы гелевых и электродных буферов не отличались от рекомендуемых.

Последующее гистохимическое окрашивание проводили согласно методическим руководствам (Brewer, 1970; Vallejos, 1983; Гончаренко, Падутов, 1988; Manchenko, 1994; и др.) с некоторыми модификациями. Включенные в анализ ферменты, используемые для их электрофоретического разделения буферные системы, число идентифицируемых локусов и аллелей приведены в табл. 1.

Зоны активности ферментов и соответствующие им генные локусы нумеровали в порядке убывания их электрофоретической подвижности от анода к катоду. Аллели обозначали в соответствии с относительной подвижностью кодируемых ими вариантов ферментов по сравнению с наиболее распространенным вариантом, подвижность кото-

рого принималась за 100 (Prakash et al., 1969). Фенотипически не проявляющиеся аллельные варианты ферментов (аллозимы) обозначали *n*.

Аллельный характер обнаруженных в процессе электрофореза вариантов ферментов устанавливали на основании изучения их сегрегации среди гаплоидных мегагаметофитов семян отдельных деревьев. В соответствии с менделеевскими закономерностями при моногенном наследовании у деревьев, гетерозиготных по какому-либо локусу, аллельные варианты ферментов должны сегрегировать в соотношении 1:1. Степень соответствия наблюдаемых соотношений аллозимов ожидаемым проверяли с помощью теста  $\chi^2$  (Айала, 1984).

При оценке уровня полиморфизма локусов использовались два критерия полиморфности: 95%-ный (частота наиболее распространенного аллеля не превышает 95%) и 99%-ный (частота наиболее распространенного аллеля не превышает 99%).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При электрофоретическом анализе 12 ферментных систем в трех выборках ели сибирской было

обнаружено 55 стабильно проявляющихся аллельных вариантов, находящихся под контролем 22 ферментных локусов. Схематическое изображение и обозначение выявленных вариантов представлено на рисунке.

*Малатдегидрогеназа* (MDH). Электрофоретический спектр MDH мегагаметофитов семян ели сибирской включает в себя три зоны ферментативной активности, контролируемые тремя независимыми локусами: *Mdh-1*, *Mdh-2*, *Mdh-3*. Быстромигрирующая зона фермента, кодируемая локусом *Mdh-1*, оказалась инвариантной. В двух других зонах, MDH-2 и MDH-3, обнаружена изменчивость. В зоне MDH-2, детерминируемой локусом *Mdh-2*, выявлены два альтернативных варианта фермента, различающихся по электрофоретической подвижности. Один из них, «медленный» *Mdh-2*<sup>72</sup>, является редким. Найдено лишь

Таблица 1. Ферменты, число идентифицируемых локусов и аллелей, буферные системы, используемые в работе

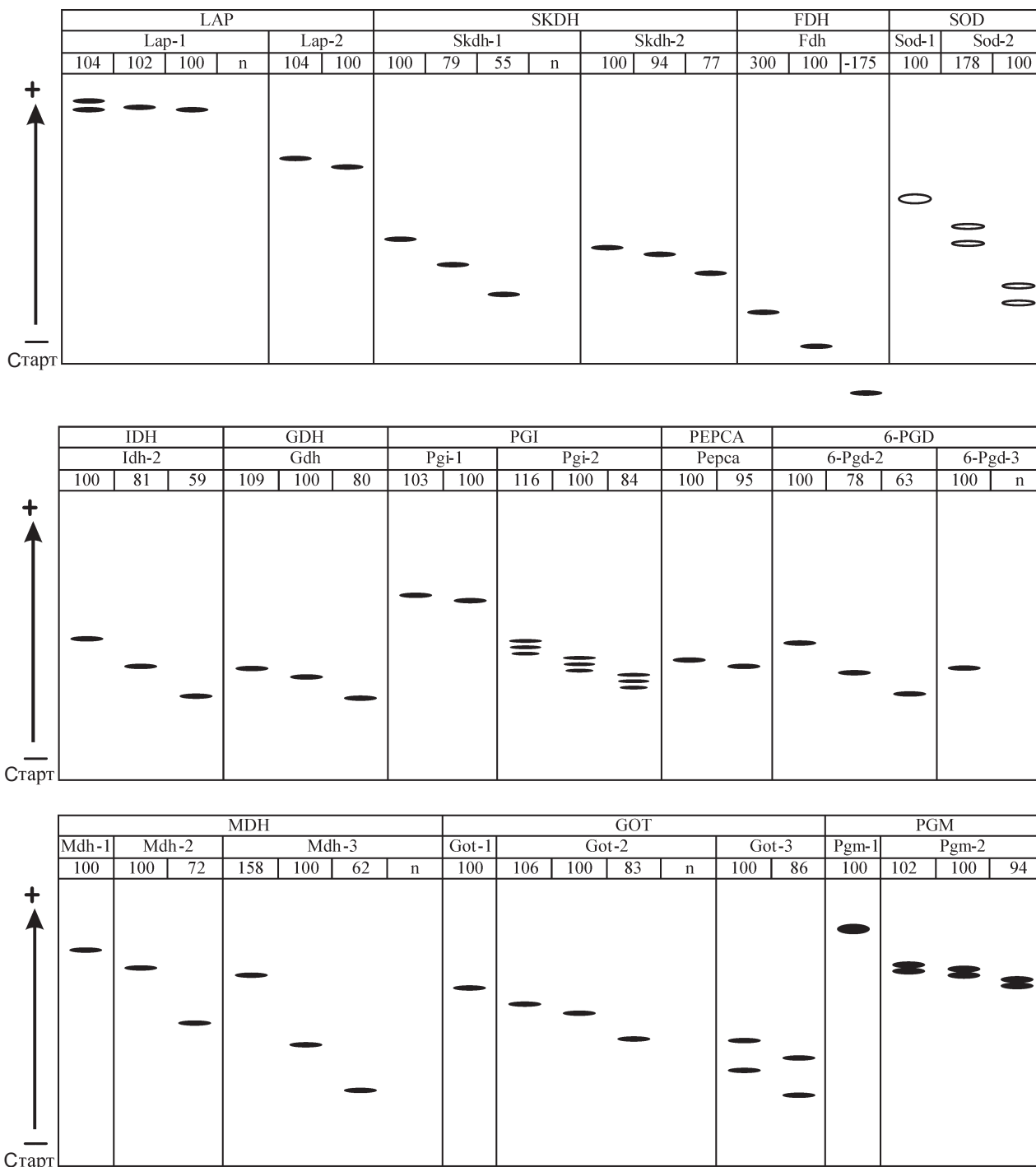
Table 1. Enzymes, the number of loci and alleles identified, and the buffer systems used in this study

Фермент	Идентифицируемый локус	Число выявленных аллелей	Буферная система
Малатдегидрогеназа (MDH, 1.1.1.37)	<i>Mdh-1</i>	1	I
	<i>Mdh-2</i>	2	
	<i>Mdh-3</i>	4	
Шикиматдегидрогеназа (SKDH, 1.1.1.25)	<i>Skdh-1</i>	4	I
	<i>Skdh-2</i>	3	
6-фосфоглюконатдегидрогеназа (6-PGD, 1.1.1.44)	<i>6-Pgd-2</i>	3	I
	<i>6-Pgd-3</i>	2	
Изоцитратдегидрогеназа (IDH, 1.1.1.42)	<i>Idh-2</i>	3	I
Фосфоенолпируваткарбоксилаза (PEPCase, 4.1.1.31)	<i>Pepca</i>	2	I, III
Глутаматоксалоацетаттрансаминаза (GOT, 2.6.1.1)	<i>Got-1</i>	1	II
	<i>Got-2</i>	4	
	<i>Got-3</i>	2	
Формиатдегидрогеназа (FDH, 1.2.1.2)	<i>Fdh</i>	3	II
Лейцинаминопептидаза (LAP, 3.4.11.1)	<i>Lap-1</i>	4	II
	<i>Lap-2</i>	2	
Фосфоглюкоизомераза (PGI, 5.3.1.9)	<i>Pgi-1</i>	2	II
	<i>Pgi-2</i>	3	
Фосфоглюкомутаза (PGM, 2.7.5.1)	<i>Pgm-1</i>	1	III
	<i>Pgm-2</i>	3	
Супероксиддисмутаза (SOD, 1.15.1.1)	<i>Sod-1</i>	1	III
	<i>Sod-2</i>	2	
Глутаматдегидрогеназа (GDH, 1.4.1.2)	<i>Gdh</i>	3	III

одно дерево, несущее данный аллель в гетерозиготном состоянии. В медленномигрирующей зоне MDH-3, кодируемой локусом *Mdh-3*, выявлены три однополосных варианта с измененной электрофоретической подвижностью (*Mdh-3<sup>158</sup>*, *Mdh-3<sup>100</sup>*, *Mdh-3<sup>62</sup>*) и вариант, не имеющий фенотипического выражения (*Mdh-3<sup>n</sup>*), который встречается крайне редко (см. рисунок). Кроме того, между зонами MDH-2 и MDH-3 обнаружена дополнительная полоса ферментативной активности, представляю-

щая собой межлокусный гетеродимер, образующийся в результате взаимодействия аллельных продуктов локусов *Mdh-2* и *Mdh-3*. У некоторых деревьев наблюдается увеличение подвижности как аллельных вариантов локусов *Mdh-2* и *Mdh-3*, так и гетеродимеров, обусловленное, по всей вероятности, действием гена-модификатора.

Обычно у хвойных выявляются три-четыре локуса, кодирующих MDH (El-Kassaby, 1981). У всех исследованных до настоящего времени ви-



Схематическое изображение и обозначение аллозимов 22 локусов ели сибирской  
Schematized and designated allozymes for 22 loci of Siberian spruce

дов елей, как правило, идентифицируются три локуса (Yeh, El-Kassaby, 1980; King, Dancik, 1983; Cheliak, Pitel, 1984; O'Reilly et al., 1985; Алтухов и др., 1986; Yeh, Arnott, 1986; Yeh et al., 1986; Boyle, Morgenstern, 1987; Ernst et al., 1987; Гончаренко, Потенко, 1991а, б; Ларионова, 1995; Гончаренко, Падутов, 2001; Путенихин и др., 2005), а у сосен (O'Malley et al., 1979; Крутовский и др., 1989; Падутов, 2001; Белоконь и др., 2005), листовниц (Ying, Morgenstern, 1990; Lewandowski, Mejnartowicz, 1990; Ларионова, Яхнева, 2003) – четыре локуса.

**Шикиматдегидрогеназа (SKDH).** На гелях, окрашенных на SKDH, выявляются две изменчивые зоны активности фермента, кодируемые локусами *Skdh-1* и *Skdh-2* (см. рисунок). Локус *Skdh-1* продуцирует три однополосных варианта, различающихся по подвижности, и вариант, не имеющий ферментативной активности. Наиболее распространенным оказался аллель *Skdh-1<sup>100</sup>*, контролирующий фенотипическое проявление самого быстрого варианта. Локус *Skdh-2* представлен тремя аллелями (*Skdh-2<sup>100</sup>*, *Skdh-2<sup>94</sup>*, *Skdh-2<sup>77</sup>*), кодирующими однополосные варианты фермента с измененной подвижностью.

Два локуса SKDH, один из которых (*Skdh-1*) оказался мономорфным, выявлены также при изучении ели сибирской на Южном Урале (Янбаев и др., 1997; Путенихин и др., 2005). Г. Г. Гончаренко и В. Е. Падутов (2001) идентифицировали у ели сибирской лишь один локус. У *Picea abies* наблюдались две зоны активности SKDH, однако при изучении генетической изменчивости этого вида учитывалась лишь «быстрая» зона фермента (Падутов, 2001). «Медленная» зона вследствие слабого и непостоянного окрашивания была исключена из анализа. Один локус SKDH использовался и при исследовании других видов ели (Boyle, Morgenstern, 1985; Knowles, 1985; Shea, Grant, 1986; Muona et al., 1987; Гцмцгу, 1992; Потенко, Кривко, 1993; Гончаренко, Падутов, 2001).

**6-фосфоглюконатдегидрогеназа (6-PGD).** Электрофоретическое разнообразие 6-PGD мегagamетофитов семян ели сибирской находится под контролем трех полиморфных локусов: *6-Pgd-1*, *6-Pgd-2*, *6-Pgd-3*. Однако четкое разделение вариантов наблюдалось лишь в двух зонах, кодируемых локусами *6-Pgd-2*, *6-Pgd-3* (см. рисунок). Более «быстрая» зона, 6-PGD-2, включала в себя три альтернативных однополосных варианта фермента с относительными подвижностями 100, 78 и 63. «Медленная» зона, 6-PGD-3, имеет два варианта, один из которых не выражен фенотипически. Кроме того, установлено, что аллельные варианты этих двух зон могут взаимодействовать друг с другом, образуя межлокусные гетеродимеры. Подобные спектры изменчивости 6-PGD у ели сибирской описаны ранее Г. Г. Гончаренко и В. В. Потенко (1991а).

Трехлокусный контроль 6-PGD установлен также у *Picea abies* (Алтухов и др., 1986; Крутов-

ский, Гафаров, 1987; Morgante et al., 1989; Падутов, 2001), *P. ajanensis* (Гончаренко, Потенко, 1992; Гончаренко, Падутов, 2001), *P. glauca* (King, Dancik, 1983; Yeh, Arnott, 1986), *P. glehnii* (Гончаренко, Потенко, 1991б; Гончаренко, Падутов, 2001), *P. sitchensis* (Yeh, Arnott, 1986), *P. schrenkiana* и *P. orientalis* (Гончаренко, Падутов, 2001).

**Изоцитратдегидрогеназа (IDH).** IDH локализуется на гелях в двух зонах активности: IDH-1 и IDH-2. «Быстрая» зона, IDH-1, представлена двумя синхронно мигрирующими полосами, однако из-за слабого и нестабильного окрашивания ее генетическая интерпретация оказалась невозможной и соответствующий ей локус был исключен из анализа. В «медленной» зоне, IDH-2, обнаружены три однополосных варианта фермента с относительными подвижностями 100, 81, 59, кодируемых аллелями локуса *Idh-2*.

Подобный наблюдаемому спектр изменчивости IDH был описан и при исследовании других популяций ели сибирской (Ларионова, 1995; Гончаренко, Падутов, 2001), а также у ряда других видов ели (Bergmann, Scholz, 1985; Алтухов и др., 1986; Muona et al., 1987; Goncharenko et al., 1995; Гончаренко, Падутов, 2001; Падутов, 2001). У североамериканских видов елей учитывался один локус, хотя нередко указывалось на наличие дополнительных зон активности фермента (Yeh, El-Kassaby, 1980; King, Dancik, 1983; Cheliak, Pitel, 1984; King et al., 1984; Boyle, Morgenstern, 1985, 1987; Cheliak et al., 1985; Yeh, Arnott, 1986; Shea, Grant, 1986; Yeh et al., 1986; Ernst et al., 1987; Alden, Loopstra, 1987).

**Фосфоенолпируваткарбоксилаза (PEPСА).** При окрашивании гелей на PEPСА выявляется одна зона активности фермента, кодируемая локусом *Pepca* с двумя аллелями – частым *Pepca<sup>100</sup>* и редким *Pepca<sup>95</sup>*, который был обнаружен лишь у одного дерева в гетерозиготном состоянии в выборке ели сибирской из Енисейского района Красноярского края. Оба аллеля продуцируют однополосные варианты фермента (см. рисунок).

К. В. Крутовский и Ф. Бергман (Krutovskii, Bergmann, 1995), исследуя *P. obovata* в зоне ее интрогрессивной гибридизации с *P. abies*, обнаружили в локусе *Pepca* четыре аллельных варианта. У других видов хвойных выявляется одна инвариантная зона PEPСА (Hussendorfer et al., 1995; Белоконь и др., 2005).

**Глутаматоксалоацетаттрансаминаза (GOT).** На гелях, окрашенных на GOT, выявляются три зоны ферментативной активности. Две «быстрые» зоны контролируются соответственно мономорфным локусом *Got-1* и полиморфным локусом *Got-2*. В исследованной выборке деревьев ели сибирской обнаружены четыре аллеля локуса *Got-2*: наиболее распространенный *Got-2<sup>100</sup>* и редкие *Got-2<sup>106</sup>*, *Got-2<sup>83</sup>*, *Got-2<sup>n</sup>*, кодирующие однополосные варианты, различающиеся по подвижности. «Медлен-

ная» зона, GOT-3, детерминируется полиморфным локусом *Got-3* с двумя аллелями: *Got-3<sup>100</sup>*, *Got-3<sup>86</sup>*, проявляющимися на гелях в виде двух синхронно мигрирующих полос фермента разной подвижности (см. рисунок).

Трехлокусный контроль электрофоретической изменчивости GOT установлен и при исследовании ели сибирской из других популяций (Ларионова, 1995; Путенихин и др., 2005). Г. Г. Гончаренко и В. В. Потенко (1991а), исследуя генетическое разнообразие ели сибирской, учитывали лишь два локуса GOT. Три локуса GOT описаны у *P. abies* (Lundkvist, 1979; Poulsen et al., 1983; Алтухов и др., 1986), у *P. glauca* (Cheliak et al., 1985).

**Формиатдегидрогеназа (FDH).** Единственная зона активности этого фермента контролируется высокополиморфным локусом *Fdh*, изменчивость которого определяется тремя аллелями. Два аллеля, *Fdh<sup>100</sup>*, *Fdh<sup>300</sup>*, кодируют анодмигрирующие однополосные варианты фермента, значительно различающиеся по подвижности, один из которых, *Fdh<sup>300</sup>*, является редким и встречается только в гетерозиготном состоянии. Третий аллель, *Fdh<sup>175</sup>*, контролирует однополосный вариант фермента, мигрирующий по направлению к катоду (см. рисунок).

Одна полиморфная зона активности этого фермента, кодируемая четырьмя аллелями, была выявлена при исследовании особей гибридной популяции *P. abies* × *P. obovata* (Krutovskii, Bergmann, 1995). У *P. glauca* в локусе *Fdh* идентифицированы три аллеля (Tsay, Taylor, 1978).

**Лейцинаминопептидаза (LAP).** Наблюдаются две изменчивые зоны активности фермента. Быстромигрирующая зона, кодируемая локусом *Lap-1*, представлена четырьмя вариантами, два из которых однополосные (*Lap-1<sup>102</sup>*, *Lap-1<sup>100</sup>*), один – двухполосный (*Lap-1<sup>104</sup>*) и один вариант не имеет ферментативной активности (*Lap-1<sup>n</sup>*). Среди продуктов второго локуса два однополосных варианта, кодируемых аллелями *Lap-2<sup>104</sup>* и *Lap-2<sup>100</sup>* (см. рисунок).

Подобный наблюдаемому спектр изменчивости LAP у ели сибирской описан Г. Г. Гончаренко, В. В. Потенко (1991а) и А. Я. Ларионовой (1995). При исследовании восьми выборок ели сибирской на Южном Урале и в Башкирском Предуралье выявлены три полиморфных локуса, кодирующих электрофоретическое разнообразие этого фермента (Путенихин и др., 2005). У большинства исследованных видов хвойных, в том числе видов рода *Picea* (King, Dancik, 1983; Cheliak, Pitel, 1984; O'Reilly et al., 1985; Гончаренко, Падутов, 2001; Падутов, 2001), идентифицируются два локуса LAP.

**Фосфоглюкоизомераза (PGI).** Выявляются две зоны ферментативной активности PGI. Обе изменчивы. В «быстрой» зоне, PGI-1, обнаружены два однополосных варианта, контролируемые двумя аллелями локуса *Pgi-1*. Аллель *Pgi-1<sup>100</sup>* ответствен

за проявление наиболее распространенного «медленного» варианта фермента, а аллель *Pgi-1<sup>103</sup>* – редко встречающегося «быстрого» варианта. Во второй, более интенсивно окрашивающейся зоне PGI-2 выявлены три различных по подвижности альтернативных варианта фермента, проявляющиеся на гелях в виде трех синхронно мигрирующих полос, кодируемых аллелями локуса *Pgi-2*: *Pgi-2<sup>116</sup>*, *Pgi-2<sup>100</sup>*, *Pgi-2<sup>84</sup>*. В исследованной выборке ели сибирской преобладает аллель *Pgi-2<sup>100</sup>*, детерминирующий промежуточный по подвижности вариант PGI.

Два локуса, кодирующие PGI, обнаружены также при исследовании ели сибирской Г. Г. Гончаренко и В. Е. Падутовым (2001). Однако, как указывают авторы, более подвижная зона окрашивалась слабо, поэтому в генетико-популяционных исследованиях этого вида ими учитывалась только одна медленно мигрирующая зона фермента. У других видов рода *Picea* также выявляются два или один локус PGI (Yeh, El-Kassaby, 1980; King, Dancik, 1983; Knowles, 1985; Yeh, Arnott, 1986; Yeh et al., 1986; Alden, Loopstra, 1987; Barrett et al., 1987; Ernst et al., 1987; Tremblay, Simon, 1989; Гончаренко, 1999; Падутов, 2001).

**Фосфоглюкомутаза (PGM).** На электрофореграмме этого фермента выявляются две зоны активности. «Быстрая» интенсивно окрашенная зона PGM-1, находящаяся под контролем локуса *Pgm-1*, была инвариантной в мегагаметофитах всех проанализированных деревьев ели сибирской. Вторая зона PGM-2 изменчива и кодируется отдельным локусом *Pgm-2* с тремя аллелями – *Pgm-2<sup>102</sup>*, *Pgm-2<sup>100</sup>*, *Pgm-2<sup>94</sup>*, продуцирующими двухполосные варианты фермента с измененной подвижностью.

Двухлокусный контроль электрофоретической изменчивости PGM установлен и при изучении других популяций ели сибирской (Гончаренко, Потенко, 1991а; Гончаренко, Падутов, 2001), а также у близкого к ели сибирской вида *P. abies* (Poulsen et al., 1983; Muona et al., 1987; Lagercrantz et al., 1988; Падутов, 2001).

**Супероксиддисмутаза (SOD).** SOD образует на гелях две зоны активности, каждая из которых кодируется отдельным локусом. Локус *Sod-1*, ответственный за проявление «быстрой» зоны, был инвариантным. В локусе *Sod-2*, контролирующем «медленную» зону, обнаружены два аллеля, *Sod-2<sup>178</sup>*, *Sod-2<sup>100</sup>*, продуктами которых являются двухполосные варианты, различающиеся по подвижности.

**Глутаматдегидрогеназа (GDH).** При окрашивании гелей на GDH проявляется одна зона активности фермента с тремя четко очерченными вариантами, которые кодируются аллелями *Gdh<sup>109</sup>*, *Gdh<sup>100</sup>*, *Gdh<sup>80</sup>* (см. рисунок). В исследованных ранее популяциях ели сибирской (Гончаренко, Потенко, 1991а; Ларионова, 1995; Гончаренко, Падутов, 2001) в локусе *Gdh* были выявлены два аллеля. Однолокусный контроль электрофоретичес-

Таблица 2. Сегрегация аллозимов в мегагаметофитах семян гетерозиготных деревьев

Table 2. Segregation of allozymes among megagametophytes of heterozygous trees

Генотип	Кол-во деревьев	Соотношение аллозимов	Критерий $\chi^2$
<i>Mdh-2</i> <sup>100/72</sup>	1	4:2	0,666
<i>Mdh-3</i> <sup>100/158</sup>	8	25:23	0,083
<i>Mdh-3</i> <sup>100/62</sup>	8	20:27	1,042
<i>Mdh-3</i> <sup>100/n</sup>	1	2:4	0,666
<i>Skdh-1</i> <sup>100/79</sup>	1	2:4	0,666
<i>Skdh-1</i> <sup>100/55</sup>	26	73:80	0,320
<i>Skdh-1</i> <sup>100/n</sup>	2	4:8	1,333
<i>Skdh-2</i> <sup>100/94</sup>	2	5:7	0,333
<i>Skdh-2</i> <sup>100/77</sup>	10	35:24	2,051
<i>6-Pgd-2</i> <sup>100/78</sup>	8	20:28	1,332
<i>6-Pgd-2</i> <sup>100/63</sup>	23	60:75	1,666
<i>6-Pgd-2</i> <sup>78/63</sup>	2	7:6	0,076
<i>6-Pgd-3</i> <sup>100/n</sup>	4	14:9	1,086
<i>Idh-2</i> <sup>100/81</sup>	7	18:24	0,856
<i>Idh-2</i> <sup>100/59</sup>	2	4:8	1,332
<i>Pepca</i> <sup>100/95</sup>	1	1:5	2,666
<i>Got-2</i> <sup>100/106</sup>	1	1:5	2,666
<i>Got-2</i> <sup>100/83</sup>	4	13:11	0,166
<i>Got-2</i> <sup>100/n</sup>	1	4:2	0,666
<i>Got-3</i> <sup>100/86</sup>	7	17:24	1,195
<i>Fdh</i> <sup>100/300</sup>	1	2:4	0,666
<i>Fdh</i> <sup>100/175</sup>	28	94:73	2,641
<i>Lap-1</i> <sup>100/104</sup>	4	13:12	0,040
<i>Lap-1</i> <sup>100/102</sup>	7	24:18	0,857
<i>Lap-1</i> <sup>100/n</sup>	1	2:4	0,666
<i>Lap-2</i> <sup>100/104</sup>	30	99:78	2,491
<i>Pgi-1</i> <sup>100/103</sup>	3	12:6	2,000
<i>Pgi-2</i> <sup>100/116</sup>	30	86:90	0,090
<i>Pgi-2</i> <sup>116/84</sup>	1	4:2	0,666
<i>Pgm-2</i> <sup>100/102</sup>	2	8:4	1,332
<i>Pgm-2</i> <sup>100/94</sup>	18	47:57	0,961
<i>Gdh</i> <sup>100/109</sup>	4	10:13	0,380
<i>Gdh</i> <sup>100/80</sup>	24	63:80	2,020
<i>Sod-2</i> <sup>100/178</sup>	4	8:15	2,130

кой изменчивости GDH установлен у большинства изученных видов рода *Picea* (Yeh, El-Kassaby, 1980; King, Dancik, 1983; Cheliak, Pitel, 1984; King et al., 1984; Boyle, Morgenstern, 1985, 1987; Cheliak et al., 1985; Ernst et al., 1987; Yeh, Arnott, 1986; Alden, Loopstra, 1987; Shea, 1987; Падутов, 2001; Гончаренко, Падутов, 2001). У *Picea abies* (Алтухов и др., 1986) GDH проявлялась в двух зонах активности, однако только одна из них, медленномигрирующая, имела четкий, хорошо идентифицируемый спектр.

Таким образом, в ходе электрофоретического исследования 12 ферментных систем в мегагаметофитах семян 86 деревьев ели сибирской идентифицированы 22 локуса, ответственных за образование 55 аллельных вариантов этих ферментов. Бульшая часть выявленных локусов обнаруживает изменчивость. Полностью мономорфными оказались лишь четыре локуса (*Got-1*, *Sod-1*, *Pgm-1*, *Mdh-1*). Наиболее высокий уровень полиморфизма среди полиморфных локусов обнаруживают локусы *Skdh-1*, *Fdh*, *Lap-2*, *Sod-2*, *Pgi-2*, *Gdh* и *6-Pgd-2*. Ожидаемая гетерозиготность этих локусов, рассчитанная по частотам выявленных аллелей (Айала, 1984), варьирует от 33 до 45%. Локусы *Mdh-3*, *Skdh-2*, *Idh-2*, *Got-3*, *Lap-1*, *Pgm-2* характеризуются средним уровнем полиморфизма. Гетерозиготность указанных локусов не превышает 28%. Локусы *Mdh-2*, *6-Pgd-3*, *Pepca*, *Got-2*, *Pgi-1* относятся к слабополиморфным. Частоты наиболее распространенных аллелей этих локусов составляют более 95%, а средняя ожидаемая гетерозиготность лишь 3,6%.

Анализ сегрегации выявленных аллельных вариантов ферментов среди мегагаметофитов семян гетерозиготных деревьев подтверждают их моногенное наследование. Из представленных в табл. 2 данных по сегрегации, суммированных для каждого типа гетерозигот, видно, что ни у одного из идентифицированных нами полиморфных локусов не наблюдалось достоверного отклонения от ожидаемого для аллельных вариантов одного локуса соотношения 1:1. Значение критерия соответствия  $\chi^2$  варьировало от 0,040 до 2,666.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований получены данные о генетическом контроле 12 ферментов (MDH, SKDH, 6-PGD, IDH, PEPCA, GOT, FDH, LAP, PGI, PGM, SOD, GDH) ели сибирской. Показано, что аллозимное разнообразие изученных ферментных систем кодируется по крайней мере 24 локусами. Однако четкое электрофоретическое разделение получено для продуктов 22 локусов, четыре из которых (*Got-1*, *Sod-1*, *Pgm-1*, *Mdh-1*) являются мономорфными, остальные локусы (*Mdh-2*, *Mdh-3*, *Skdh-1*, *Skdh-2*, *6-Pgd-2*, *6-Pgd-3*, *Idh-2*, *Pepca*, *Got-2*, *Got-3*, *Fdh*, *Lap-1*, *Lap-2*, *Pgi-1*, *Pgi-2*, *Pgm-2*, *Sod-2*, *Gdh*) полиморфны. Установлено, что идентифицированные локусы продуцируют 55 аллозимных вариантов ферментов. Анализ сегрегации выявленных вариантов в мегагаметофитах семян гетерозиготных деревьев подтверждает, что они наследуются как моногенные признаки и могут быть использованы в качестве маркеров генов для изучения генетического разнообразия и дифференциации популяций ели сибирской в Приенисейской Сибири.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ – ККФН «Енисей-2005» (проект № 05-04-97717), СО РАН (проект № 12.1), Программы Президиума РАН «Динамика генофондов растений, животных и человека».

## ЛИТЕРАТУРА

- Айала Ф. Введение в популяционную и эволюционную генетику. – М.: Мир, 1984. – 230 с.
- Алтухов Ю. П., Крутовский К. В., Гафаров Н. И. и др. Аллозимный полиморфизм в природной популяции ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.). Сообщение I. Системы полиморфизма и механизмы их генного контроля // Генетика. – 1986. – Т. 22, № 8. – С. 2135–2151.
- Белоконь М. М., Белоконь Ю. С., Политов Д. В., Алтухов Ю. П. Аллозимный полиморфизм европейской кедровой сосны (*Pinus cembra* L.) в горных популяциях Альп и Восточных Карпат // Генетика. – 2005. – Т. 41, № 11. – С. 1538–1551.
- Бобров Е. Г. Лесообразующие хвойные СССР. – Л.: Наука, 1978. – 189 с.
- Гончаренко Г. Г. Геносистематика и эволюционная филогения лесообразующих хвойных Палеарктики. – Минск: Тэхналогія, 1999. – 188 с.
- Гончаренко Г. Г., Падутов В. Е. Руководство по исследованию древесных видов методом электрофоретического анализа изоферментов. – Гомель: БелНИИЛХ, 1988. – 66 с.
- Гончаренко Г. Г., Падутов В. Е. Популяционная и эволюционная генетика елей Палеарктики. – Гомель: ИЛ НАН Б, 2001. – 197 с.
- 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.
- Гончаренко Г. Г., Потенко В. В. Генетическая структура, изменчивость и дифференциация популяций ели Глена (*P. glehnii* Mast.) // Докл. АН СССР. – 1991б. – Т. 321, № 3. – С. 606–611.
- 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 СССР. – 1992. – Т. 325, № 4. – С. 838–844.
- Корочкин Л. И., Серов О. Л., Пудовкин А. И. и др. Генетика изоферментов. – М.: Наука, 1977. – 278 с.
- Крутовский К. В., Гафаров Н. И. Наследование 6-фосфоглюконатдегидрогеназы ели европейской *Picea abies* (L.) Karst., межallelное взаимодействие локусов 6-Pgd-2 и 6-Pgd-3 // Генетика. – 1987. – Т. 23, № 11. – С. 2073–2075.
- Крутовский К. В., Политов Д. В., Алтухов Ю. П. и др. Генетическая изменчивость сибирской кедровой сосны *Pinus sibirica* Du Tour. Сообщение IV. Генетическое разнообразие и степень генетической дифференциации между популяциями // Генетика. – 1989. – Т. 25, № 11. – С. 2009–2032.
- Ларионова А. Я. Наследование аллозимных вариантов у ели сибирской (*Picea obovata* Ledeb.) // Генетика. – 1995. – Т. 31, № 9. – С. 1261–1267.
- Ларионова А. Я., Яхнева Н. В. Наследование аллозимных вариантов у лиственницы Гмелина // Хвойные boreальной зоны. – 2003. – Вып. 1. – С. 60–66.
- Падутов В. Е. Генетические ресурсы сосны и ели в Беларуси. – Гомель: ИЛ НАН Б, 2001. – 144 с.
- Потенко В. В., Кривко В. Г. Изменчивость и сцепление изоферментных локусов у ели восточной *Picea orientalis* (L.) Link. // Генетика. – 1993. – Т. 29, № 4. – С. 632–637.
- Путеныхин В. П., Шуганов З. Х., Фарукишина Г. Г. Ель сибирская на Южном Урале и в Башкирском Предуралье (популяционно-генетическая структура). – М.: Наука, 2005. – 180 с.
- Шуганов З. Х. Внутривидовая изменчивость и дифференциация видов семейства *Pinaceae* на Урале: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Пермь, 2005. – 46 с.
- Янбаев Ю. А., Шуганов З. Х., Путеныхин В. П., Бахтиярова Р. М. Дифференциация популяций ели сибирской (*Picea obovata* Ledeb.) на Южном Урале // Генетика. – 1997. – Т. 33, № 9. – С. 1244–1249.
- Alden J., Loopstra C. Genetic diversity and population structure of *Picea glauca* on an altitudinal gradient in interior Alaska // Can. J. For. Res. – 1987. – Vol. 17. – P. 1519–1526.
- Barrett J. W., Knowles P., Cheliak W. M. The mating system in a black spruce clonal seed orchard // Can. J. For. Res. – 1987. – Vol. 17. – P. 379–382.
- Bergmann F., Scholz F. Effects of selection pressure by SO<sub>2</sub> pollution on genetic structures of Norway spruce (*Picea abies*) / ed. H. R. Gregorius // Population Genetics in Forestry. – Lecture Notes in Biomathematics 60. – 1985. – P. 267–275.
- Boyle T. J. B., Morgenstern E. K. Inheritance and linkage relationships of some isozyme of black spruce in New Brunswick // Can. J. For. Res. – 1985. – Vol. 15. – P. 992–996.
- Boyle T. J. B., Morgenstern E. K. Some aspects of the population structure of black spruce in New Brunswick // Silvae Genet. – 1987. – B. 36. H. 2. – P. 53–60.
- Brewer G. J. Introduction to isozyme techniques. – N.Y.; L.: Academ. Press, 1970. – 186 p.
- Cheliak W. M., Pitel J. A. Genetic control of allozyme variants in mature tissues of white spruce trees // Heredity. – 1984. – Vol. 75. – P. 34–40.
- Cheliak W. M., Pitel J. A., Murray G. Population structure and the mating system of white spruce // Can. J. For. Res. – 1985. – Vol. 15. – P. 301–308.
- Clayton J. W., Treliak D. N. Amino-citrate buffer for pH control in starch gel electrophoresis // J. Fisheries Research Board Canada. – 1972. – Vol. 29. – P. 1169–1172.
- El-Kassaby Y. A. Genetic interpretation of malate dehydrogenase isozymes in some conifer species // Heredity. – 1981. – Vol. 72. – P. 451–452.
- Ernst S. G., Keathley D. E., Hanover J. W. Inheritance of isozymes in seed and bud tissues of blue and Engelmann spruce // Genome. – 1987. – Vol. 29. – P. 239–246.
- Gumury D. Effect of stand origin on the genetic diversity of Norway spruce (*Picea abies* Karst.) populations // For. Ecol. Manage. – 1992. – Vol. 54. – P. 215–223.
- 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. – 1995. – Vol. 194. – P. 39–54.

- Hussendorfer E., Konnert M., Bergmann F. Inheritance and linkage of isozyme variants of silver fir (*Abies alba* Mill.) // Forest Genetics. – 1995. – Vol. 2. – P. 29–40.
- King J. N., Dancik B. P. Inheritance and linkage of isozymes in white spruce (*Picea glauca*) // Can. J. Genet. Cytol. – 1983. – Vol. 25. – P. 430–436.
- King J. N., Dancik B. P., Dhir N. K. Genetic structure and mating system of white spruce (*Picea glauca*) in a seed production area // Can. J. For. Res. – 1984. – Vol. 14. – P. 639–643.
- Knowles P. Comparison of isozyme variation among natural stands and plantations: jack pine and black spruce // Can. J. For. Res. – 1985. – Vol. 15. – P. 902–908.
- Krutovskii K. V., Bergmann F. Introgressive hybridization and phylogenetic relationships between Norway, *Picea abies* (L.) Karst., and Siberian, *P. obovata* Ledeb., spruce species studied by isozyme loci // Heredity. – 1995. – Vol. 74. – P. 464–480.
- Lagercrantz U., Ryman N., Stahl G. Protein loci in diploid tissue of Norway spruce (*Picea abies* K.): description and interpretation of electrophoretic variability patterns // Hereditas. – 1988. – Vol. 108. – P. 149–158.
- Lewandowski A., Mejnartowicz L. Inheritance of allozymes in *Larix decidua* Mill. // Silvae Genet. – 1990. – B. 39. H. 5–6. – P. 184–188.
- Lundkvist K. Allozyme frequency distributions in four Swedish populations of Norway spruce (*Picea abies* K.). I. Estimations of genetic variation within and among populations, genetic linkage and a mating system parameter // Hereditas. – 1979. – Vol. 90. – P. 127–143.
- Manchenko G. P. Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels. – CRC Press, Ins. – 1994. – 574 p.
- Morgante M., Vendramin G. G., Giannini R. Genetics of 6-PGD and SKDH in Norway spruce (*Picea abies* K.) // J. Genet. & Breed. – 1989. – Vol. 43. – P. 67–72.
- Muona O., Yazdani R., Lindqvist G. Analysis of linkage in *Picea abies* // Hereditas. – 1987. – Vol. 106. – P. 31–36.
- O'Malley D. M., Allendorf F. W., Blake G. M. Inheritance of isozymes variation and heterozygosity in *Pinus ponderosa* // Biochem. Genet. – 1979. – Vol. 17. – P. 233–250.
- O'Reilly G. J., Parker W. H., Cheliak W. M. Isozyme differentiation of upland and lowland *Picea mariana* stands in Northern Ontario // Silvae Genet. – 1985. – B. 34. H. 6. – P. 214–221.
- Poulsen H. D., Simonsen V., Wellendorf H. The inheritance of six isoenzymes in Norway spruce *Picea abies* (L.) Karst. // Forest Tree Improvement. – 1983. – Vol. 16. – P. 12–33.
- Prakash S., Lewontin R. C., Hubby J. L. A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations : IV Patterns of genic variation in central, marginal, and isolated populations of *Drosophila pseudoobscura* // Genetics. – 1969. – Vol. 61. – P. 841–858.
- Ridgway G. J., Sherburne S. W., Lewis R. D. Polymorphism in the esterases of atlantic herring // Trans. Am. Fish. Soc. – 1970. – Vol. 99. – P. 147–151.
- Shea K. L. Effects of population structure and cone production on outcrossing rates in Engelmann spruce and subalpine fir // Evolution. – 1987. – Vol. 41. – P. 124–136.
- Shea K. L., Grant M. C. Clonal growth in spire-shaped Engelmann spruce and subalpine fir trees // Can. J. Bot. – 1986. – Vol. 64. – P. 255–261.
- Tremblay M., Simon J.-P. Genetic structure of marginal populations of white spruce (*Picea glauca*) at its northern limit of distribution in Nouveau-Quebec // Can. J. For. Res. – 1989. – Vol. 19. – P. 1371–1379.
- Tsay R. C., Taylor I. E. P. Isoenzyme complexes as indicators of genetic diversity in white spruce, *Picea glauca*, in southern Ontario and the Yukon Territory. Formic, glutamic, and lactic dehydrogenases and cationic peroxidases // Can. J. Bot. – 1978. – Vol. 56. – P. 80–90.
- Vallejos C. E. Enzyme activity staining // Isozymes in plant genetics and breeding. Pt. A/ eds. S. D. Tanksley, T. J. Orton. – Amsterdam : Elsevier Sci. Publ., 1983. – P. 469–516.
- Yeh F. C., El-Kassaby Y. A. Enzyme variation in natural populations of Sitka spruce (*Picea sitchensis*). I. Genetic variation patterns among trees from 10 IUFRO provenances // Can. J. For. Res. – 1980. – Vol. 10. – P. 415–422.
- Yeh F. C., Arnott J. T. Electrophoretic and morphological differentiation of *Picea sitchensis*, *Picea glauca*, and their hybrids // Can. J. For. Res. – 1986. – Vol. 16. – P. 791–798.
- Yeh F. C., Khalil M. A. K., El-Kassaby Y. A., Trust D. C. Allozyme variation in *Picea mariana* from Newfoundland: genetic diversity, population structure, and analysis of differentiation // Ibid. – 1986. – Vol. 16. – P. 713–720.
- Ying L., Morgenstern E. K. Inheritance and linkage relationships of some isozymes of *Larix laricina* in New Brunswick, Canada // Silvae Genet. – 1990. – B. 39. H. 5–6. – P. 245–251.

Поступила в редакцию 23.03.2006 г.

## GENETIC CONTROL OF ISOZYMES IN SIBERIAN SPRUCE (*PICEA OBOVATA* LEDEB.) IN THE YENISEI RIVER AREA OF SIBERIA

A. N. Kravchenko, A. Ya. Larionova

Using horizontal starch gel electrophoresis, the genetic control of MDH, SKDH, 6-PGD, IDH, PEPCA, GOT, FDH, LAP, PGI, PGM, SOD, GDH enzymes was studied in the seed megagametophytes of Siberian spruce (*Picea obovata* Ledeb.) from its three natural populations in the Yenisei River Area of Siberia. Fine electrophoretic resolution was obtained for the allelic products of 22 loci. Four loci (*Got-1*, *Sod-1*, *Pgm-1*, *Mdh-1*) were monomorphic, while the other loci (*Mdh-2*, *Mdh-3*, *Skdh-1*, *Skdh-2*, *6-Pgd-2*, *6-Pgd-3*, *Idh-2*, *Pepca*, *Got-2*, *Got-3*, *Fdh*, *Lap-1*, *Lap-2*, *Pgi-1*, *Pgi-2*, *Pgm-2*, *Sod-2*, *Gdh*) were polymorphic. Segregation analysis of the allozyme variants revealed in Siberian spruce confirms their monogenic inheritance.

**Key words:** Siberian spruce, genetic control, enzymes, locus, allele.