

БАГДАСАРОВА А.Р. ¹, КОРШИКОВ И.И. ², КАЛАФАТ Л.А. ¹, ПРИВАЛИХИН С.Н. ¹, ПИРКО Н.Н. ¹, ПОСТОВОЙТОВА А.С. ³, ПИРКО Я.В. ¹

¹ ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины», Украина, 04123, г. Киев, ул. Осиповского, 2а, e-mail: iht@i.kiev.ua

² Криворожский ботанический сад НАН Украины, Украина, 50089, г. Кривой Рог, ул. Маршака, 50

³ Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко НУЦ «Институт биологии», Украина, 03022, г. Киев, просп. академика Глушкова, 2

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ И ГЛУТАМАТОКСАЛОАЦЕТАТТРАНСАМИНАЗЫ У ОДНОВОЗРАСТНЫХ ДЕРЕВЬЕВ *PINUS PALLASIANA* D.DON, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО ДИАМЕТРУ СТВОЛА

Одна из важных задач лесного хозяйства – получение высокопродуктивных плантационных культур древесных растений [1]. До недавнего времени в ее практическом решении использовали различные фенотипические признаки, косвенно характеризующие хозяйственную ценность потомства. Однако они не всегда вполне объективны, поскольку изменяются в зависимости от возраста растения и условий произрастания. С открытием белкового полиморфизма, на который ограниченно влияют условия среды или особенности онтогенеза растений, его начали использовать в качестве молекулярно-генетических маркеров в селекции растений. Этот метод стал удобным инструментом для ранней диагностики хозяйственных качеств потомства. Молекулярно-генетические маркеры особенно важны для лесных пород, характеризующихся длительными периодами выращивания [2]. Поиск таких маркеров, ответственных за параметры роста растений и качество древесины, и в наше время остается весьма актуальной проблемой. В этом плане определенную перспективу имеют ферменты, играющие ключевую роль в метаболизме растений.

Процессы роста растений постоянно требуют синтеза структурных белков и пополнения запасов свободных аминокислот. Глутаматоксалоацетаттрансминаза (GOT) играет ключевую роль в первичной ассимиляции азота [3], который в виде NH_4 наряду с пируватом, оксалоацетатом и кетоглутаратом, используется для синтеза аминокислот [4]. Продукты реакций трансаминирования могут также использоваться в нескольких метаболических путях, например, при накоплении глутамина и аспарагина, окислении в цикле трикарбоновых кислот с образованием АТФ и восстановительных эквивалентов, в реак-

циях глюконеогенеза и др. [4]. Малатдегидрогеназа (MDH) имеет две формы: митохондриальную и цитоплазматическую. Митохондриальная форма MDH принимает участие в цикле Кребса, а цитоплазматическая может играть роль челночного механизма среди субклеточных компонентов, участвовать в кислотном метаболизме в тканях растений в автотрофной фиксации CO_2 у высших растений и других метаболических путях [5]. Высокая степень полиморфизма этих ферментных систем делает их удобным инструментом для молекулярно-генетических исследований.

Цель работы – изучить уровень гетерозиготности локусов малатдегидрогеназы и глутаматоксалоацетаттрансминазы у групп одновозрастных деревьев сосны крымской, различающихся диаметром ствола.

Материалы и методы

Был проведен анализ 220 деревьев сосны крымской (*Pinus pallasiana* D.Don) в возрасте 9–40 лет. Материал для исследования собран на территории дендрария Донецкого ботанического сада НАН Украины (ДБС), Петровского, Амвросиевского и Шахтерского лесхозов Донецкой области. У каждого дерева измеряли диаметр на высоте 1,3 м. В дальнейшем деревья в каждой возрастной группе условно разбили, в зависимости от диаметра ствола, на две группы: первая – деревья с малым, а вторая группа – с большим диаметром ствола (табл. 1).

Для определения генетических особенностей выделенных групп деревьев *P. pallasiana* были использованы изоферменты двух ферментных систем: малатдегидрогеназы (MDH, К.Ф. 1.1.1.37) и глутаматоксалоацетаттрансминазы

Таблица 1

Характеристика деревьев *P. pallasiana* в различных насаждениях Донецкой области

Насаждение (возраст деревьев)	Группа деревьев	Количество деревьев	Средний диаметр ствола, см
Шахтерский лесхоз (40 лет)	1	27	18,3 ± 0,6***
	2	23	29,2 ± 0,9***
	В целом	50	23,3 ± 0,9
Амвросиевский лесхоз (16 лет)	1	27	4,9 ± 0,2***
	2	33	9,8 ± 0,3***
	В целом	60	7,6 ± 0,2
Петровский лесхоз (16 лет)	1	22	12,2 ± 0,4***
	2	30	15,8 ± 0,2***
	В целом	52	14,3 ± 0,3
Амвросиевский лесхоз (9 лет)	1	20	2,6 ± 0,3***
	2	9	5,1 ± 0,3***
	В целом	29	3,3 ± 0,3
ДБС (9 лет)	1	18	3,2 ± 0,2***
	2	11	5,4 ± 0,2***
	В целом	29	4,0 ± 0,3

Примечания: группа 1 – деревья с меньшим диаметром ствола, группа 2 – деревья с большим диаметром ствола, *** – различия между группами статистически достоверны при $P \leq 0,999$.

(GOT, К.Ф. 2.6.1.1). Для электрофоретического анализа использовали изоферменты листовых зачатков вегетативных почек, собранных с отдельных деревьев в период покоя.

Для выделения ферментов листовые зачатки почек гомогенизировали в 100 мкл экстрагирующего буфера, приготовленного в соответствии с существующей методикой [6] с некоторыми модификациями. Электрофоретическое разделение изоферментов и последующее гистохимическое окрашивание гелей проводили по стандартным методикам [7]. Обозначение аллелей давалось по общепринятой номенклатуре Пракаша [8]. Статистическую обработку данных проводили при помощи программ GenAlex [9] и GenRes [10].

Результаты и обсуждение

В исследуемых насаждениях *P. pallasiana* локусы Got-1, Got-3 и Mdh-2 оказались низкополиморфными. Так, локус Got-1 был мономорфен в насаждениях Амвросиевского (обе группы 9-летних деревьев) и Шахтерского (в группе деревьев с меньшим диаметром ствола) лесхозов, локус Mdh-2 – мономорфен только в насаждении ботанического сада (в группе деревьев с большим диаметром). Локусы Got-2 и Mdh-3 были

высокополиморфными у всех групп деревьев во всех насаждениях.

У отдельных групп деревьев были обнаружены аллели, которые отсутствовали в других выборках. Например, в насаждении ДБС – Got-3^{null}, в насаждении Амвросиевского лесхоза (обе группы 9-летних деревьев) – Got-3^{0,60}, 16-летние деревья с меньшим диаметром ствола – Got-2^{1,20}, и в насаждении Шахтерского лесхоза (деревья с большим диаметром ствола) – Got-1^{1,90}. Как известно, наличие редких аллелей может быть сопряжено с ростом растений, поскольку они представляют собой скрытый потенциал адаптации к резко изменяющимся условиям окружающей среды [11], хотя значение редких аллелей для повышения адаптивности вида все еще остается спорным [12].

Для деревьев в насаждении Петровского лесхоза и группы с меньшим диаметром ствола 16-летних деревьев в насаждении Амвросиевского лесхоза по локусу Got-1 и деревьев ботанического сада и 16-летних деревьев в насаждении Амвросиевского лесхоза по локусу Got-3 наблюдаются отклонения частот генотипов от теоретически ожидаемого их распределения согласно закону Харди-Вайнберга. Фактическое распределение генотипов по локусам MDH во всех изученных насаждениях соответствует теоретически ожидаемому согласно закону Харди-Вайнберга. В группе деревьев *P. pallasiana* с меньшим диаметром ствола распределение частот аллелей, согласно критерию χ^2 не отличалось от группы с большим диаметром ствола. Это говорит о незначительных отличиях в генетической структуре изучаемых групп деревьев из одних и тех же насаждений *P. pallasiana*.

Наблюдаемая гетерозиготность (Ho) по локусам Got-1 и Mdh-2 деревьев с большим диаметром ствола оказалась выше по сравнению с деревьями с меньшим диаметром (табл. 2). Например, в выборке растений с малым диаметром ствола в насаждении Шахтерского лесхоза гетерозиготных генотипов по локусу Got-1 не обнаружено. В насаждении Амвросиевского и Петровского лесхозов гетерозиготность по локусу Got-1 была больше в 2,9 раз и 1,5 раза у деревьев с большим диаметром ствола. У деревьев с большим диаметром ствола в насаждениях Шахтерского, Амвросиевского и Петровского лесхозов гетерозиготность по локусу Mdh-2 была в 1,9; 2,2; и 2,4 раза больше, чем в группе деревьев с меньшим диаметром. Небольшие отличия (1,2–1,4 раза) в наблюдаемой гетерозиготности

Средняя наблюдаемая гетерозиготность (Ho) по пяти полиморфным локусам у растений *P. pallasiana*, различающихся по диаметру ствола, в насаждениях Донецкой области

Локус	Гетерозиготность									
	Шахтерский лесхоз (40 лет)		Амвросиевский лесхоз (16 лет)		Петровский лесхоз (16 лет)		Амвросиевский лесхоз (9 лет)		ДБС (9 лет)	
Группа	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Got-1	0,000	0,043	0,074	0,212	0,045	0,067	0,000	0,000	0,167	0,091
Got-2	0,333	0,304	0,481	0,424	0,500	0,567	0,400	0,444	0,444	0,364
Got-3	0,185	0,217	0,037	0,091	0,318	0,267	0,350	0,222	0,111	0,000
Mdh-2	0,037	0,087	0,111	0,212	0,045	0,100	0,200	0,222	0,222	0,000
Mdh-3	0,370	0,522	0,222	0,273	0,318	0,400	0,400	0,556	0,333	0,455

Примечания: группа 1 – деревья с меньшим диаметром ствола, группа 2 – деревья с большим диаметром ствола.

между деревьями с большим и меньшим диаметром по локусу Mdh-3 выявлены во всех насаждениях. В связи с этим требуется дальнейшая проверка связи между величиной гетерозиготности по этому локусу и скоростью роста деревьев *P. pallasiana*. В объединенной выборке деревьев с большим диаметром ствола гетерозиготность была больше по локусам Got-1 в 2 раза и Mdh-3 в 1,2 раза в сравнении с деревьями с меньшими показателями роста. Однако, несмотря на имеющуюся тенденцию к увеличению гетерозиготности у деревьев *P. pallasiana* с большим диаметром ствола, достоверно значимых отличий в уровне гетерозиготности между деревьями с разным диаметром ствола не обнаружено. Тенденции в изменении гетерозиготности у деревьев с большим и меньшим диаметром ствола могут различаться в зависимости от конкретного ферментного локуса [11].

При объединении растений по классам гетерозиготности по трем локусам GOT у 9-летних деревьев в насаждении Амвросиевского лесхоза и ДБС повышение значения средней наблюдаемой гетерозиготности сопровождается уменьшением величины среднего диаметра ствола. У 16-летних деревьев насаждения Амвросиевского лесхоза отмечена обратная зависимость. Для 40-летних деревьев в насаждении Шахтерского лесхоза также выявлена тенденция уменьшения среднего диаметра ствола с ростом величины гетерозиготности.

По двум локусам MDH средние значения наблюдаемой гетерозиготности для 16-летних деревьев в насаждении Амвросиевского лесхоза и 9-летних деревьев в насаждении ДБС уменьшаются с ростом среднего диаметра ствола. Обратная зависимость отмечена в 9-летних насаж-

дениях Амвросиевского и Петровского лесхозов. Для деревьев в насаждении Шахтерского лесхоза выявлено резкое увеличение величины среднего диаметра ствола с ростом гетерозиготности. Возможно, в 40-летнем насаждении Шахтерского лесхоза, где уже прошли процессы естественной дифференциации растений по росту и отпаду угнетенных деревьев, генетические параметры проявляются более отчетливо. Гетерозиготные индивиды, как правило, отличаются более высокими адаптивными возможностями. По утверждению Ю.П. Алтухова, высокая индивидуальная гетерозиготность определяет высокие темпы развития и полового созревания растений, более ранний возраст первой репродукции, однако замедляет пострепродуктивный рост, сокращает продолжительность жизни [13].

Значения коэффициента корреляции между величиной гетерозиготности и диаметром ствола по локусам GOT для всех насаждений варьировали от небольших отрицательных $-0,10$ (ДБС) и $-0,14$ (9-летние деревья в насаждениях Амвросиевского и Петровского лесхозов) до небольших положительных: $0,06$ (Амвросиевский лесхоз) и $0,12$ (Шахтерский лесхоз). Значения коэффициента корреляции по локусам MDH в основном были положительными, от $0,01$ для 9-летних деревьев Амвросиевского лесхоза, $0,06$ – для 16-летних деревьев, $0,27$ – для деревьев в насаждении Петровского лесхоза и до $0,31$ – для деревьев в насаждении Шахтерского лесхоза. Отрицательное значение коэффициента корреляции $-0,23$ отмечено для деревьев в насаждении ДБС.

Анализ генетических отличий деревьев с различной интенсивностью роста и параметрами продуктивности проводился рядом исследователей. В литературе приводятся противоре-

чивые данные относительно корреляции величины гетерозиготности с параметрами роста растений. В некоторых исследованиях установлена положительная связь между гетерозиготностью и скоростью роста в отдельных популяциях древесных растений [14, 15]. Позитивная корреляция по 14 полиморфным локусам природных популяций *Populus tremuloides* Michx. также была установлена между годичным радиальным приростом и уровнем гетерозиготности, только при группировке клонов по классам гетерозиготности, хотя статистически значимых корреляций между средней гетерозиготностью и годичным радиальным приростом для этого вида не выявлено [14]. Отмечена связь гетерозиготности локусов *6-PGDH* и *MDH-C* с диаметром ствола у сосны обыкновенной [11]. Однако у F2 гибридов *Populus trichocarpa* Torr. & A. Gray ex Hook. X *Populus deltoides* W. Bartram ex Marshall ни высота, ни площадь сечения ствола не коррелировали с гетерозиготностью, определенной с помощью ПДРФ-маркеров, и ни один из коэффициентов корреляции не превышал 0,16 [16]. В своей работе F. Ledig указывает, что значения коэффициента регрессии годичного прироста и гетерозиготности для деревьев сосны сильно зависят от возраста, и изменяются от отрицательных (для молодняков) до положительных (для более старых насаждений) [17]. В анализе количественной и генетической изменчивости предлагается проводить поиск ассоциаций не с гетерозиготностью, а с коадаптивными генными комплексами [18].

Значения генетической дистанции Нея (1972, D_N) между группами деревьев *P. pallasiana* с большим и меньшим диаметром ствола по локусам GOT колебались от 0,003 до 0,030. Наиболее значимо по локусам GOT отличались деревья в насаждении ДБС ($D_N = 0,030$) и 16-летние деревья в насаждении Амвросиевского лесхоза (D_N

$= 0,011$). По локусам MDH значения D_N находились в пределах от 0,002 до 0,019. Наиболее сильно отличались деревья в насаждении ДБС ($D_N = 0,016$) и деревья в насаждении Шахтерского лесхоза ($D_N = 0,019$). Таким образом, деревья с большим и меньшим диаметром ствола генетически отличаются незначительно, за исключением деревьев в насаждении ДБС, для которых значения D_N были выше по обоим исследуемым локусам. Между объединенными группами деревьев *P. pallasiana* с большим и меньшим диаметром ствола D_N находилась в пределах 0,001–0,002, что подтверждает незначительные различия в генетической структуре деревьев *P. pallasiana*, отличающихся по диаметру ствола. Диаметр ствола дерева является результатом кумулятивных, интегрированных функциональных процессов, контролируемых большим числом генов, каждый из которых имеет относительно небольшой вклад в формирование фенотипа [19]. Отсутствие тесной взаимосвязи между гетерозиготностью отдельных локусов и ростовыми показателями ствола у деревьев *P. pallasiana* можно объяснить также эпигенетическими эффектами, поскольку фенотип – это продукт взаимодействия генотипа, эпигенетики и условий среды.

Выводы

Деревья *P. pallasiana*, различающиеся по величине диаметра ствола, в насаждениях Донецкой области не имеют явно выраженных различий в уровне наблюдаемой гетерозиготности. Однако имеется тенденция к увеличению его по локусу Mdh-3 для групп деревьев с большим диаметром ствола. Значения коэффициента корреляции между гетерозиготностью и диаметром ствола по локусам GOT и MDH имели низкие (как положительные, так и отрицательные) значения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Путенихин В.П., Фарукшина Г.Г. Методы сохранения генетической гетерогенности при создании искусственных «популяций» лесообразующих видов // Хвойные бореальной зоны. – 2007. – XXIV, № 2–3. – С. 272–278.
2. Жигунов А.В. Применение биотехнологий в лесном хозяйстве России // Лесн. журн. – 2013. – № 2. – С. 22–29.
3. De La Torre F., Subrez M.F., De Santis L., Cбnovas F.M. The aspartate aminotransferase family in conifers: biochemical analysis of a prokaryotic-type enzyme from maritime pine // Tree Physiology. – 2007. – 27. – P. 1283–1291.
4. Бездудна О.Ф., Каліман П.А. Изменение содержания белка и трансаминирования аминокислот при прорастании семян сои (*Glycine max* L.) // Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія: біологія. – 2006. – 4, № 748. – С. 17–20.
5. Юдина Р.С. Генетика и феногенетика малатдегидрогеназы растений // Вестник ВОГиС. – 2010. – 14, № 2. – С. 243–254.
6. Молотков П.И. Селекция лесных пород. – М.: Лесн. пром-ть, 1982. – 221 с.
7. Davis B.J. Disk electroforesis. II. Methods and applications to human serum proteins // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 1964. – 121. – P. 67–75.

8. Prakash S., Lewontin R.C., Hubby T.L. A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations. 4. Patterns of genetic variation in central, marginal and isolated populations of *Drosophila pseudoobscura* // *Genetics (USA)*. – 1969. – 61. – P. 841–858.
9. Peakall R., Smouse P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // *Molecular Ecology Notes*. – 2006. – 6. – P. 288–295.
10. Демкович А.Е. Программа "GenRes" для анализа данных популяционно-генетических исследований хвойных // *Промышленная ботаника*. – 2007. – 7. – С. 33–36.
11. Blumenr tther M., Bachmann M., Myller-Starck G. Genetic characters and diameter growth of provenances of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) // *Silvae Genetica*. – 2001. – 50, N 5–6. – P. 212–222.
12. Katzel R. Einfluss von Durchforstungen auf die genetische Struktur von Kiefernbestanden / *AFZ/DerWald*. – 2000. – 55. – P. 737–739.
13. Алтухов Ю.П. Гетерозиготность генома, скорость полового созревания и продолжительность жизни // *Доклады РАН*. – 1996. – 348, № 6. – С. 842–845.
14. Jelinski D.E. Associations between environmental heterogeneity, heterozygosity, and growth rates of *Populus tremuloides* in a Cordilleran landscape // *Arctic and Alpine Research*. – 1993. – 25. – P. 183–188.
15. Mitton J.B., Grant M.C. Association among protein heterozygosity, growth rate, and developmental homeostasis // *Annual Review of Ecology and Systematic*. – 1984. – 15. – P. 479–499.
16. Bradshaw H.D.Jr., Stettled R.F. Molecular genetics of growth and development in *Populus*. IV. Mapping QTLs with large effects on growth, form, and phenology traits in a forest tree // *Genetics*. – 1995. – 139. – P. 963–973.
17. Ledig F.T. The relation of growth to heterozygosity in Pitch pine // *Evolution*. – 1983. – 37 (6). – P. 1227–1238.
18. Petit C., Freville H., Mignot A., Colas B., Riba M., Imbert E., Hurterez-Boussis S., Virevaire M., Olivieri I. Gene flow and local adaptation in two endemic plant species // *Biol Cons.* – 2001. – 100. – P. 21–34.
19. Bradshaw H.D.Jr., Stettled R.F. Molecular genetics of growth and development in *Populus*. II Segregation distortion due to genetic load // *Theor. Appl. Genet.* – 1994. – 89, N 5. – P. 551–558.

BAGDASAROVA A.R. ¹, KORSHIKOV I.I. ², KALAFAT L.A. ¹, PRIVALIKHIN S.N. ¹, PIRKO N.N. ¹, POSTOVOYTOVA A.S. ³, PIRKO YA.V. ¹

¹ *Institute of Food Biotechnology and Genomics NAS of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2A, e-mail: iht@i.kiev.ua*

² *Kryvoy Rog Botanical Garden of National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 50089, Krivoy Rog, Marshaka str., 50*

³ *Taras Shevchenko National University of Kyiv ESC "Institute of Biology", Ukraine, 03022, Kyiv, Akademika Glushkov ave., 2*

GENETIC POLYMORPHISM OF MALATE DEHYDROGENASE AND GLUTAMATE OXALACETATE TRANSAMINASE IN COEVAL *PINUS PALLASIANA* D.DON TREES WITH DIFFERENT STEM DIAMETER

Aims. Genetic characteristics of coeval *Pinus pallasiana* D. Don trees with different stem diameters were studied.

Methods. Pine vegetative buds tissues were used for electrophoretic analysis of isoenzymes of malate dehydrogenase and glutamate oxalacetate transaminase. **Results.** The analysis of 220 pine trees was made. Mean observed heterozygosity, genetic heterogeneity and Ney distances among tree groups with different stem diameters were calculated. Coefficient of correlation between heterozygosity and stem diameter was also calculated. **Conclusions.** Observed heterozygosity among trees with different stem diameters ranges insignificantly. There is a tendency toward the increased heterozygosity by *Mdh-3* locus in tree groups with greater stem diameter. Coefficients of correlation between heterozygosity and stem diameter by GOT and MDH loci are low.

Keywords: molecular markers, isoenzymes, *Pinus pallasiana* D. Don, genetic polymorphism.