

БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ**ПОЛИМОРФИЗМ АСПАРТАМИНОТРАНСФЕРАЗЫ У РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ И ГИБРИДОВ МИНДАЛЯ**

Г.Ф. ВШИВКОВА;

А.А. РИХТЕР, кандидат биологических наук;

Н.Г. ПОПОК, кандидат сельскохозяйственных наук

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр

Исследования, проводимые в ботанических садах, в ряде случаев касаются изучения морфологических и биологических признаков видов и сортов растений для их идентификации и дальнейшего использования в селекционной практике. Привлечение генетических маркёров для их тестирования позволяет выявить скрытую генетическую информацию, необходимую для паспортизации не только видов, но и отдалённых гибридов [7]. Такой подход позволяет более обоснованно использовать различные признаки, чтобы отличить дикие виды от спонтанных гибридов с другими представителями подсемейства *Prunoideae* Focke.

В предыдущей работе было показано, что полиморфизм аспартаминотрансферазы (ААТ) у миндаля обыкновенного (*Amygdalus communis* L.) определяется тремя аллелями а, а', b локуса Aat-1, двумя аллелями а, b локуса Aat-2 и может быть использован при регистрации сортов и форм этого вида [2].

В связи с этим представляют интерес исследования ферментативного полиморфизма ААТ у популяций диких видов и спонтанных гибридов миндаля, способные обеспечить их идентификацию и установить степень родства.

Цель настоящей работы – изучение полиморфизма аспартаминотрансферазы и возможность его использования для идентификации видов, межвидовых и межродовых гибридов миндаля.

Объекты и методы исследования

Работу выполняли на различных видах миндаля собранных в ботанической коллекции Степного отделения Никитского ботанического сада: *A. communis* L., *A. fenzliana* (Fritsch) Lipsky, – *A. nana* L., *A. vavilovii* M. Pop., *A. bucharica* Korsh., *A. webbi* Spach, *A. spinosissima* Bge., *A. petunnicovi* Litv. Изучали также виды, относящиеся к другим родам: *L. ulmifolia* (Franch.) Pachom.; *L. triloba* (Lindl.) Pachom.; *M. tomentosa* (Thunb.) Erem. et Jushev; *M. incana* (Pall.) Roem.; *M. pumila* var. *besseyi* (L.) Erem. et Jushev; *P. cerasifera* Ehrh. из Кафана; *P. cerasifera* – Fermonте красная, Fermonте желтая; *P. subcordata* var. *rubicunda* (Jepson) Murray [10], а также отдаленные гибриды *A. communis* с разнообразными представителями подсемейства *Prunoideae* Focke.: *A. fenzliana* x *A. communis*; *A. bucharica* x *A. communis*; *A. fenzliana* x *A. bucharica*; *A. nana* x *A. communis* (сорт Приморский); *A. spinosissima* x *A. communis*; *L. ulmifolia* x *A. communis* № 1; *L. ulmifolia* x *A. communis* № 2; № 1 *A. vulgaris* Lam. x *A. communis*; № 2 *A. vulgaris* x *A. communis*; *P. besseyi* x *P. vulgaris* Mill.; *L. ulmifolia* x *P. cerasifera*; *P. subcordata* var. *rubicunda* x *A. communis*.

Фермент экстрагировали из молодых, активно растущих листьев раствором 0,01 М трис-глицинового буфера, рН 8,6, содержащего 0,1% аскорбиновой кислоты, 0,1% солянокислого цистеина, 0,1 М сахарозы и 14 мМ β-меркаптоэтанола. Соотношение навески и экстрагирующего буфера составляло 1:10. Вертикальный диск-электрофорез проводили в пластинах 7,5%-ного ПААГа по Дэвису [8]. В одну лунку вносили 15 мкл экстракта. В качестве верхнего электродного использовали 0,25 М трис-глициновый буфер, рН 8,6, нижнего – 0,01 М трис-ацетатный, рН>7,0. Электрофорез проводили при 180 В в течение 3,5 часов. Гистохимическое проявление зон ААТ осуществляли стандартным способом [5].

Результаты и их обсуждение

Изученные типы спектров аспартаминотрансферазы (ААТ) у видов миндаля и их

гибридов указывают на то, что две зоны активности фермента, как и у всех косточковых плодовых растений подсемейства *Prunoideae* Focke семейства *Rosaceae* Juss., контролируются двумя локусами Aat-1 и Aat-2 (рис. 1, 2). Различия генетической системы ААТ у видов и межвидовых гибридов миндаля, а также у других видов косточковых культур и их межродовых гибридов с видами миндаля связаны со степенью полиморфизма локусов и взаимодействием аллелей в локусе.

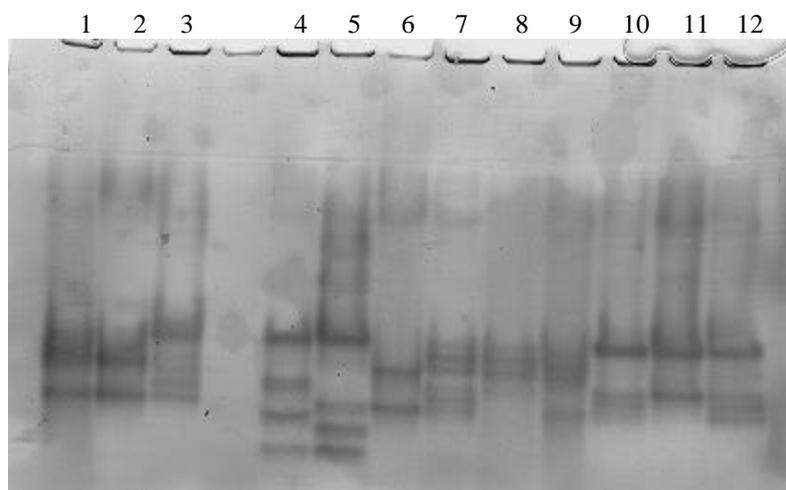


Рис. 1. Типы спектров ААТ у видов миндаля: **1** – Aat-1aa, Aat-2ab – *A. communis*; **2** – Aat-1aa, Aat-2aa – *A. nana*; **3** – Aat-1ab, Aat-2bb – *A. vavilovii*; **4** – Aat-1a'b, Aat-2bb – *A. bucharica* 1036; **5** – Aat-1a'a, Aat-2bb – *A. bucharica* 453; **6** – Aat-1aa, Aat-2aa – *A. fenzliana* 100/5; **7** – Aat-1ab, Aat-2ab – *A. communis*; **8** – Aat-1bb, Aat-2ab – 2110 *A. fenzliana* x *A. communis*; **9** – Aat-1aa, Aat-2ab – *A. fenzliana* 27 1/89; **10** – Aat-1ab, Aat-2bb – *A. webbii*; **11** – Aat-1bb, Aat-2bb – *A. webbii*; **12** – Aat-1ab, Aat-2bb – *A. bucharica*.

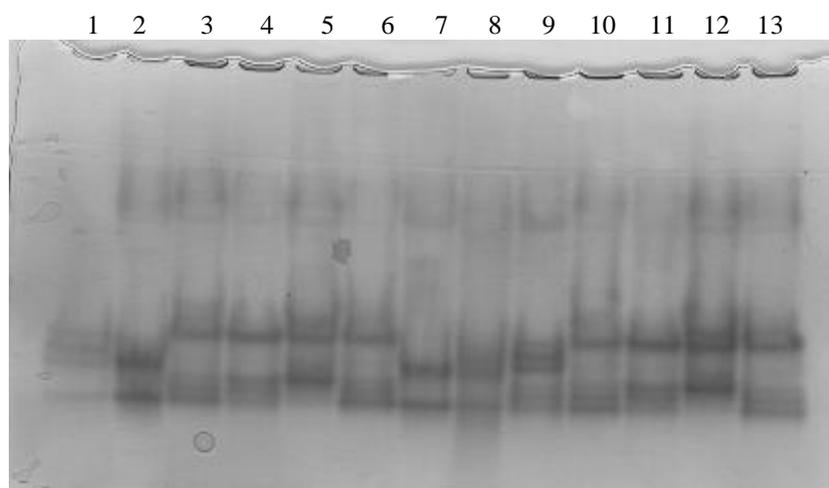


Рис. 2. Типы спектров ААТ у видов и межвидовых гибридов миндаля: **1** – Aat-1aa, Aat-2ab – *A. fenzliana* 2 7/3; **2** – Aat-1aa, Aat-2aa – *A. nana*; **3** – Aat-1ab, Aat-2bb – *A. fenzliana* x *A. communis*; **4** – Aat-1ab, Aat-2bb – *A. fenzliana* x *A. bucharica*; **5** – Aat-1bb, Aat-2bb – *P. subcordata* var. *rubicunda*; **6** – Aat-1ab, Aat-2bb – *P. subcordata* var. *rubicunda* x *A. communis*; **7** – Aat-1aa, Aat-2aa – *A. fenzliana* 1 6/2; **8** – Aat-1aa, Aat-2aa – *A. fenzliana* 6 5/2; **9** – Aat-1ab, Aat-2ab – *A. fenzliana* x *A. bucharica*; **10** – Aat-1ab, Aat-2bb – *A. bucharica* x *A. communis*; **11** – Aat-1ab, Aat-2bb – *A. communis*, (сорт Мангун); **12** – Aat-1bb, Aat-2bb – *P. subcordata* var. *rubicunda* x *A. communis*; **13** – Aat-1ab, Aat-2bb – *A. nana* x *A. communis* (сорт Приморский).

Локус Aat-1 полиморфен и представлен у видов и межвидовых гибридов миндаля двумя кодоминантными аллелями а и b, каждый из которых детерминирует один гомодимер Aat-1aa и Aat-1bb и оба – гетеродимер Aat-1ab. Оба аллельных варианта Aat-1a и Aat-1b встречаются у *A. communis*, *A. fenzliana*, *A. webbii*, *A. bucharica*, *A. vavilovii*, *A. spinosissima*. У видов *A. nana*, *A. petunnicovii* обнаружен Aat-1aa генотип, а у *P. subcordata* var. *rubicunda* x *A. communis* – Aat-1bb генотип.

У всех исследованных видов миндаля, за исключением *A. fenzliana*, локус Aat-2 мономорфен, в нём представлен один Aat-2b, который контролирует гомоаллельный вариант фермента Aat-2bb. У *A. nana* обнаружен редкий Aat-2a, кодирующий гомозиготный Aat-2aa. В локусе Aat-2 у *A. fenzliana* кроме Aat-2b, также выявлен редкий Aat-2a с частотой встречаемости 0,32, поэтому у данного вида локус Aat-2 можно считать полиморфным. Аллель Aat-2a был обнаружен у сортов *A. communis* – Desmayo Langueta, Ferragnes, Ferraduel, Mac Rogani, однако частота аллеля не превышала 5%, поэтому локус считается мономорфным [1]. К аналогичному заключению пришли американские исследователи [9].

ААТ-2 у *A. fenzliana* ведёт себя как димерный фермент: продукты двух аллелей ассоциируют, образуя гомодимерные молекулы Aat-2aa и Aat-2bb и гетеродимер Aat-2ab. Вид *A. fenzliana* не только полиморфен по морфологическим признакам, но и характеризуется широкой вариабельностью спектров аспартаминотрасферазы.

По аллельному состоянию двух зон активности у видов миндаля и их межвидовых гибридов обнаружена значительная вариабельность типов спектров (рис. 3). Так, у *A. fenzliana* и *A. communis* в зависимости от аллельного состояния двух локусов формируется пять типов спектров, у *A. bucharica* и *A. webbii* - три, у остальных видов миндаля - по одному.

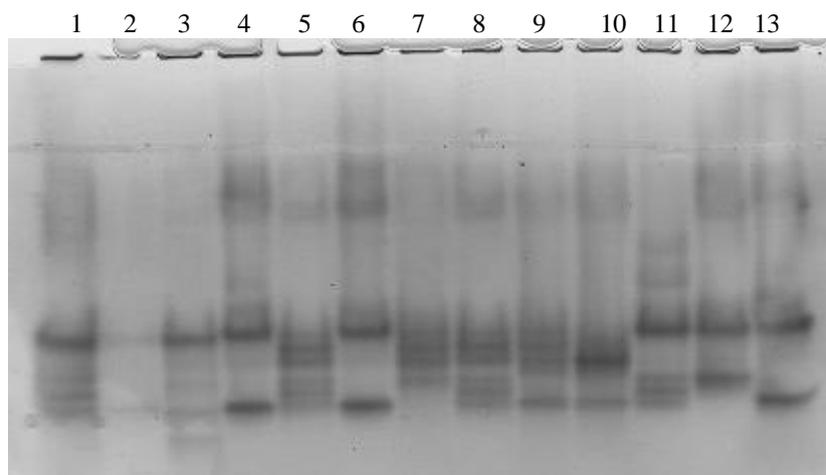


Рис. 3. Типы спектров ААТ у *A. fenzliana* и его гибридов: **1** – Aat-1ab, Aat-2bb – *A. fenzliana* 2/246; **2** – Aat-1aa, Aat-2bb – *A. fenzliana* 9/11; **3** – Aat-1a'b, Aat-2bb – *A. bucharica*; **4** – Aat-1aa, Aat-2bb – *A. fenzliana* 9/10; **5** – Aat-1ab, Aat-2ab – *A. fenzliana* x *A. bucharica* 5/1; **6** – Aat-1aa, Aat-2bb – *A. spinosissima*; **7** – Aat-1bb, Aat-2ab – *A. fenzliana* x *A. communis* 2110; **8** – Aat-1ab, Aat-2ab – *A. spinosissima*; **9** – Aat-1aa, Aat-2ab – *A. fenzliana* 11 7/12; **10** – Aat-1aa, Aat-2aa – *A. fenzliana* 6 5/7; **11** – Aat-1ab, Aat-2bb – *A. fenzliana* 2/246; **12** – Aat-1bb, Aat-2bb – *A. fenzliana* 11/10; **13** – Aat-1aa, Aat-2bb – *A. petunnicovi*.

Таким образом, для дифференциации видов и межвидовых гибридов миндаля можно использовать типы спектров, контролируемые локусами Aat-1 и Aat-2. Высокий полиморфизм по локусу Aat-2, выявленный у *A. fenzliana*, можно рассматривать как видоспецифическую особенность этого вида.

Типы спектров ААТ у видов разных родов косточковых культур и их межродовых гибридов представлены на рисунке 4.

Локус Aat-1 у плодовых косточковых растений контролирует субъединицы ААТ, которые способны ассоциировать во всех возможных димерных комбинациях друг с другом. Для сохранения единой номенклатуры аллельные варианты фермента по локусу Aat-1, были обозначены нами как Aat-1a' и Aat-1a''. Межродовые гибридные формы миндаля формируются медленно мигрирующей субъединицей Aat-1a'a' (присутствующей у других родов подсемейства *Prunoideae*), и каким либо из двух гомоаллельных вариантов ААТ миндаля – Aat-1aa или Aat-1bb. Аллельные варианты Aat-1a'a и Aat-1a'b у вновь созданных форм отличаются по электрофоретической подвижности от аллельных вариантов исходных родительских форм (видов миндаля) и чётко выявляются на электрофореграммах [1]. Как показал сравнительный анализ, носителями Aat-1a' оказались: *Prunus cerasifera* из Кафана, *P. cerasifera* Fermonte красная и Fermonte желтая, *Microcerasus incana*, *M. tomentosa*, *M. pumila* var *besseyi*, гибрид вишни бессея с персиком и два гибрида луизеании, опылённые смесью пыльцы *A. communis* (рис. 4).

Можно предположить, что донорами Aat-1a' у сортов *A. communis* могли быть легко скрещиваемые с миндалём обыкновенным представители родов *Microcerasus* Webb emend Spach и *Louiseania* Carr, а также вида *P. cerasifera* Ehrh. Об этом свидетельствуют встречающиеся в природе естественные гибриды *A. communis* с представителями перечисленных родов. В некоторых местах такие гибридные популяции достигают большой численности [4, 6].

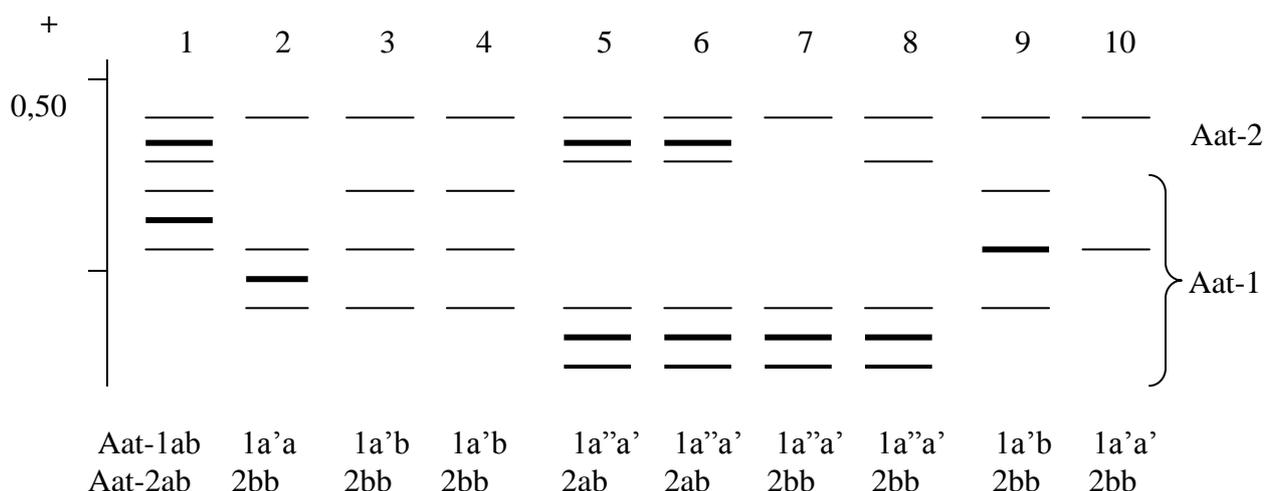


Рис. 4. Типы спектров ААТ у видов разных родов подсемейства *Prunoideae* и их межродовых гибридов: **1** – *A. communis* (cv. Desmayo Langueta), *A. fenzliana* x *A. communis* – F₁ 2110; **2** – *A. communis* (Первенец, Душанбе бот. сад 8/25, формы 431, 445, 453); **3** – *A. communis* (Самаркандский -14, форма 1036); *L. ulmifolia* x *A. communis* № 1; *L. ulmifolia* x *A. communis* № 2; № 1 *A. vulgaris* x *A. communis*; № 2 *A. vulgaris* x *A. communis*; **4** – *P. besseyi* x *P. vulgaris*; **5** – *L. ulmifolia* x *P. cerasifera*; **6** – *P. cerasifera* из Кафана; **7** – *P. cerasifera* Fermonte красная, Fermonte желтая; **8** – *A. vulgaris*; **9** – *L. ulmifolia*, *L. triloba*; **10** – *M. tomentosa*, *M. incana*, *M. pumila* var. *besseyi*.

Таким образом, аллель Aat-1a' можно использовать в качестве маркера межродовых гибридов *A. communis* с представителями других родов подсемейства *Prunoideae*.

С участием *P. cerasifera* образовалось большинство видов косточковых плодовых растений. Появление аллеля Aat-2a у сортов *A. communis* и *A. fenzliana* может быть связано с совпадением ареалов произрастания этих видов и *P. cerasifera* на стыке Переднеазиатских и Среднеазиатских генцентров [3, 4, 6]. Миндаль Фенцля (*A. fenzliana*) встречается в диком виде в Восточном Закавказье, в той его части, которая совпадает с ареалом *P. cerasifera*, поэтому у этого вида наблюдаются признаки, свойственные алыче. Спонтанные гибриды *A. fenzliana* и *A.*

communis успешно произрастают в Армении и Азербайджане, и факты интрогрессивной гибридизации *A. fenzliana* и *A. communis* отмечались ранее. Миндаль *A. fenzliana* очень сходен с гибридами, полученными от искусственного скрещивания *A. communis* с *P. cerasifera* [3, 4].

Таким образом, изоферментный анализ показал, что локус Aat-2 полиморфен у *A. fenzliana* и *P. cerasifera*, тогда как у других косточковых культур он мономорфен, что не исключает участия *P. cerasifera* в генезисе *A. fenzliana*. Предполагается, что появление Aat-2a у *A. fenzliana* связано с аллопатической гибридизацией этого вида с алычой, которая могла возникнуть в отдалённом прошлом в местах наложения ареалов.

Список литературы

1. Айала Ф. Введение в популяционную и эволюционную генетику. – М.: Мир, 1984. – 230 с.
2. Вшивкова Г.Ф., Жебентяева Т.Н., Попок Н.Г. Полиморфизм аспаратаминотрансферазы у миндаля обыкновенного // Бюл. Никит. ботан. сада. – 2000. – Вып. 76. – С. 63-65.
3. Денисов В.П., Рихтер А.А., Ядров А.А. Дикие миндали юга Армении // Тр. по прикл. бот., генет. и селекции. – 1978. – Т. 62. – Вып. – 3. – С.39-42.
4. Еремин Г.В. Отдаленная гибридизация косточковых плодовых растений. – М.: Агропромиздат, 1985. – 279 с.
5. Левитес Е.В. Генетика изоферментов растений. – Новосибирск: Наука, 1986. – 145 с.
6. Пахомова М.Г. Миндали Узбекистана. – Ташкент: Изд-во АНУзССР, 1961. – 235 с.
7. Чуботару А.А., Колцун М.Б. Задачи ботанических садов в консервации биологического разнообразия *in situ* и *ex situ*. // Бюл. Никит. ботан. сада. – 2003. – Вып. 88. – С. 21-25.
8. Davis B.J. Disk electrophoresis. 11. Method and application to human serum proteins // Ann. N.-Y. Acad. Sci. – 1964. – V. 121. – P. 404-427.
9. Hauagge R., Kester D.E., Asay R.A. Isozyme variation among California almond cultivars: 1. Inheritance // J. Amer. Soc. Hort. Sci. – 1987. – V. 112. – N. 4. – P. 687-693.
10. Index kewensis / Pinner J.L.M., Bence T.A., Davies R.A., Lloyd K.M. / Ed. Davies R.A. – Oxford: Clarendon press, 1987. – Suppl. 18. – 346 p.

Polymorphism of aspartataminotransferase in different species and hybrids of almonds

Vshivkova G.F., Richter A.A., Popok N.G.

The changeability of aspartataminotransferase of 8 species and some hybrids of almonds have been studied with the help of method of izofermental analysis. It is shown, that all Aat-1a can be used as marker of intergenus hybrids of almond with other genus of subfamily *Prunoideae* Focke. (*Microcerasus*). Locus Aat-2 – is the polymorphen in *A. fenzliana* (Fritsch) Lipsky and *P. cerasifera* Ehrh., but other stone crops have monomorphen. But this is not the fact not to use *P. cerasifera* in genesis of *A. fenzliana*.