

<https://doi.org/10.3176/biol.1977.4.05>

УДК 571.1/2:633.16+577.15+581.19

Велло ЯАСКА, Вильве ЯАСКА

ИЗОФЕРМЕНТЫ ЭСТЕРАЗЫ У ДИКОРАСТУЩЕГО И КУЛЬТУРНОГО ЯЧМЕНЯ

Культурный ячмень *Hordeum vulgare* L. s. l. и его дикорастущий сородич *H. spontaneum* C. Koch представляют собой два филогенетически близкородственных вида. Наиболее убедительно это доказано в гибридизационных и цитологических исследованиях, показывающих (Бахтеев, 1956; Zohary, 1960 и др.), что гибриды между ними имеют высокую фертильность и нормальную конъюгацию хромосом в мейозе.

Большинство исследователей в настоящее время придерживается теории монофилетического происхождения культурного ячменя от *H. spontaneum*. Высказывались, однако, принципиально различные взгляды относительно путей, места и времени происхождения отдельных морфологических форм ячменя, в особенности дву- и шестирядных (см. Бахтеев, 1964; Невский, 1941; Трофимовская, 1972; Harlan, 1968 и др.). Некоторые аспекты происхождения и эволюционного развития культурного ячменя и его дикорастущего сородича остаются невыясненными и поныне. Особый интерес в настоящее время представляет изучение генетических ресурсов, закономерностей и потенциала генетической изменчивости возделываемого и дикорастущего ячменя в целях их более рационального использования в селекционной работе.

В последние годы нами проведена серия работ (Яска, 1974, 1975; Jaaska, 1969 и др.), в которых для решения проблем филогенеза родственных ячменю зерновых (пшеницы и ржи) успешно применялись молекулярно-генетические маркеры — изоферменты. Литературные данные показывают, что для изучения проблем микроэволюции и видообразования у ячменя особенно подходят изоферменты эстеразы, относительно которых выявлен внутривидовой полиморфизм как у культурного (Allard и др., 1971; Fedak, Rajhathy, 1972; Kahler, Allard, 1970; Mitra и др., 1970), так и у дикорастущего (Fedak, Rajhathy, 1971) ячменя. Электрофоретический анализ изоферментов эстеразы предлагается использовать как вспомогательный метод для идентификации сортов ячменя (Almgård, Landegren, 1974; Bassiri, 1976; Fedak, 1974; Przybylska и др., 1973).

В настоящей работе ставилась задача сравнительного электрофоретического изучения закономерностей внутривидовой генетической изменчивости эстераз проростков культурного ячменя *H. vulgare* L. s. l. и его дикого сородича *H. spontaneum* C. Koch различного географического происхождения.

Материал и методика

Растительный материал. 1. *Hordeum spontaneum* С. Koch — дикорастущий сорный ячмень. Исследовали 40 репродукционных образцов, предоставленных Ф. Х. Бахтеевым (г. Сиигири, Московская обл.), которые представляли различные районы Турции (20 образцов), Сирии (5), Ирака (13) и Туркмении (2). Кроме того, изучались образцы дикорастущего ячменя, собранные автором из природных популяций в Таджикской и Азербайджанской ССР и Нагорно-Карабахской АО. Один образец, собранный в окрестностях г. Ашхабада, получен от П. Чопанова (Ботанический институт АН Туркменской ССР).

По особенностям морфологического строения колоска 3 образца относятся к разновидности *var. lagunculiforme* Bacht., 1 — к *var. proskowetzii* Nábèlek, а все остальные — к основной разновидности *var. spontaneum*.

2. *Hordeum vulgare* L. s. l., incl. *H. distichon* L., *H. hexastichon* L. — культурный ячмень, включая дву- и шестирядные формы самого различного географического происхождения. Исследовали 49 образцов, большинство из которых получены из коллекции Всесоюзного института растениеводства имени Н. И. Вавилова (г. Ленинград). Изученные образцы представляют собой эндемичные формы и стародавние сорта ячменя из трех основных генцентров — Эфиопии, Передней Азии (включая Закавказье и Турцию) и Восточной Азии (Китай и Япония), а также селекционные сорта из скандинавских и западноевропейских стран и из различных районов Советского Союза. Они включают двурядные (31 образец), шестирядные (18 образцов), пленчатые (41) и голозерные (8) формы, относящиеся к 23 ботаническим разновидностям.

Биохимические методы. Семена проращивались в темноте при 26 °С на фильтровальной бумаге, смоченной 8 мМ раствором нитрата кальция с 1 мМ трилоном Б. Первичный лист и coleoptиль 5—6-дневных проростков или отдельные ткани проростков разного возраста гомогенизировали в небольших тиглях с 0,2 мл свежеприготовленной холодной буферной смеси, состоящей из 0,05 М *трис*-гидроксил-аминометана (*трис*), 0,01 М этилендиамин-тетрауксусной кислоты и 0,005 М цистеина гидрохлорида. Клеточные волокна отжимали от экстракта и удаляли, а к экстрактам примешивали по 40—60 мг 4 : 1 смеси сахарозы и сфакдекса G-200.

Полученные таким образом ферментные экстракты сразу исследовались с помощью электрофореза или изоэлектрического фокусирования (ИЭФ) в пластинках полиакриламидного (ПАА) геля размерами 60×45×3 мм, приготовленных фотополимеризацией соответствующих свежеприготовленных полимеризационных растворов в кюветках из органического стекла. Полимеризационная смесь геля для электрофореза содержала 10% акриламида, 0,15% N,N'-метиленбисакриламида (*бис*), 0,25 М *трис*, 0,2% триэтилоламина, 0,5 мг% рибофлавина и 0,075 М HCl. Полимеризационный раствор геля для ИЭФ содержал 7,5% акриламида, 0,2% *бис*, 1 мМ трилона Б, 1 мг% рибофлавина и 2% амфолина pH 5—7 (ЛКБ-Продуктер, Швеция). Фотополимеризацию проводили в течение 1—1,5 ч между двумя лампами дневного света.

Катодный буфер электрофореза содержал 0,08 М глицин и 0,01 М *трис*, а анодным электролитом служил 0,1 М *трис*-ацетатный буфер с исходным pH 8,9. Католитом при ИЭФ служил 0,02 М этилендиамин, а анолитом — 0,02 М H₂SO₄.

Ферментные экстракты в обоих случаях насливали под катодный электролит.

Аппаратура, используемая при электрофорезе и ИЭФ, была одинаковой. Электрофорез проводился сначала 15 мин при силе тока 6 мА на одну пластинку ПАА геля, а затем 1,5—2 ч при 10—12 мА на гель до выхода фронтальной зоны индикатора бромфенолового синего из геля. ИЭФ проводили сначала 15 мин при 90 в, а затем еще 2,5 ч при 220 в.

После электрофореза гели инкубировали сначала 30 мин при комнатной температуре в 0,2 М малеинатном буфере с pH 6,0—6,5 для снижения pH геля, а затем окрашивали для выявления локализации эстеразной активности в гистохимической реакционной смеси, содержащей 0,002 М свежеекстазотированный основной фуксин

и 0,5 мг/мл субстрата 1-нафтилацетата в 0,1 М малеинатном буфере с конечным рН 6,0—6,5. После окончания ИЭФ гели инкубировали сразу же в реакционной смеси для выявления эстераз, которые обнаруживались в виде красноокрашенных зон. Гели фиксировали в смеси этиловый спирт—вода—концентрированная HCl (10:39:1) и фотографировали в диффузном проходящем свете на фотопленку «Микрат 200».

Электрофореграммы с гистохимически окрашенными ферментами, как и их фотографии, называются нами в последующем электрофоретическими энзимограммами или рI-энзимограммами в зависимости от того, получены ли они путем электрофореза или ИЭФ.

Градиент рН в гелях ИЭФ определяли путем разрезания их на полосы шириной в 4 мм и измерения рН в элюатах (24 ч, 4 мл дистиллированной воды на одну полосу геля). Линейный градиент значений рН в геле после ИЭФ с амфолином ЛКБ рН 5—7 по описанной методике устанавливался в пределах 4,0—6,5. Изоэстеразы, выявляемые методом ИЭФ в ПАА геле, обозначаются арабскими цифрами и характерной для них изоэлектрической точкой рI и называются рI-изоэстеразами. Дискретные фракции изоэстераз на электрофоретических энзимограммах обозначаются большими латинскими буквами и дистанцией миграции (D_m) в сторону анода, выраженной в условных единицах по шкале на левой стороне энзимограмм (рисунка). Соответствующие изоферментам символы генов выделены курсивом.

Результаты

Электрофоретический анализ. Примеры электрофоретического разделения эстеразы тканей проростков культурного и дикорастущего ячменя представлены на рис. 1 и 2. Электрофорез в ПАА геле выявляет в проростках ячменя наличие серии молекулярных форм эстеразы — изоэстераз, различающихся по электрофоретической подвижности и, судя по интенсивности окрашивания зон, по относительной активности.

На энзимограммах 1—6 рис. 1 сравниваются изоэстеразы зародыша и тканей проростка культурного ячменя (сорт 'Дрост') различного возраста. Как видно, в непроросшем зародыше по активности доминирует быстродвижущаяся эстераза, дающая на энзимограмме (1) интенсивную дискретную зону с D_m около 4,8. Высокая активность этой эстеразы наблюдается также в тканях первичных корней и листа молодого проростка, тогда как в колеоптиле ее активность с возрастом убывает.

В колеоптиле молодого 3—5-дневного проростка отмечается образование второй быстродвижущейся эстеразы с D_m около 4,1 (3), активность которой также быстро убывает с возрастом (5). Эта эстераза специфична для растущего колеоптиля, а в тканях первичных корней и листа она не обнаруживается.

На энзимограммах первичного листа (4 и 6, рис. 1) наблюдается дублет близко расположенных зон изоэстераз с D_m 3,6—4,0, интенсивность которого увеличивается с возрастом проростка, что указывает на увеличение относительной активности при развитии лиственной ткани. В других тканях проростка эти две изоэстеразы не выявляются, что свидетельствует об их тканеспецифичности. В первичных корнях (2) тканеспецифичные изоэстеразы не обнаруживались.

Аналогичные три быстродвижущиеся эстеразы выявлены нами ранее у проростков различных видов пшеницы и ржи (Яаска, 1975, 1976). Поэтому в данной работе для этих эстераз мы сохраняем ранее принятые буквенные обозначения: А (эстераза зародыша), В (эстераза растущего колеоптиля) и D (эстераза первичного листа). Независимая природа их онтогенетической и филогенетической изменчивости позволила сделать вывод об их генетической обусловленности тремя локусами. Полученные результаты говорят о наличии тех же трех локусов

эстераз у ячменя, что указывает на гомеологию генов и геномов в пределах всей трибы пшеничных.

Изученные образцы дикорастущего и культурного ячменя различного географического происхождения и морфологического строения (дву- и шестирядные, пленчатые и голозерные и т. д.) характеризовались, как видно по рис. 2, одинаковыми электрофоретическими фенотипами эстераз А и В. Отсутствие дивергенции и генетического полиморфизма с распространением электрофоретических вариантов говорит об эволюционном консерватизме локусов этих двух эстераз в пределах ареала и в ходе эволюционного развития дикого и культурного ячменя, а также о близком филогенетическом родстве последних. Единственное выявленное исключение составил сорт 'Сванхолд' (К-6496), у которого эстераза А не обнаружена, что свидетельствует о возможности редких мутационных изменений в этом локусе.

Третий локус группы быстродвижущихся эстераз — локус специфичной для листевой ткани эстеразы D оказался эволюционно менее консервативным. Как у культурного ячменя *H. vulgare*, так и у дикорастущего *H. spontaneum* наблюдается (7—17, рис. 1) внутривидовая генетическая изменчивость эстеразы D с электрофоретически различными дублетами изоформ. При этом у обоих видов обнаруживаются одинаковые электрофоретические типы эстеразы D. Это говорит о гомологической изменчивости эстеразы D у дикорастущего и культурного ячменя с одинаковым гомологическим рядом электрофоретических вариантов. У обоих видов наблюдались три аллеля с электрофоретически различными вариантами эстеразы D и, кроме того, нулевой аллель с отсутствием эстеразной активности.

Эстераза D обнаруживается всегда в виде двух изоформ, электрофоретическая подвижность которых менялась у аллельных форм всегда параллельно и в одинаковой мере. Это свидетельствует о том, что обе эти изоэстеразы детерминируются локусом одного структурного гена. Относительная активность их, однако, менялась в зависимости от возраста и условий выращивания, указывая, что одна изоформа эстеразы D может представлять собой посттрансляционную модификацию другой. Сведения о генетическом контроле двух изоэстераз листа ячменя одним локусом были представлены и в работе А. Калера и Р. Алларда (Kahler, Allard, 1970).

В группе электрофоретически быстродвижущихся эстераз, кроме трех основных, на энзимограммах наблюдаются еще 2—3 слабые полосы изоэстераз, которые, однако, здесь не рассмотрены, так как генетическая интерпретация затрудняется вследствие их малой активности.

Кроме быстродвижущихся изоферментов, электрофорез выявляет во всех тканях проростка серию медленных эстераз, расположенных на энзимограммах в диапазоне D_m от 0,9 до 3. В непроросшем зародыше эти изоэстеразы малоактивны или отсутствуют (1, рис. 1), а уже на начальных этапах развития проростка наблюдается их интенсивное образование и в тканях молодого проростка они приобретают доминирующее значение (2—6, рис. 1).

Как видно из данных сравнительного электрофоретического анализа на рис. 2, в группе медленных эстераз наблюдается значительный внутривидовой полиморфизм как у культурного (1—11), так и у дикорастущего (12—17) ячменя, который, однако, не коррелирует с видовой и разновидностной принадлежностью образцов. Так, образец К-10539 разновидности *himalayense* из Индии и образец К-18991 разновидности *trifurcatum* из Китая имеют совершенно одинаковые энзимограммы (9 и 10) с изоэстеразами, которые встречаются и у других разновидностей ячменя. Такой результат не оправдывает выделение трифуркатного

ячменя в качестве самостоятельного вида (Цвелев, 1973 и др.). Одинаковые электрофоретические варианты эстераз медленной группы обнаруживаются как у дикорастущего, так и у культурного ячменя, что говорит о гомологической генетической изменчивости эстераз у обоих видов. Выявляются межсортовые различия и группы сортов с одинаковым набором медленных эстераз (2—4, рис. 2). Однако диагностические различия между дву- и шестирядными или голозерными и пленчатыми формами по изоферментам эстеразы обнаружить не удалось.

Электрофорез в ПАА геле по принятой нами методике не позволяет, однако, всегда четко разделить все изоэстеразы медленной группы, что затрудняет учет их точного числа и интерпретацию генетической обусловленности. Эти изоэстеразы более удачно разделяются методом ИЭФ, результаты которого и будут в последующем рассмотрены.

Изоэлектрическое фокусирование. На рис. 3 представлены рI-энзимogramмы эстеразы колеоптиля дикорастущего ячменя *H. spontaneum* различного географического происхождения, на которых выявляется значительная внутривидовая изменчивость рI-изоэстераз. Весьма заметные качественные различия в составе рI-изоэстераз обнаружены между отдельными образцами из разных районов Турции (энзимogramмы 1—7), а также между образцами из Сирии, Ирака, Азербайджана и Туркмении (8—12). Кроме того, как показано на энзимogramмах 13—17 рис. 3, обнаружен определенный внутривидовый генетический полиморфизм рI-изоэстераз у образцов ячменя, собранного нами в природе (в Таджикистане и Закавказье).

Несмотря на заметный внутривидовой полиморфизм эстеразы, *H. spontaneum* из разных районов в пределах всего ареала распространения характеризуется одинаковыми рI-эстеразами без выявления специфических для какого-либо района изоферментов. Сравнение энзимogramм эстеразы, а также характера внутривидовой и онтогенетической изменчивости позволяет выделить 9 основных рI-изоэстераз, которые, по всей вероятности, генетически контролируются отдельными локусами. Ниже приводится краткая характеристика этих рI-изоэстераз, которые условно пронумерованы от 1 до 9 в порядке увеличения значений изоэлектрических точек.

Эстераза 1 с рI около 4,4. Выявлены два генетических варианта с небольшими различиями изоэлектрических точек, т. е. два рI-аллоэнзима, контролируемые двумя аллелями одного локуса. Оба они обнаружены в гомозиготном состоянии среди образцов из Турции и Таджикской ССР. Высокая активность рI-эстеразы 1 наблюдается в молодых (2—4-дневных) колеоптилях, тогда как в более старых (6—8-дневных) колеоптилях ее активность заметно снижается или даже не выявляется. В других тканях проростка — в первичном листе и корнях — эстераза 1 не обнаруживается, как и в непроросшем зародыше. Таким образом, рI-эстераза 1, подобно электрофоретически выявляемой эстеразе В, специфична для молодых, активно растущих тканей колеоптиля. Их тождественность, однако, требует подтверждения.

Эстераза 2 с рI около 5,0. Обнаруживаются два генетических рI-варианта (ср. 2—4 на рис. 3) и их кододоминантное проявление у некоторых образцов. Характер их встречаемости указывает на то, что они являются аллоэстеразами, контролируемыми двумя аллелями одного локуса с кододоминантным наследованием у гетерозигот. Активность эстеразы 2 относительно высока в непроросшем зародыше и изменяется в значительных пределах в зависимости от конкретного образца, а также возраста и типа ткани проростка.

На оригинальных рI-энзимogramмах эстеразы тканей проростка выявляются 2—3 слабые зоны, расположенные между эстеразами 1 и 2.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

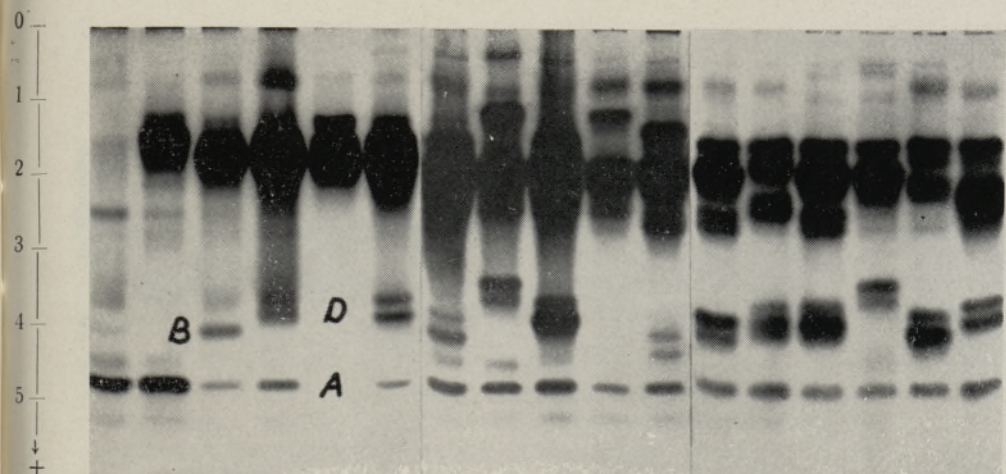


Рис. 1. Электрофоретические энзимогаммы эстеразы ячменя. Electrophoretic esterase enzymograms. 1—6 — двурядный культурный ячмень *Hordeum vulgare* L., cv. 'Drost', образец К-18407 : 1 — зародыш, 24 ч при 2° (embryo, 24 hours at 2°); 2 — первичный лист 4-дневного проростка (primary leaf, 4 days); 3 — колеоптиль, 4 дня (coleoptile, 4 days); 4 — первичные корни, 4 дня (primary roots, 4 days); 5 — колеоптиль, 7 дней (coleoptile, 7 days); 6 — первичный лист, 7 дней (primary leaf, 7 days); 7—11 — *Hordeum vulgare* L., первичный лист (primary leaf), образцы: 7 — К-16947 из Краснодарского края, var. *pallidum*; 8 — К-19355 из Армении, var. *nutans*, cv. 'Nutans 115'; 9 — К-19009 из Норвегии, var. *nutans*, cv. 'Domen'; 10 — К-8279 из Саратовской обл., var. *persicum*, cv. 'Persicum 64'; 11 — cv. 'Marocaine', из Голландии, 12—17 — *Hordeum spontaneum* C. Koch, шесть образцов из различных мест Турции (six accessions from Turkey).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

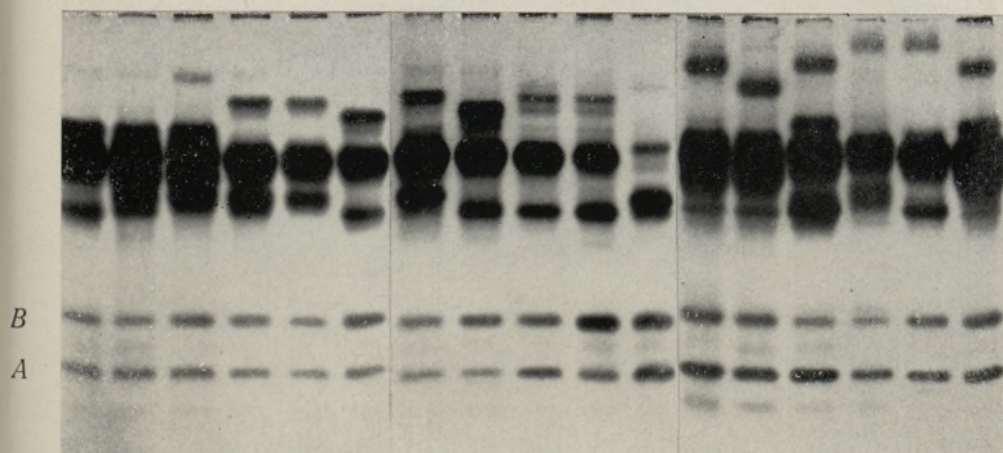


Рис. 2. Электрофоретические энзимогаммы эстеразы колеоптиля культурного ячменя *Hordeum vulgare* L. (1—11) и дикорастущего *Hordeum spontaneum* C. Koch (12—17). Electrophoretic enzymograms of the coleoptile esterase. Образцы (accessions): 1 — К-18815 из Дании, var. *nutans*, cv. 'Carlsberg II'; 2 — К-21475 из ГДР, var. *nutans*, cv. 'Alsa'; 3 — К-19009 из Норвегии, var. *nutans*, cv. 'Domen'; 4 — К-17222 из Азербайджанской ССР, var. *nutans*, cv. 'Ag-Agra'; 5 — К-19355 из Армянской ССР, var. *nutans*, cv. 'Nutans 115'; 6 — К-4954 из Киргизии, var. *nutans*, cv. 'Nutans 970'; 7 — К-18703 из Эфиопии, var. *nigrinudum*; 8 — К-20130 из Эфиопии, var. *duplinigrum*; 9 — К-10539 из Индии, var. *himalayense*; 10 — К-18991 из Китая, var. *trifurcatum*; 11 — К-3415 из Японии, var. *revelatum*, cv. 'Tanbash'; 12—13 — var. *spontaneum* из Сирии; 14—15 — var. *spontaneum* из Ирака; 16 — var. *lagunculiforme* из Таджикской ССР; 17 — var. *lagunculiforme* из Туркменской ССР.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

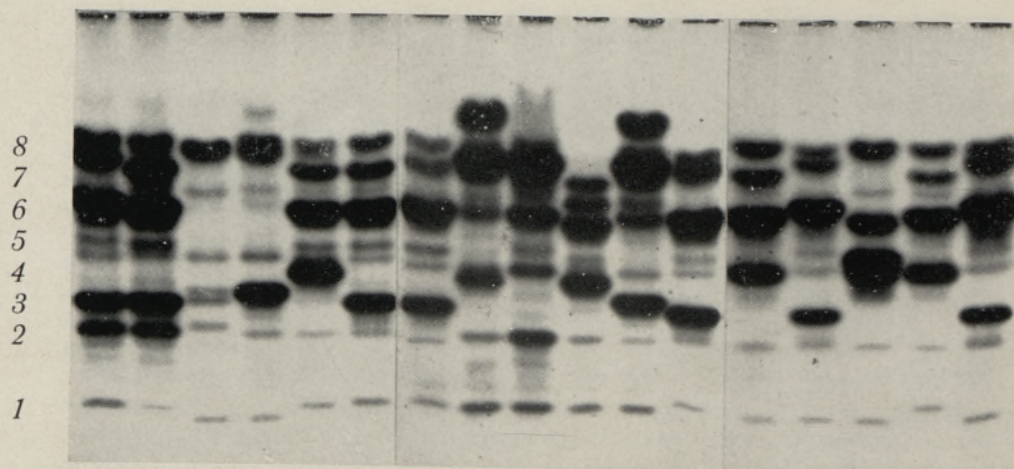


Рис. 3. pI-Энзимогаммы эстеразы колеоптиля образцов дикорастущего ячменя *Hordeum spontaneum* С. Koch (pI-enzymograms of the coleoptile esterase): 1—7 — семь образцов из различных популяций в Турции (7 accessions from Turkey); 8 — из Сирии (Syria); 9 — из Азербайджанской ССР (Azerbaijan SSR); 10 — из Сирии (Syria); 11 — из Туркменской ССР (Turkmenian SSR); 12 — из Ирака (Iraq); 13—17 — пять индивидов образца А-38/70, собранные автором из природной популяции близ пос. Ганджина на юго-западе Таджикской ССР (5 individuals from a natural population collected in the Tadjik SSR).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

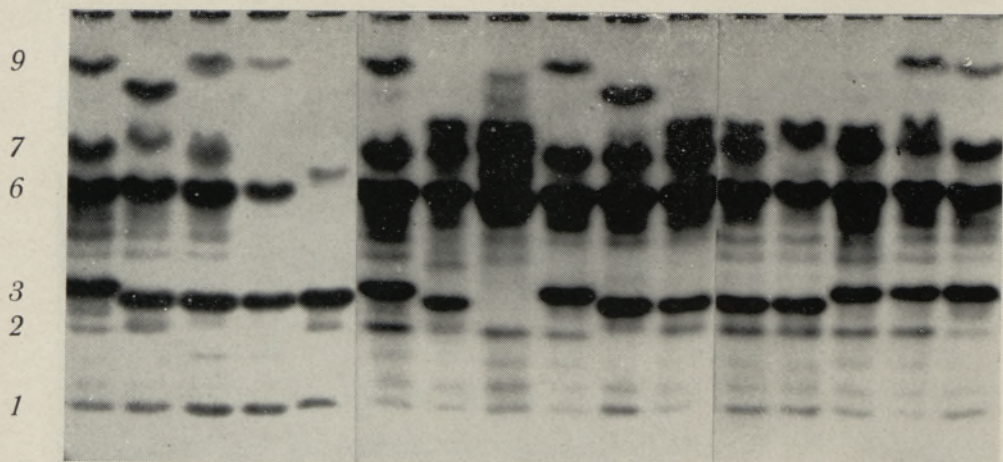


Рис. 4. pI-Энзимогаммы эстеразы колеоптиля сортов культурного ячменя *Hordeum vulgare* L. (pI-enzymograms of the coleoptile esterase): 1 — К-18703 из Эфиопии, var. *nigrinudum*; 2 — К-20130 из Эфиопии, var. *duplinigrum*; 3 — К-10539 из Индии, var. *himalayense*; 4 — К-18991 из Китая, var. *trifurcatum*; 5 — К-3415 из Японии, var. *revelatum*; 6 — К-17222, сорт 'Аг-Арпа' из Азербайджанской ССР, var. *nutans*; 7 — К-4534, сорт 'Нутанс 244' из Украинской ССР, var. *nutans*; 8 — К-18334, сорт 'Усури 8' из Приморского края, var. *nutans*; 9 — К-19355, сорт 'Нутанс 115' из Армянской ССР, var. *nutans*; 10 — К-4954, сорт 'Нутанс 970' из Киргизской ССР, var. *nutans*; 11 — К-18815, сорт 'Карлсберг II' из Дании, var. *nutans*; 12 — К-19943, сорт 'Дорак Агра' из Турции, var. *parallelum*; 13 — К-19833, сорт 'Ташкелляк' из Узбекской ССР, var. *parallelum*; 14 — К-16947 из Краснодарского края, var. *pallidum*; 15 — К-20444 из Азербайджанской ССР; var. *pallidum*; 16 — К-8279 из Саратовской области, var. *persicum*. Энзимогаммы двурядных ячменей — 1, 6—11 и 16, шестирядных — 2—5 и 12—15.

Эти эстеразы относительно активны в зародыше, но их активность убывает при прорастании, что затрудняет их учет по фотографиям энзимограмм колеоптиля на рис. 3.

Эстераза 3. Обнаружены три rI -варианта с изоэлектрическими точками в диапазоне от 5,2 до 5,4. У одного образца наблюдали одновременно два rI -варианта эстеразы 3 (энзимограмма 3, рис. 3). Характер внутривидовой сегрегации трех rI -вариантов эстеразы 3 позволяет предполагать, что они контролируются аллелями одного локуса, хотя это требует экспериментальной проверки. Эстераза 3 отсутствует в зародыше и образуется при прорастании во всех тканях проростка.

Эстеразы 4 и 5 имеют близкие значения rI около 5,6—5,7. Эстераза 4 встречается у подавляющего большинства образцов, особенно в тканях колеоптиля и корня, но слабоактивна в зародыше и первичном листе. Эстераза 5, напротив, высокоактивна в листевой ткани и менее активна в первичных корнях проростка. Среди исследованных образцов наблюдались генетические варианты с небольшими сдвигами rI и отсутствием активности (ср. 1—4, рис. 3). Независимый характер внутривидовой и онтогенетической изменчивости эстераз 4 и 5 свидетельствует в пользу предположения об их генетическом контроле двумя разными локусами.

Эстераза 6 имеет rI около 5,9. Сравнение энзимограмм позволяет выявить генетические варианты с небольшими сдвигами изоэлектрических точек, а также весьма значительные различия между образцами по активности.

Эстеразы 7 и 8 расположены на энзимограммах в районе значений rI 6,2—6,4. У них обеих, как видно из данных рис. 3, можно наблюдать генетические rI -варианты и существенные различия в активности до полного отсутствия ее у отдельных образцов из различных географических районов.

Эстераза 9 с rI 6,5 проявляет высокую активность только у некоторых образцов (8 и 11, рис. 3). Ее наличие, однако, не коррелирует с географическим происхождением образца.

На рис. 4 сравниваются rI -энзимограммы эстеразы колеоптиля возделываемого ячменя различного географического происхождения. Видно, что культурный ячмень, как и дикорастущий, характеризуется заметным внутривидовым полиморфизмом изоферментов эстеразы с наличием rI -вариантов и нулевых аллелей. Эта изменчивость, однако, не коррелирует ни с географическим происхождением образцов, ни с морфологическими признаками. Данные рис. 4 показывают, что изученные стародавние сорта ячменя из географически отдаленных генцентров и сорта современной селекции характеризуются одними и теми же rI -изоэстеразами и их генетическими вариантами. То же самое можно сказать и относительно морфологических форм возделываемого ячменя — дву- и шестирядных, пленчатых и голозерных, которые обнаруживают общность rI -фенотипов эстеразы.

Сравнение результатов, представленных на рис. 3 и 4, позволяет сказать, что дикорастущий и культурный ячмень характеризуются одинаковым составом основных rI -изоэстераз. У обоих видов наблюдается также гомологическая изменчивость rI -изоэстераз. Нельзя было обнаружить ни одной изоэстеразы, специфичной только культурному или дикорастущему ячменю, или какой-либо их морфологической форме.

Все же можно отметить, что rI -энзимограммы культурного ячменя более сходны между собой и обнаруживают меньше генетических вариантов некоторых rI -изоэстераз, чем rI -энзимограммы дикорастущего сородича. Это указывает на определенное сужение аллельного генофонда культурного ячменя по сравнению с дикорастущим относительно некоторых локусов эстеразы. Исключение составляет локус rI -эсте-

разы 9, выявляющий у многих образцов культурного ячменя генетические варианты с повышенными значениями изоэлектрических точек (1—4, 6, 9 и 15—16, рис. 4), которые не обнаружены у изученных образцов дикорастущего ячменя.

Обсуждение

Результаты настоящей работы подтверждают сведения литературы (Allard и др., 1971; Fedak, Rajhathy, 1971 и др.) о значительном внутривидовом генетическом полиморфизме изоферментов эстеразы у культурного ячменя и его дикорастущего сородича *H. spontaneum*. Отсутствие специфических для культурного или дикорастущего ячменя или их морфологических разновидностей генетических вариантов изоэстераз не позволяет использовать полученные данные для решения спорных проблем филогенеза относительно первичности дву- или шестирядных форм ячменя и локализации географического района одомашнивания. Обнаружение гомологической изменчивости с одинаковыми генетическими вариантами изоэстераз у образцов обоих видов из различных географических районов свидетельствует о длительном периоде параллельной эволюции *H. vulgare* и *H. spontaneum*. Дивергентная эволюция затрагивала, по-видимому, лишь отдельные морфологические признаки (ломкость колоса, строение колоска и т. д.), которые имеют адаптивное значение для успешного распространения в условиях культуры или дикой природы.

По внешним морфологическим признакам дикорастущий ячмень более однороден, чем возделываемый, который характеризуется большим числом ботанических разновидностей. У *H. spontaneum* различают четыре ботанические разновидности (Бахтеев, 1962) — var. *spontaneum*, var. *ischnatherum* (Cosson) Thell., var. *proskowetzii* Nábèlek и var. *lagunculiforme* Vacht., из которых две последние встречаются в природе очень редко, а две первые имеют весьма небольшое различие в строении верхушки боковых неплодущих колосков (округлые или заостренные).

Из полученных результатов следует, что основная разновидность дикого ячменя var. *spontaneum* имеет такую же степень генетического полиморфизма изоэстераз, как совокупность всех 23 изученных ботанических разновидностей культурного ячменя. Электрофоретический анализ изоферментов позволяет, таким образом, выявить скрытый от невооруженного глаза генетический полиморфизм, который не коррелирует с дифференциацией по внешним морфологическим признакам.

Характерной чертой наблюдаемого у ячменя генетического полиморфизма является отсутствие или редкая встречаемость гетерозиготных генотипов. Культурный и дикорастущий ячмень распадаются на множество гомозиготных генетических линий с характерным составом изоэстеразных аллелей. Это обусловлено тем, что оба вида ячменя являются самоопыляющимися растениями, а самоопыление, как известно, приводит к гомозиготизации генотипов. Обнаружение редких гетерозиготных особей с кодоминантным наследованием изоэстеразных вариантов свидетельствует о спорадическом перекрестном опылении в популяциях дикорастущего ячменя.

Подобная же корреляция между способом размножения и наличием гетерозигот отмечена нами для видов ржи, пшеницы и эгилопса (Яаска, 1974, 1975 и др.). Нами установлено, что сорта самоопыляющихся зерновых культур (пшеницы и ячменя) представляют собой генетически однородные и гомозиготизированные линии, а сорта перекрестноопыляющейся культуры (ржи) выявляют значительный внутрисортный полиморфизм по изоэстерасным локусам. В отличие от видов культур-

ной пшеницы, ячмень характеризуется большим внутривидовым полиморфизмом ряда изоэстераз.

Выявленная нами закономерность гомологической изменчивости изоэстераз у разных морфологических форм возделываемого и дикорастущего ячменя из различных географических районов в пределах всего ареала не позволяет объяснить наблюдаемый полиморфизм ни искусственным отбором, ни давлением определенных факторов естественного отбора. Доводы, часто приводимые в пользу действия факторов естественного отбора для поддержания полиморфизма в силу адаптивного преимущества гетерозигот, не применимы относительно ячменя из-за аутогамного способа его размножения и редкой встречаемости перекрестного опыления. В случае адаптивного преимущества определенного аллеля изоэстеразы следовало бы ожидать корреляцию его встречаемости с определенным географическим районом или с морфологической дифференциацией, что, однако, не наблюдается. Поэтому не исключено, что внутривидовая генетическая изменчивость изоэстераз у ячменя является примером нейтрального полиморфизма, поддерживаемого генетическим дрейфом в сочетании с давлением гомологической мутационной изменчивости, специфичность которой определяется особенностями молекулярного строения генома ячменя. Это предположение, однако, требует экспериментальной проверки.

Метод ИЭФ в ПАА, примененный для разделения отдельных изоферментов эстеразы, как видно из полученных результатов, имеет некоторые преимущества перед электрофорезом. Поэтому его можно рекомендовать наряду с методом электрофореза при анализе изоферментов эстеразы у сортов культурного ячменя с целью их идентификации, а также и при генетическом анализе исходного селекционного материала.

Заключение

С помощью методов электрофореза и ИЭФ в ПАА геле у культурного ячменя *Hordeum vulgare* L. s. l. и его дикорастущего сородича *H. spontaneum* C. Koch описан гомологический внутривидовой полиморфизм изоферментов эстеразы с одинаковыми генетическими вариантами. Изоэстеразные варианты, специфические для ячменя определенного географического района происхождения или для его морфологической разновидности, не обнаружены. У основной разновидности дикорастущего ячменя *H. spontaneum* var. *spontaneum* наблюдается такая же изменчивость изоэстераз, как у совокупности морфологических разновидностей возделываемого ячменя. Высказывается предположение, что внутривидовой генетический полиморфизм изоэстераз у ячменя поддерживается генетическим дрейфом нейтральных аллелей эстераз в сочетании с давлением гомологической мутационной изменчивости, специфичность которой определяется особенностями молекулярного строения генома ячменя.

Описаны закономерности изменения активности и состава изоэстераз при прорастании и развитии проростка ячменя. Выявлены изоэстеразы, свойственные определенной ткани и стадии развития проростка.

ЛИТЕРАТУРА

- Бахтеев Ф. Х., 1956. К генетике ячменя. Ботан. ж. 41 (11) : 1591—1603.
Бахтеев Ф. Х., 1962. Новое звено в дикорастущем виде ячменя. Ботан. ж. 47 (6) : 844—847.
Бахтеев Ф. Х., 1964. Современное состояние проблемы происхождения ячменя. Изв. АН СССР, сер. биол. (5) : 655—667.

- Невский С. А., 1941. Материалы к познанию дикорастущих ячменей в связи с вопросом происхождения *Hordeum vulgare* L. и *Hordeum distichon* L. Опыт монографии рода *Hordeum* L. Тр. Ин-та бот. АН СССР им. В. Л. Комарова 1 (5) : 64—255.
- Трофимовская А. Я., 1972. Ячмень. Гл. I. Проблемы эволюции и классификации видов ячменя. Л. : 7—78.
- Яаска В., 1974. Происхождение тетраплоидных пшениц по данным электрофоретического изучения ферментов. Изв. АН ЭССР. Биол. 23 (3) : 201—220.
- Яаска В., 1975. Эволюционная изменчивость ферментов и филогенетические взаимосвязи в роде *Secale* L. Изв. АН ЭССР. Биол. 24 (3) : 179—198.
- Яаска В., 1976. Геном- и тканеспецифическая регуляция изоферментов эстеразы и кислой фосфатазы у тетраплоидных пшениц при прорастании. Изв. АН ЭССР. Биол. 25 (2) : 132—145.
- Цвелев Н. Н., 1973. Обзор видов трибы *Triticeae* Dum. семейства злаков (*Poaceae*) во флоре СССР. Новости систематики высш. раст. 10 : 19—68.
- Allard, R. W., Kahler, A. L., Weir, B. S., 1971. Isozyme polymorphisms in barley populations. In: Barley Genetics 2 : 1—13.
- Almgård, G., Landegren, U., 1974. Isoenzymatic variation used for the identification of barley cultivars. Z. Pflanzenzücht. 72 (1) : 63—73.
- Bassiri, A., 1976. Barley cultivar identification by use of isozyme electrophoretic patterns. Canad. J. Plant Sci. 56 (1) : 1—6.
- Fedak, G., 1974. Allozymes as aids to canadian barley cultivar identification. Euphytica 23 (1) : 166—173.
- Fedak, G., Rajhathy, T., 1971. Esterase isoenzymes in a Middle East collection of *Hordeum spontaneum*. Barley Genetics Newsletter, Fort Collins, Colorado 1 : 67—68.
- Fedak, G., Rajhathy, T., 1972. Esterase isoenzymes in canadian barley cultivars. Canad. J. Plant Sci. 52 (4) : 507—516.
- Harlan, J. R., 1968. On the origin of barley. U. S. Dept. Agricult. Agriculture Handbook No. 338 : 9—31.
- Jaaska, V., 1969. Electrophoretic studies of seedling phosphatases, esterases and peroxidases in the genus *Triticum* L. Eesti NSV TA Toimet. Biol. 18 (2) : 170—183.
- Kahler, A. L., Allard, R. W., 1970. Genetics of isoenzyme variants in barley. I. Esterases. Crop Sci. 10 (4) : 444—448.
- Mitra, R., Jagannath, D. R., Bhatia, C. R., 1970. Disc electrophoresis of analogous enzymes in *Hordeum*. Phytochemistry 9 (8) : 1843—1850.
- Przybylska, J., Zimniak-Przybylska, Z., Dabrowska, T., 1973. Isoenzyme patterns in several cultivated varieties of barley (*Hordeum vulgare* L.). Genet. polon. 14 (1) : 62—69.
- Zohary, D., 1960. Studies on the origin of cultivated barley. Bull. Res. Council. Israel 9D (1) : 21—42.

Институт зоологии и ботаники
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
18/X 1976

Vello JAASKA, Vilve JAASKA

METSIKU JA KULTUURODRA ESTERAASI ISOENSÜUMID

Resüme

Elektroforeesi ja isoelektrilise fokuseerimise meetodi abil on kirjeldatud kultuurodra *Hordeum vulgare* L. s.l. ja selle metsikult kasvava sugulasliigi *H. spontaneum* C. Koch esteraasi isoensüümide ontogeneetilist muutlikkust ja liigisisest varieeruvust.

Avastati isoesteraaside homoloogiline varieeruvus (s. o. elektroforeetilisel ühised alloesteraasid mõlemal liigil), mis ei korreleeru proovide päritoluga erinevatest geograafilistest geenitsentritest ega jaotusega botaanilisteks teisenditeks morfoloogiliste tunnuste alusel. Võib oletada, et täheldatud isoesteraaside liigisisene polümorfism on tingitud loodusliku ja kunstliku valiku suhtes neutraalsete alloesteraaside geenilisest triivist ja homoloogilisest muutlikkusest, mille spetsiifilisus tuleneb odra genoomi molekulaarstruktuuri iseärasustest.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia
Zoologia ja Botaanika Instituut

Toimetusse saabunud
18. X 1976

Vello JAASKA, Vilve JAASKA

ESTERASE ISOENZYMES IN WILD AND CULTIVATED BARLEY

Summary

Homologous intraspecific polymorphism of esterase isoenzymes with electrophoretically similar genetic variants (alloesterases) has been described in the cultivated barley, *Hordeum vulgare* L. s. l., and its wild-growing relative, *Hordeum spontaneum* C. Koch, by means of electrophoresis (Figs 1 and 2) and isoelectric focusing (Figs 3 and 4) in polyacrylamide gel.

Three genetically independent isoesterases of high anodal mobility and characteristic tissue specificity (enzymograms 1—6 in Fig. 1) could be distinctly resolved by electrophoretic analysis. Two of them, designated as Est A (dominates in the ungerminated embryo) and Est B (specific for the young coleoptile), proved essentially monomorphic and of common mobility in both barley species (Fig. 2). Homologous intraspecific variation with electrophoretically similar alloesterase doublets in both barley species was revealed at the locus of the isoesterase D specific of the leaf tissue (7—17, Fig. 1).

Extensive intraspecific homologous variation was observed in a poorly separated cluster of electrophoretically slowly migrating isoesterases (Fig. 2) which could be better resolved by means of isoelectric focusing with the LKB Ampholine pH 5—7. The last method distinguishes, in the barley coleoptile tissue, at least nine major isoesterases (numbered 1—9 in the order of their increasing pI-value, Fig. 3), presumably controlled by separate gene loci. Homologous variation with similar isoelectric variants (called pI-alloesterases) at most of the nine isoesterase loci was revealed in both barley species which could not be distinguished by their isoesterase patterns. Alloesterases specific of a particular morphological variety or geographic region of origin were not encountered. Barley accessions of both species originating from different gene centres in Eurasia (Ethiopia, Syria, Irak, Turkey, Transcaucasia, Turkmenia, Central Asia, China, Japan, USSR, Scandinavian countries) and botanical varieties (23 in total, including two- and six-rowed, hulled and naked forms) revealed electrophoretically common genetic variants at all isoesterase loci. The basic variety of the wild barley, *H. spontaneum* var. *spontaneum*, revealed a similar amount of isoesterase polymorphism as found in all botanical varieties of cultivated barley.

Some individual variation of isoesterases has been observed in a population of wild-growing barley collected in the Tadjik SSR. Most barley individuals were homozygous with respect to isoesterase alleles, while the rare heterozygotes encountered showed codominant expression of alloesterases.

The lack of correlation between the occurrence of alloesterases and morphological characters or geographical origin of barley accessions is considered to favour the hypothesis according to which the isoesterase polymorphism in the two phylogenetically closely related barley species is maintained by the genetic drift and inherent homologous variation at isoesterase loci as specified by the molecular structure of the barley genome.

Academy of Sciences of the Estonian SSR,
Institute of Zoology and Botany

Received
Oct. 18, 1976