

ГЕНЕТИКА И ФЕНОГЕНЕТИКА МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ РАСТЕНИЙ

Р.С. Юдина

Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: yurs@bionet.nsc.ru

Статья представляет собой обзор литературных данных о структуре, функциях, свойствах и генетическом контроле фермента малатдегидрогеназы (МДГ) у растений. У большинства изученных объектов выявлен высокий уровень полиморфизма, проявляющийся в наличии множественных молекулярных форм малатдегидрогеназы. Установлено, что полиморфизм МДГ у каждого вида генетически детерминирован наличием нескольких локусов со множественными аллелями. Четкое фенотипическое проявление, высокая активность малатдегидрогеназы в разных органах и тканях делают этот фермент надежным и удобным генетическим маркером при проведении различных исследований по частной, экологической и популяционной генетике.

Ключевые слова: локусы, аллели, изоферменты, маркеры, компартменты.

Открытие изоферментов (Hunter, Markert, 1957; Markert, Moller, 1959) дало в руки исследователей простые и надежные маркерные признаки для изучения самого широкого класса биологических явлений. Появились принципиально новые возможности маркирования генов и генетических систем. Преимущество изоферментных маркеров состоит в том, что они сами являются носителями определенных функций в метаболизме и наряду с генами или локусами генома могут быть факторами идентификации этих функций. Изоферменты могут быть использованы как маркеры для филогенетического анализа и выявления интрогрессий и как маркеры для раскрытия внутривидовой дифференциации, сортовой идентификации и анализа популяций. Главными же преимуществами изоферментов как генетических маркеров являются: кодоминантный характер наследования, четкое фенотипическое проявление и легкость идентификации. Среди исследуемых изоферментных систем значительное место занимают дегидрогеназы, к числу которых относится и малатдегидрогеназа.

НАД-зависимая малатдегидрогеназа (МДГ, L-малат: НАД-оксиредуктаза; К.Ф.1.1.1.37) – широко распространенный фермент животных,

растений и микроорганизмов. МДГ катализирует окисление (дегидрирование) яблочной кислоты (L-малата) до щавелевоуксусной (оксалоацетата) в присутствии кофактора НАД⁺:

$$\text{COOH-CH}_2 - \text{CHON-COOH} + \text{НАД}^+ =$$



(Диксон, Уэбб, 1982).

МДГ относится к числу довольно хорошо изученных ферментов. Известно, что малатдегидрогеназа существует в клетке в различных молекулярных формах. У большинства исследованных объектов обнаружено две формы МДГ: митохондриальная и цитоплазматическая (Shannon, 1968; Longo, Scandalios, 1969; Scandalios, 1969; Yang, Scandalios, 1974; Yang, 1975 и др.) Митохондриальная МДГ функционирует в качестве компонента цикла Кребса, а растворимая (цитоплазматическая) может играть роль челночного механизма среди субклеточных компонентов (Ленинджер, 1974; Ting *et al.*, 1975), участвовать в кислотном метаболизме в тканях растений (Yang, 1975), в автотрофной фиксации CO₂ у высших растений и других метаболических путях (Scandalios, 1974; Yang, Scandalios, 1974; Yang, 1975).

В растительных тканях МДГ найдена также в глиоксисомах (Breidenbach, Beevers, 1967; Longo, Scandalios, 1969; Yang, Scandalios, 1974; Walk, Hock, 1977), пероксисомах (Yamazaki, Tolbert, 1969; Садунишвили, Нуцубидзе, 1980) и микросомах (Тарасова, 1988, Yudina, Levites, 2007; Юдина, Левитес, 2008). Микротельцовая форма МДГ участвует в фотодыхании и глиоксилатном цикле (Gottlieb, 1982).

Структура и свойства фермента

Изучение структуры молекулы малатдегидрогеназы у кукурузы, сельдерея, риса, авокадо и других растений показало, что молекула МДГ состоит из двух субъединиц, т. е. по своей четвертичной структуре МДГ – димер (Longo, Scandalios, 1969; Endo, Morishima, 1983; Orton, 1983; Torres, 1983; Arus, Orton, 1984).

Наиболее детально изучена малатдегидрогеназа у кукурузы (Scandalios, 1969, 1974; Yang, Scandalios, 1975a, b; Yang *et al.*, 1977; McMillin, Scandalios, 1980–1982; Goodman, Stuber, 1983; Newton, 1983). МДГ кукурузы локализована в хлоропластах (Scandalios, 1974), микротельцах, митохондриях и в цитоплазме (Ting *et al.*, 1975). По первичной структуре цитоплазматические и митохондриальные формы различаются между собой гораздо сильнее, чем митохондриальные формы МДГ разных родов (Newton, 1983). Этот вывод сделан путем сравнения реакции различных изоферментов МДГ с антисывороткой, приготовленной отдельно к продукту каждого гомозиготного *Mdh* локуса. Антисыворотка, приготовленная против очищенной митохондриальной МДГ, перекрестно реагировала с микротельцовой, но не реагировала с растворимой МДГ (Ting *et al.*, 1975; Goodman *et al.*, 1980; Newton, 1983). Изучение биохимических свойств митохондриальных и цитоплазматических МДГ кукурузы показало, что они различаются по термостабильности, оптимуму pH, кинетическим свойствам и т. д. (Yang, Scandalios, 1974; Yang, 1975).

Выявлены различия между цитоплазматическими и митохондриальными изоформами МДГ у винограда при проведении изоэлектрического фокусирования. Цитоплазматические формы имели pH 4,0–5,5, а митохондриальные были менее кислые с pH от 5,5 до 7,5, с мо-

лекулярным весом 80 тыс. дальтон (Taureilles *et al.*, 1995).

При изучении молекулярных свойств глиоксисомальной и митохондриальной МДГ семян арбуза также найдены различия. Молекулярный вес глиоксисомальной МДГ арбуза составляет 67 тыс. дальтон, а митохондриальной – 74 тыс. При высоких концентрациях энзима наблюдалась агрегация глиоксисомального фермента, а митохондриального – нет. Ферменты различаются по своим изоэлектрическим точкам, термостабильности, оптимуму pH и другим свойствам (Walk *et al.*, 1977; Walk, Hock, 1977).

При воздействии различных ингибиторов синтеза МДГ кукурузы было показано, что митохондриальные МДГ синтезируются на цитоплазматических рибосомах (Yang, Scandalios, 1975a). Есть сведения и о том, что митохондриальная и глиоксисомальная МДГ синтезируются в форме предшественников с большой молекулярной массой, затем при транспортировке этих предшественников из цитоплазмы в органеллы происходит процесс отщепления части полипептидной цепи с молекулярной массой 8 тыс. дальтон от глиоксисомального предшественника и 3,3 тыс. дальтон от митохондриального, что приводит к образованию конечных функциональных субъединиц. Цитоплазматическая МДГ не синтезировалась в форме предшественника (Gietl, Hock, 1982).

Малатдегидрогеназа исследовалась и у других растительных объектов: фасоли (Habig, Racusen, 1968), шпината (Yamazaki, Tolbert, 1969; Rocha, Ting, 1971; Zschoche, Ting, 1973a), овса (Yue, 1968; Grimwood, McDaniel, 1970), пшеницы (Mitra, Bhatia, 1971; Воденичарова, 1980; Benito, Salinas, 1983; Hart, 1983), хлопчатника (O'Sullivan, Wedding, 1972; Bortman *et al.*, 1981), арабидопсиса (Cammaerts, Jacobs, 1975), гороха (Zschoche, Ting, 1973b; Weeden, Magh, 1984), сахарной свеклы (Тарасова, 1988), амаранта (Юдина и др., 2005) и т. д.

Наряду с вышеуказанными различиями имеются и сходные характеристики множественных молекулярных форм МДГ растений. Так, у большинства изученных объектов молекулярные веса МДГ имеют размеры от 60 до 70 тыс. дальтон. При электрофорезе в крахмальном геле формы малатдегидрогеназы, связанные с органеллами,

мигрируют от катода к аноду в определенной последовательности: ближе всего к катоду, как правило, располагается микротельцовая, затем митохондриальная и цитоплазматическая (O'Sullivan, Wedding, 1972). Общим является и тот факт, что митохондриальные МДГ большинства эукариот по данным иммунологических исследований имеют сходные структурные характеристики, показывая высокую степень эволюционной сохранности (Newton, 1983).

На основании вышеизложенного и с учетом того факта, что различные и высокоспецифичные формы этого фермента находятся почти в каждом главном субклеточном компоненте, можно заключить, что МДГ является уникальным модельным ферментом для изучения взаимоотношений между органеллами (Scandalios, 1974).

Генетический контроль малатдегидрогеназы

Полиморфизм и специфичность множественных молекулярных форм НАД-МДГ характерны как для разных тканей одного растения, так и для разных компартментов клетки. Кроме того, полиморфизм по молекулярным формам выявлен и для каждого компартмента. 7 митохондриальных и 6 цитоплазматических электрофоретических вариантов выявлены у кукурузы (Goodman *et al.*, 1980; Newton, Schwartz, 1980; McMillin, Scandalios, 1981, 1982; Goodman, Stuber, 1983); по 3 варианта МДГ растворимых и митохондриальных у сои (Kiang, Gorman, 1983); 4 растворимые и 5 митохондриальных форм МДГ у арабидопсиса (Cammaerts, Jacobs, 1975); 2 растворимые и 2 митохондриальных варианта обнаружены у сосны (Guries, Ledic, 1978) 4 митохондриальных и 3 микросомальных у сахарной свеклы (Тарасова, 1988, Юдина, Левитес, 2008) и т. д.

Известно, что молекулярная гетерогенность ферментных форм либо генетически детерминирована, либо является следствием эпигенетических изменений.

Первые доказательства генетической природы полиморфизма МДГ были получены Лонго и Скандалиосом на кукурузе (Longo, Scandalios, 1969). При скрещивании двух инбредных линий кукурузы, 59 и Oh 51A, имеющих различные формы митохондриальных МДГ, были получены реципрокные гибриды. Изоферментные

спектры этих гибридов были идентичны и содержали, помимо родительских форм МДГ, гибридные. Расщепление потомства в F₂ на два родительских фенотипа и гибридный соответствовало менделевскому.

К настоящему времени изоферменты малатдегидрогеназы у кукурузы изучены более детально, чем у других культур. Существуют две модели генетического контроля МДГ у кукурузы. Согласно модели Гудмана с соавторами, митохондриальная МДГ кодируется тремя структурными генами: *Mdh1*, *Mdh2* и *Mdh3*, а цитоплазматическая – двумя: *Mdh4* и *Mdh5*. Митохондриальные формы МДГ способны взаимодействовать на уровне субъединиц с образованием межгенных и межаллельных гетеродимеров. Гибридные димеры не образуются между изоформами разных субклеточных органелл (Goodman *et al.*, 1980; Newton, 1983). Структурные гены МДГ принадлежат к различным группам сцепления: *Mdh1* локализован в хромосоме 8, *Mdh2* – в дистальном конце длинного плеча хромосомы 6 и *Mdh3* – в дистальном конце длинного плеча хромосомы 3 (Newton, Schwartz, 1980; Newton, 1983). Другая интерпретация представлена Мак-Миллином и Скандалиосом (McMillin, Scandalios, 1980, 1981). Эти модели различаются номенклатурой и постулированием отдельных вариантов МДГ (табл. 1). Одна из причин разной интерпретации изоферментных спектров заключается в применении разных буферных систем для электрофореза. С использованием трис-цитратного буфера, рН 7,0 (в работах Мак-Миллина и Скандалиоса) происходит относительно слабое разделение изоферментов, что, по мнению Гудмана и Стабера (Goodman, Stuber, 1983), может приводить к ошибкам при интерпретации результатов.

В табл. 1 приведен перечень различных растительных объектов, у которых изучен генетический контроль малатдегидрогеназы. Наследование МДГ у кукурузы, эвкалипта, сахарной свеклы и др. определяли классическим методом генетического анализа с гибридизацией контрастных форм, анализом расщепления в F₂ и бэкрассах. У пшеницы наследование изоферментов определяли по сопоставлению спектров у нормальных и анеуплоидных форм. У некоторых культур, сосны, кедра, персика и др., проводили анализ соответствия частот фенотипических классов в панмиктических попу-

Таблица 1

Генетический контроль НАД зависимой малатдегидрогеназы у растений

Культура	Локус	Аллели	Хромосома	Компартмент	Метод исследования	Буфер	Ткань	Литературный источник
Авокадо (<i>Persea americana</i>)	<i>Mdh1</i>	<i>F</i> <i>S</i>	–	–	кр.	трисцитрат, рН = 6,9	листья, пыльца, фрукты	Torres, 1983; 1984
Амарант (<i>Amaranthus</i> L.)	<i>Mdh1</i> <i>Mdh2</i>	<i>Mdh2-F</i> <i>Mdh2-N</i> <i>Mdh2-S</i>	– –	– –	кр.	трисцитрат, рН = 7,0	листья, семена, проростки	Юдина и др., 2005
Гребневик обыкновенный (<i>Cynosurus cristatus</i>)	<i>Mdh1</i> <i>Mdh2</i>	<i>F</i> <i>S</i> <i>F</i> <i>S</i>	– –	– –	д/э		побеги	Ennos, 1986
Кедр ладанный (<i>Calocedrus deccurens</i>)	<i>Mdh1</i> <i>Mdh2</i> <i>Mmdh1</i>	<i>Mdh1-0.60</i> <i>Mdh1-1.00</i> <i>Mdh1-1.07</i> <i>Mdh1-1.39</i> <i>Mdh1-1.46</i> <i>Mdh1-1.54</i> <i>Mdh1-1.77</i> <i>Mdh2-0.11</i> <i>Mdh2-1.00</i> <i>Mdh2-2.22</i>	– – –	– – –	кр.	цитрат N морфолин, рН = 6,1	макрогаметофит, зародыши	Harry, 1983
Кукуруза (<i>Zea mays</i>)	<i>Mdh1</i> <i>Mdh2</i> <i>Mdh3</i> <i>Mdh4</i> <i>Mdh5</i> <i>Mmm</i>	<i>-A1</i> <i>-A6</i> <i>-A10.5</i> <i>-A null</i> <i>-B3</i> <i>-B6</i> <i>-B null</i> <i>-C16</i> <i>-C18</i> <i>-D8</i> <i>-D12</i> <i>-D14.5</i> <i>-D null</i> <i>-E12</i> <i>-E15</i> <i>-E16.4</i> <i>-E null</i>	8 6L 3L 1L 5S 1L	м м м ц ц –	кр.	гистидин, рН = 5,7, рН = 5,0	корни, проростки, эндосперм, щиток, листья	Goodman <i>et al.</i> , 1980; Newton, Schwartz, 1980; Goodman, Stuber, 1983

Продолжение таблицы 1

Культура	Локус	Аллели	Хромосома	Компартмент	Метод исследования	Буфер	Ткань	Литературный источник
Кукуруза (<i>Zea mays</i>)	<i>Mmdh1</i>	- <i>m8</i> - <i>m10</i>	–	м	кр.	трис- цитрат, рН = 7,0	корни, проростки, эндосперм, щиток, пыльца	McMillin, Scandalios, 1981
	<i>mMdh2</i>	- <i>m5</i> - <i>m3</i> - <i>m0</i>	–	м				
	<i>mMdh3</i>	- <i>m8</i>	–	м				
	<i>mMdh4</i>	- <i>m7</i> - <i>m3</i>	–	м				
	<i>sMdh1</i>	- <i>s5</i> - <i>s1</i>	–	ц				
	<i>sMdh2</i>	- <i>s4a</i>	–	ц				
	<i>sMdh3</i>	- <i>s1</i> - <i>s4</i> - <i>s8</i> - <i>s0</i>	–	ц				
Овес (<i>Avena barbata</i>)	<i>Mdh1</i>	<i>Mdn1</i>	–	–	кр.	гистидин, трис- цитрат, рН = 7,0	проростки, зеленые листья	Price, Kahler, 1983
Опунция (<i>Opuntia basilaris</i>)	<i>MDH1</i>	<i>a1</i> <i>a2</i>	–	м/т	кр.	трис- цитрат, рН = 7,0	листвоветь	Sternberg, Ting, 1979
Орех-пекан (<i>Caria illinoien</i>)	<i>Mdh1</i>		–	–	кр.	цитрат- морфо- лин, рН = 6,1	листья, камбий, стебли, пыльца	Marquard, Skorpenske, 1989
Персик (<i>Persica vulgaris</i>)	<i>Mdh1</i>		–	ц	кр.	гистидин, трис- цитрат рН = 7,0		Arulsekar <i>et al.</i> , 1986
	<i>Mdh2</i>		–	м				
Перец (<i>Cap-sicum L.</i>)	<i>Mdh1</i>		–	–	кр.	литиевый буфер	листья	McLeod <i>et al.</i> , 1983
Петуния (<i>Petunia hybrida</i>)	<i>mdh1</i>	1 2	7	–	кр.	трис- цитрат, рН = 7,0	листья, корни, цветы	Wijsmann, 1983
Пшеница (<i>Triticum aestivum</i>)	<i>Mdh</i>	A B	1B	м	ПААГ		проростки	Flavell, McPherson, 1972; Powling <i>et al.</i> , 1981

Продолжение таблицы 1

Культура	Локус	Аллели	Хромо-сома	Компарт-мент	Метод исследования	Буфер	Ткань	Литературный источник
Пшеница (<i>Triticum aestivum</i>)	<i>MDH</i>	1 3	–	ц	ПААГ кр.	гистидин, трис- цитрат, рН = 7,0	проростки	Benito, Salinas, 1983
	<i>MDH</i>	1 3	–	–				
Рис (<i>Oryza sativa</i>)	<i>Mdh-A</i>	-1 -2 -3	–	–	кр.	боратный буфер	коле- оптиль, листья, корни	Endo, Morishma, 1983
	<i>B</i>	–	–					
	<i>C</i>	–	–					
Сахарная свекла (<i>Beta vulgaris</i>)	<i>Mor1</i>	<i>Mor1-N</i> <i>Mor1-P</i>	–	м/с	кр.	трис- цитрат, рН = 7,0	семена, проростки, листья	Левитес и др., 1980; Тарасова, 1988
	<i>Mor2</i>	<i>Mor2-F</i> <i>Mor2-S</i>	–	м				
	<i>Mor3</i>							
Сельдерей (<i>Apium graveo- lens</i>)		<i>MDH1</i> <i>MDH2</i>	– –	– –	кр.	гистидин, трис- цитрат, рН = 7,0	проростки	Orton, 1983, Arus, Orton, 1984
	<i>Mdh3</i>	<i>-F</i> <i>-S</i>	–	–				
Сосна (<i>Pinus attenuata</i>)	<i>Mdh1</i>		–	–	кр.	морфо- лин- цитрат, рН = 6,1	женский гаметофит	Strauss, Conkle, 1986
	<i>Mdh2</i>		–	–				
	<i>Mdh3</i>		–	–				
	<i>Mdh4</i>		–	–				
	<i>Mdhm</i>		–	–				
Сосна (<i>P. rigida</i> Mill.)	<i>Mdh1</i>	<i>F</i> <i>S</i>	–	ц	кр.	морфо лин- цитрат, рН = 6,1	женский гаметофит	Guries, Ledic, 1978; O' Malley <i>et al.</i> , 1986
	<i>Mdh2</i>	<i>F</i> <i>S</i>	–	м				
Сосна (<i>P. banksa</i>)	<i>Mdh3</i>	1 2	–	–	кр.	морфо- лин- цитрат, рН = 6,1	женский гаметофит	Cheliak <i>et al.</i> , 1984
	<i>Mdh4</i>	1 2	–	–				
Соя (<i>Glycine max</i>)	<i>Mdh1</i>	1 2 3	–	ц	ПААГ кр.	гистидин, рН = 6,0	семядоли, молодые листья	Kiang, Gorman, 1983
	<i>Mdh2</i>	4 5 6	–	м				

Окончание таблицы 1

Культура	Локус	Аллели	Хромо-сома	Компарт-мент	Метод исследования	Буфер	Ткань	Литературный источник
Фасоль (<i>Phaseolus lunatus</i>)	<i>Mdh1</i>	<i>Mdh1</i> ⁸⁴ <i>Mdh1</i> ¹⁰⁰	–	ц	кр.	0,1 М трис-малат, рН = 7,2	семядоли, корни, листья	Zoro <i>et al.</i> , 1999
	<i>Mdh2</i>	<i>Mdh2</i> ¹⁰⁰ <i>Mdh2</i> ¹⁴⁰	–	ц				
	<i>Mdh3</i>	<i>Mdh3</i> ¹⁰⁰ <i>Mdh3</i> ¹⁰⁴	–	м				
Хохлатка (<i>Corydalis solida</i>)	<i>MDH</i>	<i>ff</i> <i>ss</i>	–	–	ПААГ		побеги, семена	Nagy <i>et al.</i> , 1980
Цитру- совые (<i>Citrus and Pancirus trifoliata</i>)	<i>Mdh1</i>	<i>F</i> <i>S</i>	–	–	кр.		нуцеллус	Torres <i>et al.</i> , 1978, 1982
	<i>Mdh2</i>	<i>F</i> <i>S</i>	–	–				
	<i>Mdh3</i> <i>Mdh4</i>		–	–				
Эвкалипт (<i>Eucalyptus</i> L'Herit.)	<i>Mdh1</i>	1 2	–	–	кр.	гистидин- цитрат, рН = 8,0	проростки	Moran, Bell, 1983
	<i>Mdh2</i>	1 2 3 4	–	–				
Эхино- цереус (<i>Cereus peruvianus</i>)		<i>sMDH1</i> <i>sMDH2</i> <i>sMDH3</i> <i>sMDH4</i> <i>mMDH1</i> <i>mMDH2</i> <i>mMDH3</i> <i>mMDH4</i> <i>mMDH5</i> <i>gMDH1</i>	– – – – – – – – – –	ц ц ц ц м м м м м м гл/с	кр.	трис- цитрат рН = 7,0	проростки, семена, каллус	Machado <i>et al.</i> , 1993
Ячмень (<i>Hordeum vulgare</i>)	<i>Mdh1</i>	-1 -2	5	–	кр.	гистидин, цитрат, рН = 8,0	зародыши, корневые и листовые побеги	Brown, Munday, 1982; Powling <i>et al.</i> , 1981; Linde- Laursen <i>et al.</i> , 1987
	<i>Mdh2</i>	-1 -2	3	–				

Сокращенные обозначения: ПААГ – полиакриламидный гель; д/э – диск электрофорез; кр. – крахмальный гель; ц – цитоплазма, м – митохондрии; г/л – глиоксисомы; м/т – микротельца; м/с – микросомы; (–) – отсутствие данных.

лящих теоретическим частотам, вычисленным по формуле Харди–Вайнберга, а также сопоставляли изоферментные спектры в соматической ткани и пыльце. Помимо структурных локусов, контролирующих синтез МДГ, у кукурузы, сосны и кедра обнаружены гены *Mmm*, *Mdhm* и *Mdh1m* соответственно, модифицирующие как электрофоретическую подвижность, так и энзиматическую активность (Goodman, Stuber, 1983; Harry, 1983; Strauss, Conkle, 1986).

Наряду с кукурузой определена хромосомная локализация *Mdh* локусов у ячменя, пшеницы и пегунии (Goodman *et al.*, 1980; Newton, Schwartz, 1980; Powling *et al.*, 1981; Brown, Munday, 1982; Benito, Salinas, 1983; Goodman, Stuber, 1983; Wijisman, 1983).

Экспрессия локусов, контролирующих МДГ у растений

Вариации изоферментных спектров, сопровождающие процессы роста и дифференцировки тканей, описаны у многих видов растений и для разных ферментных систем. Малагдегидрогеназа не является исключением. Цитоплазматическая и митохондриальная формы МДГ кукурузы активны в корнях, проростках, эндосперме, щитке, гипокотиле, колеоптиле, листьях и пыльце (Longo, Scandalios, 1969; Goodman *et al.*, 1980; Newton, Schwartz, 1980; Newton, 1983), в то время как микротельцовая МДГ активна в эндосперме и щитке (Longo, Scandalios, 1969; Ting *et al.*, 1975; Yang, Scandalios, 1975b; Newton, 1983). В период созревания зерновки кукурузы показано возрастание количества изоферментов МДГ (Scandalios, 1974). Выявлен синтез *de novo* изоферментов МДГ при развитии проростка кукурузы (Yang, Scandalios, 1975a). Обнаружены изменения отдельных форм фермента в процессе развития пшеницы (Honold *et al.*, 1967) и арабидопсиса (Cammaerts, Jacobs, 1975).

Детально изучена органная специфичность НАД-МДГ у сахарной свеклы. Изоферментные спектры выявлялись в сухих семенах, проростках, листьях, стеблях, корнях, прицветниках, бутонах, завязи и пыльце (Тарасова, 1987). Специфичность характеризуется как определенным числом изоферментов и их относительной активностью в исследованных органах: семенах, проростках, листьях, прицветниках, бутонах, за-

вязях и семяпочках, так и полным отсутствием изоферментов на фореграммах: стебле, корне. Следует отметить, что отсутствие некоторых изоферментов МДГ на электрофореграммах в ряде органов не является доказательством того, что соответствующий локус не активен, не исключено, что изоферменты в данных случаях присутствуют в столь малых концентрациях, что их нельзя обнаружить данным методом. Генетическая детерминация изоферментов МДГ у сахарной свеклы позволяет интерпретировать тканевую специфичность как результат дифференциальной активности генов, контролирующих малагдегидрогеназу на разных этапах онтогенеза. Также может иметь место неодновременная реализация генетической информации двух различных аллелей. Например, при исследовании изоферментов МДГ в листьях сахарной свеклы у линии П-83-3, гетерозиготной по локусу *Mor1* с аллелями *Mor1-N* и *Mor1-P*, должно выявляться три изофермента: np, пр и pp, что характерно для спектра димерного фермента у гетерозигот. В молодых листочках не активируется аллель *Mor1-N*, а в нормально развитых листьях выявляются все три изофермента. В литературе также имеются сведения об асинхронной активации родительских аллелей у гетерозигот в онтогенезе (Корочкин, 1977).

Таким образом, на примере малагдегидрогеназы можно видеть, что изоферменты являются эффективными инструментами для изучения регуляторных систем у эукариот. Генетический анализ позволяет сравнительно легко локализовать как структурные, так и регуляторные гены. Все это дает возможность получать надежную информацию о процессах регуляции генной активности в онтогенезе и лучше понимать пути клеточной дифференциации при развитии организмов (Хавкин, 1969; Корочкин, 1977; Созинов, 1985).

Использование изоферментов малагдегидрогеназы в популяционно-генетических исследованиях у растений

Изоферментные спектры могут служить основой для идентификации и регистрации сортов, документации генофонда культурных растений и диких сородичей с целью учета, сохранения и использования в селекции. Результа-

ты этой работы зависят от уровня изученности генетического контроля ферментов.

Так, благодаря фундаментальным работам Гудмана и др. (Goodman *et al.*, 1980) было проанализировано 25 тыс. растений кукурузы, принадлежащих к 125 расам или синтетическим сортам из Южной и Северной Америки, исследованы инбредные линии и гибриды F₁ и F₂ от их скрещивания, синтетики и различные коммерческие и экспериментальные гибриды; составлен каталог генотипов с различными комбинациями аллельных вариантов малатдегидрогеназы. Была выявлена значительная дифференциация частот встречаемости различных генотипов по МДГ среди изучаемого материала. Например, генотипы *Mdh1-A6*, *Mdh2-B6*, *Mdh3-C16* были обнаружены у 21 линии; *Mdh1-A6*, *Mdh2-B3*, *Mdh3-C16* – у 12; в то же время многие генотипы по малатдегидрогеназе встречались только у одной линии или гибрида. Возможно, здесь сказались общность происхождения одних линий и уникальность получения других. Но не исключено, что наиболее распространенные генотипы имеют какие-то преимущества, и при отборе им отдавалось предпочтение. Этот пример с малатдегидрогеназой подтверждает большие преимущества использования локусов со множественными аллелями для решения вопросов селекции, экологической и популяционной генетики.

Изоферменты НАД-зависимой малатдегидрогеназы использовались также для идентификации инбредных линий сахарной свеклы из коллекции лаборатории популяционной генетики растений ИЦиГ СО РАН (Новосибирск). Проанализировано 394 линии, и каждой линии на основании изоферментного спектра малатдегидрогеназы приписан соответствующий генотип. В коллекции определены частоты девяти генотипических классов, выявляемых обычно при двухлокусном контроле анализируемого признака с двумя аллелями в каждом локусе (Тарасова, 1987; Tarasova *et al.*, 1988). Частоты генотипических классов по обоим локусам резко различались. Соотношение генотипических классов по локусу *Mor1* было равно 285NN : 93NP : 16PP, а по локусу *Mor2* – 238SS : 136FS : 20FF.

Изучена структура популяций диких и культивируемых видов амаранта по частотам алле-

лей локусов, контролирующих изоферменты, в том числе локуса *Mdh1* (Юдина и др., 2008).

Наряду с другими изоферментами, малатдегидрогеназа использовалась при идентификации 57 сортов яблонь (Biruk, Kazlovskaya, 2008).

В качестве генетического маркера использовался один из полиморфных локусов МДГ в селекционных программах у 290 культивируемых форм персиков (Agulsekar *et al.*, 1986).

Описана генетическая структура коллекции 570 деревьев кедра из трех регионов Калифорнии по частотам множественных аллелей двух локусов, кодирующих малатдегидрогеназу: локуса *Mdh1* с 7 аллелями и *Mdh2* с 3 аллелями (Harry, 1983) и т. д.

Все вышеизложенное свидетельствует о том, что высокий уровень активности малатдегидрогеназы в разных органах и тканях, наличие локусов с множественными аллелями, кодоминантный характер наследования, четкое фенотипическое проявление изоферментных спектров делают этот фермент надежным и удобным генетическим маркером в популяционно-генетических исследованиях.

Заключение

Большое число видов, у которых МДГ изучена и используется в экспериментах для описания и характеристики различных процессов, свидетельствует о высокой эффективности данного фермента как генетического и физиологического маркера. Следует также сказать, что ферменты со всей совокупностью изоферментных систем и их белковых кофакторов представляют собой в молекулярной биологии важнейшую область биологического и генетического маркирования организма с большим числом его теоретических и практических аспектов для многостороннего использования.

Литература

- Воденичарова М.И. Генетика изоферментов у пшениц // Усп. соврем. генетики. 1980. Т. 9. С. 171–182.
Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М.: Мир, 1982. 920 с.
Корочкин Л.И. Взаимодействие генов в развитии. М.: Наука, 1977. С. 669–670.
Левитес Е.В., Юдина Р.С., Малецкий С.И. Генетический контроль НАД-зависимой малатдегидроге-

- назы у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Докл. АН СССР. 1980. Т. 255. № 4. С. 989–991.
- Ленинджер А. Биохимия. М.: Мир, 1974. С. 43–54.
- Садунишвили Т.А., Нуцубидзе Н.Н. Внутриклеточная локализация малат- и глутаматдегидрогеназы в листьях лимона // Сообщение Груз. ССР. 1980. Т. 100. № 3. С. 696–696.
- Созинов А.А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции. М.: Наука, 1985. 272 с.
- Тарасова Р.С. Генетически детерминированные формы НАД-зависимой МДГ и их использование при биохимической паспортизации инбредных линий сахарной свеклы // Генетика. 1987. Т. 23. № 9. С. 1630–1636.
- Тарасова Р.С. Генетика и фенотипика малатдегидрогеназы сахарной свеклы: Дисс. ... канд. наук. Новосибирск: Наука, 1988. 134 с.
- Юдина Р.С., Железнова Н.Б., Захарова О.В. и др. Изомимная оценка генетической коллекции амаранта (*Amaranthus* L.) // Генетика. 2005. Т. 41. № 12. С. 1681–1687.
- Юдина Р.С., Ибрагимов С.С., Железнова Н.Б. Изучение структуры популяций амаранта (*Amaranthus* L.) по изоферментным спектрам // Информ. вестник ВОГУС. 2008. Т. 12. № 3. С. 385–390.
- Юдина Р.С., Левитес Е.В. Субклеточная локализация изоферментов НАД-зависимой малатдегидрогеназы сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Генетика. 2008. Т. 44. № 12. С. 1638–1643.
- Хавкин Э.Е. Формирование метаболических систем в растущих клетках растений. М.: Наука, 1969. 168 с.
- Arulsekar S., Parfitt D.E., Beres W., Hansche P.E. Genetics of malate dehydrogenase isozymes in the peach // J. Heredity. 1986. V. 77. № 1. P. 49–51.
- Arus P., Orton T.J. Inheritance patterns and linkage relationships of eight genes of celery (*Apium graveolens*) // J. Heredity. 1984. V. 75. P. 11–14.
- Benito C., Salinas J. The chromosomal location of malate dehydrogenase isozymes in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) // Theor. Appl. Genet. 1983. V. 64. № 3. P. 255–258.
- Biruk A., Kazlovskaya Z. Prospects for using of isozyme markers in identification of apple cultivars // Sodininkyste ir darziningkyste. Mokslo Darbai. 2008. 27(2). P. 359–364.
- Bortman S.J., Trelease R.N., Miernyk J.A. Enzyme development and glyoxysome characterization in cotyledon of cotton seeds // Plant Physiol. 1981. V. 68. № 1. P. 82–87.
- Brown A.H.D., Munday J. Population genetics structure and optimal sampling of land races of barley // Genetica. 1982. V. 40. P. 315–324.
- Breidenbach R.W., Beevers H. Association of the glyoxylate cycle enzymes in a novel subcellular particle from castor bean endosperm // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1967. V. 27. P. 462–469.
- Cammaerts D., Jacobs M. Study of the intracellular location and the genetic control of malate dehydrogenase isozymes in *Arabidopsis thaliana* // Plant Sci. Lett. 1975. V. 4. № 4. P. 249–256.
- Cheliak W.M., Morgan K., Dancik B.P. et al. Segregation of allozymes in mega-gametophytes of viable seed from a natural population of jack pine, *Pinus banksiana* Lamb // Theor. Appl. Genet. 1984. V. 69. № 2. P. 145–151.
- Endo T., Morishima H. Rise // Isozymes in plant genetics and breeding. Amsterdam: Elsevier, 1983. Part B. P. 129–146.
- Ennos R.A. Allozyme variation, linkage and duplication in the perennial grass; *Cynosurus cristatus* // J. Heredity. 1986. V. 77. P. 61–62.
- Flavell R.B., McPherson F.J. Control of wheat malate dehydrogenase by rye chromosomes // Biochem. Genet. 1972. V. 7. № 3/4. P. 259–268.
- Gietl C., Hock B. Organelle-bound malate dehydrogenase isoenzymes are synthesized as higher molecular weight precursors // Plant Physiol. 1982. V. 70. № 2. P. 483–487.
- Goodman M.M., Stuber C.W. Genetic identification of lines and crosses using isoenzyme electrophoresis // Ann. Corn Sorghum Res. Conf. Proc. 1980. V. 35. P. 10–31.
- Goodman M.M., Stuber C.W. Maize. Isozymes in plant genetics and breeding. Amsterdam: Elsevier, 1983. Part B. P. 1–33.
- Goodman M.M., Stuber C.W., Lee C.N., Johnson F.M. Genetic control of malate dehydrogenase isozymes in maize // Genetics. 1980. V. 94. P. 153–168.
- Gottlieb L.D. Conservation and duplication of isozymes in plants // Science. 1982. V. 216. № 4544. P. 373–380.
- Grimwood B.G., McDaniel R.G. Variant of malate dehydrogenase isoenzymes in mitochondrial population // Biochem. Biophys. Acta. 1970. V. 220. P. 410–415.
- Guries R.P., Ledic F.T. Inheritance of some polymorphic isozymes in pitch pine (*Pinus rigida* Mill.) // Heredity. 1978. V. 40. P. 27–32.
- Habig W., Racusen D. A malate dehydrogenase of high molecular weight from bean leaves // Can. J. Bot. 1968. P. 719–720.
- Harry D.E. Identification of a locus modifying the electrophoretic mobility of malate dehydrogenase isozymes in incense-cedar (*Calocedrus decurrens*), and its implications for population studies // Biochem. Genet. 1983. V. 21. N. 5/6. P. 417–434.
- Hart G.E. Hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell). Isozymes in plant genetics and breeding. Amsterdam: Elsevier, 1983. Part B. P. 35–56.
- Honold G.R., Masko V., Stahman M.A. NAD and

- NADP-dependent malate dehydrogenase in wheat // *Naturwissenschaften*. 1967. V. 54. P. 169 p.
- Hunter R.L., Markert C.L. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gel // *Science*. 1957. V. 125. № 3261. P. 1294–1295.
- Kiang Y.T., Gorman M.B. Soybean. Isozymes in plant genetics and breeding. Amsterdam: Elsevier, 1983. Part B. P. 295–298.
- Linde-Laursen I., Nelson G., Johansen H.B. Distribution of isoenzyme markers at loci in a pedigree of European spring barley // *Hereditas*. 1987. V. 106. P. 241–251.
- Longo C.P., Scandalios J.G. Nuclear gene control of mitochondrial malic dehydrogenase in maize // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1969. V. 62. № 1. P. 104–111.
- Machado M.F.P.S., Prioly A.J., Mangolin C.A. Malate dehydrogenase (MDH; EC 1.1.1.37) isozymes in tissues and callus cultures of *Cereus peruvianus* (Cactaceae) // *Biochem. Genet.* 1993. V. 31. № 3/4. P. 167–172.
- Markert C.L., Moller F. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic and species specific patterns // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1959. V. 45. P. 753–763.
- Marquard R.D., Skorpenske R.G. Expression of heritable biochemical markers from various pecan tissues // *Euphytica*. 1989. V. 42. № 1/2. P. 65–70.
- McLeod M.J., Guttman S.I., Esbaugh W.N. Peppers (*Capsicum*). Isozymes in plant genetics and breeding. Amsterdam: Elsevier, 1983. Part B. P. 189–201.
- McMillin D.E., Scandalios J.G. Duplicated cytosolic malate dehydrogenase genes in *Zea mays* // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1980. V. 77. P. 4866–4870.
- McMillin D.E., Scandalios J.G. Genetic analysis of the two groups of duplicated genes coding for mitochondrial malate dehydrogenase in *Zea mays*: Possible origin of *mMdh* genes by chromosomal segment duplication // *Mol. Gen. Genet.* 1981. P. 211–221.
- McMillin D.E., Scandalios J.G. Genetic, immunological and gene dosage studies of mitochondrial and cytosolic MDH variant in maize // *J. Heredity*. 1982. V. 73. № 3. P. 177–182.
- Mitra R., Bhatia C.R. Isozymes and polyploidy. I. Qualitative and quantitative isozyme studies in the Triticine // *Genet. Res. Camb.* 1971. V. 18. P. 57–69.
- Moran G.F., Bell J.G. *Eucalyptus*. Isozymes and plant genetics and breeding. Amsterdam: Elsevier, 1983. Part B. P. 423–442.
- Nagy A.N., Siddiqui M.O., Kocsis Z.G., Vida G. *In vitro* dissociation-recombination of malate dehydrogenase subunits in *Corydalis solida* // *Theor. Appl. Genet.* 1980. V. 58. № 2. P. 75–78.
- Newton K.J. Genetics of mitochondrial isozymes. Isozymes in plant and breeding. Amsterdam: Elsevier, 1983. Part A. P. 157–170.
- Newton K.J., Schwartz D. Genetic basis of the major malate dehydrogenase isozymes in maize // *Genetics*. 1980. V. 95. P. 425–442.
- O'Malley D.M., Guries R.P., Nordheim E.V. Linkage analysis for 18 enzyme loci in *Pinus rigida* Mill // *Theor. Appl. Genet.* 1986. V. 72. P. 530–535.
- Orton T.J. Celery and Celeriac (*Apium graveolens* L.). Isozymes in plant and breeding. Amsterdam: Elsevier, 1983. Part B. P. 351–356.
- O'Sullivan S.A., Wedding R.T. Malate dehydrogenase isoenzymes from cotton leaves. Molecular weight // *Plant Physiol.* 1972. V. 49. P. 117–123.
- Powling A., Islam A.K.M.R., Shepherd K.W. Isozymes in wheat-barley hybrid derivative lines // *Biochem. Genet.* 1981. V. 19. P. 237–254.
- Price S., Kahler A.L. Oats // Isozymes in plant and breeding. Amsterdam: Elsevier, 1983. Part B. P. 103–127.
- Rocha V., Ting I.P. Malate dehydrogenase of leaf tissue from *Spinacea oleracea*: Properties of three isoenzymes // *Arch. Biochem. Biophys.* 1971. V. 147. № 1. P. 114–122.
- Scandalios J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants; a review // *Biochem. Genet.* 1969. V. 3. № 1. P. 37–79.
- Scandalios J.G. Isoenzymes in development and differentiation // *Ann. Rev. Plant Physiol.* 1974. V. 25. P. 225–258.
- Shannon L.M. Plant isoenzymes // *Ann. Rev. Plant Physiol.* 1968. V. 19. P. 187–210.
- Sternberg L., Ting I.P., Hanscom Z. Polymorphism of microbody malate dehydrogenase in *Opuntia basilaris* // *Plant Physiol.* 1979. V. 59. P. 329–330.
- Strauss S.H., Conkle M.T. Segregation, linkage and diversity of allozymes in knobcone (*Pinus attenuata*) // *Theor. Appl. Genet.* 1986. V. 72. P. 483–493.
- Tarasova R.S., Levites E.V., Maletskyi S.I. Isozyme as markers for identification of sugar-beet inbred lines in the process of their development // *Biochemical identification of varieties (Materials III Intern. Symp. ISTA)*. Leningrad. USSR, 1988. C. 240–243.
- Taureilles-Saurel C., Romieu C.G., Robin J.-P., Flanzly C. Grape (*Vitis vinifera* L.) malate dehydrogenase. I. Intercellular compartmentation of the isoforms // *Am. J. Enol. Vitic.* 1995. V. 46. № 1. P. 22–28.
- Ting I.P., Fuhr I., Curry R., Zschoche W.G. Malate dehydrogenase isozymes in plant, preparation, properties and biological significance // *Isozymes / Ed. C.L. Markert. N.Y. a.o.: Acad. Press, 1975. P. 369–384.*
- Torres A.M., Soost K.K., Mau-Lastovisks T. Leaf isozymes as genetic markers in citrus // *Amer. J. Bot.* 1978. V. 68. № 8. P. 869–881.
- Torres A.M., Soost K.K., Diedenhoffen U. Genetics and distinguishing nucellar from zygotic seedlings // *J. Heredity*. 1982. V. 73. № 5. P. 335–339.
- Torres A.M. Fruit trees // *Isozymes in plant genetics*

- and breeding. Part B. Amsterdam: Elsevier, 1983. Part B. P. 329–338.
- Torres A.M. Isozymes from avocado cotyledons // J. Heredity. 1984. V. 75. P. 300–302.
- Walk R.A., Hock B. Glyoxisomal and mitochondrial malate dehydrogenase of watermelon (*Citrullus vulgaris*) cotyledons. II. Kinetic properties of the purified isoenzymes // Planta. 1977. V. 136. P. 221–228.
- Walk R.A., Michaeli S., Hock B. Glyoxisomal and mitochondrial malate dehydrogenase of watermelon (*Citrullus vulgaris*) cotyledons. I. Molecular properties of the purified isoenzymes // Planta. 1977. V. 136. P. 211–220.
- Weeden N.F., Marx G.A. Chromosomal locations of twelve isozyme loci in *Pisum sativum* // J. Heredity. 1984. V. 75. № 5. P. 365–370.
- Wijsman N.J.W. Petunia // Isozymes in plant and breeding. Amsterdam: Elsevier, 1983. Part B. P. 229–252.
- Yamazaki R.K., Tolbert N.E. Malate dehydrogenase in leaf peroxisome // Biochem. Biophys. Acta. 1969. V. 178. № 1. P. 11–20.
- Yang N.S. Biochemical properties and development expression of genetically determined malate dehydrogenase isozymes in maize // Isozymes. III Developmental Biology. N.Y. a.o.: Acad. Press, 1975. P. 191–211.
- Yang N.S., Scandalios J.G. Purification and biochemical properties of genetically defined malate dehydrogenase in maize // Arch. Biochem. Biophys. 1974. V. 161. P. 335–353.
- Yang N.S., Scandalios J.G. Cytoplasmic synthesis of soluble and mitochondrial malate dehydrogenase isozymes in maize // Arch. Biochem. Biophys. 1975a. V. 171. P. 575–585.
- Yang N.S., Scandalios J.G. *De novo* synthesis and developmental control of multiple gene-controlled malate dehydrogenase isozymes in maize scutella // Biochem. Biophys. Acta. 1975b. V. 384. P. 293–306.
- Yang N.S., Sorenson J.G., Scandalios J.G. Genetic control of mitochondrial malate dehydrogenase: evidence for duplicated chromosome segments // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. P. 310–314.
- Yudina R.S., Levites E.V. Malate dehydrogenase isozymes as markers of organelles physiological state sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // Sugar. Tech. 2007. V. 9. № 1. P. 67–71.
- Yue S.B. Electrophoretic mobilities of malate dehydrogenase from barley seedlings // Experientia. 1968. V. 24. № 1. P. 87–88.
- Zschoche W.C., Ting I.P. Purification and properties of microbody MDH from *Spinacea oleracea* leaf tissue // Arch. Biochem. Biophys. 1973a. V. 159. P. 767–776.
- Zschoche W.C., Ting I.P. Malate dehydrogenase from *Pisum sativum*: Tissue distribution and properties of the particulate forms // Plant Physiol. 1973b. V. 51. P. 1076–1081.
- Zoro I.Bi., Maquet A., Wathelet B., Baudoin J.-P. Genetic control of isozymes in the primary gene pool *Phaseolus lunatus* L. // Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 1999. V. 3. № 1. P. 10–27.

GENETICS AND PHENOGENETICS OF MALATE DEHYDROGENASE IN PLANTS

R.S. Yudina

Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: yurs@bionet.nsc.ru

Summary

Literature data on the structure, functions, properties and genetics of the enzyme malate dehydrogenase (MDH) in plants are reviewed. Most of the studied objects reveal a high level of polymorphism, which manifests itself in the presence of multiple molecular species of malate dehydrogenase. It has been shown that MDH polymorphism in each species is genetically determined by presence of several loci with multiple alleles. Clear phenotypic manifestation and high activity of MDH in various organs and tissues make this enzyme a convenient and reliable marker for genetic studies.

Key words: loci, alleles, isoenzymes, markers, compartments.