

ПОЛИМОРФИЗМ БЕЛКОВ У ОДНОЛЕТНИХ ВИДОВ *SALSOLA* СЕКЦИИ *KALI* (*SALSOLA APERTA*, *S. PAULSENII*, *S. PESTIFER* И *S. SOGDIANA*).

© Е. В. Шуйская^{1*}, К. Н. Тодерич²

¹Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН

Россия, 127276 г. Москва, ул. Ботаническая 35.

E-mail: evshuya@mail.ru

²Международный Центр по развитию сельского хозяйства на засоленных почвах (ИКБА).

Узбекистан, 100000 г. Ташкент, ул. Осие, 6а.

E-mail: k.toderich@cgiar.com

Проанализирован полиморфизм белков у дикорастущих в пустынных и полупустынных районах Центральной Азии однолетних видов маревых: *Salsola aperta*, *S. paulsenii*, *S. pestifer* и *S. sogdiana*. Уровень генетического разнообразия в популяциях данных видов невысокий и формируется под давлением экологических условий (независимо от генетической близости видов). Образуется две группы по условиям произрастания и уровню полиморфизма: сорные – более полиморфные (*S. pestifer* и *S. sogdiana*) и пустынные – менее полиморфные (*S. paulsenii* и *S. aperta*) виды.

Ключевые слова: полиморфизм белков, *Salsola*, *Chenopodiaceae*, пустыня.

Введение

Дикорастущие виды однолетних солянок (род *Salsola*, сем. *Chenopodiaceae*) относятся к видам-пионерам восстановления песчаных пустынь Центральной Азии. С таксономической точки зрения род *Salsola* (subfam. *Salsoloideae*) является одним из самых сложных и мало изученных. До настоящего времени основной темой дискуссий являются виды секции *Salsola* (*Kali* (*Adanson*) *Ulbr.*). Согласно литературным данным к секции *Salsola Kali* относится 20 видов, по которым опубликован ряд работ по биогеографическому распространению, морфоэмбриологическим и экофизиологическим особенностям [1, 2, 3]. Однако, виды данной секции морфологически очень схожи и характеризуются относительно малоинформативными ключевыми систематическими параметрами. Многие виды этой секции, произрастающие в основном на засоленных песчаных почвах пустыни Кызылкум являются эволюционно молодыми и наблюдается большой интерес к экофизиологическим и генетическим особенностям данных однолетних пустынных видов и, следовательно, к их таксономии, эволюции и географическому распространению.

В популяционно-генетических исследованиях широко применяются изоферменты, которые проявляют внутривидовой полиморфизм и часто оказываются селективными маркерами, т.е. находящимися под давлением условий окружающей среды (стресса) [4, 5]. Популяционный подход к изучению полиморфизма белков, или адаптивной изменчивости ферментов, позволяет не только оценить генетическое разнообразие, но понять механизмы адаптации растений и их популяций к меняющимся условиям окружающей среды.

Целью данной работы было изучение полиморфизма белков (изоферментов) у четырех близких однолетних видов *Salsola* секции *Kali*, произрастающих в аридных (*S. aperta*, *S. paulsenii*) и полупустынных (*S. pestifer*, *S. sogdiana*) условиях.

Материалы и методы

Объектами исследования послужили виды *Salsola aperta* Pauls., *S. paulsenii* Litw., *S. pestifer* Nelson. и *S. sogdiana* Iljin. Номенклатура исследуемых видов дана согласно «Флоре Узбекистана» [6]. Виды *S. aperta* и *S. paulsenii* встречаются в основном на солонцеватых песках, по окраинам песчаных массивов (барханов). Виды *S. pestifer* и *S. sogdiana* относятся к рудеральным, сорным растениям, произрастающим вдоль дорог, у поселений, на полях, а также на маломощных, закрепленных и прибрежных песках [7]. Семена для анализа были собраны в аридных условиях (пустыня Кызылкум, индекс аридности $I = 3 - 5$) в одной популяции *S. aperta* и 10 популяциях *S. paulsenii*, а также полупустынных (Зеравшанская долина, $I = 11 - 13$) в 3 популяциях *S. pestifer* и одной *S. sogdiana*. Индекс аридности $I = P/(T+10)$, где P – среднегодовые осадки, T – среднегодовая температура, согласно [8].

Изоферментный анализ проводили по ранее описанной методике для пустынных видов маревых [9]. Анализировали восемь ферментов: глутаматоксалоацетаттрансминазу (GOT, Е.С. 2.6.1.1), диафоруазу (DIA, Е.С. 1.6.99), глутаматдегидрогеназу (GDH, Е.С. 1.4.1.2), супероксиддисмутазу (SOD, 1.15.1.1), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу (G6PD, Е.С. 1.1.1.49), 6-фосфоглюконатдегидрогеназу (6PGD, 1.1.1.44), малатдегидрогеназу (MDH, Е.С. 1.1.1.37), малик-энзим (Me, Е.С. 1.1.1.40). Гистохимическое окрашивание ферментов и генетическую интерпретацию осуществляли по Г. Г. Гончаренко с соавт. [10] с некоторыми модификациями. Выявленные зоны активности ферментов и соответствующие им генные локусы обозначали сокращенными названиями ферментов. Нумерация локусов и аллелей проводилась в порядке убывания их электрофоретической подвижности от анода к катоду. Для оценки уровня генетической изменчивости в программе PopGen 32 рассчитывали следующие пока-

* автор, ответственный за переписку

затели: долю полиморфных локусов (P_{99}), среднее число аллелей на локус (A), среднюю наблюдаемую (H_o) и ожидаемую (H_e) гетерозиготности, генетические дистанции.

Результаты

Глутаматоксалоацетаттрансаминаза (GOT (AAT)) выявляется на электрофореграмме в виде двух зон активности с одинаковой электрофоретической подвижностью у *S. paulsenii* и *S. pestifer*, трех зон у *S. aperta* и двух зон у *S. sogdiana*, соответствующих самой быстрой и самой медленной зонам *S. aperta* (табл.). Зоны предположительно кодируются тремя локусами, один из которых (Got-1, быстрая зона) был общим для всех изученных видов и оказался полиморфным (2 и более аллелей) у *S. sogdiana*. Локус Got-2 был полиморфным у *S. paulsenii* и *S. pestifer*, у *S. aperta* все три локуса оказались мономорфными.

Глутаматдегидрогеназа (GDH) у *S. paulsenii* представлена двумя зонами, у остальных видов одной (медленной) зоной активности, предположительно контролируемые локусами Gdh-1 (быст-

рая) и Gdh-2 (медленная). Полиморфизм был обнаружен по локусу Gdh-2 только у *S. pestifer* (табл.).

Супероксиддисмутаза (SOD) представлена 3 зонами активности у *S. aperta*, двумя у *S. sogdiana* и одной (быстрой) у *S. paulsenii* и *S. pestifer*, предположительно контролируемые тремя мономорфными локусами (Sod-1, Sod-2, Sod-3) (табл.).

Диафораза (DIA) у *S. paulsenii* и *S. pestifer* представлена двумя зонами активности с одинаковой электрофоретической подвижностью у обоих видов. У *S. aperta* и *S. sogdiana* обнаружена только одна зона активности, соответствующая быстрой зоне *S. paulsenii* и *S. pestifer* (табл.). Полиморфизм наблюдался у *S. pestifer* по локусу Dia-2 (медленная зона) и у *S. sogdiana* по локусу Dia-1 (быстрая зона).

6-фосоглюконатдегидрогеназа (6PGD) представлена двумя зонами активности с одинаковой электрофоретической подвижностью у видов *S. aperta* и *S. sogdiana*. У *S. paulsenii* и *S. pestifer* наблюдалась только медленная зона. Полиморфизм обнаружен у *S. sogdiana* по обоим локусам (табл.).

Таблица

Аллельные частоты по 20 локусам в популяциях четырех однолетних видов маревых

Локусы	Аллели	<i>S. aperta</i>	<i>S. paulsenii</i> *	<i>S. pestifer</i> *	<i>S. sogdiana</i>
Got-1	90				0.67
	100	1.00	1.00	1.00	0.33
Got-2	90		0.04	0.26	–
	100	1.00	0.96	0.74	–
Got-3	100	1.00	–	–	1.00
Gdh-1	100	–	1.00	–	–
	90				
Gdh-2	110	1.00	1.00	0.84	1.00
	120			0.16	
Sod-1	100	1.00	1.00	1.00	1.00
Sod-2	100	1.00	–	–	–
Sod-3	100	1.00	–	–	1.00
Dia-1	90				0.19
	100	1.00	1.00	1.00	0.81
Dia-2	90			0.75	–
	100	–	1.00	0.25	–
6pgd-1	100				0.50
	110	1.00	–	–	0.50
6pgd-2	100		1.00	1.00	0.29
	105	1.00			0.71
G6pd	110		1.00	1.00	0.76
	120	1.00			0.24
Mdh-1	80			0.03	0.02
	90	1.00	1.00	0.97	0.98
Mdh-2	100	1.00	–	–	1.00
	90			0.15	
Mdh-3	100	1.00	1.00	0.85	–
	100	1.00	1.00	1.00	1.00
Me-1	100	1.00	1.00	1.00	1.00
	80				
Me-2	90				0.02
	100	1.00		0.47	0.98
Me-3	110		1.00	0.53	
	90		0.06		
	95		0.75	0.35	
	100		0.19	0.65	
	105	–			1.00

* видовой уровень (по 10 популяциям *S. paulsenii* и по 3 популяциям *S. pestifer*)

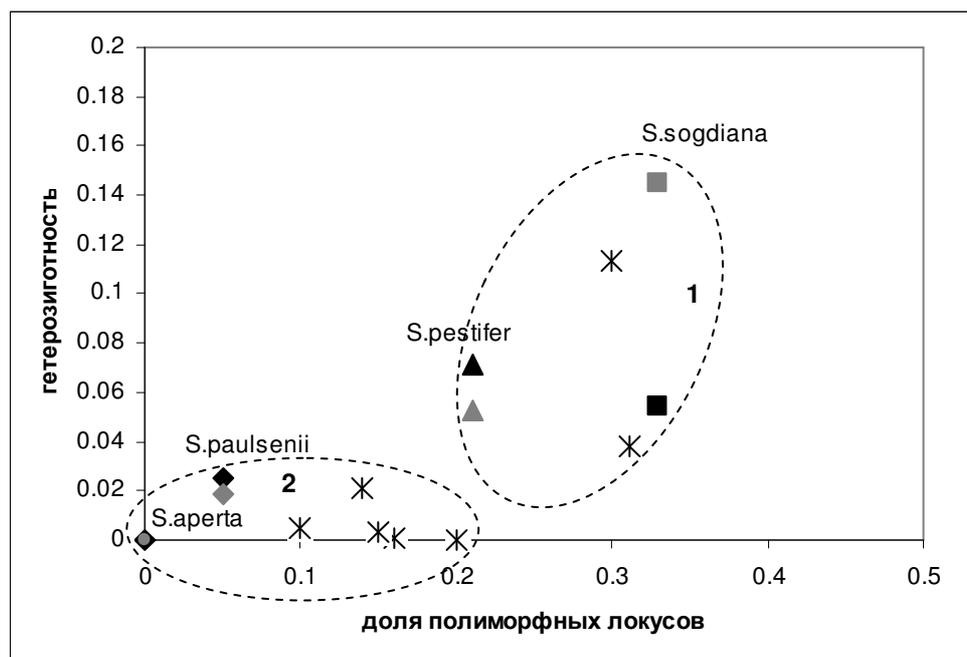


Рис. 1. Уровень генетического полиморфизма в популяциях однолетних видов маревых: круги – *S. aperta*, ромбы – *S. paulsenii*, треугольники – *S. pestifer*, квадраты – *S. sogdiana*, черные – значение наблюдаемой гетерозиготности (H_o), серые – значение ожидаемой гетерозиготности (H_e). Звездочки – H_o других однолетних маревых: (1) рудеральные виды: *S. tragus* [18], *S. komarovii* [19]; (2) пустынные виды: *Salsola incanescens*, *S. sclerantha*, *Climacoptera lanata*, *C. turcomanica*, *C. longistilosa* [17].

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (G6PD) представлена одной зоной активности с одинаковой электрофоретической подвижностью у всех изученных видов, кодируемой локусом *G6pd*, полиморфным только у *S. sogdiana*.

Малатдегидрогеназа (MDH) представлена четырьмя зонами активности у *S. aperta*, и тремя у остальных видов, причем самая быстрая и самая медленная зоны (*Mdh-1*, *Mdh-4*) оказались общими для всех видов. Локус *Mdh-1* был полиморфным у *S. pestifer* и *S. sogdiana*, локус *Mdh-3* – только у *S. pestifer* (табл.).

Малик-энзим (Me) представлен 3 зонами активности с одинаковой электрофоретической подвижностью у *S. paulsenii*, *S. pestifer* и *S. sogdiana*. У *S. aperta* малик-энзим представлен только 2 быстрыми зонами активности. Первая зона, общая для всех видов, предположительно контролируется одним мономорфным у всех видов локусом *Me-1*. Локус *Me-2* оказался полиморфным у *S. pestifer* и *S. sogdiana*, в то время как *Me-3* был полиморфным у *S. paulsenii* и *S. pestifer* (табл.).

В результате электрофореза 8 ферментных систем всего было обнаружено 20 локусов: 17 у *S. aperta*, 15 у *S. sogdiana*, 15 у *S. paulsenii*, 14 у *S. pestifer* (табл.). Из них 10 локусов (*Got-1*, *Gdh-2*, *Sod-1*, *Dia-1*, *бpgd-2*, *G6pd*, *Mdh-1*, *Mdh-4*, *Me-1*, *Me-2*) оказались общими для всех изученных видов. Таким образом, каждая ферментная система кодируется 1-2 общими для изученных видов локусами. Причем локусы *Sod-1*, *Mdh-4* и *Me-1* оказались мономорфными по всем изученным видам. Всего бы-

ло найдено 37 аллелей и только 6 аллелей (*Got-1*¹⁰⁰, *Sod-1*¹⁰⁰, *Dia-1*¹⁰⁰, *Mdh-1*⁹⁰, *Mdh-4*¹⁰⁰, *Me-1*¹⁰⁰) были общими для всех изученных видов.

Наибольшее количество аллелей найдено у *S. sogdiana* (22) и *S. pestifer* (21), но только 9 аллелей встречались у обоих видов. У *S. aperta* и *S. paulsenii* зафиксировано 17 и 18 аллелей, 7 из которых были общими для данных видов. Наибольшее количество общих аллелей оказалось у видов *S. paulsenii* и *S. pestifer* (16) и видов *S. aperta* и *S. sogdiana* (13). Вид *S. aperta* отличается от трех других видов наличием локуса *Sod-3*, *S. paulsenii* характеризуется наличием локуса *Gdh-1* и уникальным аллелем *Me-3*⁹⁰. У вида *S. pestifer* обнаружено 3 уникальных аллеля, у *S. sogdiana* – 4. Однако ни один из найденных уникальных аллелей не является диагностическим для данных видов (т.е. частота встречаемости < 1). Редкие аллели, выявленные у *S. paulsenii*, *S. pestifer* и *S. sogdiana* (табл.) находятся в популяциях в гетерозиготном состоянии. Гетерозиготы были обнаружены по локусам *Got-2*, *Gdh-2*, *Mdh-3* и *Dia-2* у *S. pestifer*, *Dia-1*, *бpgd-1,2* у *S. sogdiana* и *Me-3* у *S. paulsenii*.

В среднем количество аллелей на локус уменьшается в ряду *S. sogdiana* (1.47), *S. pestifer* (1.30), *S. paulsenii* (1.06) и *S. aperta* (1). Такая же тенденция наблюдается по доле полиморфных локусов и уровню ожидаемой гетерозиготности (H_e) (рис. 1). Уровень наблюдаемой гетерозиготности (H_o) наибольшим оказался у *S. pestifer*. У *S. sogdiana*, в отличие от других видов наблюдался значительный дефицит гетерозигот ($H_o < H_e$). 85%

от общей выявленной изменчивости приходится на межвидовую (F_{st} по [11]).

На основе коэффициентов генетической дистанции Нея [12] была проведена количественная оценка степени близости между исследованными видами (рис. 2). Наименьшее генетическое расстояние оказалось между видами *S. paulsenii* и *S. pestifer* (0.119), наибольшее – между *S. paulsenii* и *S. aperta* (1.043). Виды *S. aperta* и *S. sogdiana* образовали второй кластер на дендрограмме (рис. 1) с генетическим расстоянием равным 0.333. Генетическое расстояние между видами *S. paulsenii* и *S. sogdiana* составило 0.958, между *S. pestifer* и видами *S. aperta*, *S. sogdiana* – 0.873 и 0.781 соответственно.

Обсуждение

Изученные нами ферментные системы у четырех видов *Salsola* кодируются 1–4 локусами с 1–4 аллелями на локус. Наибольшим изоферментным спектром представлена малатдегидрогеназа: по 3 формы у *S. paulsenii*, *S. pestifer* и *S. sogdiana* и 4 у *S. aperta*, причем две из них (Mdh-1 и Mdh-4) оказались общими для всех изученных видов. Известно, что изоформы MDH есть в различных компартментах клетки (митохондрии, хлоропласты и цитоплазма) [13]. У культурных C_4 видов (кукуруза, сорго, просо, сахарный тростник) найдено от 4 до 8 изоферментов NAD^+ -малатдегидрогеназы, а также стресс-индуцированные изоформы [14]. Данный фермент оказался полиморфным (на уровне P_{99}) у двух рудеральных видов (*S. pestifer* и *S. sogdiana*), в то время как у пустынных видов все локусы были мономорфными. Малик-энзим считается более консервативным и обычно представлен 1–2 изоферментами [15]. Однако у изученных нами видов ферментная система малик-энзима была наиболее полиморфной: три локуса (два из которых общие для четырех видов) и 9 аллелей. Наименее полиморфной оказалась супероксиддисмутаза (один из важнейших ферментов антиоксидантной защитной системы), которая у всех изученных видов кодируется мономорфными локусами.

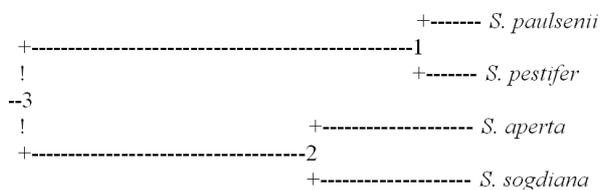


Рис. 2. Дендрограмма изученных видов, построенная на основе коэффициентов генетической дистанции Нея [12] с помощью невзвешенного парно-группового метода кластерного анализа (UPGMA).

Изученная популяция *S. aperta* оказалась мономорфной по всем анализированным ферментным системам. Генетический полиморфизм у *S. paulsenii* невысокий, но соответствует уровню генетического разнообразия других пустынных однолетних видов

маревых: *Salicornia europaea* [16], *Salsola incanescens*, *S. sclerantha*, *Climacoptera lanata*, *C. turcomanica*, *C. longistilosa* [17] (рис. 2). Генетический полиморфизм *S. pestifer* и *S. sogdiana* сравним с таковым у рудеральных солянок секции Kali *S. tragus* ($P = 0.31$, $H_0 = 0.04$) [18] и *S. komarovii* ($P = 0.30$, $H_0 = 0.113$) [19] (рис. 1). Дефицит гетерозигот у *S. sogdiana* свидетельствует о давлении сильного стресса на данную популяцию [4].

Расчитанные генетические дистанции между *S. paulsenii* и *S. pestifer* оказались на уровне отдаленных популяций или подвидов, что в некоторой степени согласуется с известным фактом о большой морфологической схожести данных видов [3, 20, 21]. Кроме того, известно, что *S. paulsenii* тесно связан с переходными формами, вероятно, гибридного происхождения, с одной стороны с *S. pestifer*, с другой – с псамофильным видом *S. praecox* Litw. [7]. Так как это эволюционно молодые виды [1, 22], то можно предположить, что расхождение видов от общего предка происходило (или происходит) по типу «центральные – периферийные популяции» [23]. Центром видообразования видов маревых, в частности рода *Salsola*, является пустыни Средней и Центральной Азии [24], и пустынные популяции *S. paulsenii* можно предположить как центральные. Генетическая структура данных популяций находится практически в равновесии (по Харди-Вайнбергу), что свидетельствует о стабильности условий окружающей среды. Низкий уровень полиморфизма можно рассматривать как следствие давления постоянного стресса. В отдаленных периферийных популяциях (полуаридные популяции *S. pestifer*, попавших в более изменчивые и благоприятные (окраины поселений, дорог, орошаемых полей) условия, формируется более высокий уровень полиморфизма и избыток гетерозигот (эффект небольшого, но разнообразного стресса [4, 23]).

Результаты наших исследований показывают, что экологические условия влияют на уровень генетического разнообразия независимо от генетической близости видов. Формируется две четких группы по экологическим условиям произрастания и уровню генетического разнообразия: сорные (*S. pestifer* и *S. sogdiana*) и пустынные (*S. paulsenii* и *S. aperta*) виды.

Выводы

1. Уровень полиморфизма белков у изученных видов невысокий и сравним с уровнем полиморфизма у других однолетних видов маревых.

2. *S. paulsenii* и *S. pestifer* – генетически (по частотам аллелей) очень близкие виды, но характеризуются различным уровнем генетического разнообразия: большим у *S. pestifer* из полуаридной зоны (средний стресс) и значительно меньшим у *S. paulsenii* из аридной зоны (сильный стресс). Селективными, т.е. находящимися под давлением условий окружающей среды, оказались пять локусов (Got-2, Gdh-1, Dia-3, Mdh-3, Me-2).

3. Уровень генетического разнообразия формируется под давлением экологических условий – образуется две четких группы по экологическим условиям произрастания и уровню генетического полиморфизма: сорные (*S. pestifer* и *S. sogdiana*) и пустынные (*S. paulsenii* и *S. aperta*) виды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бочанцев В. П. Род *Salsola* L., краткая история его развития и расселения // Ботанический журнал. 1969. Т. 54. №7. С. 989–1001.
2. Бутник А. А., Ашурметов О. А., Нигманова Р. Н., Пайзиева С. А. Экологическая анатомия пустынных растений Средней Азии (полукустарники, полукустарнички). Т.: ФАН. 2001. 132 с.
3. Toderich K.N. Genus *Salsola* of Central Asian Flora: its structure and adaptive evolutionary trends. Doctorate thesis. Tokyo University of Agriculture and Technology. 2008. 165 p.
4. Алтухов Ю. П. Генетические процессы в популяциях. Москва: ИКЦ «Академкнига». 2003. 431 с.
5. Spooner D., van Treuren R., de Vicente M.C. Molecular markers for genebank management. Technical Bulletin No. 10. Rome, Italy: International Plant Genetic Resources Institute. 2005. 126 p.
6. Флора Узбекистана. Ташкент: Наука. 1953. Т. II. 548 с.
7. Грубов В. И. Растения Центральной Азии. По материалам Ботанического института им. В. Л. Комарова. Вып. 2. Маревые. Изд-во: Наука. М.-Л. 1966. 136с.
8. Encyclopedia of Climatology. 1987.
9. Шуйская Е. В., Рахманкулова З. Ф., Тодерич К. Н., Семиошина Е. С., Усманов И.Ю. Полиморфизм дыхательных белков у C4 вида *Kochia prostrata* (L.) Schrad в условиях засухи // Вестник Башкирского Университета. 2012. Т. 17. №3. С. 1267–1271.
10. Гончаренко Г. Г., Падутов В. Е., Потенко В. В. Руководство по исследованию хвойных видов методом электрофоретического анализа изоферментов. Гомель. 1989. 150 с.
11. Wright S. Evolution and the genetics of populations. V. 2 // The theory of gene frequencies. Chicago: Univ. Chicago Press. 1984. 511 p.
12. Nei M. Genetic distance between populations // The American Naturalist. 1972. V. 106. N. 949. P. 283–292.
13. Scheibe R. Malate valves to balance cellular energy supply // *Physiologia plantarum*. 2004. V. 120. P. 21–26.
14. Епринцев А. Т., Федорина О. С. Функционирование малатдегидрогеназного комплекса в мезофилле и обкладке кукурузы в условиях солевого стресса // Журнал стресс-физиологии и биохимии. 2006. №2. С. 4–9.
15. Левитас Е. В. Генетика изоферментов растений. Новосибирск: Наука. Сибирское отделение. 1986. 143 с.
16. Wolff S. L., Jefferies R. L. Morphological and isozyme variation in *Salicornia europaea* (s.l.) (Chenopodiaceae) in North America // *Canadian Journal of Botany*. 1987. №65. P. 1410–1419.
17. Shuyskaya E. V., Radjabov T. F., Toderich K. N., Gismatullina L. G. Diversity of annual C4 Chenopods in desert halophytic phytocenosis // *Arid Environment* (в печати)
18. Ryan F. J., Ayres D. R. Molecular markers indicate two cryptic, genetically divergent populations of Russian thistle (*Salsola tragus*) in California // *Canadian Journal of Botany*. 2000. V. 78. P. 59–67.
19. Kim S. T., Chung M. G. Genetic Variation and Population Structure in Korean Populations of Sand Dune Species *Salsola komarovi* (Chenopodiaceae) // *J. Plant Res.* 1995. V. 108. P. 195–203.
20. Rilke S. Revision der Section *Salsola* s.l. der Gattung *Salsola* (Chenopodiaceae) // *Bibl. Bot. (Stuttgart)*. 1999. V. 149. P. 1–190.
21. Toderich K.N., Shuyskaya E.V., Ozturk M., Juylova E.A., Gismatullina L.G. Pollen morphology of some Asiatic species of genus *Salsola* (Chenopodiaceae) and its taxonomical relationships // *Pak.J.Bot.* 2010. N.42. P. 155–174.
22. Гамалей Ю. В. Экологическая эволюция фотосинтеза и распределения фотосинтатов: C3 и C4 параллели в семействах цветковых растений. В кн.: Фотосинтез: физиология, онтогенез, экология. По ред. Е. С Роньжиной. Калининград. Из-во: ФГОУ ВПО «КГТУ». 2009. С. 7–39.
23. Safriel U. N., Volis S., Kark S. Core and peripheral populations and global climate change // *Israel Journal of Plant Sciences*. 1994. V. 42. P. 331–345.
24. Pyankov V., Ziegler H., Kuz'min A., Edwards G. Origin and evolution of C4 photosynthesis in the tribe Salsoleae (Chenopodiaceae) based on anatomical and biochemical types in leaves and cotyledons // *Plant Systematics and Evolution*. 2001. V. 230. P. 43–74.

Поступила в редакцию 13.03.2013 г.