

Дифференциация морфо-физиологических форм *Sium latifolium* L. с помощью молекулярных маркеров

Л. Е. Козеко, Е. Л. Кордюм, В. И. Глазко¹

Институт ботаники им. Н. Г. Холодного НАН Украины
Ул. Терешенковская, 2, Киев, 01004, Украина

¹ Институт агроэкологии и биотехнологии УААН
Ул. Метрологическая, 12, Киев, 03143, Украина

*Поиск возможных молекулярно-генетических маркеров трех природных морфо-физиологических форм — сухоходольной и двух воздушно-водных — поручейника широколистного (*Sium latifolium* L.) проводили по трем ферментным системам — кислой фосфатазе, пероксидазе и эстеразе. Результаты изоферментного анализа листьев позволили дифференцировать формы *Sium latifolium* по семи изоформам пероксидазы и трем изоформам эстеразы. Обсуждаются возможные пути адаптации растений этого вида на онтогенетическом и популяционно-генетическом уровнях к контрастным по водному режиму условиям.*

Введение. Способность особей адаптироваться к условиям различных экологических ниш обеспечивает их выживание и успешное возобновление в гетерогенной среде, что особенно важно для растительных организмов с прикрепленным образом жизни. Предполагают, что такая пластичность генетически детерминирована [1]. Реализация ее в онтогенезе идет посредством дифференциальной экспрессии генетической информации и, в конечном счете, выражается в формировании определенного фенотипа. Адаптация на популяционном уровне осуществляется путем дифференциации генетически полиморфных особей между биотипами.

Следовательно, можно ожидать, что совокупность особей одного вида, обитающих в пределах одной экологической ниши, должна иметь общие особенности в генной экспрессии и/или в сочетаниях аллельных вариантов по ряду структурных генов. Эти особенности, очевидно, контролируются изменениями экологических факторов. Поэтому определенные типы белкового спектра могут служить маркерами тех генетических систем, которые обеспечивают адаптационные процессы. Одним из эффективных методов оценки популяций на эколо-

гическую пластичность считается анализ спектров полиморфных белковых систем [2]. Подтверждением этому могут служить данные исследования фенотипической пластичности *Taraxacum officinale* Web. ex Wigg., из локальных популяций которого были выделены биотипы на основе сведений об аллельных сочетаниях по локусам ряда ферментных систем [3]. При определении генетического сходства популяций *Aconitum noveboracense* и *A. columbianum* проведено сравнение двух методов сканирования генотипов — по полиморфным локусам изоферментов и путем RAPD (random amplified polymorphic DNA)-анализа ДНК [4]. Отмечалось, что метод анализа электрофоретических вариантов ферментов (даже при небольшом числе анализируемых локусов) позволяет сделать те же выводы, что и более обширный анализ полиморфных фрагментов ДНК, фланкированных случайными декануклеотидами (RAPD-PCR).

Объектом нашего исследования служил поручейник широколистный (*S. latifolium* L.). Особи данного вида способны нормально развиваться в контрастных условиях водного режима, образуя два морфологически выраженных экотипа — сухоходольный и воздушно-водный. В процессе работы среди воздушно-водных растений на основании морфоло-

гических признаков выделены две морфо-физиологические формы. Цель исследования состояла в дифференциации трех форм *S. latifolium* — суходольной и двух воздушно-водных — с использованием молекулярно-генетических маркеров.

Анализ проводили по трем ферментным системам — кислой фосфатазе, пероксидазе и эстеразе. Это полилокусные полиморфные системы, для которых описаны онтогенетические особенности экспрессии и широкая субстратная специфичность (см. [5, 6]). Известно, что условия выращивания оказывают значительное влияние на спектры продуктов изоферментных локусов в растениях [7]. Кроме того, сведения о субстратной специфичности могут дать более полную характеристику полисубстратных ферментов у данного вида и позволят точнее маркировать генотип [8].

Материалы и методы. Образцы листьев *S. latifolium* отбирали с растений двух популяций — воздушно-водной и суходольной, расположенных по берегам реки Псел в окрестностях районного центра В. Багачка Полтавской обл. Отбор проводили в июле 2002 г. в фазе цветения.

На основании экологических условий и морфотипа растения предварительно разделили на три морфо-физиологические формы: суходольную, воздушно-водную (1) (у этих двух форм листочки сложного листа имели цельную пластинку с мелкопильчатым краем) и воздушно-водную (2) (имеющую сложный лист с рассеченными листовыми пластинками с пильчатым краем).

Для изоферментного анализа образцы листьев отбирали с 13 суходольных растений, 11 воздушно-водных (1) и пяти воздушно-водных (2). С каждого растения брали третий и четвертый листья (у водных растений это были воздушные листья). Образцы листьев в индивидуальных маркированных полиэтиленовых пакетах сохраняли при температуре 4 °С. Листовую пластинку массой 0,3 г гомогенизировали с 0,5 мл 2 %-го тритона X-100 в охлажденной фарфоровой ступке с пестиком. Гомогенат подвергали двукратному замораживанию — оттаиванию для более полной экстракции белков, затем центрифугировали при 1200 g в течение 1,5 мин. Супернатант сразу же использовали для анализа. Электрофоретическое разделение белков проводили в 13 %-м крахмальном геле. Гелевый буфер содержал 50 мМ трис, 1,6 мМ ЭДТА, 65 мМ борную кислоту, рН 7,9. Электродным служил 0,3 М Na-боратный буфер, рН 8,6. Окрашивание на активность кислой фосфатазы (ACP; EC 3.1.3.2) проводили по [9]. Пероксидазную (PRX; EC 1.11.1.7) активность выявляли по [10]; в качестве субстрата использовали 0,1 М бензидин или 0,1 М

пирогаллол. Окрашивание на эстеразную (EST; EC 3.1.1.1) активность проводили по [11] в 0,1 М фосфатном буфере, рН 4,5 или 6; в качестве субстрата брали смесь 0,9 мМ α - и β -нафтилацетата. Субстратную специфичность изоформ эстеразы определяли по окрашиванию зон ферментативной активности в геле: зоны, специфичные к α -нафтилацетату, окрашивались в серый цвет, зоны, специфичные к β -нафтилацетату — в розовый. Анализ проводили в трех аналитических повторностях. Зоны активности ферментов в гелях обозначали в соответствии с их электрофоретической подвижностью: наиболее близкая к аноду («быстрая») зона — 1, следующая — 2 и так далее.

Результаты и обсуждение. Суходольные и воздушно-водные растения *S. latifolium*, используемые в работе, принадлежали двум природным популяциям, растущим соответственно на суходоле и в прибрежной водной зоне в одних и тех же климатических условиях. Поэтому с определенной долей допущения критическим фактором в формировании двух популяций можно считать разницу в режиме водообеспечения.

В листьях трех форм растений проведен сравнительный анализ спектров кислой фосфатазы, пероксидазы и эстеразы. На зимограммах кислой фосфатазы у всех исследованных растений обнаружена одна зона фермента (рис. 1). У разных растений зона имела отличия по подвижности, причем эти отличия не коррелировали с фенотипическими особенностями растений.

У 29 растений осуществлено определение спектра пероксидазы с субстратной специфичностью к бензидину (рис. 2) и у 18 из них — сравнение со спектром фермента, специфичного к пирогаллолу. При анализе зимограмм, полученных с использованием обоих субстратов, в сумме обнаружены 11 зон ферментативной активности (PRX1—11). Это позволило предположить экспрессию 11 локусов фермента.

Известно, что полиморфизм субстратной специфичности изоформ фермента может свидетельствовать об эволюции энзимной системы [8]. Для выявления возможных вариаций в субстратной специфичности между формами растений мы провели сравнение сродства пероксидазы к двум субстратам. Количество изоформ пероксидазы со специфичностью к бензидину изменялось от пяти до семи на образец. Компонентный состав спектра со специфичностью к пирогаллолу оказался сходным с предыдущим, но количество зон на образец было ниже в растениях всех трех форм: у 13 из 18 исследованных растений выявлено по пять зон, у остальных их количество варьировало от одной до

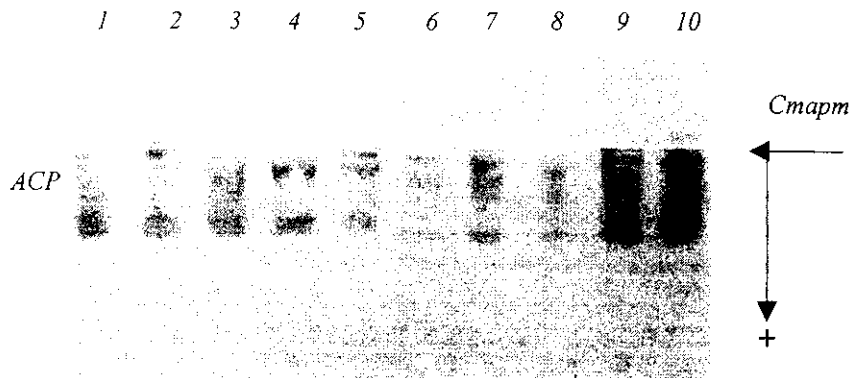


Рис. 1. Зимограммы кислой фосфатазы (ACP) листьев *S. latifolium*: 1—5 — растения суходольной формы; 6—8 — растения воздушно-водной формы с цельными листовыми пластинками; 9, 10 — растения воздушно-водной формы с рассеченными листовыми пластинками

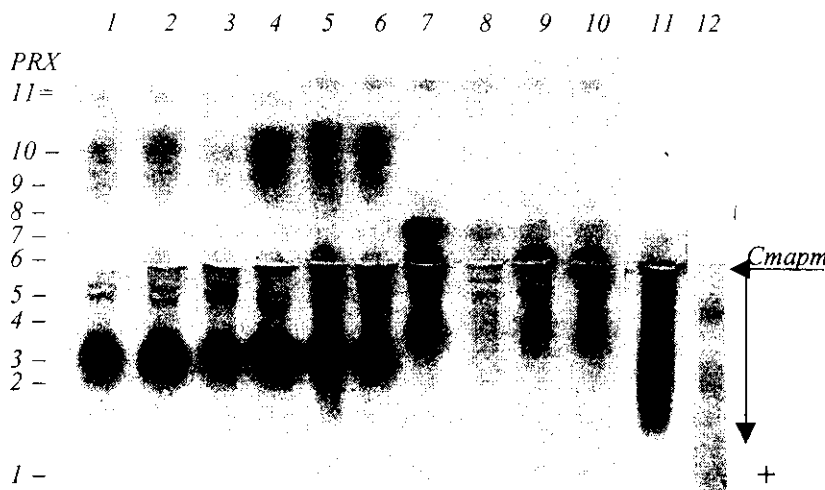


Рис. 2. Зимограммы бензидинспецифичной пероксидазы (PRX) листьев *S. latifolium*: 1—6 — растения суходольной формы; 7—10 — растения воздушно-водной формы с цельными листовыми пластинками; 11, 12 — растений воздушно-водной формы с рассеченными листовыми пластинками (12 — спектр, полученный в результате дополнительного анализа образца 11, проведенного для разрешения диффузного пятна в области PRX2-5). Здесь и на рис. 3 по вертикали слева указаны зоны активности фермента, пронумерованные в восходящем порядке, начиная с зоны наивысшей электрофоретической подвижности

шести. Различия между формами растений по субстратной специфичности не обнаружены. Поскольку по количеству изоформ пероксидаза показала более высокое сродство к бензидину, далее приведены данные анализа, полученные с использованием этого субстрата.

Спектры пероксидазы имели как общие компоненты, так и типичные различия между формами растений. Изоформы PRX1, 5, 6 и 11 выявлены в листьях растений всех форм. Зона PRX1 обнаружена у всех суходольных и у девяти из 16 исследованных воздушно-водных растений. Окрашивание в области PRX5 наблюдалось у четырех суходольных, шести воздушно-водных растений с цельными листочками, но особенно ярким оно было на зимограммах пяти исследованных воздушно-водных растений с рассеченными листочками. Зоны PRX6 и 11 присутствовали во всех образцах. PRX11

имела два варианта по электрофоретической подвижности: в 16 образцах она располагалась ближе к аноду, а в 13 — ближе к катоду, что не коррелировало с принадлежностью растения к определенной форме.

Активность зон PRX2, 4, 7 и 8 выявлена только у воздушно-водных растений, а у суходольных отсутствовала. PRX2 экспрессировалась у восьми из 16 исследованных воздушно-водных растений, в том числе у трех растений с цельными, и пяти — с рассеченными листочками. Но у последних пяти окрашивание быстро распространялось на область зон PRX3—5 и становилось слитным (рис. 2, вариант 11). Дополнительный анализ этой области позволил выявить две зоны активности — PRX2 и 5 (рис. 2, вариант 12). Изоформы PRX4 и 7 проявлялись у всех воздушно-водных растений, а PRX8 — только у пяти с цельными листочками.

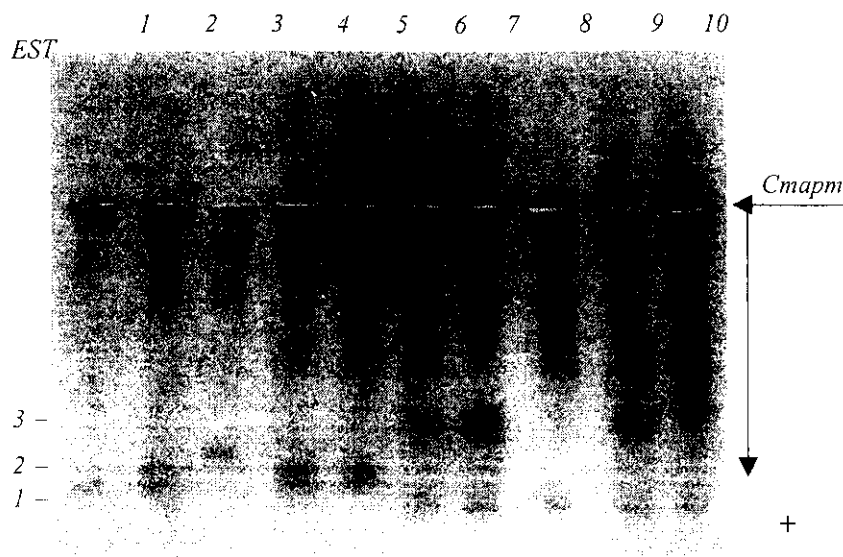


Рис. 3. Зимограммы эстеразы (EST) листьев *S. latifolium*: 1—5 — растения суходольной формы; 6—8 — растений воздушно-водной формы с цельными листовыми пластинками; 9, 10 — растения воздушно-водной формы с рассеченными листовыми пластинками. Субстратная специфичность изоформ: EST1 — к α -нафтилацетату; EST2 — к α -нафтилацетату в вариантах 9, 10 и к β -нафтилацетату в вариантах 6—8; EST3 — к β -нафтилацетату

Изоформы PRX3, 9 и 10, наоборот, окрашивались у всех суходольных растений и отсутствовали у воздушно-водных.

В общем различия между формами растений не обнаружены по четырем изопероксидазам. Удалось их дифференцировать по семи компонентам пероксидазного спектра: четыре из них типичны только для воздушно-водных растений и три — только для суходольных. Для спектра пероксидазы воздушно-водных растений с рассеченными листочками было характерно интенсивное диффузное окрашивание в области зон PRX2-5, чего не наблюдалось в других образцах, и отсутствие изопероксидазы 8, встречающейся у других воздушно-водных растений.

Большинство пероксидаз растений — мономеры [5]. Такие ферменты, как правило, обладают наибольшей молекулярной гетерогенностью. По мнению Голдовского [12], множественность молекулярных форм фермента должна обеспечивать большую пластичность приспособления биохимических процессов организма к изменяющимся условиям среды. Поскольку пероксидаза является ферментом, регулирующим уровень перекисных соединений в организме, и индукторами ее могут быть разнообразные физические, химические и биологические факторы [8, 13], то большое количество молекулярных форм фермента, выявленных в листьях *S. latifolium*, и их специфичность к различным субстратам могут свидетельствовать о высоком уровне и разнообразии окислительных процессов.

Электрофоретический анализ эстеразы у исследованных растений показал значительную гетерогенность спектра (рис. 3). Его компонентный

состав оставался постоянным при изменении pH реакционной среды от 6 до 4,5. Три наиболее подвижные зоны были идентифицированы четко (EST1, 2 и 3), что позволило использовать их при сравнительном анализе форм *S. latifolium*. Изоформы EST1 и 3 отсутствовали у всех воздушно-водных растений и выявлены у суходольных. EST1 со специфичностью к α -нафтилацетату экспрессировалась во всех суходольных растениях, а EST3 со специфичностью к β -нафтилацетату — в девяти из них. Зона EST2, наоборот, отсутствовала у всех суходольных растений и выявлена у всех воздушно-водных. По этой зоне суммарно обнаружены два варианта, различающихся по электрофоретической подвижности. Наличие спектров четырех образцов позволяет предположить присутствие гетерозигот по данному локусу. Характер этой зоны в зимограммах остальных растений может свидетельствовать о наличии гомозиготных вариантов: в трех — более медленных и в восьми — более быстрых. У всех воздушно-водных растений с цельными листочками EST2 имела сродство к β -нафтилацетату. Особенность эстеразного спектра пяти исследованных растений с рассеченными листочками заключалась в том, что EST2 относилась к более подвижному варианту и имела сродство к α -нафтилацетату. Менее подвижные зоны эстеразной активности имели диффузный характер. Это не дало возможности использовать их в данном анализе. Следует отметить, что упомянутая область зимограмм проявляла специфичность к α -нафтилацетату, причем более интенсивное окрашивание наблюдалось в зимограммах суходольных растений.

В целом анализ эстеразного спектра листьев *S. latifolium* позволил дифференцировать формы растений по трем наиболее подвижным зонам: две выявлялись только у сухоходольной формы, а одна — лишь у воздушно-водных. Экспрессия молекулярных форм фермента с различной субстратной специфичностью и их активность при разных значениях pH характеризуют вид как легко адаптирующийся к различным экологическим условиям, что показано, например, для различных видов можжевельника [8].

Следует отметить, что две формы воздушно-водных растений существенно различались по спектрам пероксидазы и эстеразы. В совокупности с фенотипическими различиями это дает морфо-генетические предпосылки для возможного таксономического разделения этих форм.

Изоэнзимы, по которым выявлены различия, и соответствующие им локусы могут служить модельной системой для исследования генетических основ адаптационной пластичности *S. latifolium*. Устойчивые различия в спектрах ферментов сухоходольных и водных растений, вероятно, являются следствием дифференциальной экспрессии генома, модулируемой критическими факторами среды. В этом случае речь идет об адаптации в онтогенезе, которая осуществляется поддержанием гомеостаза в диапазоне физиологической нормы реакции [1, 14]. Механизмами поддержания такой стабильности могут быть альтернативное включение генов или их групп, регуляция на эпигенетическом уровне; работа регуляторных белков, контролирующих экспрессию целых регулонов, реализацию фенотипов, адаптированных к разным условиям среды [15].

С другой стороны, полученные различия в компонентном составе ферментов могут объясняться адаптивными генотипическими модификациями, возникшими под давлением воздействий окружающей среды. Тогда устойчивость этих различий между двумя популяциями может указывать на популяционно-генетический уровень процессов адаптации. Если превалирует первый путь, вид становится более пластичным, а при реализации второго пути — более генетически варибельным [16]. Фенотипическую пластичность и вариации генотипа рассматривают и как адаптационные механизмы, положительно взаимодействующие между собой, и как адаптационные альтернативы [17]. Выяснение генетической природы полученных нами различий в спектрах ферментов может помочь в определении пути развития исследуемых популяций *S. latifolium*. Предполагают два альтернативных пути развития видов в ответ на изменение

экологических условий: первый — быстрая изменчивость и специализация к определенным условиям среды; второй — совершенствование адаптационной способности отдельных фенотипов к конкретным внешним условиям [18].

Выводы. Таким образом, в результате проведенного исследования трех ферментных систем по двум из них были выявлены молекулярно-генетические маркеры трех морфо-физиологических форм *S. latifolium*. Три изопероксидазы и две изоэстеразы могут служить маркерами изученных сухоходольных растений, четыре изопероксидазы и одна изоэстераза — маркерами воздушно-водных растений. Типичными для формы с рассеченными листьями были интенсивная диффузно окрашенная область в пероксидазном спектре и отличие по субстратной специфичности изоэстеразы, маркирующей воздушно-водные растения.

L. E. Kozeko, E. L. Kordyum, V. I. Glazko

Differentiation of morpho-physiological forms of *Sium latifolium* L. using molecular genetic markers

Summary

Search for possible molecular genetic markers of three natural morpho-physiological forms of *S. latifolium* L. (one terrestrial and two aerial-aquatic forms) was carried out with three enzymatic systems — acid phosphatase, peroxidase and esterase. The results of an isozyme analysis of leaves indicate differentiation between these forms on seven isoperoxidases and three isoesterases. Possible patterns of adaptation of the *S. latifolium* plants to contrast water conditions at the ontogenetic and population-genetic levels are discussed.

Л. Е. Козеко, Е. Л. Кордюм, В. І. Глазко

Диференціювання морфо-фізіологічних форм *Sium latifolium* L. за допомогою молекулярних маркерів

Резюме

Пошук можливих молекулярно-генетичних маркерів трьох природних морфо-фізіологічних форм веху широколистоного (*S. latifolium* L.) — сухоходольної та двох повітряно-водних — здійснювали за трьома ферментними системами — кислото фосфатазою, пероксидазою та естеразою. Результати ізоферментного аналізу згаданих ферментів у листках дозволили диференціювати форми веху за сімома ізоформами пероксидази та за трьома ізоформами естерази. Обговорюються можливі шляхи адаптації рослин веху на онтогенетичному і популяційно-генетичному рівнях до контрастних умов водного режиму.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кордюм Е. Л. Фенотипічна пластичність у рослин: загальна характеристика, адаптивне значення, можливі механізми, відкриті питання // Укр. бот. журн.—2001.—58, № 2.—С. 141—151.
2. Конарев В. Г. Белки растений как генетические маркеры.—М.: Колос, 1983.—320 с.
3. Solbrig O. T., Simpson B. B. Components of regulation of a

- population of dandelions in Michigan // *J. Ecol.*—1974.—62, N 2.—P. 473—486.
4. Cole T. C., Kuchenreuther M. A. Molecular markers reveal little genetic differentiation among *Aconitum noveboracense* and *A. columbianum* (*Ranunculaceae*) populations // *Amer. J. Bot.*—2001.—88, N 2.—P. 337—347.
 5. Левитес Е. В. Генетика изоферментов растений.—Новосибирск: Наука, 1986.—145 с.
 6. Глазко В. И., Созинов И. А. Генетика изоферментов животных и растений.—Киев: Урожай, 1993.—528 с.
 7. McCown B. H., McCown D. D., Beck G. E., Hall T. C. Isoenzyme complements of *Dianthus callus* cultures: influence of light and temperature // *Amer. J. Bot.*—1970.—57, N 2.—P. 148—152.
 8. Сарсенбаев К. Н., Беков А. А.-Х., Рахимбаев И. Р. Изоферменты в хемосистематике высших растений.—Алма-Ата: Наука, 1982.—160 с.
 9. Vallejos C. E. Enzyme activity staining // *Isozymes in plant genetics and breeding*.—Amsterdam: Elsevier, 1983.—Pt A.—P. 469—515.
 10. Przybylska J., Zimniak-Przybylska Z., Dabrowska T. Isoenzyme patterns in several cultivated varieties of barley (*Hordeum vulgare* L.) // *Genet. Pol.*—1978.—14, N 1.—P. 61—69.
 11. Soltis D. E., Haufler C. H., Darrow D. C., Gastony G. J. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers and staining schedules // *Amer. Fern. J.*—1983.—73, N 1.—P. 9—27.
 12. Голдовский А. М. Значение множественности представителей каждой группы веществ в организме // *Эволюц. биохимия и физиология*.—1972.—8, № 4.—С. 353—357.
 13. Андреева В. А. Фермент пероксидаза: Участие в защитном механизме растений.—М.: Наука, 1988.—128 с.
 14. Delpuech J.-M., Moreteau B., Chiche J., Pla E., Voudibio J., David J. R. Phenotypic plasticity and reaction norms in temperate and tropical populations of *Drosophila melanogaster*: ovarian size and developmental temperature // *Evolution*.—1995.—49, N 4.—P. 670—675.
 15. Головлев Е. Л. Метастабильность фенотипа у бактерий // *Микробиология*.—1998.—67, № 2.—С. 245—255.
 16. Scheiner S. M., Goodnight C. J. The comparison of phenotypic plasticity and genetic variation in populations of the grass *Danthonia spicata* // *Evolution*.—1984.—38, N 3.—P. 845—855.
 17. Stearns S. C. The evolutionary significance of phenotypic plasticity // *BioScience*.—1989.—39, N 5.—P. 436—445.
 18. Spitze K., Sadler T. D. Evolution of a generalist genotype: multivariate analysis of the adaptiveness of phenotypic plasticity // *Amer. Naturalist*.—1996.—148.—P. 108—123.

УДК 575.826:575.857:577.151.64
Надійшла до редакції 19.12.02