

УДК 575.17:582.671(571.63)

НИЗКИЙ УРОВЕНЬ АЛЛОЗИМНОГО ПОЛИМОРФИЗМА РЕЛИКТОВЫХ ВОДНЫХ РАСТЕНИЙ ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА *Nelumbo komarovii* Grossh. И *Euryale ferox* Salisb.

© 2012 г. О. Г. Корень¹, М. С. Яцунская^{1,2}, О. В. Наконечная¹¹ Учреждение Российской академии наук Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения РАН, Владивосток 690022

e-mail: markelova@biosoil.ru, koren@ibss.dvo.ru

² Дальневосточный Федеральный университет, Владивосток 690950

Поступила в редакцию 07.12.2011 г.

Методом аллозимного анализа изучена генетическая изменчивость двух реликтовых водных растений, лотоса Комарова (*Nelumbo komarovii* Grossh.) и эвриалы устрашающей (*Euryale ferox* Salisb.), в Приморском крае. Показано отсутствие аллозимной изменчивости в приморских популяциях *Nelumbo komarovii* и низкий уровень изменчивости в популяции *Euryale ferox* ($P_{95} = 7.69$, $A = 1.07$, $H_0 = 0.072$, $H_e = 0.038$). Поскольку данные для изучаемых видов приводятся впервые, приведены описание фенотипов и генетическая интерпретация для исследованных ферментных систем. Проведено сравнение изоферментных спектров *N. komarovii* с данными, опубликованными для *N. nucifera* из Китая. Отсутствие аллозимной изменчивости *N. komarovii* и экстремально низкий уровень изменчивости *E. ferox* в реликтовых приморских популяциях обсуждаются в связи с эволюционной историей этих видов, их распространением после плейстоцен-голоценового похолодания и выживанием на данной территории на границе ареалов.

Юг Дальнего Востока России представляет собой северо-восточную границу дальневосточной Азии, которая, вместе с тропической Азией, считается центром происхождения и распространения многих видов растений. В отличие от многих регионов, лежащих в этих же широтах, растительный покров южной части Дальнего Востока России развивался с плейстоцена непрерывно, благодаря отсутствию оледенения во время плейстоцен-голоценового похолодания [1]. Многие теплолюбивые виды – остатки древних флор – сохранились здесь в рефугиумах, где в настоящее время существуют на пределе своего климатического оптимума. По разным причинам популяции этих видов в Приморье являются не только краевыми, но и “островными”, изолированными от основных ареалов. Особенно это характерно для реликтовых водных растений, для которых обмен генами с центральными популяциями физически невозможен вследствие закрытости их местообитаний (пресные озера, реки, протоки).

Лотос Комарова (*Nelumbo komarovii* Grossh.) и эвриала устрашающая (*Euryale ferox* Salisb.) – два представителя флоры, которая была характерна для пресных водоемов Приморья третичного периода [1]. Их популяции в Приморье и Приамурье достигают северной границы своих ареалов [2].

В России *N. komarovii* распространен преимущественно в южных и центральных районах бассейна р. Усури и на Приханкайской низменности,

а также встречается на юге Хасанского района и о-ве Путятин (Приморский край). Вопрос о распространении вида за пределами российского Дальнего Востока связан с таксономическими проблемами рода *Nelumbo*. Впервые лотос Комарова описал как самостоятельный вид А.А. Гроссгейм в 1940 г. [3]. Позднее М. Китагава в своей сводке по флоре Маньчжурии [4] привел *N. komarovii* как синоним для *Nelumbo nucifera* var. *macro-rhizomata* Nakai. Н.Н. Цвелев в сводке “Сосудистые растения Советского Дальнего Востока” [5] вносит примечание, что *N. komarovii* отличается от “очень близких видов: южноазиатского – *N. nucifera* и *N. caspica* большим количеством плодолистиков (и, соответственно, плодов) на цветоложе, а также более узкими (в зрелом состоянии) плодами”. Он предположил, что *N. nucifera* был описан по культивируемым и уже подвергшимся длительной селекции формам, тогда как *N. komarovii* соответствует дикорастущим клонам, сохранившимся лишь в более северных и потому менее населенных районах Восточной Азии. *N. caspica*, по его мнению, представлен лишь одичавшими из древней культуры популяциями. Г.Э. Куренцова в 1968 г. [1] приводит описание лотоса из Приморского края *N. nucifera* и *N. komarovii* как синонимы, но позже, в 1973 г. [6], уже использует только *N. komarovii*. Согласно другому, более широко распространенному мнению, *N. komarovii* и *N. caspica* являются формами *N. nucifera* Gaertner

[7, 8]. Лотос орехоносный, *N. nucifera*, широко распространен в Восточной Азии и Индии. Вид давно и широко культивируется в Китае, Японии и других дальневосточных странах, где его используют как пищевое и декоративное растение [9, 10]. Он также произрастает в южной части Северной Америки [11]. Отмечено, что лотос легко интродуцируется и дичает (натурализуется) в подходящих условиях [12]. Морфологические лотос, обитающий в Приморском крае, отличается от растущих в Китае и Японии форм более крупными цветками и плодами. Однако более убедительных доводов в пользу как самостоятельности вида *N. komarovii*, так и его принадлежности к виду *N. nucifera* до сих пор не приведено. В Приморском крае по меньшей мере три популяции *N. komarovii* описаны как реликтовые, природные, неинтродуцированные [13]. Поскольку генетических исследований *N. komarovii* ранее не проводили, его взаимоотношения с лотосами Китая, где произрастают не только *N. nucifera*, но и его разновидности и сорта, до сих пор не ясны.

Эвриала устрашающая *Euryale ferox* Salisb., единственный представитель монотипного рода *Euryale*, также является реликтом третичной флоры. В настоящее время вид встречается в Китае, Индии, Тайване, Японии и других странах Юго-Восточной Азии [10], хотя в плиоцене вид был распространен также в Европе [7]. В некоторых странах Юго-Восточной Азии вид культивируют как пищевое растение [14]. В России эвриала растет только на юге Приморского и Хабаровского краев, где известно несколько местообитаний вида в долинах рек Уссури и Илистая [15].

Оба вида на Дальнем Востоке России никогда не культивировали, поскольку они не представляли для местного населения интереса, кроме декоративного, в отличие от стран, где расположен основной ареал этих видов. Таким образом, изолированные от основных ареалов приморские популяции лотоса и эвриалы, возможно, представляют более ранние, неокультурные формы этих растений. С другой стороны, экстремальные для этих древних теплолюбивых видов условия существования в Приморском крае, изолированность от основных ареалов и усиление антропогенного воздействия, которое приводит к зарастанию, обмелению и заболачиванию водоемов, где еще произрастают *N. komarovii* и *E. ferox* [6, 16], ставят под угрозу их существование на этой территории. В настоящее время оба вида занесены в Красные книги Приморского и Хабаровского краев [15, 17] (а ранее в Красную книгу РСФСР [18]). Несмотря на это, их численность неуклонно сокращается.

Изучение генетической изменчивости *N. komarovii* и *E. ferox*, произрастающих на юге Дальнего Востока России, могло бы не только прояснить генетические взаимоотношения этих популяций

с основными ареалами, но и понять процессы, происходящие в этих реликтовых популяциях на границе ареалов. Кроме того, эти данные необходимы для разработки программ по сохранению приморских популяций этих видов, имеющих лекарственную, пищевую и декоративную ценность [19, 20]. В настоящее время данных об уровне генетического полиморфизма *E. ferox* нет. По генетической изменчивости *N. nucifera*, *N. lutea* и их гибридов, произрастающих на территории Китая, Таиланда и Индии, опубликовано несколько работ, в которых были использованы аллозимные, ISSR и RAPD маркеры [21–24]. Однако генетическая изменчивость *N. komarovii*, растущего на территории юга Дальнего Востока России, ранее не изучалась.

В связи с этим целью данной работы было изучение генетической изменчивости *N. komarovii* и *E. ferox*, произрастающих на территории Приморского края, на основе аллозимных маркеров, как первый шаг на пути к исследованию генетических взаимоотношений этих популяций с основными ареалами *N. nucifera* и *E. ferox*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Многолетник *N. komarovii* и однолетник *E. ferox* — короткостебельные растения с крупными щитовидными плавающими листьями на длинных черешках [25]. Сбор листьев растений *N. komarovii* и *E. ferox* проводили в 2006, 2007 и 2010 гг. в естественных местах обитания. Также в анализе использовали растения, пророщенные из семян, полученных из Биробиджана (ЕАО) (3 шт.). Материалом для анализа служили замороженные в жидком азоте листья 47 растений *N. komarovii*: из природных популяций оз. Лотос (Хасанский район) — 25 шт., на о. Путятин (Находкинская агломерация) — 19 шт., искусственного насаждения — в пруду вблизи с. Новогордеевка (Анучинский район) — 3 шт. Листья 17 образцов *E. ferox* собраны в проточных заводях р. Илистая (Черниговский район). Для работы выбирали растения, находящиеся на расстоянии не менее 50 м друг от друга. Гомогенизацию, электрофоретическое фракционирование и гистохимическое окрашивание ферментов проводили по методикам, описанным ранее [26]. Состав буферных систем и режимы фракционирования представлены в табл. 1, исследованные ферментные системы — в табл. 2. Показатели полиморфности (P), среднего числа аллелей на локус (A), средней наблюдаемой (H_o) и ожидаемой (H_e) гетерозиготности рассчитывали общепринятыми методами [27]. Статистическую обработку проводили с использованием программы TFPGA [28].

Таблица 1. Используемые буферные системы и условия электрофоретического фракционирования ферментов для *Nelumbo komarovii* и *Euryale ferox*

Буферная система	Электродный буфер	Гелевый буфер	Режим и длительность фракционирования	Фракционируемые ферменты	
				<i>N. komarovii</i>	<i>E. ferox</i>
ТС*	0.14 М трис, 0.14 М лимонная кислота, рН 7.8	Электродный буфер, разбавленный 1 : 2.5	80 mA, 180 V, 14 ч	MDH, FUM, SKDH, ME, ACP	MDH, FUM, SKDH, DIA, 6-PGD
ТЕВ*	0.18 М трис, 0.10 М борная кислота, 0.004 М ЭДТА, рН 8.6	Электродный буфер, разбавленный 1 : 25	17 mA, 180 V, 16 ч	AAT, GPI, PGM, GDH, FE	ADH, GPI, PGM, GDH

Таблица 2. Исследованные ферментные системы и количество полиморфных локусов и аллелей, выявленных в листьях *Nelumbo komarovii* и *Euryale ferox*

№	Фермент	Сокращенное обозначение	К.Ф. №	Число интерпретируемых локусов	Полиморфные локусы	Число аллелей
1	Аспаратаминотрансфераза	AAT	2.6.1.1.	2 (–*)	0 (–*)	2 (–*)
2	Алкогольдегидрогеназа	ADH	1.1.1.1	– (1*)	– (0*)	– (1*)
3	Глюкозофосфатизомераза	GPI	5.3.1.9.	2 (1*)	0 (0*)	2 (1*)
4	Глутаматдегидрогеназа	GDH	1.4.1.2	2 (2*)	0 (0*)	2 (2*)
5	Диафораза	DIA	1.6.4.3	– (1*)	– (0*)	– (1*)
6	Кислая фосфатаза	ACP	3.1.3.2.	1 (–*)	0 (–*)	1 (–*)
7	Малатдегидрогеназа	MDH	1.1.1.37.	5 (2*)	0 (0*)	5 (2*)
8	Малик-энзим	ME	1.1.1.40.	1 (–*)	0 (–*)	1 (–*)
9	Флуоресцентная эстераза	FE	3.1.1.2.	4 (–*)	0 (–*)	4 (–*)
10	Фосфоглюкомутаза	PGM	2.7.5.1.	4 (1*)	0 (1*)	4 (2*)
11	Шикиматдегидрогеназа	SKDH	1.1.1.25	1 (2*)	0 (0*)	1 (2*)
12	Фумараза	FUM	4.2.1.2	1 (1*)	0 (0*)	1 (1*)
13	6-Фосфоглюконатдегидрогеназа	6-PGD	1.1.1.44	– (2*)	– (0*)	– (2*)
Всего				23 (13*)	0 (1*)	23 (14*)

Примечание. (*) – данные приведены для *E. ferox*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе были исследованы 21 ферментная система у *N. komarovii* и 18 ферментных систем у *E. ferox*. У *N. komarovii* стабильно выявлялись 10 ферментов, которые были представлены 23 электрофоретическими вариантами, предположительно кодируемыми 23 локусами (табл. 2, рис. 1). У *E. ferox* стабильно окрашивались 9 ферментных систем, при анализе которых было обнаружено 14 электрофоретических вариантов, кодируемых 13 локусами (табл. 2, рис. 2). У *N. komarovii* все исследованные локусы оказались мономорфны, у *E. ferox* лишь по одному из 13 проанализированных локусов был выявлен полиморфизм. Поскольку данные для изучаемых видов представлены впервые, ниже приведены описание фенотипов и генетическая интерпретация для исследованных

ферментных систем. Полное название каждой ферментной системы отражено в табл. 2.

Аспаратаминотрансфераза (AAT) на электрофореграммах *N. komarovii* представлена двумя мономорфными зонами активности, которые предположительно находятся под контролем двух независимых локусов: *Aat-1* и *Aat-2*. По данным Tian с соавт. [21], у *N. nucifera* из Китая AAT кодируется единственным локусом, по которому был выявлен полиморфизм у культивированного лотоса, но все исследованные дикорастущие растения обладали одинаковым генотипом *Aat* (BB). У *E. ferox* AAT была не активна.

Алкогольдегидрогеназа (ADH) у *N. komarovii* не активна, хотя у *N. nucifera* этот фермент представлен двумя мономорфными локусами [21]. У *E. ferox* на электрофореграммах фермент представлен одной мономорфной зоной.

Фермент	AAT		ACP	ME	SKDH	FUM	MDH				
Локус	<i>Aat-1</i>	<i>Aat-2</i>	<i>Acp</i>	<i>Me</i>	<i>Skdh</i>	<i>Fum</i>	<i>Mdh-1</i>	<i>Mdh-2</i>	<i>Mdh-3</i>	<i>Mdh-4</i>	<i>Mdh-5</i>
Аллели	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
↑ +							≡				
↓ -	—	—	—	—	—	≡		—	—	—	≡

Фермент	FE				PGM				GPI		GDH	
Локус	<i>Fe-1</i>	<i>Fe-2</i>	<i>Fe-3</i>	<i>Fe-4</i>	<i>Pgm-1</i>	<i>Pgm-2</i>	<i>Pgm-3</i>	<i>Pgm-4</i>	<i>Gpi-1</i>	<i>Gpi-2</i>	<i>Gdh-1</i>	<i>Gdh-2</i>
Аллели	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
↑ +	—	—			—	≡			—			
↓ -			—	—			—	≡			—	≡

Рис. 1. Схематическое изображение электрофоретических вариантов ферментов AAT, ACP, ME, SKDH, FUM, MDH, FE, PGM, GPI и GDH в листьях *Nelumbo komarovii*.

Фермент	DIA	PGM		FUM	ADH	6-PGD	
Локус	<i>Dia</i>	<i>Pgm-1</i>	<i>Pgm-2</i>	<i>Fum</i>	<i>Adh</i>	<i>6-Pgd-1</i>	<i>6-Pgd-2</i>
Аллели	1.00	1.10	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
↑ +							
↓ -		—	—	—	—	—	—

Фермент	MDH		GDH		GPI	SKDH	
Локус	<i>Mdh-1</i>	<i>Mdh-2</i>	<i>Gdh-1</i>	<i>Gdh-2</i>	<i>Gpi</i>	<i>Skdh-1</i>	<i>Skdh-2</i>
Аллели	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
↑ +							
↓ -	≡	—	—	—	≡	—	—

Рис. 2. Схематическое изображение электрофоретических вариантов ферментов DIA, PGM, FUM, ADH, 6-PGD, MDH, GDH, GPI и SKDH в листьях *Euryale ferox*.

Глюкозофосфатизомераза (GPI) у *N. komarovii* окрашена на геле двумя зонами активности, каждая из которых предположительно находится под контролем мономорфного локуса: *Gpi-1* и *Gpi-2*. Медленная зона выявляется в виде трех фракций

фермента, но аллельной изменчивости в этой зоне также не наблюдается. У *N. nucifera* для GPI описан только один локус, который был мономорфен [21]. У *E. ferox* GPI представлена на геле двумя зонами активности, но учитывали только

Таблица 3. Основные показатели генетического полиморфизма *Nelumbo komarovii* и *Euryale ferox*

Популяции	N	$P_{95}, \%$	$P_{99}, \%$	H_o	H_e	A	n_e
<i>N. komarovii</i>	47	0	0	0	0	1	1
<i>E. ferox</i>	17	7.69	7.69	0.072	0.038	1.07	1.04

Примечание. N – число исследованных растений, $P_{95}, P_{99}, \%$ – полиморфность с учетом 95 и 99%-ного критерия, H_o – наблюдаемая гетерозиготность, H_e – ожидаемая гетерозиготность, A – количество аллелей на локус, n_e – эффективное число аллелей.

один локус *Gpi*, поскольку быстроподвижная фракция GPI-1 выявляется в виде широкой размытой зоны.

Глутаматдегидрогеназа (GDH) у *N. komarovii* окрашена двумя зонами активности, которые предположительно контролируются двумя независимыми локусами: *Gdh-1* и *Gdh-2*. Медленная зона представлена тремя фракциями фермента. Для *N. nucifera* описан только один мономорфный локус *Gdh* [21]. У *E. ferox* GDH представлена в виде двух мономорфных зон активности, что позволяет предположить наличие двух локусов, *Gdh-1* и *Gdh-2*.

Диафараза (DIA) у *N. komarovii* не активна. У *N. nucifera* обнаружен один мономорфный локус *Dia* [21]. У *E. ferox* фермент выявлен одной мономорфной зоной активности.

Кислая фосфатаза (ACP) на электрофореграммах *N. komarovii* представлена одной мономорфной зоной активности. Та же картина описана для *N. nucifera* [21]. У *E. ferox* ACP не активна.

Малатдегидрогеназа (MDH) у *N. komarovii* окрашивается на электрофореграммах в виде пяти зон активности, которые были интерпретированы как продукты мономорфных генов: *Mdh-1*, *Mdh-2*, *Mdh-3*, *Mdh-4* и *Mdh-5*. При этом самая подвижная и самая медленная зоны выявляются в виде трех фракций, а три промежуточные зоны – в виде одной фракции фермента. Для *N. nucifera* показано два локуса, один из которых, *Mdh-2*, оказался высокополиморфным и у культиваров и у дикорастущих китайских лотосов [21]. У *E. ferox* MDH представлена на геле в виде двух зон активности, которые предположительно находятся под контролем двух независимых локусов, *Mdh-1* и *Mdh-2*. Быстрая зона выявляется в виде трех фракций фермента.

Малик-энзим (ME) у *N. komarovii* выявляется одной зоной активности фермента и находится под контролем одного гена *Me*. У *N. nucifera* этот фермент также представлен одним мономорфным локусом [21]. У *E. ferox* ME не активна.

Флуоресцентная эстераза (FE). У *N. komarovii* на геле показаны четыре зоны активности, предположительно кодируемые четырьмя мономорфными локусами. В работе Tian с соавт. [21] этот фермент не использовали. У *E. ferox* FE не активна.

Фосфоглюкомутаза (PGM) у *N. komarovii* выявляется в виде четырех зон активности и находится под контролем четырех мономорфных локусов. Локусы *Pgm-2* и *Pgm-4* представлены двойными фракциями. У *N. nucifera* обнаружен только один мономорфный локус PGM [21]. У *E. ferox* PGM выявляется в виде двух зон активности. Быстроподвижную зону PGM-1, локализованную в виде широкой размытой полосы, в работе не учитывали. Медленная зона представлена двумя фракциями фермента, являющимися продуктами разных аллелей. Фермент, окрашенный в данной области, предположительно находится под контролем одного полиморфного локуса с двумя аллелями.

Шикиматдегидрогеназа (SKDH) у *N. komarovii* представлена одной мономорфной зоной активности. У *N. nucifera* выявлено два мономорфных локуса SKDH [21]. У *E. ferox* SKDH представлена двумя мономорфными зонами.

Фумараза (FUM) у *N. komarovii* выявляется на электрофореграммах в виде одной мономорфной зоны активности, представленной тройными фракциями. В работе Tian с соавт. [21] FUM не использовали. У *E. ferox* также окрашивается одна зона FUM, предположительно контролируется мономорфным локусом *Fum*.

6-Фосфоглюконатдегидрогеназа (6-PGD) у *N. komarovii* была не активна. У *N. nucifera* выявлен один локус *6-Pgd*, по которому обнаружена изменчивость у одного из культиваров лотоса [21]. У *E. ferox* представлена двумя мономорфными локусами.

В целом по 10 исследованным ферментным системам *N. komarovii* идентифицировано 23 мономорфных гена. Предполагается, что шесть ферментов *N. komarovii* находятся под мультигенным контролем, тогда как четыре фермента находятся под контролем одного локуса. Изученные популяции *N. komarovii* характеризуются отсутствием аллозимной изменчивости ($P_{95} = 0$; $A = 1$) (табл. 3).

У *E. ferox* по девяти исследованным ферментным системам выявлено 13 генов, один из которых, *Pgm-2*, был полиморфным с двумя аллелями. Этот локус у *E. ferox* высокоизменчивый (частоты аллелей 0.53 и 0.47), наблюдаемая гетерозиготность составила 94.12%. В целом *E. ferox* обладает низким уровнем полиморфизма ($P_{95} = 7.69$; $A = 1.07$) (табл. 3).

При сравнении полученных для *N. komarovii* данных с результатами исследования *N. nucifera* в работе Tian с соавт. [21] хорошо видно, что локусы, контролирующие большинство ферментов, различаются у этих видов. Так, из 11 изученных у обоих видов ферментов только для двух, АСР и МЕ, количество выявленных локусов совпадало. Остальные ферменты у *N. komarovii* представлены либо большим количеством локусов, чем у *N. nucifera* (AAT, GDH, GPI, MDH, PGM), либо меньшим (ADH, DIA, SKDH). При использовании унифицированной методики такие различия между видами являются диагностическими и позволяют дифференцировать различные виды. Однако в данном случае различия изоферментных спектров могут быть вызваны методическими и техническими различиями в работе. Одним из недостатков аллозимного анализа является зависимость его результатов от условий экстракции белка, буферов, используемых при экстракции и электрофоретическом разделении ферментов, плотности геля, условий электрофореза. Кроме того, поскольку аллозимная изменчивость маркирует экспрессируемый геном, различия по некоторым изоферментным локусам могут быть связаны с уровнем их экспрессии, который может меняться у некоторых ферментов при определенных условиях [29]. Относительно унифицированной методики используется при аллозимном анализе хвойных, что позволяет сравнивать результаты, полученные в разных лабораториях [26]. Для впервые изучаемых видов приходится подбирать условия экстракции и разделения ферментов. Эти методические подходы часто различаются в разных лабораториях, что не позволяет корректно сравнивать их результаты. Так, большее количество локусов, выявленное в нашей работе у пяти ферментов *N. komarovii*, может быть связано с тем, что при хранении материала и экстракции ферментов использовался жидкий азот, который способствует более эффективному разрушению клеточных структур и высвобождению белков. В работе Tian с соавт. ферменты экстрагировались на льду из свежей (незамороженной) ткани [21]. В то же время отсутствие активности у некоторых ферментов *N. komarovii* в нашей работе может быть вызвано их разрушением во время транспортировки и фиксации материала. Кроме того, различия в буферных системах, используемых для разделения ферментов, также могут влиять на результат в двух работах.

Таким образом, различия электрофоретических спектров *N. komarovii* в нашей работе и *N. nucifera* в работе Tian с соавт. все еще не дают оснований считать *N. komarovii* самостоятельным видом. Для таких заключений необходимо провести совместный анализ приморских лотосов и растений из Китая в одной лаборатории.

Отсутствие аллозимного полиморфизма в приморских популяциях лотоса вполне согласуется с результатами Tian с соавт. [21], которые также отмечают очень низкий уровень аллозимной изменчивости у дикорастущих лотосов. В этой работе были изучены как дикорастущие растения, так и культивары, в том числе гибриды *N. nucifera* и *N. lutea*. Из 23 идентифицированных авторами локусов, пять оказались полиморфными, из которых только три были полиморфны у дикорастущих лотосов. Авторы отмечают, что у этого вида можно было бы ожидать более высокий уровень полиморфизма, поскольку вид очень древний и широко распространен в Австрало-Азиатском регионе от северных провинций Китая до севера Австралии. Действительно, ископаемые остатки лотосов датируются ранним мелом, 99.6–112 млн. лет назад [30–32]. Длительная эволюционная история и существование лотосов в настоящее время в различных климатических условиях должны были способствовать накоплению генетических мутаций и закреплению различий под влиянием отбора. Однако низкий уровень изменчивости у *N. nucifera* выявляется не только при использовании аллозимных, но и ДНК маркеров (ISSR). Так, в работе Tian с соавт. [21] показатели генетической изменчивости *N. nucifera* и их гибридов на основе ISSR маркеров ($P = 26.67$, $H_e = 0.10$) были не намного выше оценок на основе аллозимных маркеров ($P = 21.74$, $H_e = 0.05$). Интересно, что еще более низкий уровень изменчивости был выявлен с применением ISSR маркеров у дикорастущих *N. nucifera*, произрастающих в более северной провинции Китая [23], тогда как более высокие показатели были отмечены в центральных провинциях Китая [24]. Если генетическая изменчивость лотосов уменьшается от центра ареала к северным популяциям, отсутствие аллозимного полиморфизма в приморских популяциях лотоса, находящихся на северной границе ареала, может быть объяснено совместным действием дрейфа генов (“эффект основателя” или “бутылочное горлышко”) и отбора, вследствие вымирания лотоса в период плейстоцен-голоценового похолодания и последующего быстрого распространения по широкому ареалу. При этом в более холодном климате происходил более жесткий отбор генотипов, которые получали преимущество благодаря вегетативному размножению, характерному для лотосов [16]. Поскольку *N. komarovii* может формировать клон уже через 10 дней после прорастания (личные наблюдения), а семена лотоса не теряют способность к прорастанию в течение тысяч лет [33], приморские популяции лотоса могли также возникнуть из немногочисленных сохранившихся в период плейстоцен-голоценового похолодания семян растений, произраставших на этой территории в более ранние эпохи.

Те же эволюционные события отразились на характере распространения и уровне генетической изменчивости другого водного реликта — *E. ferox*. Низкий уровень аллозимного полиморфизма, выявленный в приморских популяциях эвриалы ($P_{95} = 7.69$, $H_o = 0.072$, табл. 3), отмечается обычно у редких и эндемичных видов часто с фрагментированным или островным ареалом [34–37]. Близкие показатели аллозимной изменчивости также выявлены в реликтовых приморских популяциях женьшеня ($P_{95} = 7.6$, $H_o = 0.022$ [38]), который, как и *N. komarovii* и *E. ferox*, существовал на территории Приморского края непрерывно предположительно с третичного периода [1, 6]. Это может свидетельствовать об общих эволюционных процессах, которым подвергались представители древней теплолюбивой флоры на территории Приморского края.

Реликтовые виды не всегда характеризуются низкими уровнями изменчивости, но среди немногих растений, у которых зарегистрировано полное отсутствие аллозимного полиморфизма, все же преобладают реликты со сложной эволюционной историей, включающей периоды флуктуации численности и размера ареала [36, 39–41]. Так, полное отсутствие аллозимной изменчивости по 24 локусам выявлено у *Bensoniella oregona*, эндемика Южного Орегона и Северо-Западной Калифорнии — древней территории, богатой редкими реликтовыми видами [39]. Отсутствие изменчивости у этого вида предположительно связано с эффектом популяционного “бутылочного горлышка”, усиленного такими характеристиками вида, как самоопыление, клональная репродукция и малый размер популяций. Экстремально низкие показатели аллозимной изменчивости были обнаружены у другого калифорнийского эндемика, *Pinus torreyana*, представленного всего двумя небольшими популяциями, материковой и островной. Каждая из этих популяций была полностью мономорфной по 59 локусам, и лишь по двум локусам эти популяции различались между собой [42]. Несвойственную для хвойных генетическую однородность, выявленную у этого вида, авторы также связывают с генетическим дрейфом вследствие сокращения популяций до нескольких особей во время климатических флуктуаций Голоцена. Отсутствие или экстремально низкие уровни аллозимной изменчивости отражают события эволюционного прошлого и в других случаях, но некоторые характеристики вида, прежде всего способ размножения и распространения, также вносят вклад в поддержание низкого уровня полиморфизма [34–37, 41]. В случае приморских реликтовых популяций *N. komarovii* и *E. ferox* инбридинг и вегетативное размножение также могут вносить вклад в поддержание низкого уровня изменчивости. Так, *N. komarovii* успешно размножается вегетативным способом [15, 16], хотя

растения в приморских популяциях ежегодно успешно плодоносят, а семена легко прорастают и вполне жизнеспособны [13, личные наблюдения]. Лотос характеризуется самоопылением и перекрестным опылением, которое может осуществляться жуками, пчелами и шмелями [43]. Однако существующие исследования системы размножения лотоса проведены не в приморских популяциях *N. komarovii*, где под влиянием местных экологических факторов у вида может преобладать одна из форм инбридинга.

E. ferox — однолетник и, следовательно, размножается исключительно семенами. В то же время для вида характерно наличие клейстогамии [13]. Единичные цветки *E. ferox* чаще всего остаются под водой, лишь иногда приподнимаясь над поверхностью воды и приоткрывая лепестки околоцветника [13]. Клейстогамия как крайняя форма самоопыления неизбежно должна приводить к инбридингу и низкому уровню гетерозиготности. Интересно, что единственный полиморфный локус, выявленный у *E. ferox*, является высокополиморфным ($H_o = 94\%$). Высокая гетерозиготность по локусу *Pgm-2* небольшой выборки растений из одного местообитания может объясняться либо рекомбинацией (перекрестное опыление), либо наличием одной из форм апомиксиса, при которой потомки полностью сохраняют материнский геном. В любом случае изначальным условием такой изменчивости по локусу должно быть прохождение через популяционное “бутылочное горлышко” нескольких различных генотипов *E. ferox*.

В случае *N. komarovii* даже преобладанием вегетативного размножения трудно объяснить отсутствие каких-либо различий между такими изолированными и удаленными популяциями, как оз. Лотос (Хасанский р-н), о-в Путятин (Находкинская агломерация) и Приамурье. Более того, сохранение в разных местообитаниях одного и того же генотипа в результате случайных событий (генетический дрейф) кажется маловероятным. Возможно, на северной границе ареала сохранились лишь наиболее приспособленные особи и, следовательно, генетическая однородность приморских и приамурских лотосов является следствием отбора в большей степени, чем генетического дрейфа.

Таким образом, низкий уровень генетической изменчивости двух реликтовых водных видов, основной ареал которых находится южнее, отражает, скорее всего, общую эволюционную историю этих видов, которые в период плейстоцен-голоценового похолодания подверглись жесткому генетическому дрейфу и отбору. Представляется, что оба вида достаточно хорошо приспособлены к суровым климатическим условиям вследствие отбора и благодаря успешному семенному или вегетативному размножению. В то же время экстре-

мально низкий уровень изменчивости обоих видов не способен обеспечить им достаточную эволюционную гибкость для выживания в условиях меняющейся окружающей среды. В связи с этим наибольшую угрозу для существования лотоса и эвриалы в Приморском крае представляет сокращение их местообитаний вследствие хозяйственной деятельности. Однако для разработки программ по сохранению этих популяций необходимы дальнейшие исследования их генетической изменчивости с применением маркеров с большей разрешающей способностью, таких как ISSR и микросателлиты. Более того, вопрос о таксономическом статусе *N. komarovii* по-прежнему остается открытым, и необходимы дополнительные исследования приморских и китайских лотосов с применением различных молекулярных маркеров.

Авторы выражают свою искреннюю благодарность с.н.с. лаб. биотехнологии БПИ ДВО РАН к.б.н. Татьяне Юрьевне Горпенченко за помощь в сборе материала.

Работа поддержана программами Президиума РАН № 22 и № 23 (проекты 09-1-П22-03 и 09-1-П23-06), грантом РФФИ (проект 11-04-01388-а), грантом ДВО РАН (проект № 11-III-B-06-094).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Куренцова Г.Э. Реликтовые растения Приморья. Л.: Наука, 1968. 72 с.
2. Крестов П.В., Верхолат В.П. Редкие растительные сообщества Приморья и Приамурья. Владивосток: ДВО РАН, 2003. 200 с.
3. Гроссгейм А.А. Лотос в СССР // Ботанические материалы Гербария БИН АН СССР. Л., 1940. Т. 8. Вып. 4–9. С. 130–136.
4. Kitagawa M. Neo-Lineamenta Florae Manshuricae. Hirschberg: J. Cramer, 1979. 715 p.
5. Цвелев Н.Н. Сем. 37. Лotosовые – Nelumbonaceae Dumort. // Сосудистые растения Советского Дальнего Востока / Отв. ред. Харкевич С.С. Л.: Наука, 1987. Т. 2. С. 29–30.
6. Куренцова Г.Э. Естественные и антропогенные смены растительности Приморья и южного Приамурья. Новосибирск: Наука, 1973. 230 с.
7. Комаров В.Л. Сем. Кувшинковые – Nymphaeaceae DC. // Флора СССР / Отв. ред. Комаров В.Л. Л.: Изд-во АН СССР, 1937. Т. 7. С. 2–14.
8. Тахтаджян А.Л. Система и филогения цветковых растений. Л.: Наука, 1966. 611 с.
9. Ohwi J. Flora of Japan. Washington: Smithsonian inst., 1965. 1067 p.
10. Flora of China. St. Louis: Beijing, Missouri Botanical Garden Press, 2001. V. 6. P. 115–118.
11. Flowering Plants of the World. Oxford: Oxford Univ. Press, 1978. P. 44–45.
12. Flora of North America. Oxford: Oxford Univ. Press, 1997. P. 64–65.
13. Пишеникова Л.М. Водные растения российского Дальнего Востока. Владивосток: Дальнаука, 2005. С. 77–87.
14. Flora of Taiwan. V. 2. Taiwan: Epoch publishing co., 1976. P. 541–548.
15. Красная книга Приморского края. Растения. Владивосток: Апельсин, 2008. 688 с.
16. Крюкова М.В. Эколого-биологические особенности лотоса Комарова на северо-восточной границе ареала // Вестник ДВО РАН. 2009. № 3. С. 75–79.
17. Красная книга Хабаровского края: Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды растений и животных: официальное издание / Министерство природных ресурсов Хабаровского края, Институт водных и экологических проблем ДВО РАН. Хабаровск: Изд. дом “Приамурские ведомости”, 2008. 632 с.
18. Красная книга РСФСР. Растения. М.: Росагропромиздат, 1988. 590 с.
19. Row L.-C., Ho J.-C., Chen C.-M. Cerebrosides and Tocopherol Trimers from the Seeds of *Euryale ferox* // J. Nat. Prod. 2007. V. 70. P. 1214–1217.
20. Растительные ресурсы России: дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. М.: СПб.: Тов-во научных изданий КМК, 2008. Т. 1. С. 19–22.
21. Tian H.-L., Xue J.-H., Wen J. et al. Genetic diversity and relationships of lotus (*Nelumbo*) cultivars based on allozyme and ISSR markers // Scientia Horticulturae. 2008. V. 116. P. 421–429.
22. Na A., Hong-bo G., Wei-dong K. Genetic variation in rhizome lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn. ssp. *nucifera*) germplasm from China assessed by RAPD markers // Agricultural Sciences in China. 2009. V. 8. № 1. P. 31–39.
23. Xue J.H., Zhuo L.H., Zhou S.L. Genetic diversity and its geographic pattern of wild lotus (*Nelumbo nucifera*) in Heilongjiang Province // Chinese Sci. Bull. 2006. V. 51. P. 1–12.
24. Han Y.-C., Teng C.-Z., Chang F.-H. et al. Analyses of genetic relationships in *Nelumbo nucifera* using nuclear ribosomal ITS sequence data, ISSR and RAPD markers // Aquat. Bot. 2007. V. 87. P. 141–146.
25. Тахтаджян А.Л. Система магнолиофитов. Л.: Наука, 1987. 439 с.
26. Гончаренко Г.Г., Падутов В.Е., Потенко В.В. Руководство по исследованию хвойных видов методом электрофоретического анализа изоферментов. Гомель: Полеспечать, 1989. 164 с.
27. Животовский Л.А. Популяционная биометрия. М.: Наука, 1991. 271 с.
28. Miller M.P. Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author. 1997.
29. Левитес Е.В. Генетика изоферментов растений. Новосибирск: Наука, 1986. 144с.
30. Вахрамеев В.А. Региональная стратиграфия СССР. М.: Изд-во АН СССР, 1952. 340 с.
31. Upchurch G.R., Jr., Crane P.R., Drinnan A.N. The megafloora from the Quantico locality (Middle to Upper

- Albian) // Museum Natural History Memoir. 1994. V. 4. 58 p.
32. Anderson B., Cole W.W., Barrett S.C.H. Specialized bird perch aids cross-pollination // Nature. 2005. V. 435. P. 41–42.
 33. Павленко Г.Е. Лотос Комарова на северной границе ареала // Флора Дальнего Востока / Отв. ред. Хван А.В. Благовещенск: АмурКНИИ, 1977. С. 55–59.
 34. Matolweni L.O., Balkwill K., McLellan T. Genetic diversity and gene flow in the morphologically variable, rare endemics *Begonia dregei* and *Begonia homonyma* (Begoniaceae) // Amer. J. Bot. 2000. V. 87. № 3. P. 431–439.
 35. Evans M.K., Dolan R.B., Menges E.S., Gordon D.R. Genetic diversity and reproductive biology in *Warea carteri* (Brassicaceae), a narrowly endemic Florida scrub annual // Amer. J. Bot. 2000. V. 87. № 3. P. 372–381.
 36. Crawford D.J., Ruiz E., Stuessy T.E. et al. Allozyme diversity in endemic flowering plant species of the Juan Fernandez Archipelago, Chile: ecological and historical factors with implications for conservation // Amer. J. Bot. 2001. V. 88. № 12. P. 2195–2203.
 37. López-Pujol J., Orellana M.R., Bosch M. et al. Effects of habitat fragmentation on allozyme diversity and conservation status of the coastal sand dune plant *Stachys maritima* (Lamiaceae) in the Iberian peninsula // Plant Biol. 2003. V. 5. № 5. P. 504–512.
 38. Koren O.G., Potenko V.V., Zhuravlev Yu.N. Inheritance and variation of allozymes in *Panax ginseng* C.A. Meyer (Araliaceae) // Int. J. Plant Sci. 2003. V. 164. № 1. P. 189–195.
 39. Soltis P.S., Soltis D.E., Tucker T.L. Allozyme variability is absent in the narrow endemic *Bensoniella oregona* (Saxifragaceae) // Conser. Biol. 1992. V. 6. № 1. P. 131–134.
 40. Cole C.T., Biesboer D.D. Monomorphism reduced gene flow, and cleistogamy in rare and common species of *Lespedeza* (Fabaceae) // Amer. J. Bot. 1992. V. 79. P. 567–575.
 41. Vandepitte K., Roldarn-Ruiz I., Jacquemyn I H., Honnay O. Extremely low genotypic diversity and sexual reproduction in isolated populations of the self-incompatible lily-of-the-valley (*Convallaria majalis*) and the role of the local forest environment // Ann. Bot. 2010. V. 105. P. 769–776.
 42. Ledig F.T., Conkle M.T. Gene diversity and genetic structure in a narrow endemic, Torrey pine (*Pinus torreyana* Parry ex. Carr) // Evolution. 1983. V. 37. P. 79–85.
 43. Li J.K., Huang S.Q. Effective pollinators of Asian sacred lotus (*Nelumbo nucifera*): contemporary pollinators may not reflect the historical pollination syndrome // Ann. Bot. 2009. V. 104. № 5. P. 845–851.

Low Level of Allozyme Polymorphism in Relict Aquatic Plants of the Far East *Nelumbo komarovii* Grossh. and *Euryale ferox* Salisb.

O. G. Koren^a, M. S. Yatsunskaya^{a,b}, and O. V. Nakonechnaya^a

^aInstitute of Biology and Soil Science, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia

e-mail: markelova@biosoil.ru, koren@ibss.dvo.ru

^bFar Eastern Federal University, Vladivostok, 690950 Russia

Using allozyme analysis, genetic variation of two relict aquatic plants from Primorsky krai, Komarov lotus (*Nelumbo komarovii* Grossh.) and Gorgon plant (*Euryale ferox* Salisb.), was examined. The absence of allozyme variation in the Primorye populations of *Nelumbo komarovii* along with low polymorphism level in the population of *Euryale ferox* ($P_{95} = 7.69$; $A = 1.07$; $H_o = 0.072$; $H_e = 0.038$) was demonstrated. Since the data for the species examined are reported for the first time ever, the phenotypes and genetic interpretation of the enzyme systems tested are presented. The isoenzyme profiles of *N. komarovii* were compared with the data reported for *N. nucifera* from China. The absence of allozyme variation in *N. komarovii*, along with extremely low level of variation revealed for *E. ferox*, is discussed in association with the evolutionary histories of these species, their dispersal after the Pleistocene–Holocene cooling, and survival on this territory in range boundaries.