

УДК 582.572.7: 581.19: 543.545

О.В. Дорогина
В.М. Доронькин
И.Ю. Селютина
Е.С. Конищенко

O.V. Dorogina
V.M. Doronkin
I.Yu. Selutina
E.S. Konichenko

СТРУКТУРА РОДА *IRIS* L. (IRIDACEAE JUSS.) АЗИАТСКОЙ
РОССИИ, ВЫЯВЛЕННАЯ SDS-ЭЛЕКТРОФОРЕЗОМ ЗАПАСНЫХ БЕЛКОВ СЕМЯН

STRUCTURE OF THE GENUS *IRIS* L. (IRIDACEAE JUSS.) IN ASIATIC
RUSSIA REVEALED BY SDS-ELECTROPHORESIS OF SEED STORAGE PROTEINS

Аннотация. Проведена оценка таксономической структуры рода *Iris* L. Азиатской России с помощью SDS-электрофореза в полиакриламидном геле. Полученные результаты показали, что виды рода *Iris* внутри секции имеют сходную структуру полипептидных спектров. Для *I. ensata*, *I. potaninii* и *I. bloudowii* выявлена видоспецифичность по запасным белкам семян. С помощью коэффициентов сходства определен уровень различия между разными видами; обнаружено, что виды, принадлежащие к одной секции, имеют большие величины коэффициентов сходства (64–73%), чем виды, принадлежащие к разным секциям (Ксх=23,3–51,4%). Результаты исследования также подтверждают деление *Iris* на подроды и секции, предложенное ранее В.М. Доронькиным (2006).

Ключевые слова: *Iris*, Iridaceae, таксон, систематика, SDS-электрофорез, белки эндосперма.

Summary. Preliminary assessment of taxonomic structure of the genus *Iris* L. of Asiatic Russia by SDS-electrophoresis in polyacrylamide gel was performed. It is shown that the species from the same section have similar structure of the polypeptide spectra. For *I. ensata*, *I. potaninii*, and *I. bloudowii*, the species specificity of seed storage proteins was revealed. Distinction level is defined by coefficient of similarity between different species; similarity of species from the same section is sufficiently higher (64–73%) than between species from different sections (23,3–51,4%). Also, our results favor the system of *Iris* of Asian Russia elaborated by Doronkin (2006).

Key words: *Iris*, Iridaceae, taxon, systematization, SDS-electrophoresis, seed storage proteins.

Объем рода *Iris* L. (Iridaceae Juss.) до последнего времени является предметом пристального внимания. Так, Г.И. Родионенко (2005, 2006а, б, 2007, 2009), основываясь на морфологии, выделил ряд таксонов из этого рода в самостоятельные роды. Молекулярно-генетические исследования С.А. Wilson (2011) показали ошибочность этой точки зрения.

На основе изучения азиатских представителей *Iris* была предложена система рода (Доронькин, 2006), где виды были распределены в 6 подродов и 8 секций.

Целью данной работы явилось уточнение таксономической структуры рода *Iris*.

Для этого использовали метод SDS-электрофореза в полиакриламидном геле, где в качестве маркеров были выбраны запасные белки семени. В частности, этот метод успешно применяется в таксономических исследованиях, а

также для решения проблем частной филогении и эволюции таксонов (Дорогина и др., 2003; Семихов, 1991). Оптимальным уровнем применения данного метода является изучение внутри- и межвидовой изменчивости, так как преимущества запасных белков заключаются в значительном внутривидовом полиморфизме, независимости от условий произрастания растений и разной степени специфичности (Дорогина, 1997). При использовании белковых маркеров исследуется генетическая изменчивость, что особенно важно при изучении фенотипически близких видов (Дорогина, Агафонова, 2004; Новожилова и др., 1991). К преимуществам данного метода также можно отнести его экономичность при достаточно высокой информативности.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования были взяты семена представителей рода *Iris* Азиатской России (табл. 1). Из каж-

Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, ул. Золотодолинская, 101; 630090, Новосибирск, Россия;
e-mail: olga-dorogina@yandex.ru, norbo@ngs.ru
Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Zolotodolinskaya str., 101; 630090,
Novosibirsk, Russia

дого исследуемого вида анализировали выборки семян от 8 до 80 шт. (в большинстве случаев – из различных ценопопуляций одного вида).

Перед экстракцией семена замачивали в дистиллированной воде и выдерживали в термостате в течение 1 суток при температуре 37°С. Затем очищали от семенной кожуры, отсекали зародыш и измельчали с помощью ручного пресса. Экстрагировали 2% SDS-буфером при комнатной температуре в течение 12–16 часов. Электрофорез проводили в SDS-системе по методике Laemmli (1970) с учетом модификаций (Агафонова (Дорогина), Агафонов, 1989), но для улучшения разделения использовали 16% полиакриламидный гель. В каждом случае проводили электрофорез одних и тех же образцов в двух вариантах – с использованием редуцирующего агента, 2-меркаптоэтанола (+Me), и без него (-Me). Гели окрашивали Кумасси, фиксировали в 10% ТХУ.

Для оценки молекулярной массы полипептидных фракций использовали белковые маркеры с известными молекулярными массами («Fermentas», Литва): β-галактозидаза – 116.0 кДа, альбумин – 66.2 кДа, овальбумин – 45.0 кДа, лактат-дегидрогеназа – 35.0 кДа, рестрикт эндонуклеазы Bsp981 – 25.0 кДа, β-лактоглобулин – 18.4 кДа, лизоцим – 14.4 кДа. Изменчивость по полипептидным спектрам у представителей изучаемых видов оценивали с помощью коэффициентов сходства, вычисляемых по формуле (Ladizinsky, Hymovits, 1979):

$$K_{сх} = [N1 / (N1 + N2)] \times 100\%,$$

где N1 – число пар гомологичных белковых компонентов; N2 – число различающихся белковых компонентов.

Результаты и обсуждение. У всех изученных видов *Iris* молекулярные массы белков эндосперма распределились преимущественно в диапазоне от 14.4 кДа до 116 кДа.

У представителей секции *Limniris* (подрод *Limniris*) (рис. 1) основные, ярко выраженные компоненты были обнаружены в области от 45 до 116 кДа; 1–3 компонента расположены в области 35 кДа и присутствовала слабо выраженная группа легкоподвижных компонентов.

У представителей секции *Ioniris* (подрод *Ioniris*) электрофоретический спектр был представлен небольшим количеством компонентов: один компонент расположен в области 66.2 кДа, 2–3 компонента – в области между 25–35 кДа, кроме того, обнаружены 2 легкоподвижные фракции.

Представители секции *Psammiris* (подрод *Iris*) характеризовались следующими особеннос-

тями полипептидного спектра: основные компоненты находились в области между 66.2 и 45 кДа, несколько компонентов (3–5) обнаружено в области 35 кДа и 5–6 легкоподвижных белковых фракций – в области 18.4–14.4 кДа.

Электрофоретический спектр *I. ventricosa* (подрод *Tenuifoliae*) сходен со спектрами видов секции *Psammiris* (подрод *Iris*), но отличался тем, что у него в области 25.0–18.4 кДа находилась группа из 5–6 белковых субъединиц, кроме того, выявлены отличия в числе низкомолекулярных белков. Основные белковые компоненты *I. tenuifolia* (подрод *Tenuifoliae*) были обнаружены в области 35.0–25.0 кДа; в общих чертах спектр сходен с полипептидным спектром *I. ventricosa*.

На спектрах представителей *I. halophila* (типовая секция подрода *Xyridion*) обнаружен один компонент в области 116–66.2 кДа, 2 близкорасположенных компонента в области около 66.2 кДа, группа из 5 компонентов в области 35 кДа и 5 низкомолекулярных субъединиц.

Для видов из секции *Haloiris* (подрод *Eremiris*) характерна группа из 4–5 субъединиц, расположенных в области 66.2–45.0 кДа, 3–4 компонента в области 35.0–25.0 кДа и 2–3 легкоподвижных компонента.

На электрофоретических спектрах видов из этой секции (без обработки Me) были обнаружены небольшие отличия: на спектрах *I. pallasii* отмечались 3 ярко выраженных компонента в области 25 кДа, 35 кДа и от 45 до 116 кДа. Электрофоретические спектры образцов *I. biglumis* отличались более равномерным распределением компонентов. В случае применения меркаптоэтанола спектры становились более равномерными и достигалось лучшее разделение белковых субъединиц, но значительных отличий между видами и в этом случае не наблюдалось.

Необходимо отметить, что для изученных видов рода *Iris* в большинстве случаев внутривидовая изменчивость электрофоретических спектров была невысока. Так, внутривидовая изменчивость в выборках из ценопопуляций *I. ensata* (подрод *Limniris*) колебалась в пределах $K_{сх}$ от 85,8 до 94,3%, различия между ценопопуляциями также невелики – $K_{сх}$ =86,6%. По результатам проведенного анализа, среднее внутривидовое значение коэффициентов сходства для *I. ventricosa* – 94,8% (Селютина и др., 2005). Изменчивость внутри изученных выборок *I. oxypetala* низкая, что подтверждается высокими средними значениями коэффициентов сходства: для ценопопуляций № 1 $K_{сх}$ =92,9%,

Таблица 1

Положение изученных видов в системе рода *Iris* L. Азиатской России (Доронькин, 2006), места сбора образцов из ценопопуляций

Подрод – секция	Вид	Местонахождение и дата сбора семян
<i>Limniris</i> (Tausch) Spach – <i>Limniris</i> Tausch	<i>Iris ensata</i> Thunb.	Приморский край. Хасанский р-он, окр. пос. Комиссарово. Заливаемый осоково-разнотравный луг. 19.09.2004 г. Кожевников А., Доронькин В.
	<i>I. sanguinea</i> Donn	Читинская область. Читинский р-он, окр. пос. Чепурово. Заросли ивняка на берегу реки. 21.07.2000 г. Доронькин В.
	<i>I. setosa</i> Pall. ex Link	Якутия. Орджоникидзовский р-он, окр. пос. Качикатцы. Сырой луг. 24.08.1982 г. Доронькин В.
<i>Ioniris</i> Spach – <i>Ioniris</i> (Spach) Rodion.	<i>I. uniflora</i> Pall. ex Link	Читинская обл. Агинский р-он, окр. с. Агинского, гора Цаган-Обо. Ирисово-хемерокалисово-разнотравная степь. 20.07.2000 г. Доронькин В.
	<i>I. ruthenica</i> Ker-Gawl.	Республика Алтай. Усть-Коксинский р-он, окр. с. Курунда. Разнотравный луг на опушке леса. 26.07.2003 г. Мальцева Т.
<i>Eremiris</i> Spach – <i>Haloiris</i> Doronkin	<i>I. pallasii</i> Fisch.	Республика Алтай. Кош-Агачский р-он, р. Юстыд. Злаково-ирисово-разнотравный луг на берегу реки. 07.09.2002 г. Королук Е.
	<i>I. biglumis</i> Vahl	Республика Хакасия. Окр. оз. Шира. Каменистая степь. 10.08.2002 г. Курбатский В.
	<i>I. oxypetala</i> Bunge	Приморский край. Уссурийский р-он, пос. Пуциловка. Ирисово-марево-злаковый деградированный луг. 17.09.2004 г. Кожевников А., Доронькин В. Приморский край. Уссурийский р-он, с. Алексее-Никольск. Злаково-полынно-ирисово-разнотравный деградированный луг. 17.09.2004 г. Кожевников А., Доронькин В.
<i>Tenuifoliae</i> (Diels) Doronkin – <i>Tenuifoliae</i> (Diels) Lawrence	<i>I. tenuifolia</i> Pall.	Читинская обл. Агинский р-он, окр. пос. Агинский. Злаков-ирисовая степь на сухом склоне. 03.06.1980 г. Доронькин В.
	<i>I. ventricosa</i> Pall.	Читинская обл. Приаргунский р-он, окр. с. Манкечур. Ирисово-разнотравная степь. 20.07.2000 г. Доронькин В. Приморский край. Уссурийский р-он, окр. с. Корфовка. Разнотравно-ирисовый луг. 17.09.2004 г. З. Кожевникова, В. Доронькин.
<i>Xyridion</i> (Tausch) Spach – <i>Xyridion</i> Tausch	<i>I. halophila</i> Pall.	Омская обл. Черлакский р-он, окр. д. Елизаветинки, левый берег р. Иртыш. Разнотравный злаково-осоковый луг. 20.07.1984 г. Доронькин В.
<i>Iris</i> – <i>Psammiris</i> (Spach) Taylor	<i>I. bloudowii</i> Ledeb.	Республика Алтай. Онгудайский р-он, окр. пос. Акташ. Ирисово-разнотравный луг. 05.08.2004 г. Королук А.
	<i>I. potaninii</i> Maxim.	Республика Алтай. Кош-Агачский р-он, среднее течение р. Калгуты. Каменистые склоны с злаково-осоковым покровом. 05.09.1998 г. Доронькин В.

№ 2 $K_{сх}=97,72\%$. Среднее межпопуляционное значение $K_{сх} = 95.3\%$.

В результате проведенной оценки по изменчивости запасных белков, не выявлено существенных отличий между видами. Например, $K_{сх}$ между *I. pallasii* и *I. biglumis* – 65%, в то время как внутривидовые $K_{сх}$ у *I. biglumis* характе-

ризовались значениями от 70 до 90%, то есть на межвидовом и внутривидовом уровне изменчивость белковых спектров небольшая и приблизительно одинаковая (Селютина, Черкасова, 1995).

В целом для видов рода *Iris* можно отметить небольшую индивидуальную, внутривидовую и внутривидовую изменчивость. В

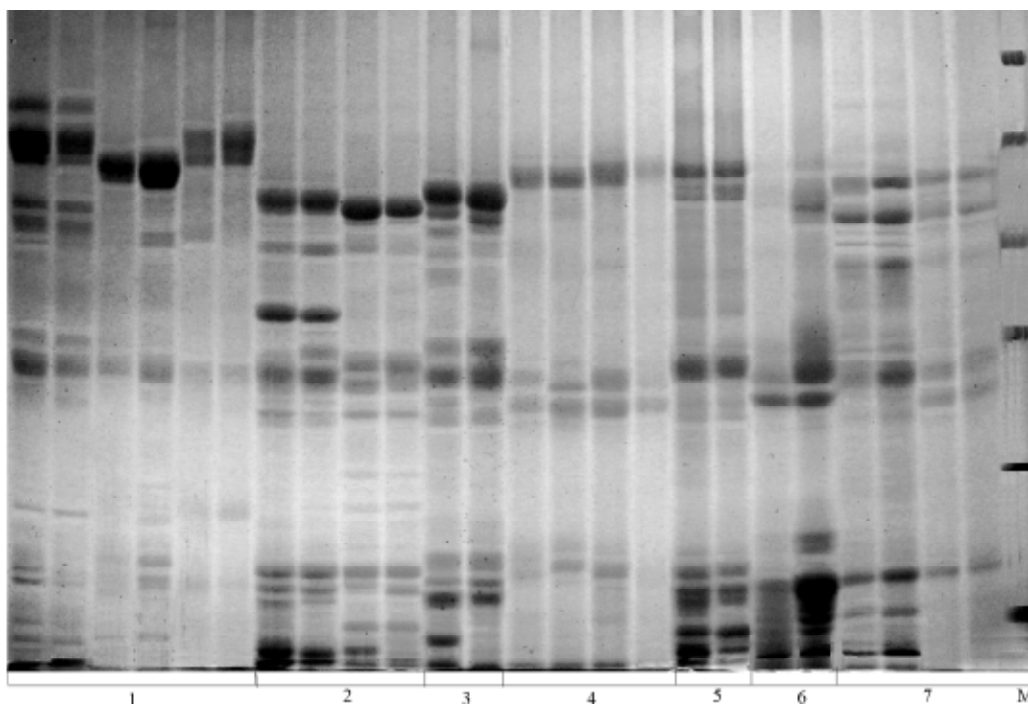


Рис. 1. Электрофоретические спектры видов *Iris* L. (каждый вид представлен двумя треками): 1. *I. ensata*, *I. sanguinea*, *I. setosa* (*Limniris*); 2. *I. bloudowii*, *I. potaninii* (*Psammiris*); 3. *I. ventricosa* (*Ventricosae*); 4. *I. uniflora*, *I. ruthenica* (*Ioniris*); 5. *I. halophila* (*Xyridion*); 6. *I. tenuifolia* (*Tenuifoliae*); 7. *I. pallasii*, *I. biglumis* (*Haloiris*).

изученных ценопопуляциях при анализе семян в пределах отдельного плода (коробочки) выявлена незначительная изменчивость. Изменчивость, обнаруженная в ценопопуляциях, была значительно больше, чем внутри коробочки.

Однообразие белковых спектров может быть обусловлено рядом причин и связано преимущественно с вегетативным способом размножения вида или небольшим размером популяций. С точки зрения популяционной теории, малые популяции с фрагментарным ареалом должны характеризоваться низким уровнем полиморфизма и гетерозиготности, т. к. уровень генетической изменчивости является результатом взаимодействия мутаций, генетического дрейфа и естественного отбора (Журавлев и др., 1999).

Полученные результаты, характеризующие уровень сходства запасных белков семян видов внутри отдельной секции, показали, что для разных секций величина $K_{сх}$ колебалась от 64,3% (секция *Limniris*), где отмечалась наибольшая гетерогенность электрофоретических спектров, до 73,0% в секции *Haloiris*, для которой характер-

на однородность белковых спектров и незначительная межвидовая дифференциация (табл. 2). На основании сравнительного анализа уровня сходства между секциями можно сделать вывод, что наименьшая величина $K_{сх}$ была обнаружена между секциями *Limniris* и *Psammiris* и составила от 23,3 до 34,5%, а наибольшая – между *Limniris* и *Haloiris* – от 64,3 до 73,0% (табл. 3).

На рисунке 2 представлена дендрограмма, построенная на основании электрофоретических спектров запасных белков семян рода *Iris*. Из рисунка следует, что *I. ensata*, *I. sanguinea*, *I. setosa*; *I. uniflora*, *I. ruthenica*; *I. pallasii*, *I. biglumis*; *I. tenuifolia*, *I. ventricosa*; *I. bloudowii*, *I. potaninii* образуют отдельные клады и формируют одинаковую модель полипептидных спектров внутри соответствующих секций, что также подтверждается общей картиной электрофоретических спектров запасных белков семян для каждой отдельной секции.

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что виды рода *Iris* внутри секции имеют сходную структуру полипептидных спектров. Для отдельных таксонов (*I. en-*

Таблица 2

Уровень изменчивости запасных белков семян видов внутри отдельной секции

Подрод – секция	<i>Limniris</i> – <i>Limniris</i>	<i>Iris</i> – <i>Psammiris</i>	<i>Ioniris</i> – <i>Ioniris</i>	<i>Eremiris</i> – <i>Haloiris</i>
$K_{сх}$	64,3	64,5	66,7	73,0

Таблица 3

Уровень изменчивости запасных белков семян между видами разных секций

	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	33,8	30,2	44,0	31,1	23,5	27,37	40,0	51,1	41,0
2	23,3	29,4	42,0	25,5	26,2	51,4	35,4	41,5	48,0
3	26,2	34,5	48,4	24,0	31,5	32,2	28,4	47,2	41,0
4			40,0	23,4	28,9	29,9	34,3	23,4	34,3
5			42,5	24,2	29,1	31,3	34,3	24,1	26,3
6				26,1	28,3	27,6	28,2	26,3	25,3
7						36,0	27,2	23,1	23,4
8						25,3	35,4	430,0	28,2
9							43,1	31,3	29,1
10								42,3	42,2

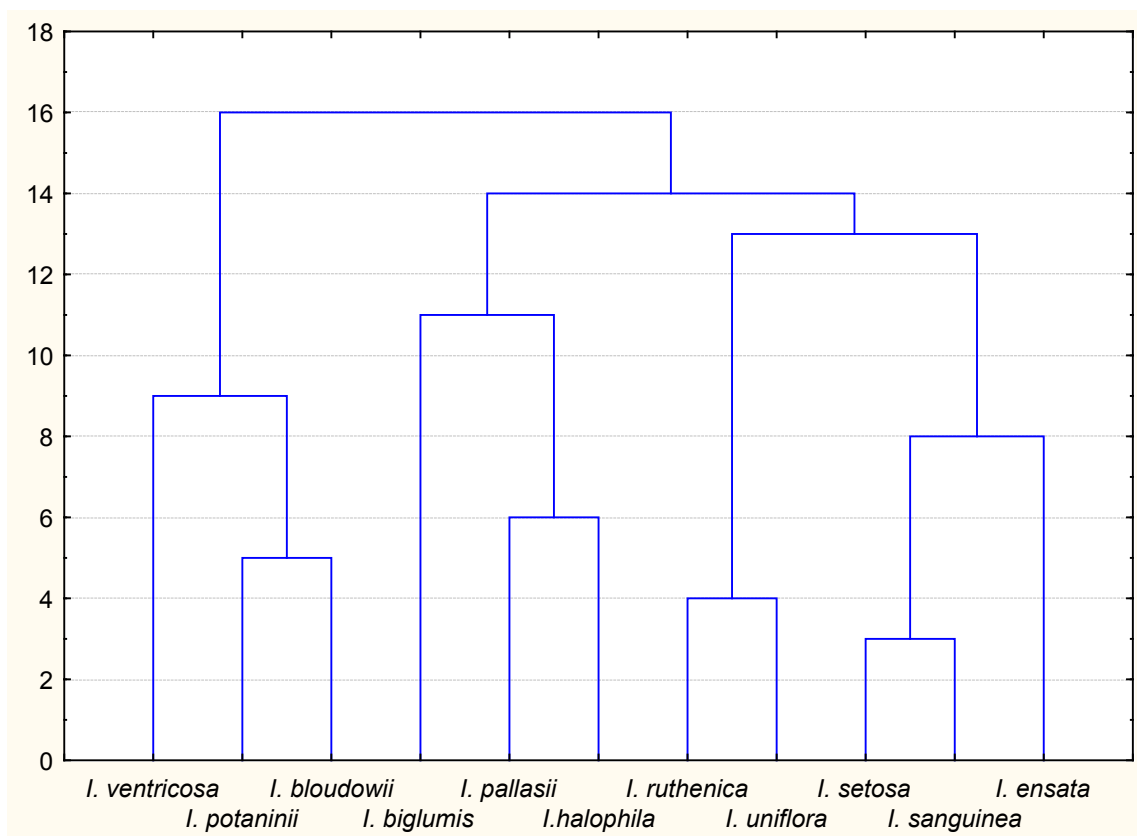
Примечание: 1 – *I. ensata*. 2 – *I. sanguinea*. 3 – *I. setosa* (*Limniris*). 4 – *I. bloudowii*. 5 – *I. potaninii* (*Psammiris*). 6 – *I. ventricosa* (*Ventricosae*). 7 – *I. uniflora*. 8 – *I. ruthenica* (*Ioniris*). 9 – *I. halophila* (*Xyridion*). 10 – *I. tenuifolia* (*Tenuifoliae*). 11 – *I. pallasii*. 12 – *I. biglumis* (*Haloiris*).

sata, *I. potaninii*, *I. bloudowii*) обнаружена видоспецифичность белковых маркеров. С помощью Ксх определен уровень сходства между разными видами. При этом было обнаружено, что виды, принадлежащие к одной секции, характеризуются большими величинами Ксх (64–73%), чем виды из разных секций (Ксх = 23,3–51,4%).

Таким образом, проведенное изучение электрофоретических спектров запасных белков

семян у представителей рода *Iris* позволило выявить видовую специфичность, а также подтвердить существующее деление рода на подроды и секции в предложенной выше системе рода *Iris* Азиатской России.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта по Программе «Биологическое разнообразие» №30 Президиума РАН.

Рис. 2. Дендрограмма сходства электрофоретических спектров эндосперма представителей рода *Iris* L.

ЛИТЕРАТУРА

- Агафонов А.В., Агафонова О.В.** Способ идентификации генотипов многолетних злаков трибы Пшеницевые (Triticeae). Авторское свидетельство СССР № 1546022, 1989. – 4 с.
- Агафонова (Дорогина) О.В.** Существует ли геномная специфичность в роде пырейник? // Докл. Акад. Наук, 1997. – Т. 355, № 6. – С. 838–840.
- Агафонова (Дорогина) О.В., Цвелелева И.Н., Агафонова М.А.** Полиморфизм электрофоретических спектров полипептидов семян некоторых видов сем. Fabaceae, характеризующихся перекрестным типом опыления // Сиб. экол. журн., 2003. – № 1. – С. 9–16.
- Дорогина О.В., Агафонова М.А.** Идентификация близкородственных видов *Hedysarum theinum*, *H. neglectum* и *H. austrosibiricum* (Fabaceae) с помощью запасных глобулинов семян // Бот. журн., 2004. – Т. 89, № 10. – С. 1637–1645.
- Доронькин В.М.** Система рода *Iris* L. (Iridaceae Juss.) Азиатской России // Материалы Всерос. конф., посвящ. 60-летию ЦСБС «Роль ботанических садов в сохранении биоразнообразия растительного мира Азиатской России: настоящее и будущее» (Новосибирск, 17–19 июля 2006 г.). – Новосибирск, 2006. – С. 101–103.
- Журавлев Ю.Н., Корень О.Г., Музарок Т.И., Резунова Г.Д., Козыренко М.М., Артюкова Е.В., Илюшко М.В.** Молекулярные маркеры для сохранения редких видов растений Дальнего Востока // Физиология растений, 1999. – Т. 46, № 6. – С. 953–964.
- Новожилова О.А., Арефьева Л.П., Семихов В.Ф., Прусаков А.Н., Вахромеев В.И.** Исследование проламинов злаков методом SDS-электрофореза // Изв. АН СССР, сер. биол., 1991. – № 6. – С. 928–934.
- Родионенко Г.И.** О самостоятельности рода *Xyridion* (Iridaceae) // Бот. журн., 2005. – Т. 90, № 1. – С. 55–59.
- Родионенко Г.И.** *Eremiris* – новый род семейства Iridaceae // Бот. журн., 2006а. – Т. 91, № 11. – С. 1707–1712.
- Родионенко Г.И.** О самостоятельности рода *Sclerosiphon* (Iridaceae) // Бот. журн., 2006б. – Т. 91, № 12. – С. 1895–1898.
- Родионенко Г.И.** О самостоятельности рода *Limniris* (Iridaceae) // Бот. журн., 2007. – Т. 92, № 4. – С. 547–554.
- Родионенко Г.И.** Новая система рода *Iris* (Iridaceae) // Бот. журн., 2009. – Т. 94, № 3. – С. 423–435.
- Селютин И.Ю., Черкасова Е.С.** Метод SDS-электрофореза для изучения внутривидовой изменчивости запасных белков у редких видов рода *Iris* L. // Труды 3 интеграц. междисциплин. конф. молодых учен. СО РАН и высш. шк. «Научные школы Сибири: взгляд в будущее» (Иркутск, 10–14 октября 2005 г.). – Иркутск, 2005. – С. 294–298.
- Селютин И.Ю., Черкасова Е.С., Дорогина О.В., Доронькин В.М.** Внутривидовая изменчивость запасных белков у редких видов *Iris ensata* и *I. ventricosa* (Iridaceae) // Проблемы изучения растительного покрова Сибири: Материалы III Междунар. конф., посвящ. 120-летию Гербария им. П.Н. Крылова (ТГУ, Томск, 16–18 ноября 2005 г.). – Томск, 2005. – С. 34–35.
- Семихов В.Ф.** Хемосистематика и ее положение в систематике растений // Журн. общ. биол., 1991. – Т. 52, № 5. – С. 635–645.
- Ladizinsky G., Hymowitz T.** Seed protein electrophoresis in taxonomic and evolutionary studies // Theor. Appl. Genet., 1979. – Vol. 54. – P. 145–151.
- Laemmli U.K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature, 1970. – Vol. 227, № 5259. – P. 680–685.
- Wilson C.A.** Subgeneric classification in *Iris* re-examined using chloroplast sequence data // Taxon, 2011. – Vol. 60, № 1. – P. 27–35.