



УДК 575.17:582.651 (571.63)

О.В. Наконечная, О.Г. Корень

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ *ASARUM SIEBOLDII* (ARISTOLOCHIACEAE)
В ПОПУЛЯЦИИ ПРИМОРСКОГО КРАЯ

O.V. Nakonechnaya, O.G. Koren

GENETIC VARIABILITY OF *ASARUM SIEBOLDII* (ARISTOLOCHIACEAE)
IN THE POPULATION OF PRIMORSKY REGION

Наконечная О.В. – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. биотехнологии Биолого-почвенного института ДВО РАН, г. Владивосток. E-mail: markelova@biosoil.ru

Корень О.Г. – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. биотехнологии Биолого-почвенного института ДВО РАН, г. Владивосток. E-mail: koren@ibss.dvo.ru

Nakonechnaya O.V. – Cand. Biol. Sci., Senior Staff Scientist, Lab. of Biotechnology, Biology and Soil Institute, FEB RAS, Vladivostok. E-mail: markelova@biosoil.ru

Koren O.G. – Cand. Biol. Sci., Leading Staff Scientist, Lab. of Biotechnology, Biology and Soil Institute, FEB RAS, Vladivostok. E-mail: koren@ibss.dvo.ru

Asarum sieboldii Miq. (Aristolochiaceae) – копытень Зибольда, низкое травянистое многолетнее растение, является компонентом реликтовых комплексов растительности современных рефугиумов Северо-Восточной Азии. В России вид встречается на юге Приморского края и о. Сахалин, произрастает в Китае, на Корейском п-ове и в Японии. Вид обладает лекарственными свойствами; немногочисленен, на российском Дальнем Востоке сбор даже 1 т затруднен. С помощью аллозимных маркеров исследована генетическая изменчивость в природной популяции *A. sieboldii* в Приморском крае. Поскольку данные для изученного вида приводятся впервые, дано описание фенотипов. В ходе анализа 6 ферментов идентифицировано 11 мономорфных локусов (*Idh*, *Lap*, *6-Pgd*, *Gdh-1*, *Gdh-2*, *Acp-1*, *Acp-2*, *Mdh-1*, *Mdh-2*, *Mdh-3*, *Mdh-4*) и 11 аллелей. Семь локусов, выявленных у *A. sieboldii*, совпадают по подвижности с аналогичными локусами представителей сем. Aristolochiaceae. Выявленные локусы *A. sieboldii* не имели изменчивости. Основные показатели полиморфизма (полиморф-

ность, наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготности) равны нулю, число аллелей на локус – 1. Для других видов рода *Asarum* ранее приведены невысокие показатели полиморфизма. Отсутствие аллозимной изменчивости *A. sieboldii*, вероятно, связано с историей существования вида. Наличие самоопыления у цветков, а также вегетативное размножение, характерное для вида, способствуют появлению особей с идентичным генотипом. Редкие события перекрестного опыления у особей с единым генотипом не могут повлиять на уровень изменчивости в данной популяции. Муравьи, как вероятные агенты по переноске семян, также не способны обеспечить их перенос на значительные расстояния.

Ключевые слова: генетическая изменчивость, *Asarum sieboldii*, лекарственный вид, Приморский край.

Asarum sieboldii Miq. (Aristolochiaceae), *Asarum* of Zibold is a low grassy perennial plant, a component of relic complexes of vegetation of modern refugium of Northeast Asia. In Russia the

kind is met in the south of Primorsky Region and Sakhalin Island, grows in China, on the Korean peninsula and in Japan. The kind possesses medicinal properties; not numerous in Russian Far East collecting it even is complicated by 1 t. By means of allozyme markers genetic variability in natural population of *A. sieboldii* in Primorsky Region was investigated. As data for the studied kind were provided for the first time, the description of phenotypes was given. During the analysis of 6 enzymes 11 monomorphic loci (*Idh*, *Lap*, *6-Pgd*, *Gdh-1*, *Gdh-2*, *Acp-1*, *Acp-2*, *Mdh-1*, *Mdh-2*, *Mdh-3*, *Mdh-4*) and 11 alleles were identified. Seven loci revealed at *A. sieboldii* coincided in mobility with similar loci of representatives this. *Aristolochiaceae*. The revealed *A. loci. sieboldii* had no variability. The main indicators of polymorphism (the polymorphism observed and expected heterozygotes) were equal to zero, the number of alleles in a locus was 1. For other types of the sort *Asarum* low indicators of polymorphism were given earlier. The lack of allozyme variability of *A. sieboldii* was probably connected with the history of existence of the kind. The existence of self-pollination in flowers, and also vegetative reproduction, characteristic for appearance, promote emergence of individuals with identical genotype. Rare events of cross-pollination in individuals with a uniform genotype cannot affect variability level in this population. Ants as probable agents in carrying seeds are also not capable of providing their transfer on considerable distances.

Keywords: genetic variability, *Asarum sieboldii*, medicinal species, Primorsky Region.

Введение. *Asarum sieboldii* Miq. (*Aristolochiaceae*) – копытень Зибольда, низкое травянистое растение. Его китайское название – Hsi-hsing; в Мукденской провинции он известен под именем «дикий, или горный женьшень» [1]. В России вид встречается на юге Приморского края и о. Сахалин, а за ее пределами произрастает в Китае, на Корейском п-ове и в Японии. Копытень встречается в хвойных и смешанных лесах в кустарниковых зарослях [2], является компонентом редких сообществ; на российском Дальнем Востоке сбор даже 1 т затруднен [3].

Вид обладает лекарственными свойствами, входит в японскую фармакопею. Корневища обладают профилактическим и лечебным дейст-

вием при сверхвысокочастотном поражении. Его используют в народной медицине для лечения лейкозов и опухолей любых локализаций, при болезнях десен. В китайской медицине корневища применяют в качестве мочегонного, противоглистного, потогонного, жаропонижающего, рвотного, слабительного и улучшающего пищеварение средства; также при ревматизме, параличе и коликах. Порошок рекомендуют как седативное средство, при болезнях печени и в качестве ранозаживляющего средства. Корневища корейцы используют для лечения плеврита и пневмонии [3]; при гриппе, респираторных инфекциях, бронхите, при бронхиальной астме, что подтверждено в клинике [4]. Он относится к ядовитым растениям, поскольку при внутреннем употреблении вызывает острое воспаление желудочно-кишечного тракта, может вызвать аборт [5].

Ранее для видов рода *Asarum* были опубликованы исследования, посвященные изучению их филогенетических отношений на основе морфологических параметров и генетических маркеров (ITS) [6, 7]. Между тем данные с использованием изоферментов для характеристики представителей *Asarum* малочислены и приведены только для четырех видов рода, произрастающих в Южной Корее: *A. maculatum* Nakai, *A. patens* (Yamaki) Y.N. Lee, *A. sieboldii* [8] и *A. misandrum* B.U. Oh & J.G. Kim [9]. Описание генетических маркеров *A. sieboldii*, встречающегося на территории Российской Федерации, не дано. Учитывая все вышеприведенные доводы, полагаем, что исследование *A. sieboldii* в России актуально.

Цель исследования: выявить уровень генетического разнообразия лекарственного растения *A. sieboldii* в природной популяции Приморского края методом аллозимного анализа и сравнить полученные результаты с данными, приведенными для видов рода *Asarum*.

Работа является продолжением многолетнего исследования представителей сем. *Aristolochiaceae* [10–12].

Материалы и методы. *Asarum sieboldii* – многолетнее корневищное растение, 5–10 см высотой. Листья расположены парами, сердцевидные, 4–9 см дл., 5–15 см шир.; черешки 5–15 см дл. Цветки одиночные. Околоцветник простой, зеленый или пурпурный. Завязь полуниж-

няя. Плод – коробочка, до 1,5 см дл., 1,2 (2) см шир. Семена – 3–3,5 мм дл. и около 1,5 мм шир., многочисленные, бурые, с вдавленным швом и расположенным в нем мясистым придатком (элайосома), превышающим по длине семя [1, 2].

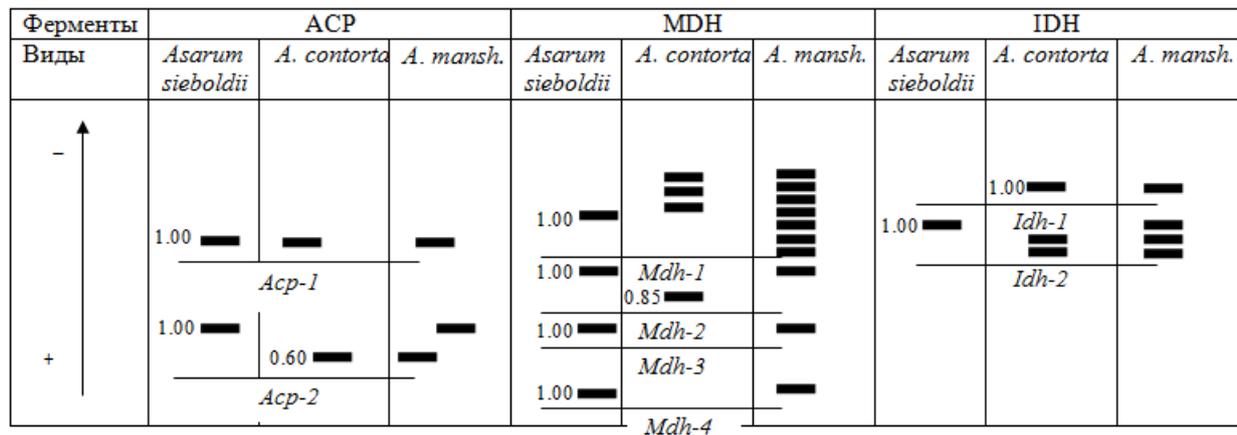
Для проведения анализа *A. sieboldii* служили замороженные в жидком азоте листья 30 растений, собранных в 2003 г. в природной популяции, приуроченной к бассейну реки Малая Борисовка (Приморский край, Россия). Листья брали с растений, отделенных друг от друга расстоянием около 70 м.

Листья гомогенизировали в 200 мкл экстрагирующего раствора (1 % PVP-40, 1 % сахарозы, 1% β-меркаптоэтанола в дистиллированной воде). Электрофорез проводили в горизонтальном 13 % крахмальном геле с добавлением 10 % сахарозы, в буферной трис-HCl (pH 8,0) системе. Гистохимическое окрашивание зон ферментной активности выполняли по стандартным методикам [13]. Были исследованы следующие ферментные системы: глутаматдегидрогеназа (GDH, 1.4.1.2), изоцитратдегидрогеназа (IDH, 1.1.1.42.), кислая фосфатаза (ACP, 3.1.3.2.), лейцинаминопептидаза (LAP, 3.4.11.1), малатдегидрогеназа (MDH, 1.1.1.37.), 6-фосфоглюконатдегидрогеназа (6-PGD, 1.1.1.44). Для сравнительного описания подвижности аллелей использовали данные по *Aristolochia manshuriensis* Kom. и *A. contorta* Bunge (Aristolochiaceae), полученные ранее [14, 15].

Результаты исследования и их обсуждение. В ходе электрофоретического анализа 6 ферментов *A. sieboldii* было обнаружено, что одним локусом представлены ферментные системы IDH, LAP, 6-PGD, двумя – GDH; тремя – ACP, четыре зоны выявлены для MDH. IDH *A. sieboldii*, вероятно, находится под контролем мономорфного локуса *Idh*, совпадающего по подвижности с самой быстрой фракцией локуса *Idh-2* у *A. manshuriensis* (рис.). LAP *A. sieboldii* представлена продуктами мономорфного локуса *Lap*. У *A. contorta* локус *Lap* полиморфный с 4 аллелями. 6-PGD *A. sieboldii*, вероятно, проявляется одним мономорфным локусом. Для

A. misandrum приведены два локуса 6-Pgd, при этом один из них полиморфный [9]. Два локуса 6-Pgd-1 и 6-Pgd-2 ранее выявлены у *A. contorta*. ACP *A. sieboldii*, вероятно, представлена тремя зонами активностями, но наименее подвижная зона была плохо различима и в работе не учитывалась. Самая быстрая и средняя по подвижности зоны, предположительно, контролируемые мономорфными локусами *Acp-1* и *Acp-2*, совпадают по подвижности с аналогичными зонами у *A. manshuriensis*. При этом зона ACP-2 *A. sieboldii* соответствует *Acp-2*^{1.00} *A. manshuriensis* (см. рис.). GDH *A. sieboldii* представлена продуктами двух, предположительно, мономорфных локусов *Gdh-1* и *Gdh-2*. *Mdh-1* *A. sieboldii* проявляется белком, расположенным в середине зоны MDH-1 *A. manshuriensis*, представленной семью фракциями, продуктами мономорфного локуса *Mdh-1*. У *A. contorta* зона MDH-1 выявляется тремя фракциями и также совпадает по подвижности с аналогичной зоной *A. manshuriensis*. Локусы *Mdh-2*, *Mdh-3*, *Mdh-4* *A. sieboldii* совпадают по подвижности с тремя мономорфными локусами (*Mdh-2*, *Mdh-3*, *Mdh-4*), отмеченными ранее для *A. manshuriensis*, и локусами (*Mdh-2* и *Mdh-4*) *A. contorta* (см. рис.). Всего у *A. sieboldii* идентифицировано 11 мономорфных локусов и 11 аллелей. Семь локусов, выявленных у *A. sieboldii*, совпадают по подвижности с аналогичными локусами представителей семейства. Для выявления общности локусов для всех представителей семейства необходимы дополнительные исследования.

У *A. sieboldii* основные показатели полиморфизма (P, He, Ho) равны нулю, число аллелей на локус (A) – 1. Интересно отметить, что для *A. sieboldii*, *A. maculatum* и *A. patens*, произрастающих на территории Кореи, приведены более значимые показатели (A=1,2, P=16,3; A=1,21, P=19,2 и A=1,08, P=7,7 соответственно) [8]. У *A. misandrum* выявлены высокие показатели полиморфизма (A=2,05, P=71,4, He=0,294). Это авторы связывают с событиями перекрестного опыления, которое предполагают у *A. misandrum* [9].



Схематическое изображение электрофоретических вариантов трех ферментов в листьях *Asarum sieboldii*, *Aristolochia contorta* и *A. manshuriensis*

У редких и эндемичных видов экстремально низкий или отсутствующий уровень изменчивости часто связан с историей существования вида, с прохождением через «бутылочное горлышко», когда численность популяции падает вследствие каких-либо причин, а восстановление популяции идет из ограниченного количества сохранившихся особей. Определенное влияние может оказывать другой процесс – эффект основателя, когда формирование новой популяции происходит также из ограниченного числа «переселенцев», например, при размножении семенами. Биологические особенности вида, такие как система скрещивания (преобладание само- или перекрестного опыления), использование апомиксиса или другого способа бесполого размножения для поддержания численности, способность вида к распространению пыльцы и семян являются важными аспектами, каждый из которых может вносить определенный вклад в формирование и поддержание уровня изменчивости.

Интересно отметить, что местность (Борисовское плато), где произрастает исследованная популяция *A. sieboldii*, находится под охраной российских военных частей и ранее не подвергалась глобальным изменениям, следы пожаров на территории нами не обнаружены. Поэтому события «бутылочного горлышка», вероятно, не оказали значимого влияния на уровень изменчивости в популяции *A. sieboldii*. Но «эффект основателя», когда популяция разрастается из нескольких особей, вполне мог отразиться

и сформировать изначально невысокий уровень изменчивости.

Ранее для *A. sieboldii* была отмечена преимущественно автогамия [16]. Такой способ опыления имеет направление на снижение генетического разнообразия и гетерозиготности внутри популяции по сравнению со смешанной формой опыления или перекрестноопыляемыми видами [17]. Цветки другого представителя рода *A. misandrum*, вероятно, тоже являются самосовместимыми, но имеют зависимость от внешних опылителей, и эти факторы способствуют формированию высокого уровня генетического разнообразия, отмеченного в популяциях [9]. В случае *A. sieboldii*, несмотря на то, что цветок имеет приспособления для перекрестного опыления (протогиния, окраска строения околоцветника, неодновременное раскрытие пыльников), события перекрестного опыления, вероятно, крайне редки.

Семенной способ размножения ранее отмечен для *A. sieboldii* [18]. Семена *A. sieboldii*, также как у других видов рода, имеют элайсомы, что, вероятно, привлекает муравьев, участвующих в распространении семян [19]. Плоды *A. sieboldii* расположены в зоне лесной подстилки, при созревании немного растрескиваются, и небольшая часть семян высыпается на землю. То есть семена остаются рядом с материнским растением и находятся на земле. Здесь или муравьи, или потоки воды во время дождя могли бы быть агентами по переноске семян на новые территории.

Другой способ размножения *A. sieboldii* – вегетативный, характерный также для других видов рода, например, *A. europaeum* [18], *A. canadense* [20]. Интересен факт, отмеченный для представителей рода *Asarum*. Показано, что генеты *A. canadense* потенциально почти «вечные». Так, для смоделированных 2000 генет возраст составил 104 г., жизнь отдельной генеты – от 3 до 4,8 лет [20]. Следовательно, за 100 лет существования клоновой особи ее общий генотипический вариант может растиражироваться в десятки раз, перенося, хоть и медленно, с помощью семян такой вариант на значительные расстояния и занимая при этом новые территории.

Выводы. Таким образом, выявленный уровень изменчивости в исследованной популяции *A. sieboldii* первоначально, вероятно, связан с «эффектом основателя», впоследствии при наличии самоопыления был снижен до полного отсутствия, а вегетативное размножение закрепило полученный результат и многократно повторяет, сохраняя определенную численность популяции. Необходимы дальнейшие исследования природных популяций, а также уточнение аспектов репродуктивной биологии, для более детального заключения.

Работа поддержана проектом РАН № 15-1-6-030.

Литература

1. Иванова Н.А. Пор. Аристолохиецветные *Aristolochiales* Lindl. // Флора СССР. М.; Л., 1936. – Т. 5. – С. 431–442.
2. Харкевич С.С. Сем. *Aristolochiaceae* // Сосудистые растения советского Дальнего Востока. – Л., 1987. – Т. 2. – С. 19–21.
3. Шретер А.И. Лекарственная флора советского Дальнего Востока. – М., 1975. – 327 с.
4. Растительные ресурсы России и сопредельных государств. – СПб., 1996. – Ч. 1. – С. 103–104.
5. Фруентов Н.К., Кадаев Г.Н. Ядовитые растения. Медицинская токсикология растений Дальнего Востока. – Хабаровск, 1971. – 256 с.
6. Kelly L.M. Phylogenetic relationships in *Asarum* (*Aristolochiaceae*) based on morphology and ITS sequences // *Am. J. Bot.* – 1998. – V. 85, № 10. – P. 1454–1467.
7. Sinn B.T., Kelly L.M., Freudenstein J.V. Phylogenetic relationships in *Asarum*: effect of data partitioning and a revised classification // *Am. J. Bot.* – 2015. – V. 102, № 5. – P. 765–779.
8. Yamaji H., Yokoyama J., Pak J.H., Maki M. No genetic differentiation between *Asarum maculatum* and *A. sieboldii* var. *sieboldii* (*Aristolochiaceae*) in Korea // *Acta Phytotax. Geobot.* 2004. – V. 55, № 3. – P. 199–205.
9. So S., Kim M. Genetic variation and population structure of *Asarum misandrum* (*Aristolochiaceae*) in Korea // *Korean Journal of Plant Taxonomy.* – 2013. – V. 43, № 3. – P. 181–187.
10. Наконечная О.В., Нечаев В.А., Холина А.Б. Характеристика местообитаний кирказона скрученного *Aristolochia contorta* Bunge в Приморье // *Вестн. КрасГАУ.* – 2010. – № 12. – С. 35–41.
11. Наконечная О.В., Корень О.Г. Аллозимная изменчивость двух возрастных состояний кирказона маньчжурского (*Aristolochia manshuriensis*) в природных популяциях // *Вестн. КрасГАУ.* – 2011. – № 10. – С. 65–69.
12. Наконечная О.В., Нестерова С.В. Примитивные признаки и адаптации реликтовой лианы *Aristolochia manshuriensis* // *Вестн. КрасГАУ.* – 2013. – № 1. – С. 40–47.
13. Левитес Е.В. Генетика изоферментов растений. – Новосибирск, 1986. – 144 с.
14. Nakonechnaya O.V., Koren O.G., Zhuravlev Yu.N. Allozyme variation of the relict plant *Aristolochia manshuriensis* Kom. (*Aristolochiaceae*) // *Rus. J. Genetics.* – 2007. – V. 43, № 2. – P. 217–226.
15. Nakonechnaya O.V., Kholina A.B., Koren O.G. et al. Genetic diversity of rare species of *Aristolochia contorta* Bunge (*Aristolochiaceae*) in Primorsky Krai // *Rus. J. Genetics.* – 2012. – V. 48, № 2. – P. 152–162.
16. Yamaji H., Fukuda T., Yokoyama J. et al. Reticulate evolution and phylogeography in *Asarum* sect. *Asiasarum* (*Aristolochiaceae*) documented in internal transcribed spacer sequences (ITS) of nuclear ribosomal DNA // *Mol. Phylogenet. Evol.* – 2007. – V. 44, № 2. – P. 863–884.
17. Hamrick J.L., Godt M.J.W. Allozyme diversity in plant species // *Plant population genetics,*

- breeding and genetic resources. – Massachusetts, 1989. – P. 43–63.
18. Каприсонова Р.А., Былов В.Н. Травянистые растения широколиственных лесов СССР. – М., 1985. – 208 с.
 19. Hou D. *Aristolohiaceae* // Flora Malesiana. – 1984. – V. 10. – P. 53–108.
 20. Damman H., Cain M.L. Population growth and viability analyses of the clonal woodland herb, *Asarum canadense* // J. Ecol. – 1998. – V. 86, № 1. – P. 13–26.
 10. Nakonechnaja O.V., Nechaev V.A., Holina A.B. Charakteristika mestoobitanij kirkazona skruchennogo *Aristolochia contorta* Bunge v Primor'e // Vestn. KrasGAU. – 2010. – № 12. – S. 35–41.
 11. Nakonechnaja O.V., Koren' O.G. Allozimnaja izmenchivost' dvuh vozrastnyh sostojanij kirkazona man'chzhurskogo (*Aristolochia manshuriensis*) v prirodnyh populjacijah // Vestn. KrasGAU. – 2011. – № 10. – S. 65–69.
 12. Nakonechnaja O.V., Nesterova S.V. Primitivnye priznaki i adaptacii reliktovoj liany *Aristolochia manshuriensis* // Vestn. KrasGAU. – 2013. – № 1. – S. 40–47.

Literatura

1. Ivanova N.A. Por. *Aristolohiecvetnye Aristolochiales* Lindl. // Flora SSSR. M.; L., 1936. – T. 5. – S. 431–442.
2. Harkevich S.S. Sem. *Aristolohiaceae* // Sosudistye rastenija sovetskogo Dal'nego Vostoka. – L., 1987. – T. 2. – S. 19–21.
3. Shreter A.I. Lekarstvennaja flora sovetskogo Dal'nego Vostoka. – M., 1975. – 327 s.
4. Rastitel'nye resursy Rossii i sopredel'nyh gosudarstv. – SPb., 1996. – Ch. 1. – S. 103–104.
5. Fruentov N.K., Kadaev G.N. Jadovitye rastenija. Medicinskaja toksikologija rastenij Dal'nego Vostoka. – Habarovsk, 1971. – 256 s.
6. Kelly L.M. Phylogenetic relationships in *Asarum* (*Aristolohiaceae*) based on morphology and ITS sequences // Am. J. Bot. – 1998. – V. 85, № 10. – P. 1454–1467.
7. Sinn B.T., Kelly L.M., Freudenstein J.V. Phylogenetic relationships in *Asarum*: effect of data partitioning and a revised classification // Am. J. Bot. – 2015. – V. 102, № 5. – P. 765–779.
8. Yamaji H., Yokoyama J., Pak J.H., Maki M. No genetic differentiation between *Asarum maculatum* and *A. sieboldii* var. *sieboldii* (*Aristolohiaceae*) in Korea // Acta Phytotax. Geobot. 2004. – V. 55, № 3. – P. 199–205.
9. So S., Kim M. Genetic variation and population structure of *Asarum misandrum* (*Aristolohiaceae*) in Korea // Korean Journal of Plant Taxonomy. – 2013. – V. 43, № 3. – P. 181–187.
13. Levites E.V. Genetika izofermentov rastenij. – Novosibirsk, 1986. – 144 s.
14. Nakonechnaja O.V., Koren O.G., Zhuravlev Yu.N. Allozyme variation of the relict plant *Aristolochia manshuriensis* Kom. (*Aristolohiaceae*) // Rus. J. Genetics. – 2007. – V. 43, № 2. – P. 217–226.
15. Nakonechnaja O.V., Kholina A.B., Koren O.G. et al. Genetic diversity of rare species of *Aristolochia contorta* Bunge (*Aristolohiaceae*) in Primorsky Krai // Rus. J. Genetics. – 2012. – V. 48, № 2. – P. 152–162.
16. Yamaji H., Fukuda T., Yokoyama J. et al. Reticulate evolution and phylogeography in *Asarum* sect. *Asiasarum* (*Aristolohiaceae*) documented in internal transcribed spacer sequences (ITS) of nuclear ribosomal DNA // Mol. Phylogenet. Evol. – 2007. – V. 44, № 2. – P. 863–884.
17. Hamrick J.L., Godt M.J.W. Allozyme diversity in plant species // Plant population genetics, breeding and genetic resources. – Massachusetts, 1989. – P. 43–63.
18. Kaprisonova R.A., Bylov V.N. Travjanistye rastenija širokolistvennyh lesov SSSR. – M., 1985. – 208 s.
19. Hou D. *Aristolohiaceae* // Flora Malesiana. – 1984. – V. 10. – P. 53–108.
20. Damman H., Cain M.L. Population growth and viability analyses of the clonal woodland herb, *Asarum canadense* // J. Ecol. – 1998. – V. 86, № 1. – P. 13–26.