

СТАТЬЯ

УДК 574.21

DOI 10.17513/use.38302

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА
У БЕЛОГО КЛЕВЕРА (*TRIFOLIUM REPENS L.*)
В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УСЛОВИЙ ПРОИЗРАСТАНИЯ****Шишлова М.А., Быковская Н.В.***ФГАОУ ВО Дальневосточный федеральный университет (Школа педагогики), Владивосток,
e-mail: shishlova1@rambler.ru*

Показана целесообразность использования белого клевера (*Trifolium repens L.*) в качестве биоиндикатора загрязнения территории. Был проведен анализ взаимосвязи фенотипического разнообразия растений *Trifolium repens L.* и степени антропогенной нагрузки на территории. Путем изучения частоты встречаемости отдельных фенотипов клевера белого ползучего в популяциях был изучен морфогенетический полиморфизм гена V, который отвечает за формирование белого рисунка на листьях. Колебания в частотах установили для таких фенотипов, как: «пятно отсутствует», «полное пятно», «разорванное пятно», «разорванное высокое пятно», «центральная верхняя точка», «большое сплошное пятно у основания», «низкое треугольное пятно у основания». Исследования проводились более 20 лет на территории городского парка г. Уссурийска Приморского края. В статье проведен сравнительный анализ фенотипического разнообразия у белого клевера во временной промежутке 10 лет. Полученные данные свидетельствуют о потенциале используемого метода для мониторинга качества окружающей среды и его значимости для оценки уровня антропогенного воздействия на экосистему. Полученные и обработанные результаты имеют практическое значение в области популяционной генетики. Фактический материал может быть использован не только на занятиях по дисциплине «Генетика» у студентов, но и на уроках биологии в средней школе в разделе «Общая биология» в теме «Генетика».

Ключевые слова: генетика, полиморфизм, множественный аллелизм, «седые» пятна у белого клевера, антропогенная нагрузка

**POLYMORPHISM STUDY
IN WHITE CLOVER (*TRIFOLIUM REPENS L.*)
DEPENDING ON THE GROWING CONDITIONS****Shishlova M.A., Bykovskaya N.V.***School of Education Far Eastern Federal University, Vladivostok, e-mail: shishlova1@rambler.ru*

The expediency of using white clover (*Trifolium repens L.*) as a bioindicator of pollution of the territory is shown. The analysis of the relationship between the phenotypic diversity of *Trifolium repens L.* plants and the degree of anthropogenic load on the territory was carried out. By studying the frequency of occurrence of individual phenotypes of white creeper clover in populations, the morphogenetic polymorphism of gene V, which is responsible for the formation of a white pattern on leaves, was studied. Frequency fluctuations were established for such phenotypes as: «no spot», «full spot», «torn spot», «torn high spot», «central upper point», «large solid spot at the base», «low triangular spot at the base». The research has been conducted for more than 20 years on the territory of the city park of Ussuriysk, Primorsky Krai. The article provides a comparative analysis of the phenotypic diversity of white clover in a time period of 10 years. The data obtained indicate the potential of the method used to monitor environmental quality and its importance for assessing the level of anthropogenic impact on the ecosystem. The results obtained and processed are of practical importance in the field of population genetics. The actual material can be used not only in classes on «Genetics» for students, but also in biology lessons in high school in the section «General Biology» in the topic «Genetics».

Keywords: polymorphism, multiple allelism, «gray» spots in white clover, anthropogenic load

Введение

Клевер белый (*Trifolium repens L.*) с его разнообразием фенотипов является отличным индикатором изменений в окружающей среде под воздействием антропогенных факторов. Этот вид растений не только отражает наличие мутаций в своих генах, но и оценивает мутагенную активность почвы, на которой он растет. Исследования в этой области помогают не только контролировать состояние экосистем, но и принимать меры по их восстановлению [1, 2].

Клевер белый для Приморского края является заносным одичавшим растением, которое растет на лугах, лесных опушках, по дорогам, берегам рек, у жилья. Относится к влаголюбивым растениям, хорошо растет при достаточном и даже обильном увлажнении [3].

В течение многих лет выполняется исследование полиморфизма по «седым» пятнам у белого клевера в популяциях г. Уссурийска и Приморского края [4]. Авторами была разработана лабораторная работа «Изучение множественного аллелизма по “седым”

пятнам у клевера белого» с использованием исследовательского метода для студентов биологического направления.

Множественный аллелизм представляет собой одно из главных явлений в наследственной изменчивости организма. Разнообразные состояния одного гена возникают в результате мутаций. Поскольку у диплоидных организмов может быть только две аллели из серии множественных аллелей, то в значительной степени увеличивается комбинативная изменчивость организмов. В основе генетического полиморфизма лежит множественный аллелизм, который является неотъемлемым механизмом генетического гомеостаза популяций. В результате популяционный генофонд характеризуется целостностью и сбалансированностью.

Целью исследования стало изучение фенотипического разнообразия в популяциях белого клевера.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

- 1) ознакомиться с явлением множественного аллелизма, наследованием в серии множественных аллелей;
- 2) изучить полиморфизм по «седым» пятнам у белого клевера;
- 3) определить фенотипическое разнообразие популяции белого клевера в городском парке «Зелёный остров» в г. Уссурийске Приморского края;
- 4) сравнить фенотипическую структуру популяции белого клевера в парке «Зелёный остров» в г. Уссурийске в 2013 г. и в 2023 г.

Материалы и методы исследования

Известно, что полиморфизм – одновременное существование в популяции двух и более резко отличающихся типов организмов. Полиморфизм имеет генетическую основу (генный, хромосомный, внеядерный). Одним из базовых механизмов генетического полиморфизма является множественный аллелизм.

Мутацией определяется переход гена из одного аллельного состояния в другое. Если исходная нормальная аллель A мутирует в рецессивную аллель a , имеет место прямая мутация. В том случае, когда мутантная аллель a превращается в исходную нормальную аллель A , происходит явление обратных мутаций. Однако, как показало исследование генетики аллелей, процесс их мутирования отнюдь не ограничивается взаимопревращением A в a ($A \rightarrow a$, $a \rightarrow A$). Было выяснено, что мутации могут давать целый ряд разных состояний этого гена (A^1 , A^2 , A^3 , A^4 ...и т.д. и a^1 , a^2 , a^3 , a^4 ...и т.д.) –

серию множественных аллелей [5]. Множественный аллелизм – это наличие трех и более аллельных состояний гена. Компаундом называют комбинацию в гетерозиготе двух разных аллелей из набора множественных аллелей. В компаунде одна аллель может доминировать над другой или они могут быть кодоминантны. В ряду аллелей устанавливают и указывают, какая аллель над какой аллелью доминирует [6].

Явление множественного аллелизма встречается в природе и увеличивает полиморфизм популяций, тем самым играет свою роль в процессе эволюции.

У растений по принципу множественного аллелизма функционирует механизм самонесовместимости при опылении. При этом пыльца не может прорасти на рыльцах цветков конкретных генотипов. Гаметофитная самонесовместимость известна у более 10 тысяч покрытосеменных растений и обусловлена генами пыльцевых зерен. Данная система несовместимости определяется у многих растений серией множественных аллелей гена S , (S^1 , S^2 , S^3 , S^4 , S^5 , S^6 и т.д.) – даже до нескольких сотен у некоторых цветковых растений. Механизм несовместимости работает так: у диплоидных клеток пестика в наличии две аллели из серии; а в гаплоидных пыльцевых зернах в наличии одна аллель гена S . Если в клетках пестика и в пыльцевом зерне содержится одинаковая аллель, то формирование пыльцевой трубки не происходит [7; 8, с. 51].

Множественный аллелизм по гену белоглазия наблюдается и у плодовой мушки. Мушка дрозофила имеет ген белоглазия (*white*), множественные мутации которого определяют разный цвет глаз в гомозиготе и в гетерозиготе с различной комбинацией мутантных аллелей. Вот некоторые из мутантных аллелей *white*:

- w^{co} – коралловый цвет глаз;
- w^{bl} – кровавый;
- w^e – эозиновый;
- w^{ch} – вишневый;
- w^a – абрикосовый;
- w^h – медовый;
- w^{bf} – темно-желтый;
- w^t – слабоокрашенный;
- w^p – пурпурный;
- w^i – слоновая кость;
- w – белый [8, с. 424].

У многих млекопитающих ген C (*color*) имеет серии аллелей, например у кроликов:

C – дикий тип, c^{ch} – шиншиллово-окраска, c^h – гималайская окраска, c^a – альбинос [8, с. 425].

Множественный аллелизм по группам крови наблюдается у животных и человека. Так, по механизму множественных аллелей наследуются 4 группы крови в системе АВО у людей.

Ген *I* в системе АВО имеет три различных состояния: I^A , I^B , I^o . Две аллели I^A , I^B доминируют над третьей аллелью I^o , но по отношению друг к другу они равноценны, кодоминантны, обе проявляются фенотипически у гетерозиготы $I^A I^B$. Различные генотипы по гену *I* детерминируют 4 группы крови: I (O) группа – генотип $I^o I^o$, II (A) группа – генотипы $I^A I^A$ или $I^A I^o$, III (B) группа – генотипы $I^B I^B$ или $I^B I^o$, IV (AB) – генотип $I^A I^B$ [8, с. 427].

У клевера белого, или ползучего (*Trifolium repens* L.) выявлен генетический полиморфизм по показателю наличия или отсутствия «седого» пятна (называют также светлым, белым пятном) на простых листиках в тройчатом листе, по особой конфигурации пятна. На непохожесть листьев по «седому» пятну влияет серия множественных аллелей гена *V*, а именно:

- V – полное пятно;
- V^H – полное высокое пятно;
- V^B – разорванное пятно;
- V^{BH} – разорванное высокое пятно;
- V^P – центральная верхняя точка;
- V^F – большое сплошное пятно у основания;
- V^L – низкое треугольное пятно у основания;
- v – пятно отсутствует.

Выделяют 11 или больше аллелей данного гена. Кроме 8 общепринятых, авторами учитывается V^M – m-образное пятно. В «седом» рисунке можно увидеть доминирование одной из аллелей в компаунде, у некоторых гетерозигот – кодоминирование. Все аллели доминантны по отношению к рецессивной аллели v .

В гистологических исследованиях было установлено, что проявление белого рисунка обусловлено появлением палисадных клеток с небольшим количеством хлоропластов или их отсутствием. Получается, что палисадные клетки уменьшаются в объеме в области рисунка, вытягиваются меньше, межклеточное пространство оказывается больше, чем в зеленой части листа. У других видов клевера есть белые пятна, как у клевера красного, у которого меньше число вариантов пятен. Установлено, что у клевера красного возникновение светлого рисунка зависит от неодинаковой скорости роста палисадных и эпидермальных кле-

ток. В результате палисадные клетки больше подвергаются воздействию солнечного излучения, которое вызывает разрушение хлорофилла [6].

Результаты исследования и их обсуждение

Для изучения полиморфизма рисунка листьев клевера авторы провели сбор материала в популяции на поле в парке «Зелёный остров» в г. Уссурийске в 2023 г. Собирали по одному тройчатому листу с каждого из тысячи растений, далее листья высушивали и наклеивали на гербарную бумагу. Листья клевера пронумеровывали и определяли рисунок на каждом листе. А также использовали гербарные материалы студенческих сборов за 2013 г. Затем провели анализ соотношения разных фенотипов в серии множественных аллелей гена *V*.

Непосредственно можно видеть только фенотипы, а не генотипы или гены. Генетическую изменчивость определенных популяций чаще всего предпочтительнее выявлять, используя частоты аллелей, а не генотипов, потому что несхожих аллелей чаще всего гораздо меньше, следовательно, генотипов больше. Количество генотипов определяли по формуле:

$$\frac{n(n+1)}{2},$$

где n – число встретившихся в выборке аллелей. Число гомозиготных генотипов соответствует n .

Для расчета числа гетерозиготных генотипов использовали формулу [9, с. 99]:

$$\frac{n(n-1)}{2}.$$

При статистической обработке данных применяли критерий Стьюдента. Для выведения статистической ошибки использовали общепринятую формулу [9, с. 99].

Количество различных аллелей гена *V* в популяции в парке в 2023 г. составляет 9, следовательно, в данной популяции

число разных генотипов: $\frac{9(9+1)}{2} = 45,$

число гетерозиготных генотипов: $\frac{9(9-1)}{2} = 36,$
гомозиготных генотипов: 9.

Проследим динамику полиморфизма в популяции белого клевера на поле в городском парке «Зелёный остров» в г. Уссурийске от 2013 г. к 2023 г. (таблица).

Частота фенотипов с разными «седыми» пятнами в популяции белого клевера на поле в парке «Зелёный остров» в г. Уссурийске в 2013 г. и 2023 г., %

Фенотип	Популяция 2013 г.	Популяция 2023 г.
Пятно отсутствует	9,4±0,9	3,7±0,6
Полное пятно	36,4±1,5	49,6±1,6
Полное высокое пятно	9,6±0,9	9,7±0,9
Разорванное пятно	1,4±0,4	3,7±0,6
Разорванное высокое пятно	0,3±0,2	1,8±0,4
Центральная верхняя точка	32,8±1,5	16,4±1,2
Большое сплошное пятно у основания	0	4,1±0,6
Низкое треугольное пятно у основания	0,2±0,1	0,6±0,2
m-образное пятно	9,9±0,9	10,4±1,0

Примечание: «—» – значения, отличающиеся между выборками 2013 г. и 2023 г. по критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

В эти годы наиболее часто встречаются такие фены, как: «полное пятно», «центральная верхняя точка» (таблица).

В 2013 г. отсутствует «большое сплошное пятно у основания».

Наибольшее разнообразие фенов авторы установили в 2023 г. – 9. Меньшее количество фенов обнаружили в 2013 г. – 8 (таблица).

Колебания в частотах установили для таких фенов, как: «пятно отсутствует», «полное пятно», «разорванное пятно», «разорванное высокое пятно», «центральная верхняя точка», «большое сплошное пятно у основания», «низкое треугольное пятно у основания».

Редко встречающимися являются «низкое треугольное пятно у основания» и «большое сплошное пятно у основания». Растения клевера с этими пятнами имеют больше клеток, лишенных хлорофилла, следовательно, такие растения менее жизнеспособны по сравнению с другими.

Итак, полиморфизм по признаку «наличие/отсутствие» «седого» пятна сохраняется в течение 10 лет в популяции на поле в парке «Зелёный остров» в г. Уссурийске.

Выводы современного исследования подтверждаются результатами ранее проводившегося исследования полиморфизма в популяции в парке «Зелёный остров» в 2001 г. в Уссурийске [4].

Ряд исследователей предлагают использовать полиморфизм по белым рисункам на листьях у *Trifolium repens*, базирующийся на множественном аллелизме гена *V*, для биоиндикации загрязнения на территориях произрастания [10, 11]. Предположительно, что на урбанизированных территориях мутагенное действие поллютантов вызывает

увеличение количества исследуемых фенов в популяциях *Trifolium repens*. Следовательно, фенетический полиморфизм у белого клевера можно использовать для оценки загрязнения окружающей среды [12, 13].

Выводы

В результате проведенной работы авторы пришли к следующим выводам.

1. Показано, что полиморфизм у белого клевера по наличию или отсутствию белых (или так называемых седых) пятен на листьях, по особой конфигурации пятен детерминирован серией из 9 множественных аллелей гена *V*.

2. Выявлена низкая частота встречаемости фенов «низкое треугольное пятно у основания» и «большое сплошное пятно у основания». Растения с такими пятнами имеют больше клеток, лишенных хлорофилла, следовательно, такие растения менее жизнеспособны.

3. Анализ фенотипической структуры популяции белого клевера на поле в парке «Зелёный остров» в г. Уссурийске показал большее разнообразие фенов в 2023 г. по сравнению с 2013 г. Установлено 9 фенов (соответственно, 45 генотипов) в 2023 г. Установлено 8 фенов (соответственно, 36 генотипов) в 2013 г., отсутствует фен «большое сплошное пятно у основания».

4. Популяция белого клевера в парке «Зелёный остров» в г. Уссурийске характеризуется фенетическим полиморфизмом.

Полученные и обработанные результаты имеют практическое значение в области популяционной фенетики.

Фактический материал может быть использован на лабораторном занятии по ге-

нетике «Изучение множественного аллелизма по “седым” пятнам у клевера белого» для студентов биологического направления, а также на уроках биологии в средней школе в разделе «Общая биология» в теме «Генетика». Результаты исследований по изучению полиморфизма белого клевера в природных популяциях используются для проведения экскурсии у студентов и школьников, которая даст возможность продемонстрировать проявление генетически закономерных изменений в природе, находить и констатировать факты, требующие пояснений с позиций генетики, видеть разнообразную изменчивость живых организмов.

Список литературы

1. Бекузарова С. А., Шабанова И.А. Клевер – биоиндикатор тяжелых металлов // Известия Горского государственного аграрного университета. 2014. Т. 51, № 3. С. 297-301.
2. Степанова Л. П., Яковлева Е.В., Писарева А.В. Экологическая оценка степени фитотоксичности почв антропогенно-трансформированных территорий // Вестник Мичуринского государственного аграрного университета. 2017. № 2. С. 10-15.
3. Скалозуб О. М. Географическое распространение и фитоценотическая приуроченность растений рода клевер в Приморском крае // Аграрный вестник Приморья. 2021. № 3 (23). С. 11-14.
4. Быковская Н.В., Боровик Г.В. Множественный аллелизм в популяциях клевера ползучего в г. Уссурийске // Животный и растительный мир Дальнего Востока: сб. науч. тр. Вып. 9. Уссурийск: Изд-во УГПИ, 2005. С. 105-111.
5. Горшкова Т.А. Оценка возможности использования клевера ползучего (*Trifolium repens* L.) для биоиндикации антропогенного нарушения среды // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2012. Т. 14, № 1. С. 69-73.
6. Нахаева В.И., Александрова Т.В., Рубцова А.В. Генетический полиморфизм в популяциях *Trifolium repens*, произрастающих в различных условиях окружающей среды г. Омска // Успехи современного естествознания. 2015. № 1. С. 49-53.
7. Сергеева В.В., Кресамова А.А., Андреева Ю.С. *Trifolium repens* (L.) — биоиндикатор загрязнения окружающей среды (на примере г. Краснодара) // Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия: Естественные и технические науки. 2019. № 6-2. С. 18-26.
8. Инге-Вечтомов С.Г. Генетика с основами селекции: учебник для студентов высших учебных заведений. СПб.: Изд-во Н-Л, 2010. 718 с.
9. Моисейкина Л.Г., Турдуматов Б.М., Кузнецова О.В., Гладких М. Ю. Генетика и биометрия. Элиста: Калмыцкий государственный университет имени Б.Б. Городовикова, 2017. 166 с.
10. Лозинская О.В., Русак Н.Ю., Мельнов С.Б. Оценка экологического состояния урбоценозов на основе полиморфизма листовой пластинки *Trifolium repens* L. // Экологический вестник. 2014. № 2. С. 102-108.
11. Седых Л.О., Новикова Е.А., Латышева Е. В., Фролова Л.А. Клевер ползучий как модельный объект при изучении внутриаллельного взаимодействия в серии множественных аллелей // Наука и Образование. 2020. Т. 3, № 2. URL: <https://opusmgau.ru/index.php/see/article/view/1704/1703> (дата обращения: 15.05.2024).
12. Левицкий С.Н. Генетический полиморфизм в популяциях *Trifolium repens*, произрастающих в условиях различной антропогенной нагрузки территорий // Фундаментальные исследования. 2013. № 4-1. С. 108-111.
13. Сергеева В.В., Кресамова А.А., Андреева Ю.С. *Trifolium repens* (L.) — биоиндикатор загрязнения окружающей среды (на примере г. Краснодара) // Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия: Естественные и технические науки. 2019. № 6-2. С. 18-26.