

Изменчивость флавоноидов в популяциях люцерны в связи с селективным давлением отбора при засолении

Л. В. ПОЛЯКОВА, Г. Г. МАЙСТРЕНКО, Р. Е. КРОГУЛЕВИЧ

Центральный сибирский ботанический сад СО РАН
630090 Новосибирск, ул. Золото долинская, 101

АННОТАЦИЯ

В условиях вегетационного опыта проведен анализ изменчивости некоторых показателей первичного и вторичного обмена при засолении. Показано, что ответом на засоление является уменьшение надземной фитомассы и увеличение содержания флавоноидов. Изучены связи между указанными признаками при использовании методов вариационной статистики.

Установлено, что в популяциях люцерны, адаптированных к условиям произрастания, распределение вероятностей деления на фенотипы по составу флавоноидов (в пределах и за пределами модификационной изменчивости) близко к нормальному. При засолении усиливается зависимость уровня приспособленности от содержания флавоноидов.

В популяционных исследованиях последних лет все больше внимания уделяется изучению причин и механизмов природной селекции. В основе подобных исследований лежит выяснение условий и причин появления определенных фенотипических признаков. Приспособленность при этом рассматривается как результат взаимоотношения конкретных фенотипов с окружающей средой [1].

В большинстве работ, посвященных изучению давления отбора, в качестве фенотипических признаков используются многочисленные морфологические характеристики и довольно часто изоферментный анализ некоторых методически хорошо освоенных ферментов [2]. Другие биохимические признаки используются редко и практически нет упоминания об использовании в популяционном анализе флавоноидных компонентов растений (вторичный биохимический признак) [3].

Между тем изучение изменчивости этого признака в природных популяциях показало его высокую информативность в экологическом аспекте [4] и на популяционном уровне в связи

с разной жизнеспособностью отдельных растений популяции [5].

Эти данные позволили предположить, что постановка эксперимента с четким контролем влияния одного из факторов окружающей среды (засоления) может способствовать выявлению адаптивного значения флавоноидных компонентов на популяционном уровне.

Поскольку отбор является множественным и действует одновременно на многие признаки [6], помимо флавоноидных компонентов в анализ включены также общее содержание белка и симбиотическая фиксация азота. Все признаки рассматривали на фоне развития надземной фитомассы растений как комплексного отражения их приспособленности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Растения люцерны (сорт Сибирская-8) выращивали в вегетационном домике в полиэтиленовых стаканах без дна, вмещающих 1,5 кг кварцевого песка, до стадии бутонизации – начала цветения. Стаканы, содержавшие по одно-

му растению, помещали в емкости, в которых в течение всего опыта поддерживали постоянный уровень питательного раствора. В качестве питательной среды контрольных и опытных растений служила среда Кнопфа с 0,1 нормы азота. В варианте с засолением (опыт) в нее добавили NaCl в концентрации 0,14 %. Состав питательной среды оставался постоянным в ходе экспериментов. Семена люцерны перед посевом инокулировали 3-суточной культурой *Rhizobium meliloti*, штаммом СХМ-71 из коллекции культур Института сельхозмикробиологии РАСХН. В каждом варианте опыта анализировали 30–55 растений. Биометрическая обработка данных проведена по Плохинскому [7].

Для определения симбиотической (нитрогеназной) активности использовали стандартный метод редукции ацетилена [8]. Содержание белка определяли по методу Бузун и др. [9]. Выделение и идентификацию компонентов флавоноидного комплекса проводили методами хроматографии и спектрофотометрии, как отмечено в работе [4].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Представление об изменении показателей в условиях контроля и опыта и достоверности отличий дают данные табл. 1.

Как и следовало ожидать, признаки, затрагивающие первичный обмен – содержание белка (Б) и нитрогеназная активность (НГ) клубеньков, – имеют низкую или среднюю [10] вариабельность в группах растений, выращенных как на пресном, так и на засоленном фонах. Вариабельность вторичных биохимических признаков ведущих компонентов флавоно-

идного комплекса – трицин-5,7-ди-О-глюкозид (K_1) и трицин-5-О-диглюкозид (K_2) – заметно выше и составляет по первому компоненту более 80 % и свыше 40 % - по второму. Следует отметить, что в природных популяциях люцерны желтой также отмечена высокая вариабельность первого компонента [4, 5].

При сравнении данных, полученных на пресном и засоленном фонах, можно сделать вывод, что содержание белка и нитрогеназная активность изменились незначительно. Достоверно возросло содержание флавоноидных компонентов и значительно снизилась воздушно-сухая надземная фитомасса растений (W), что является, очевидно, ответной реакцией на засоление среды.

Для всех изученных признаков рассчитаны коэффициенты корреляции по отношению к воздушно-сухой надземной фитомассе, так как это один из главных показателей селективного давления отбора (табл. 2). Нитрогеназная активность показала высокие коэффициенты корреляции с указанным признаком ($-0,49$ в контроле и $+0,56$ в опыте), однако их противоположные знаки не позволяют оценить характер отношений этих признаков как достоверный и требуется дальнейшее экспериментальное подтверждение взаимозависимости этих признаков.

Флавоноидные компоненты также дают разные знаки корреляции с НГ в контроле и опыте, что не позволяет оценить характер взаимоотношений этих двух признаков.

Наиболее устойчивая корреляционная зависимость – отрицательная – отмечается для флавоноидных компонентов люцерны с признаком приспособленности (количество надземной фитомассы растений). Следует отметить, что в по-

Т а б л и ц а 1

Биохимические показатели контрольных и опытных растений

Вариант опыта	Биометрические данные	K_1	K_2	Σ г	W, г	НГ, мМС ₂ Н ₄ / (ч · раст.)	Б, %
		%					
Контроль $n = 55$	$x \pm m$	$0,07 \pm 0,01$	$0,38 \pm 0,02$	$0,45 \pm 0,02$	$1,74 \pm 0,14$	$2,22 \pm 0,05$	$21,0 \pm 0,26$
	σ	0,06	0,18	0,21	1,04	0,38	2,01
	CV, %	82,6	47,1	47,4	59,8	17,5	4,7
Опыт $n = 30$	$x \pm m$	$0,13 \pm 0,02$	$0,53 \pm 0,04$	$0,66 \pm 0,05$	$1,15 \pm 0,12$	$2,19 \pm 0,08$	$20,7 \pm 0,50$
	σ	0,11	0,23	0,29	0,69	0,46	2,61
	CV, %	84,8	42,8	43,9	59,7	21,1	12,6

П р и м е ч а н и е. Отличия по K_1 , K_2 , Σ г, W достоверны на 95–99 % уровня значимости; Σ г – сумма глюкозидов; W – воздушно-сухая надземная фитомасса.

Т а б л и ц а 2

Коэффициенты корреляции флавоноидных соединений и нитрогеназной активности клубеньков с надземной фитомассой люцерны

Показатель	K_1	$\sum \Gamma$	НГ
W_K	-0,04	-0,12	-0,49
$W_{оп}$	-0,19	-0,77	+0,56

Примечание: W_K – воздушно-сухая надземная фитомасса контрольного варианта Γ , $W_{оп}$ – то же, опытного варианта.

давляющем большинстве случаев коэффициенты корреляции очень низкие, поэтому основное внимание уделяется не абсолютному значению коэффициентов, а устойчивому характеру негативных количественных отношений этих признаков. Во многих работах популяционного анализа отмечают, как правило, низкие значения коэффициентов корреляции между большинством изучаемых признаков, однако большее значение придается складывающейся корреляционной структуре отношений признаков. В эволюционном аспекте придается значение негативной корреляционной зависимости признаков [6].

Отмечаемая в данном эксперименте негативная корреляционная связь признака приспособленности и флавоноидных компонентов подтверждает наши заключения относительно природных популяций люцерны желтой и степной [5] и, следовательно, может рассматриваться как характерный показатель стабилизации популяции в данной среде.

Таким образом, устойчивая отрицательная корреляционная связь флавоноидов с признаком приспособленности особей свидетельствует о том, что в нашем эксперименте сохраняется стабильность популяции по флавоноидному признаку и даже усиливается в опыте, так как абсолютное значение коэффициентов возрастает. Поэтому в дальнейшем анализ давления отбора на популяцию, выражающегося в разной степени приспособленности растений к среде обитания по такому комплексному показателю, как развитие надземной фитомассы, сделан на основании особенностей поведения веществ вторичного обмена – флавоноидов.

Возрастание зависимости приспособленности особей от уровня синтезируемых особью флавоноидов четко просматривается при составлении уравнений регрессии, которые рас-

считаны для наиболее варибельного компонента – трицин-5,7-ди-О-глюкозида – и суммы компонентов. Уравнения регрессии показывают, что зависимость надземной фитомассы от содержания первого компонента трицина в условиях пресного и засоленного фона увеличивается в условиях последнего примерно в 1,5 раза, так как уравнения в контроле и опыте соответственно имеют вид: $y = 1,26 - 1,5x$ и $y = 1,4 - 2,15x$. Зависимость фитомассы от суммы двух синтезируемых глюкозидов трицина на засоленном фоне возрастает почти в 5 раз, так как уравнения регрессии имеют вид: $y = 1,9 - 0,34$ (контроль) и $y = 2,3 - 1,8x$ (опыт). Как показывают эти уравнения регрессии, изменение флавоноидного комплекса под воздействием засоления происходит не хаотично, а имеет определенную направленность, которая отражается на фенотипическом составе контрольной и опытной популяции по этому признаку.

Фенотипический состав популяций по флавоноидному признаку рассматривали с точки зрения распределения признака по классам значимости, учитывающим количество особей в пределах модификационной изменчивости признака ($x \pm 1\sigma$) и с содержанием флавоноидов выше и ниже этого уровня. За теоретическое распределение признака принято стандартное нормальное распределение, при котором значению $x \pm 1\sigma$ соответствует 68 % растений (частота встречаемости соответствует 0,68), а значениям менее $x - 1\sigma$ и выше $x + 1\sigma$ по 16 % растений (частоты встречаемости соответствуют 0,16) (табл. 3).

В зависимости от содержания трицин-5,7-ди-О-глюкозида (K_1) и суммы двух компонентов ($\sum \Gamma$) опытной и контрольной популяций экземпляры люцерны были распределены на фенотипы по четырем классам значимости признака. Для каждой популяции рассчитали индекс фенотипического разнообразия (E) Shannon по формуле:

$$E = -\sum_i^n P_i \log P_i,$$

где E – индекс разнообразия, P_i – частота фенотипа, n – число фенотипов.

Данные табл. 3 показывают, что в условиях пресного фона фенотипическое распределение вероятности растений близко к нормальному и

Сравнение фактических распределений вероятностей (P_i^*) фенотипов люцерны по составу флавоноидов с теоретическим (P_i) и индексы разнообразия (E)

Фенотип	Теоретическая вероятность P_i	Фактическая вероятность K_1		Фактическая вероятность $\sum \Gamma$	
		контроль	опыт	контроль	опыт
		P_i^*			
$< x-1\sigma$	0,16	0,15	0,10	0,17	0,03
$x \pm 1\sigma$	0,68	0,75	0,56	0,68	0,53
$> x+1\sigma$	0,16	0,10	0,34	0,15	0,20
$> x+2\sigma$	–	–	–	–	0,24
x^2		2,4	25,0	0,12	74,0
E	0,371	0,413	0,419	0,497	0,497

Примечание: $P = 0,999$.

низкие значения x^2 подтверждают это. В условиях засоления фенотипическое разнообразие популяции заметно возрастает. Эти расчеты позволяют заключить, что селективное давление отбора, вызванное изменением одного абиотического фактора – уровня засоления среды – приводит к возрастанию содержания флавоноидных компонентов, к смене фенотипического распределения состава флавоноидов, которое уже не соответствует нормальному распределению.

В рассматриваемых популяциях люцерны выделены группы растений с "низкой" и "высокой" приспособленностью, где значение воздушно-сухой фитомассы соответственно ниже $x - 1\sigma$ и выше $x + 1\sigma$. Сравнение этих групп растений контроля и опыта выявляет, что экземпляры, наиболее изменчивые по содержанию флавоноидов под влиянием стрессового фактора, наименее продуктивны по фитомассе: содержание суммы трициновых глюкозидов в опыте возрастает более чем на 200 %, в то время как в группе растений, значительно превышающих средний

показатель по фитомассе, сумма флавоноидов в опыте возрастает лишь на 12 % (табл. 4).

Эти различия свидетельствуют о том, что у растений с низкой фитомассой энергетические затраты на дополнительный синтез флавоноидов в ответ на засоление гораздо выше, чем у особей, надземная фитомасса которых в популяции была максимальной.

Эту точку зрения подтверждает анализ контрольной и опытной популяций на выявление экземпляров, в которых хроматографически достаточно заметно отмечается третий глюкозид, предположительно трицин-5-О-моноглюкозид.

Подсчет экземпляров с заметным содержанием этого компонента дал частоты его проявления (f) 0,20 в контроле (12 особей из 60) и 0,17 в опыте (5 особей из 30). Практически одинаковая частота их в популяции говорит о высокой наследуемости признака, не зависимой от действия дополнительного стрессового фактора на популяцию.

Таблица 4

Содержание глюкозидов трицина в группах растений, отличающихся по развитию надземной фитомассы

Вариант опыта	Биометрические показатели	Глюкозиды I гр. особей с $W < x-1\sigma$, $n = 8$ (к), $n = 7$ (оп)		Глюкозиды II гр. особей с $W > x+1\sigma$, $n = 6$ (к), $n = 5$ (оп)	
		K_1^x	$\sum \Gamma^*$	K_1	$\sum \Gamma$
Контроль	$x \pm m$	$0,07 \pm 0,02$	$0,35 \pm 0,09$	$0,06 \pm 0,01$	$0,41 \pm 0,08$
	CV %	90,9	74,3	61,6	50,2
Опыт	$x \pm m$	$0,14 \pm 0,03$	$0,74 \pm 0,13$	$0,08 \pm 0,02$	$0,51 \pm 0,06$
	CV %	55,7	46,1	43,7	28,6

Примечание. * $P = 0,95$; W I гр. $< 0,7$ г в контроле и $< 0,45$ г в опыте; W II гр. $> 2,8$ г в контроле и $> 1,9$ г в опыте.

Таблица 5

Показатели надземной фитомассы и двух глюкозидов трицина в группе растений, содержащих дополнительный флавоновый компонент

Вариант опыта	Биохимические признаки	x	$\pm m$	σ	CV %	f
Контроль	W	1,42	0,22	0,77	54,2	0,20
	K ₁	0,09	0,02	0,07	73,3	
	K ₂	0,37	0,05	0,19	51,3	
Опыт	W	0,48	0,09	0,19	40,2	0,17
	K ₁	0,21	0,07	0,15	69,5	
	K ₂	0,80	0,06	0,14	17,5	

Характерной особенностью растений, синтезирующих 3-й компонент, является низкая надземная фитомасса. Особенно четко это проявляется в опытной популяции (табл. 5).

Для основной массы растений обеих популяций присутствие третьего компонента не характерно, т. е. более сбалансированными к данному экологическому окружению по флавоноидному фенотипу являются экземпляры с выраженным содержанием лишь двух глюкозидов трицина. Заметное образование еще одного глюкозида трицина (характерного для люцерны степной) свидетельствует о некотором нарушении наиболее адаптивного для данной среды фенотипа, и это четко проявляется в снижении адаптивного потенциала таких растений, приводящего к формированию пониженной надземной фитомассы. При действии стрессового фактора она падает до предельно низкого уровня – 0,48 г воздушно-сухой массы, по сравнению со средней массой растения контрольной популяции – 1,74 г.

Таким образом, анализ вторичного биохимического признака в популяции люцерны показал, что в хорошо адаптированной к среде обитания популяции распределение фенотипов

по флавоноидному составу близко к нормальному, при этом отмечается негативная корреляционная связь между содержанием флавоноидов и надземной фитомассой. Изменение одного из факторов среды – засоления – ведет к увеличению общего содержания флавоноидов и к усилению зависимости уровня приспособленности от содержания этой группы веществ, так как определенная часть энергии расходуется не на процессы роста и развития растений, а на дополнительный синтез флавоноидных структур.

ЛИТЕРАТУРА

1. M. J. Wode et Kalisz, *Evolution*, 1990, 44, 1947–1955.
2. Л. Меттлер, Т. Грегг, *Генетика популяций и эволюция*, М., Мир, 1972.
3. J. C. Beart, T. H. Lilley, E. Haslam, *Phytochemistry*, 1983, 24, 33–38.
4. Л. В. Полякова, *Биол. науки*, 1990, 10, 123–132.
5. Л. В. Полякова, Там же, 1992, 6, 96–106.
6. J. A. Silander, *Evolution*, 1985, 39, 1034–1052.
7. А. В. Плохинский, *Биометрия*, М., Изд-во МГУ, 1970.
8. R. W. Hardy, R. D. Holsten, E. K. Jackson, R. S. Burns, *Plant physiol.*, 1968, 43: 8, 1185–1207.
9. Г. А. Бузун, К. М. Джумухадзе, Л. В. Милешко, *Физиол. растений*, 1982, 29, 198–204.
10. А. Ф. Мерешко, *Генетика*, 1994, 30: 10, 1317–1325.

Flavonoid Variation in *Medicago falcata* L. Populations due to Selective Pressure at Medium Salinization

L. V. POLYAKOVA, G. G. MAISTRENKO, R. E. KROGULEVICH

An analysis of variation of some indices of the primary, and secondary metabolism at medium salinization was performed under experimental conditions. It was established that a medium salinization led to a decrease of the aboveground phytomass and an ancrease of the flavonoid content.

The correlation between these indices was analysed with the help of variation statistic methods.

It was found that distribution of probabilities of division of alfalfa populations in the medium to which it is adapted into groups within and beyond flavonoid variation is close to normal. At medium salinization, the dependence of the adaptability level on the flavonoid content is enhanced.