

**АНТЭКОЛОГИЯ И ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ТИПА ОПЫЛЕНИЯ
ПО ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИМ СПЕКТРАМ ПОЛИПЕПТИДОВ СЕМЯН В ПОПУЛЯЦИЯХ
РЕДКОГО ВИДА *HEDYSARUM THEINUM*, ПРОИЗРАСТАЮЩЕГО В ГОРНОМ АЛТАЕ**

О.В. ДОРОГИНА, Н.А. КАРНАУХОВА

**THE FORECAST OF A POLLINATION TYPE BY ELECTROPHORETIC SPECTRA OF SEED
POLYPEPTIDES IN THE POPULATIONS OF A RARE SPECIES *HEDYSARUM THEINUM*
GROWING IN THE ALTAI MOUNTAINS**

O.V. DOROGINA, N.A. KARNAUKHOVA

Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, 630090 Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101
Central Siberian Botanical Garden, SB RAS, 630090 Novosibirsk, Zolotodolinskaya st., 101
Fax: +7(383) 330-19-86, e-mail: olga-dorogina@yandex.ru

Рассматриваются особенности опыления цветка *Hedysarum theinum* Krasnob. (*Fabaceae*). В 13 популяциях этого вида, проанализирована зависимость между уровнем полипептидной вариабельности и характером опыления. Было выявлено 7 популяций с перекрестным типом опыления, 2 популяции с преимущественным типом опыления — самоопыление и 4 — с разнохарактерным типом опыления.

В результате искусственного самоопыления, проведенного во всех этих популяциях, только в популяциях, у которых по электрофоретическим спектрам полипептидов семян, тип опыления был определен как самоопыление, в первый год образовалось небольшое число семян. Таким образом, метод электрофореза полипептидов семян позволяет прогнозировать преобладающий тип опыления в каждой отдельно взятой популяции *Hedysarum theinum*.

Ключевые слова: полипептиды, электрофоретические спектры, *Hedysarum theinum*, *Fabaceae*, самоопыление, антэкология.

Peculiarities of pollination of flowers of *Hedysarum theinum* Krasnob. (*Fabaceae*) are considered. The interrelationship between the polypeptide variation and pattern of pollination was analyzed in 13 populations of this species. Cross pollination was revealed in 7 populations, self-pollination — in 2 populations and both types of pollination — in 4 populations. Thus the method of electrophoresis of seed polypeptides allows forecasting a predominant type of pollination in *H. theinum* populations.

Key words: polypeptides, electrophoretic spectra, *Hedysarum theinum*, *Fabaceae*, self-pollination, antecology.

Устойчивость репродуктивных органов растений к неблагоприятным факторам внешней среды (температура, водообеспеченность, освещенность и др.) является одним из важнейших показателей способности к самовоспроизведению. Например, температурные условия по-разному влияют на различные компоненты репродуктивной системы растений. У большинства растений рыльце цветка восприимчиво к опылению лишь в течение короткого периода, продолжительность которого у большинства видов растений также зависит от условий внешней среды, особенно от температуры и влажности воздуха. Разнообразен и харак-

тер действия различных факторов внешней среды на разные компоненты репродуктивной системы растений. По мнению G.L. Stebbins (1974), различия между адаптивными признаками, обеспечивающими выживание и воспроизводство у высших растений, находятся на значительно более высоком уровне интеграции органов репродуктивной системы. Подчеркивается, что изменения структуры цветка и механизмов опыления растений представляют единую систему адаптивных реакций. Поэтому всестороннее изучение вопросов семенного размножения редких, эндемичных и исчезающих видов позволяет успешно решать

задачи, связанные с их сохранением в природе и при интродукции.

Считается, что в процессе эволюции у растений происходила смена облигатного перекрестного опыления, основанного на самонесовместимости, на самоопыление, клейстогамию, апомиксис и вегетативное размножение. При этом самонесовместимость явилась результатом спонтанных мутаций генов в локусе несовместимости. Для редких и исчезающих видов особенно важна разработка подходов, позволяющих исследовать динамику типов опыления, так как переход растений от перекрестного типа опыления к самоопылению приводит к инбридингу в популяциях, к уменьшению фертильности и, как следствие, при определенных условиях внешней среды — к исчезновению популяций.

Связь между характером белковой вариативности и способом опыления растения была

отмечена В.Г. Конаревым (1985) при анализе электрофоретических спектров запасных белков семян. Позднее Э.Э. Егги и Е.К. Потокина (1989) показали возможности электрофореза как тест-метода для прогнозирования характера опыления у культурных и дикорастущих видов бобовых, исключая растения рода *Hedysarum*. По их данным, в случае самонесовместимых видов и строгих самоопылителей коэффициенты белковой вариативности превышают значение 0.7 или соответственно не превышают 0.3. Коэффициенты в интервале 0.4–0.6 свидетельствуют о разнохарактерном способе опыления данного объекта или особенностях его происхождения.

Целью данной работы явилось исследование возможности прогнозирования типа опыления по электрофоретическим спектрам полипептидов семян в популяциях редкого вида *Hedysarum theinum* Krasnob. (*Fabaceae*) — копеечник чайный.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для разделения полипептидов семян применили метод электрофореза в полиакриламидном геле (Laemmli, 1970), модифицированный нами при изучении полиморфизма запасных белков эндосперма (проламинов) семян у представителей рода *Elymus* L. (Агафонова, Агафонов, 1991). Использовали трис-глициновую буферную систему для SDS-электрофореза в 10 и 14 %-ных полиакриламидных гелях, в экстракты белков добавляли редуцирующий агент 0.2 М 2-меркаптоэтанол. В качестве маркеров были выбраны полипептиды семян.

Для оценки молекулярной массы полипептидных фракций использовали стандартный образец линии *Elymus sibiricus* L. ALT-1 — эталонный спектр, состоящий из компонентов, промаркированных белками с известными молекулярными массами.

Образцом называли белковый экстракт, полученный из одного семени и представленный на

электрофореграмме в виде 1-го спектра. Для характеристики внутрипопуляционной изменчивости по электрофоретическим спектрам полипептидов исследовали выборки в количестве 48–60 семян из 13 популяций *H. theinum* (табл. 1).

Внутрипопуляционную изменчивость по полипептидным спектрам семян у представителей этого вида оценивали с помощью коэффициентов вариативности, определяемых по формуле (Ayala et al., 1970). Вычисления проводили для каждой пары спектров внутри выборок. При этом белковые компоненты регистрировали на миллиметровой бумаге. Построение матрицы проводили по наличию (1) или отсутствию (0) белкового компонента для каждого из образцов. Расчеты выполняли с использованием компьютерных программ Statistica и BioDiversity Pro (Дорогина, Агафонова, 2004).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

H. theinum Krasnob. — редкий высокогорный альпийский вид (Красная книга..., 1996), имеющий дизъюнктивный центральноазиатско-южно-сибирский ареал (Алтай, Монголия, Тарбагатай, Джунгарский Алатау, Памир). Наиболее часто встречается на субальпийских и альпийских лугах, каменистых склонах, вдоль ручьев, на лесных полянах в кедрово-лиственничном редколесье (Агафонова, Володарская, 2000). *H. theinum* как само-

стоятельный вид был выделен по ряду морфологических и биохимических признаков из *H. neglectum* Ledeb. (Красноборов и др., 1985).

Опыление у растений рода *Hedysarum* происходит, в основном, за счет насекомых-опылителей. Цветки у изучаемого вида обычного мотылькового типа, обоеполые, окраска венчика ярко малиновая. Соотношение частей околоцветника имеет диагностическое значение.

Места сбора и результаты самоопыления *Hedysarum theinum* Krasnob.

| Район исследований | № популяции | Высота над уровнем моря, экспозиция склона, почвы | Пояс растительности, тип растительности, формация, ассоциация | Результаты самоопыления |
|-------------------------------------|-------------|--|--|-----------------------------|
| Центральный Алтай гора Красная | 17 | 1700 м; западная; горно-лесолуговые субальпийские почвы | Лесной пояс. Субальпийское травянистое разнотравно-копееч-никовое кедрово-лиственничное редколесье | 10 изоляторов; 3 семени |
| Западный Алтай Ивановский хребет | 5 | 1600 м; юго-западная; горно-лесолуговые субальпийские почвы | – » – | 10 изоляторов; нет семян |
| Проходной хребет | 3 | 1700 м; юго-западная; горно-лесолуговые субальпийские почвы | – » – | 9 изоляторов; 2 семени |
| Ивановский хребет | 15 | 1700 м; юго-западная; горно-лесолуговые субальпийские почвы | – » – | 7 изоляторов; нет семян |
| | 14 | 1800 м; юго-восточная; горно-лесолуговые субальпийские почвы | – » – | 10 изоляторов; нет семян |
| | 11 | 1800 м; юго-восточная; маломощные щебнистые почвы | Субальпийское травянистое редколесье | 10 изоляторов; нет семян |
| | 8 | 1750 м; северо-западная; горно-лесолуговые субальпийские почвы | – » – | Растения не цвели |
| Западный Алтай Ивановский хребет | 9 | 1850 м; юго-восточная; маломощные щебнистые почвы | Высокогорный пояс. Крупнотравный альпийский луг, разнотравно-копеечниковый | 6 изоляторов; нет семян |
| | 12 | 1900 м; юго-восточная; горно-лесолуговые субальпийские почвы | – » – | 6 изоляторов; нет семян |
| | 16 | 2100 м; юго-западная, маломощные щебнистые почвы | – » – | 6 изоляторов; нет семян |
| | 7 | 2050 м; юго-восточная, маломощные щебнистые почвы | Дриадовая тундра | Растения не цвели |
| | 6 | 1950 м; юго-западная; горно-лесолуговые субальпийские почвы | Крупнотравный субальпийский луг | Растения не цвели |
| Хребет Холзун | 2 | 1850 м; северо-западная; маломощные щебнистые почвы | – » – | 6 изоляторов; нет семян |

В развитии цветка *H. theinum* можно выделить те же фазы, которые выделяет З.Н. Беспалова (1965) в развитии цветка караганы: 1) фазу формирования бутона в почке; 2) фазу плотного бутона; 3) фазу рыхлого бутона; 4) фазу опыления в бутоне; 5) фазу распустившегося цветка; 6) фазу увядания цветка. Цветки копеечника протерандричны. Вскрывание пыльников происходит в фазу рыхлых бутонов. Приспособление цветков к опылению простейшее для бобовых — створчатое, типа клапана (Knuth, 1898–1905; Kugler, 1955). Под тяжестью насекомого-посетителя лодочка отклоняется вниз, рыльце и пыльники остаются на месте и прикасаются к брюшку насекомого. Когда давление на лодочку прекращается, она возвращается в исходное положение и снова скрывает генеративный аппарат. При вскрывании пыльников рыльце еще головчатое. Созревание его происходит непосредственно перед

раскрыванием цветка, чаще всего в бутонах с едва приподнятым флагом. У только что раскрывающихся цветков рыльца головчатые, покрыты сосочками, окрашиваются растворами солей, хотя и не очень интенсивно (Сеппар Э.Э., 1971). По интенсивности окраски можно судить о степени зрелости рыльца. Рыльце расположено, как правило, выше пыльников на 2–3 мм.

Целостность воспринимающей поверхности рыльца нарушается от малейшего механического прикосновения. После посещения насекомого поверхность рыльца несколько деформируется. Экологическое значение разрушения поверхности рыльца бобовых заключается в том, что при этом пыльцевые зерна, достигающие тканей рыльца, приходят в соприкосновение с клеточным соком и прорастают. Самостерильность многих бобовых, видимо, основана на том, что без механи-

Значения коэффициентов вариальности для выборок растений *Hedysarum theinum* Krasnob.

| № популяции | Среднее значение коэффициента вариальности для выборки | Тип опыления |
|-----------------------------------|--|------------------|
| 3 17 | 0.33 0.36 | Самоопыление |
| 9 11 15 16 | 0.47 0.48 0.51 0.49 | Разнохарактерный |
| 2 5 6 7 8 12 14 | 0.65 0.61 0.61 0.63 0.64 0.64 0.68 | Перекрестный |

ческого разрушения поверхности рыльца пыльца не может на нем прорасти. Опыты по изоляции цветков и соцветий *H. theinum*, проведенные нами, показали, что у изолированных цветков завязывания плодов не происходит, плодоцветение в контроле довольно значительное. Единичные случаи завязывания плодов в изолированных соцветиях обнаруживались только после постукивания по цветку в фазе рыхлого бутона. Таким образом, морфология и физиология цветков копеечников не исключают самоопыления, но затрудняют его.

По данным Э.Э. Сеппар (1971), суточная периодичность цветения исследованных видов *Hedysarum*, опыляющихся насекомыми, тесно связана с погодно-климатическими факторами, биологией цветка и с деятельностью насекомых-опылителей. Однако определенный ритм цветения может быть обусловлен причинами не только внешнего, но и внутреннего характера — генетической природой самого растения.

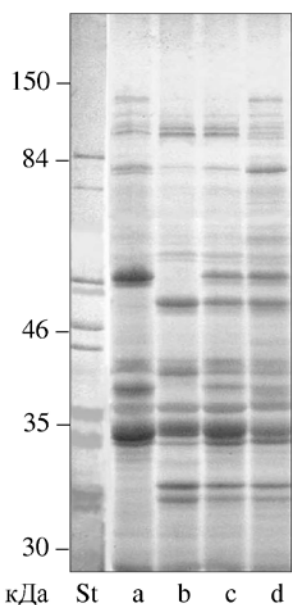
Для определения типа опыления в каждой из исследованных популяциях регистрировали электрофоретические спектры полипептидов семян без учета интенсивности компонентов. Для каждой выборки определяли коэффициент вариальности (табл. 2), как описано в разделе «Материал и методы».

Принимая во внимание эти критерии, и анализируя табл. 2, можно отметить, что 7 из 13 исследованных популяций *H. theinum* характеризуются перекрестным типом опыления, 4 популяции — разнохарактерным типом опыления и только 2 популяции (3 и 17) можно отнести к самоопыляющимся.

Поскольку исследовались природные популяции, как следует из полученных данных, у видов, наряду с перекрестным и разнохарактерным типами опыления, имел место небольшой процент самоопыления и самонесовместимости. Этим подтверждается вывод о том, что можно говорить о преобладающем типе размножения внутри популяции, вида и т.д., так как в любой естественной группе растений встречаются особи, способные как к авто-, так и к аллогамии. Таким образом, можно заключить, что преобладающим типом опыления для популяций *H. theinum* является перекрестный.

Установленное вышеупомянутыми авторами (Егги и Потокина, 1998) соотношение между уровнем полипептидной вариальности запасных белков семян и типом опыления бобовых, по-видимому, носит общий характер и распространяется также на растения других семейств. Так, например, для злаков генотипы сортов автогамных видов могут различаться по компонентному составу лишь одним-двумя очень близкими друг к другу типами запасного белка глиаина. Критерием же сорта-перекрестника является совокупность большого числа различающихся по компонентному составу типов спектра (Конарев, 1985).

Определение типа опыления является важной биологической характеристикой для растения. Недостаток знаний о системах воспроизведения дикорастущих представителей семейства *Fabaceae* затрудняет использование этих растений в селекции, проведение дальнейших исследований в условиях интродукции и ограничивает возможности сохранения генофонда видов и родов этого семейства как в природных условиях, так и в коллекциях.



Электрофоретические спектры полипептидов семян самоопыленного (в течение 8 лет) гибридного растения из 5-й популяции *H. theinum*.

SDS-система, +Me-вариант, St — стандартный образец линии *E. sibiricus* (ALT-1); a, b — спектры родительских форм; c, d — спектры гибридных форм.

Известно, что в условиях изменяющейся среды соотношение особей, способных к тому или другому способу опыления, может меняться. Для проверки правильности прогноза типа опыления по электрофоретическим спектрам полипептидов семян был проведен анализ завязываемости семян у растений из 10 популяций (в трех популяциях растения в этот год не цвели) после самоопыления. С этой целью изолировалось от 10 до 20 цветков у 10 растений из каждой популяции.

Результаты опыта показали, что только в двух популяциях: 3-й и 17-й, тип опыления у которых по электрофоретическим спектрам был определен как самоопыление, в первый год цветения было обнаружено по 3 выполненным семенам из 10 завязав-

шихся (см. табл. 2). Во всех остальных популяциях ни на одном из изолированных растений не было обнаружено ни одного хотя бы частично выполненного семени.

В то же время, в течение 8 лет (с 1992 по 1999 гг.) мы проводили наблюдения за изолированным растением из 5-й популяции, преимущественный тип опыления которой по электрофоретическим спектрам полипептидов семян был определен как перекрестный. Исследования показали, что в течение 8 лет это растение не завязало ни одного семени и только в 2000 г. появилось 6 плохо выполненных семян. В 2001 г. завязалось 12 семян, а в 2002 г. их количество увеличилось еще в 2 раза. Это подтверждает тот факт, что у растений, характеризующихся преимущественно перекрестным типом опыления, в редких случаях семена могут образовываться и путем самоопыления, что также наблюдалось и у разных сортов *Vicia faba* L. (Жученко, 1988).

При электрофоретическом разделении экстрактов семян, с этого растения были обнаружены гибридные (c, d) и родительские (a, b) спектры (рис.).

Вероятно, при самоопылении произошло расщепление на исходные родительские и дочерние формы, что отразилось на полипептидном составе и подтвердило гибридное происхождение этого растения. Метод электрофореза запасных полипептидов семян позволяет успешно прогнозировать не только преобладающий тип опыления, но также выявлять гибридные растения, получая при этом некоторые сведения об исходных скрестившихся формах.

Приведенный способ выявления гибридных растений и их родителей по полипептидам семян достаточно прост в исполнении. В то же время, этот элементарный электрофорез позволяет дать весьма существенные характеристики неизвестной популяции, виду, сорту, любому образцу из сем. *Fabaceae* — определить тип опыления, и сделать некоторые предположения о его происхождении.

ВЫВОДЫ

Анализ зависимости между уровнем полипептидной вариабельности и характером опыления показал, что 7 из 13 популяций *H. theinum* характеризовались перекрестным типом опыления, в двух популяциях было обнаружено самоопыление и в четырех — разнохарактерный тип опыления.

У растений *H. theinum* из популяций 3 и 17, характеризующихся самоопылением по электрофоретическим спектрам полипептидов семян, при

изоляции в первый год образовалось небольшое число семян.

У растения из популяции 5, характеризующегося перекрестным типом опыления, только через 8 лет завязалось небольшое число плохо выполненных семян, что подтверждает факт образования в редких случаях семян путем самоопыления у растений, характеризующихся преимущественно перекрестным типом опыления. Кроме того, при самоопы-

лении этого растения произошло расщепление на исходные родительские и дочерние формы, что отразилось на полипептидном составе и подтвердило гибридное происхождение этого растения.

Метод электрофореза полипептидов семян позволяет прогнозировать не только преобладающий тип опыления, но также выявлять гибридные рас-

тения, получая при этом некоторые сведения об исходных родительских формах.

Авторы выражают благодарность м.н.с. ЦСБС СО РАН С.Б. Нечепуренко (Володарской) за любезно предоставленный семенной материал. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта по программе Президиума РАН «Биоразнообразие и динамика генофондов».

ЛИТЕРАТУРА

- Агафонова О.В., Агафонов А.В. Повышение разрешающей способности электрофоретического метода для таксономических и генетико-селекционных исследований многолетних злаков трибы Пшеницевые (*Triticeae*). Киев, 1991. 11 с. (Деп. ВИНТИ 23.10.91, № 2467-В91).
- Агафонова О.В., Володарская С.Б. Продуктивность и содержание олигомерных катехинов у *Hedysarum theinum* Krasnob. в центральном и юго-западном Алтае // Раст. ресурсы. 2000. Вып. 4. С. 47–52.
- 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.
- Егги Э.Э., Потокина Е.К. Перекрестник или самоопылитель? Электрофоретическое разделение полипептидов семян для определения способа опыления у бобовых // Бот. журн. 1998. Т. 83. № 12. С. 77–83.
- Жученко А.А. Адаптивный потенциал культурных растений (эколого-генетические основы). Кишнев, 1988. 766 с.
- Конарев А.В., Цикало Н.В., Жиров Е.Г. Анализ геномного состава амфидиплоидов по белкам зерна // Бюл. ВИР. 1985. Вып. 149. С. 751–757.
- Красная книга Республики Алтай (растения). Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды растений. Новосибирск, 1996. 130 с.
- Красноборов И.М., Азовцев Г.Р., Орлов В.П. Новый вид рода *Hedysarum* (*Fabaceae*) из Южной Сибири // Бот. журн. 1985. Т. 70. № 7. С. 968–973.
- Сеппар Э.Э. К анэкологии некоторых видов рода *Hedysarum* L. О ритмах цветения копеечников // Науч. докл. высш. школы. Биол. науки. 1971. № 11. С. 55–60.
- Ayala G.J., Muraio C.A., Perez-Salas S. Enzyme variability in the *Drosophilae* Williston group. I. Genetic differentiation among species // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1970. № 67. P. 225–232.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. Vol. 227. № 5259. P. 680–685.
- Stebbins G.L., Flowering plants: Evolution above the species level. Cambridge (Mass.), 1974. P. 1–34.