

Кутлунина Н.А.\*, Беляев А.Ю.\*\*

\*Уральский государственный университет им. А.М. Горького, Екатеринбург

\*\*Институт экологии растений и животных УрО РАН, Екатеринбург

## ГЕНОТИПИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И КЛОНОВАЯ СТРУКТУРА В ПОПУЛЯЦИЯХ ДВУХ БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ ВИДОВ ТЮЛЬПАНА НА ЮЖНОМ УРАЛЕ

Исследовано генотипическое разнообразие в трех популяциях стерильного триплоида – тюльпана приречного (*Tulipa riparia*) и двух популяциях диплоидного вида – тюльпана Биберштейна (*T. biebersteiniana*) методом изоферментного анализа. Обсуждаются причины высокой генотипической изменчивости *T. riparia* и возможные механизмы формирования клоновой структуры.

### Введение

Большинство травянистых многолетних растений сочетают половое размножение с одной из форм вегетативного и, таким образом, обладают способностью формировать клоны. Соотношение семенного и вегетативного размножения зависит от внешних и внутренних факторов. Неблагоприятные условия среды ограничивают половое размножение и усиливают клональный рост. Большое влияние на баланс этих двух форм размножения оказывают генетические факторы [1]. Так, полиплоидизация может приводить к частичной или полной стерилизации и утрате полового размножения. Каковы эволюционные последствия перехода к клональному росту? Существует ли опасность того, что вегетативная репродукция приведет к снижению или потере генетического разнообразия в популяции? По-видимому, риск не очень велик, так как большинство видов сохраняет способность к половому размножению, а даже его низкий уровень может поддерживать генетическое разнообразие [2]. В то же время наличие семенного размножения не всегда гарантирует сохранение высокого уровня генетической изменчивости, так как различные факторы – дрейф генов, инбридинг и давление отбора могут приводить к генетическому истощению [3].

На Южном Урале произрастает тюльпан Биберштейна *Tulipa biebersteiniana* Shult. et Shult. fil. – евроазиатский степной вид, характеризующийся высоким полиморфизмом. Известно, что на большей части своего ареала вид представлен желтоцветковыми особями. Но в бассейне р. Белой, по ее притокам, стекающим с западного макросклона Уральских гор, преобладают розовоцветко-

вые особи. В 2001 году М.С. Князев, П.В. Куликов и Е.Г. Филиппов описали тюльпан приречный – *Tulipa riparia* Knjasev, Kulikov et Philiprov, отличающийся от тюльпана Биберштейна более крупными размерами, преобладанием розовоцветковых форм, триплоидностью и отсутствием плодоношения [4]. П.В. Куликов [5] рассматривает *T. riparia* как триплоидную расу *T. biebersteiniana* и относит его к неморальным эндемикам Южного Урала. Увеличение числа особей тюльпана приречного происходит вегетативно. У большинства достаточно крупных луковиц в начале вегетационного периода образуется горизонтальный стolon длиной 10-20 см. Впоследствии на конце stolона формируется луковичка, а stolон отмирает. Со временем возникает клон не связанных между собой ramet, которые могут быть удалены друг от друга на достаточно большое расстояние. Виды с таким типом клонального роста называются «партизаны» (guerrilla) в отличие от видов с плотным клоном – «пучок» (phalanx) [3]. В связи с тем, что семенное размножение у тюльпана приречного ни в природе, ни в культуре не отмечено [4], можно было предполагать существование популяций, состоящих из одного или небольшого числа клонов. Однако наблюдения в природе и культуре выявили изменчивость окраски околоцветника [4;6], а исследования показали неоднородность особей одной популяции по уровню фертильности пыльцевых зерен [7]. В связи с этим целью нашего исследования была оценка генотипической изменчивости в трех популяциях *T. riparia*. Для сравнения мы исследовали популяции близкого, по-видимому, родительского вида – *T. biebersteiniana*, который также способен к

вегетативному размножению путем формирования столонов с дочерней луковицей, но в то же время не утрачивает семенного размножения. Для оценки генотипического разнообразия мы использовали метод изоферментного анализа. Данный метод успешно использован для идентификации сортов культурных тюльпанов [8; 9]. Для дикорастущих тюльпанов подобные исследования проводятся впервые.

#### Материал и методика

В 2005-2006 гг. исследованы три популяции *T. riparia* в районе среднего течения р. Сим (Челябинская область). Первая популяция – Сим расположена на пойменном злаково-крупнотравном лугу, между железнодорожным полотном и руслом реки Сим (в 10 км выше г. Аша). Вторая популяция – Куряк находится в пойме левобережного притока р. Сим – р. Куряк в одном км от устья, основные типы сообществ – пойменные злаково-крупнотравные луга и прирусловые умеренные заросли. Третья популяция – Малоюз находится в одном км от станции Бьянка в пойме ручья Малоюз в составе черемухово-ольховых кустарниковых сообществ.

В 2006 г. исследованы две популяции *T. biebersteiniana*: в 3 км к юго-востоку от п. Халилово (популяция Халилово) и в окрестностях станции Губерля (популяция Губерля) (Оренбургская область). В популяции Халилово материал был собран в пяти микропопуляциях, расположенных в 200-500 м друг от друга. Три микропопуляции произрастают в межсочных понижениях с луговой степью, четвертая – на лугу рядом с шоссе Орск – Кувандык, пятая – в умеренных зарослях ручья, впадающего в р. Большая Каля. В популяции Губерля материал собирали по двум межсочным понижениям с временными водотоками.

Для изоферментного анализа и кариологических исследований выкапывали растения, произрастающие на расстоянии не менее 2-3 м друг от друга. Для более детальной оценки распределения клонов у *T. riparia* были заложены трансекты протяженностью от нескольких десятков метров в небольшой популяции на р. Малоюз, до трех км – вдоль

берега р. Сим. На трансектах пробы включали все луковицы с площади 15x15 см.

Приготовление экстрактов для изоферментного анализа проводили по стандартной методике [10]. Для выявления органоспецифичной изменчивости изоэнзимов и сравнения их активности использовали различные органы тюльпанов: чешуи луковиц, столоны, зеленые ростки луковиц, листовые пластинки, стебли.

Для исследования влияния времени и условий хранения луковиц на активность изоферментов использовали: 1) экстракты из свежесобраных луковиц, 2) экстракты из хранившихся при комнатной температуре в течение 2-3 месяцев, а затем стратифицированных и пророщенных луковиц, 3) то же без стратификации. Экстракты, приготовленные для анализа, хранили в морозильной камере при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Электрофорез проводили в 6,4%-ном полиакриламидном геле в трис-ЭДТА-боратной системе по протоколу, описанному в работе В.Л. Семерикова и А.Ю. Беляева [10]. Для исследования были использованы 7 полиморфных ферментных систем: АДН – алкогольдегидрогеназа (К.Ф.1.1.1.1), ИДН – изоцитратдегидрогеназа (К.Ф.1.1.1.42), 6-PGD – 6-фосфоглюконатдегидрогеназа (К.Ф.1.1.1.43), SkDH – шикиматдегидрогеназа (К.Ф.1.1.1.25), PGI – фосфоглюкоизомераза (К.Ф.5.3.1.9), PGM – фосфоглюкомутаза (К.Ф.5.4.2.2), С-EST – колориметрическая эстераза (К.Ф.3.1.1.1). В связи с триплоидностью тюльпана приречного интерпретация электрофореграмм в терминах «локус-аллель» невозможна. Анализ зимограмм для отдельных растений позволил выявить своеобразные сочетания бэндов (окрашиваемых полос) по каждой ферментной системе, которые мы интерпретируем как морфы. Идентичные сочетания морф по большинству систем у сравниваемых особей рассматривали как свидетельство принадлежности растений к одному изоэнзимному фенотипу или генотипу (клону).

Генотипическое разнообразие оценивали с помощью модифицированного индекса разнообразия Симпсона, предложенного для клональных растений [11]:  $D = 1 - \{[\sum n_i(n_i - 1)] / [N(N-1)]\}$ , где  $n_i$  – число выявленных в популяции изоэнзимных фенотипов  $i$  (и соответственно генотипов),  $N$  – общее число проана-

лизированных растений. Индекс разнообразия D варьирует от 0 в популяциях, состоящих из одного генотипа, до единицы в популяциях, где каждая особь является уникальным генотипом.

### Результаты и их обсуждение

Исследование нескольких модельных растений тюльпанов показало, что все энзимные системы демонстрировали идентичность зимограмм, полученных для разных органов одного растения тюльпана. В то же время активность изоферментов органоспецифична. Максимальная активность отмечена в запасующих чешуях луковиц, столонах и прорастающих побегах луковиц, чуть ниже – в листьях и самая низкая активность – в стеблях.

Исследование влияния времени и условий хранения луковиц показало наибольшую интенсивность окрашивания в геле экстрактов из свежесобранных луковиц, удовлетворительная активность ферментов наблюдалась и после 2-3-месячного хранения при комнатной температуре и последующего прора-

щивания луковиц. Более длительное хранение луковиц приводило к значительному снижению активности изоэнзимов вплоть до полного исчезновения их окрашивания в гелях.

Изучение электрофореграмм позволило выделить морфы *T. riparia* и *T. biebersteiniana* по шести ферментным системам, причем у системы PGI использовали быструю (PGI1) и медленную (PGI2) зоны активности. Изофореграммы по колориметрической эстеразе не представлены в виде морф из-за множественности бэндов, хотя использованы нами для выявления генотипов (клонов).

По всем системам, кроме SkDH и C-EST, состав морф в двух популяциях *T. biebersteiniana* сходный, доля уникальных морф в каждой популяции невелика (табл. 1).

В популяции *T. biebersteiniana* Халилово выявлено 27 изозимных генотипов среди 57 проанализированных растений (табл. 2); 16 генотипов являются уникальными, то есть каждый представлен одной особью, остальные 11 встречаются неоднократно (от 2 до 9), что свидетельствует о формировании рас-

Таблица 1. Частота встречаемости морф ферментных систем *T. biebersteiniana*, %

Система	Морфа	Халилово	Губерля	Система	Морфа	Халилово	Губерля		
SkDH	1	8,77	0	PGI1	1	71,93	25		
	2	19,30	0		2	10,53	33,14		
	3	5,26	0		3	15,79	17,96		
	4	5,26	0		4	1,75	25		
	5	15,79	28,57		N	57	28		
	6	15,79	0		IDH	1	47,37	14,29	
	7	0	35,71			2	31,58	75	
	8	3,51	14,29			3	3,51	10,71	
	9	0	10,71			4	17,54	0	
	10	7,02	0			N	57	28	
	11	0	10,71			6- PGD	1	20,51	45,11
	12	10,53	0				2	41,03	0
	13	8,77	0		3		25,64	54,89	
N	57	28	4	12,82	0				
PGI2	1	24,56	33,33	PGM	N	39	24		
	2	17,54	0		1	87,24	51,55		
	3	8,77	0		2	4	11		
	4	0	3,70		3	8,76	0		
	5	19,30	7,40		4	0	37,45		
	6	17,54	0		N	37	27		
	7	3,51	11,11		ADH	1	23,91	48,6	
	8	1,75	0			2	47,83	7,44	
	9	1,75	7,4			3	10,87	0	
	10	3,51	25,93			4	13,04	43,96	
	11	1,75	11,11			5	4,35	0	
N	57	27	N	46	24				

Примечание: N – общее число растений, проанализированных по данной ферментной системе

Таблица 2. Генотипическое разнообразие в популяциях *T. riparia* и *T. biebersteiniana*

Вид	Местонахождение	Число рамет в выборке	Число генет (генотипов) в выборке	Индекс разнообразия Симпсона (D)
<i>T. biebersteiniana</i>	3 км к юго-западу от п. Халилово	57	27	0,94
<i>T. biebersteiniana</i>	Окрестности ст. Губерля	28	12	0,95
<i>T. riparia</i>	Р. Сим	45	10	0,82
<i>T. riparia</i>	Р. Куряк	73	6	0,76
<i>T. riparia</i>	Ручей Малоюз	43	7	0,77

селяющихся клонов. Все клоны представлены небольшим числом особей, которые находятся на ограниченном расстоянии друг от друга. В пойме ручья, впадающего в р. Большая Каяла, обнаружен триплоидный клон *T. biebersteiniana* ( $2n = 3x = 36$ ). Это удалось установить по характеру бэндов системы SkDN (три бэнда встречаются только у триплоидных тюльпанов, у диплоидных – один или два) и подтвердить кариологическими исследованиями. Ранее для *T. biebersteiniana* указывали только диплоидный ( $2n = 2x = 24$ ) и тетраплоидный ( $2n = 4x = 48$ ) уровни [12; 13].

В популяции *T. biebersteiniana* Губерля выявлено 12 изоэнзимных генотипов среди 28 растений (табл. 2). Четыре генотипа являются уникальными, 8 – представлены растениями расселяющихся клонов, в состав которых входит от 2 до 5 растений изученной выборки. Значение индекса разнообразия очень близко к популяции Халилово и составляет 0,95.

Таким образом, генотипическая структура популяций *T. biebersteiniana* свидетельствует о сочетании семенного размножения и клонального роста. Клоны расположены достаточно локально, так как отсутствуют особые факторы расселения луковиц.

В каждой популяции *T. riparia* по большинству ферментных систем имеется свой набор уникальных морф и только одна-две морфы являются общими для трех популяций (табл. 3).

В популяции *T. riparia* на р. Сим обнаружено 10 изосимных генотипа в выборке из 45 растений. Три генотипа являются уникальными, остальные встретились неоднократно, свидетельствуя о формировании клонов. В них насчитывалось от 2 до 16 растений. Наиболее часто встречались два генотипа, их

доли в популяции – 25,5 и 34%. Растения из этих клонов имеют розовую окраску околоцветника. Именно эти клоны далеко расселились вдоль р. Сим и были собраны на протяжении 3 км вдоль русла.

В популяции на р. Куряк выявлено 6 генотипов среди 73 исследованных растений. Три генотипа преобладают, составляя 35,6, 31,5 и 20,5%. Им свойственна соответственно розовая, желтая и светло-желто-розовая окраска околоцветника.

В популяции на р. Малоюз наблюдалось 7 генотипов на 43 растения. Все генотипы представлены нешироко расселившимися клонами.

Таким образом, установлено, что во всех трех популяциях стерильного триплоида *T. riparia* генотипическое разнообразие несколько ниже, чем у родственного *T. biebersteiniana*, способного к семенному размножению, но выше, чем в среднем у клональных видов. N. Ellstrand и M. Roose [11] проанализировали данные по 21 клональному виду, средний индекс разнообразия, подсчитанный ими, составил 0,62. Генотипическое разнообразие имеет тенденцию незначительно возрастать от притоков (р. Куряк и ручей Малоюз) к принимающей их реке (Сим). Интересно то, что для каждой популяции нами обнаружен свой набор генотипов, то есть ни один генотип не встречается в двух популяциях. Такой высокий уровень генетической изменчивости между популяциями считается атипичным для клональных видов, хотя был отмечен у клонального бромелиевого – экмеи и тополя осинообразного [3].

Каковы причины высокого внутривидового генетического разнообразия клональных видов, в том числе *T. riparia*? В качестве возможных причин называются:

сохранение способности к половому размножению [14]; специализация по местообитаниям, когда различные клоны занимают участки с разными микроусловиями [3]; соматические мутации [15]; многократное происхождение видов [16]. Применительно к *T. riparia* более предпочтительными являются первая и последняя причины. Несмотря на триплоидность тюльпана и на то, что плодоношения в природе не обнаружено, нельзя полностью исключать наличие редкого семенного размножения, а такие случаи приводят к рекомбинации и сохранению генетического разнообразия. Известны факты, когда нечетные полиплоиды, в том числе триплоиды, иногда способны формировать семена. Редкое семенное размножение отмечено у триплоидов сусака зонтичного [17] и хлебного дерева [18].

Мы определяли фертильность пыльцы у растений *T. riparia* из популяции на р. Куряк [7]. Средний показатель составляет 42,6%, диапазон варьирования – от 11,8 до 77,1%. Исследование женской репродуктивной сферы показало наличие значительных нарушений развития, приводящих к полной дегенерации семязпочек более чем у половины исследованных растений. В то же время обнаружены растения с нормальными семязпочками, в которых формируются зародышевые мешки *Eryostemones*-типа. Таким образом, состояние репродуктивной сферы *T. riparia* свидетельствует о возможности спорадического семенного размножения. Фактором, ограничивающим или исключаящим этот процесс, является фитоценотическая обстановка злаково-крупнотравного пойменного луга. Вызреванию семян препятствует густой травостой высотой более 1 м, а прорастанию семян – значительное задержание.

По-видимому, одним из источников генотипической изменчивости *T. riparia* является его аллополиплоидная природа, установленная нами при изучении кариотипа и дифференциальном окрашивании хромосом [19]. У аллополиплоидов возможны различные комбинации родительских геномов и как следствие – неоднородность видов [16]. Еще одним источником изменчивости аллополиплоидов являются хромосомные и ге-

Таблица 3. Частота встречаемости морф ферментных систем *T. riparia*, %

Система	Морфа	Сим	Куряк	Малоюз
Skdh	1	23,91	26,67	19,05
	2	36,96	0	0
	3	26,09	0	0
	4	2,17	0	0
	5	4,35	4	33,33
	6	6,52	0	0
	7	0	36	0
	8	0	30,67	0
	9	0	2,67	0
	10	0	0	19,05
	11	0	0	9,52
	12	0	0	19,05
N		46	75	42
Pci2	1	26,09	1,59	51,28
	2	32,61	0	0
	3	36,96	0	0
	4	4,35	0	0
	5	0	41,27	17,95
	6	0	53,97	0
	7	0	3,17	0
	8	0	0	20,51
	9	0	0	7,69
	10	0	0	2,56
N		46	63	39
Pci1	1	47,73	43,33	73,53
	2	27,27	11,67	17,65
	3	15,90	45	8,82
	4	9,09	0	0
	N		44	60
Idh	1	48,84	41,67	0
	2	34,88	6,94	61,11
	3	2,33	0	0
	4	6,98	0	0
	5	6,98	34,72	38,89
	6	0	16,67	0
N		43	72	36
6-Pcd	1	33,33	4,48	18,92
	2	15,56	0	0
	3	33,33	61,19	0
	4	17,78	0	0
	5	0	31,34	81,08
	6	0	2,99	0
N		45	67	37
Pgm	1	83,73	74,3	86,80
	2	11,12	10,52	13,20
	3	5,15	15,18	0
	N		43	65
Adh	1	40	0	0
	2	17,50	0	0
	3	32,50	0	0
	4	5	0	0
	5	5	0	0
	6	0	32,84	0
	7	0	62,69	0
	8	0	4,48	0
	9	0	0	5,13
	10	0	0	33,33
	11	0	0	41,03
	12	0	0	20,51
N		40	67	39

Примечание: N – общее число растений, проанализированных по данной ферментной системе

номные перестройки, увеличивающие структурный полиморфизм и пластичность вида [20; 21].

Анализ пространственной структуры популяций *T. riparia* позволил выявить ряд закономерностей. Как и все «партизаны», *T. riparia* формирует рыхлые взаимопроникающие клоны, поэтому в одной пробе вдоль трансекты можно обнаружить два и даже три генотипа. Расселение клонов вдоль русел рек и ручьев происходит за счет мощных водных потоков в периоды весенних и летних павод-

ков. Так, в 2005 и 2006 гг. на р. Куряк мы наблюдали в весенний период, как происходит размывание берега и дернины, на которых произрастает тюльпан, падают в воду и луковицы переносятся по течению. Поэтому на р. Куряк мы встречаем один и тот же клон на протяжении километра по течению реки, а на р. Сим – на протяжении 3-х км. Отбор проб по трансекте вдоль реки показал, что максимальное генетическое разнообразие и высокая мозаичность распределения клонов обнаруживаются именно здесь.

**Список использованной литературы:**

1. Eckert C.G. The loss of sex in clonal plants // *Evol. Ecol.* 2002. 15. P. 501-520.
2. Silander J.A. Microevolution in clonal plants // *Population biology and evolution of clonal organisms.* 1985. New Haven. P. 107-152.
3. Mclellan A.J., Prati D., Kalts O., Schmid B. Structure and analysis of phenotypic and genetic variation in clonal plants // In: *The ecology and evolution of clonal plants* Edd. H. De Kroon and J van Groenendael. Backhuys Publishers, Leiden, 1997. P. 185-210.
4. Князев М.С., Куликов П.В., Филиппов Е.Г. Тюльпаны родства *Tulipa biebersteiniana* (Liliaceae) на Южном Урале // *Бот. журн.* 2001. Т.86. №3. С. 109-119.
5. Куликов П.В. Конспект флоры Челябинской области (сосудистые растения). Екатеринбург – Миасс: «Геотур». 2005. 537 с.
6. Беляев А.Ю., Князев М.С. Раноцветущие декоративные многолетники уральской флоры, перспективные для озеленения // *Новые декоративные растения в культуре на Среднем Урале: Сб. науч. трудов.* Свердловск: УНЦ АН СССР, 1986. С. 3-12.
7. Кутлунина Н.А., Жеребцова М.И., Зимницкая С.А. Размер и качество пыльцевых зерен видов *Tulipa* (Liliaceae) и *Saxifraga* (Saxifragaceae) разной ploидности // *Бот. журн.* 2006. Т. 91. №11. С. 1695-1704.
8. Booy G, Donkers-Venne T.H.M., van der Schoot J. Identification of tulip cultivars based on polymorphism in esterase isozymes from bulb scales // *Euphytica.* 1993. 69. P. 167-176.
9. Booy G., Van Raamsdonk L.W.D. Variation in the enzyme within and between *Tulipa* species; usefulness for the analysis of genetic relationships at different taxonomical level // *Biochemical Syst. and Ecol.* 1998. 26. P. 199-224.
10. Семериков В.Л., Беляев А.Ю. Аллозимный полиморфизм в природных популяциях и культурных сортах клевера лугового (*Trifolium pratense* L.) // *Генетика.* 1995. 31. №6. С. 815-819.
11. Ellstrand N.C., Roose M.L. Pattern of genotypic diversity in clonal plant species // *Amer. J. Bot.* 1987. Vol. 74. P. 123-131.
12. Бочанцева З.П. Тюльпаны: морфология, цитология и биология. Ташкент, 1962. 408 с.
13. Дanelия И.М. К кариосистематике некоторых кавказских представителей рода *Tulipa* (Liliaceae) // *Бот. журн.* 1989. Т. 74. №2. С. 193-200.
14. Pornon A., Escaravage N., Till-Bottraud I., Doche B. Variation of reproductive traits in *Rhododendron ferrugineum* L. (*Ericaceae*) populations along a successional gradient // *Plant Ecology.* 1997. Vol. 130. P. 1-11.
15. Eckert C.G. Clonal plant research: proliferation, integration, but not much evolution // *Amer. J. Bot.* 1999. 86 (11). P. 1649-1654.
16. Soltis P.S., Soltis D.E. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. Vol. 97. №13. P. 7051-7057.
17. Eckert C.G., Massonnet B., Thomas J.J. Variation in sexual and clonal reproduction among introduced populations of flowering rush, *Butomus umbellatus* (Butomaceae) // *Can. J. Bot.* 2000. 78. P. 437-446.
18. Ragon D. Chromosome number and pollen stainability of three species of Pacific Island breadfruit (*Artocarpus*, Moraceae) // *Amer. J. Bot.* 2001. 88 (4). P. 693-696.
19. Кутлунина Н.А., Коперуба В.В. Дифференциальное окрашивание хромосом тюльпанов секции *Eriostemones* (Liliaceae), произрастающих на Южном Урале, в связи с проблемами эволюции группы // *Материалы конференции по морфологии и систематике растений, посвященной 300-летию со дня рождения Карла Линнея.* М. 2007. С. 115-117.
20. Козлова А.А., Карташова Н.Н. Адаптивная роль структурного полиморфизма триплоидов *Paris quadrifolia* L. // *Популяции растений (генетическая и цитогенетическая структура): Межвуз. Сб. Л.:Изд-во Ленингр. Ун-та, 1979. С. 132-145.*
21. Leitch I.J., Bennet M.D. Polyploidy in angiosperms // *Trends Plant Sci.* 1997.12. P. 470-476.

**Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №07-04-00768-а.**