

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ЧАСТОТЫ АПОМИКСИСА И ПОЛОВОЙ СТРУКТУРЫ В ПОПУЛЯЦИЯХ *ANTENNARIA DIOICA* ЕВРОПЕЙСКОЙ ЧАСТИ РОССИИ

Из рода *Antennaria* Gaertn. (Asteraceae) на территории европейской части России широко распространён только вид *A. dioica* (L.) Gaertn. [1]. В средней полосе России этот вид во всех областях довольно обычен, хотя к югу и юго-востоку встречается реже [2]. По Саратовской области проходит юго-восточная граница ареала вида в европейской части России. Вид спорадически встречается лишь в северных и центральных районах Правобережья [3].

Известно, что в роде широко распространён автономный гаметофитный апомиксис в регулярной форме (апоспория + нередуцированный партеногенез). Он описан примерно у 20 видов рода, в т.ч. и у *A. dioica* [4–7]. Изучение особенностей репродуктивной биологии данного вида в экстремальных условиях обитания на границе ареала и в центральной его части представляет безусловный интерес.

Материалы и методика

Исследовали 13 популяций *A. dioica*, произрастающих в Саратовской, Пензенской, Ульяновской, Кировской областях и Республиках Чувашии, Мари-Эл, Коми по градиенту географических координат (51°30' СШ, 45°30' ВД – 60°00' СШ, 49°30' ВД). Основные исследования проводили в четырёх популяциях *A. dioica* из Татищевского, Б.-Карабулакского, Хвалынского и Вольского районов Саратовской области.

Исследования проводили в 2007–2012 гг. Частоту апомиксиса диагностировали на основе сравнения семенной продуктивности растений при свободном опылении и беспыльцевом режиме цветения. Исследовали в среднем 30 растений каждого вида, отбор которых осуществляли случайным образом. Для обеспечения беспыльцевого режима соцветия «женских» растений за 2–3 дня до цветения краевых цветков помещали под пергаментные изоляторы, под которыми они находились до полного созревания семян. Сбор семян, завязавшихся при свободном опылении, собирали по достижению ими зрелого состояния. При подсчете семена разделяли на два морфологических класса по степени

выполненности (выполненные и шуплые). Затем вычисляли частоту завязываемости семян, как процентное отношение числа выполненных семян к общему числу цветков в соцветии.

Соцветия для цитоэмбриологического анализа фиксировали за 1–3 суток до начала цветения в фиксаторе Кларка. Для просветления семязачатков использовали просветляющую жидкость Герра [8]. Методика приготовления препаратов «просветлённых» семязачатков модифицирована нами. Цветки выдерживали в железоммонийных квасцах 20 минут, затем подкрашивали в ацетокармине 5–12 часов. Из цветков выделяли семязачатки и мацерировали их с помощью цитазы 1 час. После этого под стереомикроскопом Stemi 2000 (Karl Zeiss, Германия) удаляли внешние слои клеток, оставляя зародышевый мешок, окружённый интегументальным тапетумом. Эту структуру переносили на предметное стекло в каплю просветляющей жидкости, накрывали покровным стеклом и оставляли не менее чем на 1 час, после чего анализировали препараты под микроскопом Axiostar-plus (Karl Zeiss, Германия) в режиме фазового контраста при увеличении $\times 400$.

Вариационные ряды обсчитывали с помощью программного продукта Microsoft Office Excel 2007. Сравнение вариационных рядов осуществляли по критерию Стьюдента (t_{st}) при уровне значимости $P \leq 0,95$. В случае близости величин среднеарифметической к 0 или 100% для определения доверительного интервала использовали метод ср. Для сравнения качественных признаков использовали метод вычисления средней ошибки при альтернативном распределении [9, 10].

Результаты и обсуждение

Семенная продуктивность *A. dioica* при различных режимах цветения. На территории Саратовской области в популяциях растения *A. dioica* ведут себя почти как исключительно амфимитичные. Из 6 лет наблюдений (2007–2012 гг.) при среднем (30–70%) и низком (0–20%) уровне семенной продуктивности при цветении в условиях свободного опыления семенная продуктивность при беспыльцевом

режиме цветения во всех 4-х исследованных популяциях Саратовской области была равна 0. Исключение составляет только популяция из Б.-Карабулакского района, в которой в 2012 г. семенная продуктивность при данном режиме цветения была на уровне $13,77 \pm 0,62 \%$. Интересно, что в популяциях Пензенской области, произрастающих на 100–300 км севернее Саратовских популяций, во все годы наблюдений имела место завязываемость семян при беспыльцевом режиме цветения на фоне низкой семенной продуктивности при цветении в условиях свободного опыления. С учётом этого частота формирования семян путём апомиксиса в этих популяциях *A. dioica* была на уровне 10–60%.

Частота апомиксиса в популяциях *A. dioica* по цитоэмбриологическим маркёрным признакам. При цитоэмбриологическом изучении в 2007–2010 гг. у растений *A. dioica* из популяций Саратовской области признаков апомиксиса обнаружено не было. При этом формировались нормально дифференцированные эуспорические мегагаметофиты, морфологически подобные *Polygonum*-типу. В 2012 г. исключение составили только популяции из Татищевского и Б.-Карабулакского районов. В них в 2007–2010 гг. подобных признаков также не выявлено, но в 2012 г. с частотой около 1,0 % обнаружена апоспория или преждевременная эмбриония.

В то же время у растений популяций, произрастающих в Пензенской области в годы наблюдения (2009, 2010, 2012) чаще всего обнаруживались цитоэмбриологические признаки апомиксиса с частотой 5–30 %. При этом имело место как формирование апоспорических инициалей, так и преждевременная эмбриония. Только в одной популяции в 2010 г. признаков гаметофитного апомиксиса на уровне цитоэмбриологического контроля не обнаружено. Однако и в этой популяции в данный год наблюдения семена в условиях беспыльцевого режима цветения завязывались. Всё это однозначно указывает на то, что популяции *A. dioica* из Пензенской области во все годы наблюдения вели себя как факультативно апомиктические с варьирующей по годам частотой гаметофитного апомиксиса. При этом наряду с преждевременной эмбрионией у растений данной популяции выявлены и случаи развития апоспорических инициалей вблизи нормально сформированного эуспорического мегагаметофита ($16,4 \pm 0,8 \%$). Примечательно, что в данной популяции в 2010 г. Эмбри-

ологических признаков гаметофитного апомиксиса обнаружено не было, но в $5,0 \pm 0,4 \%$ семязачатков мегагаметофиты эуспорической природы дегенерировали.

Сходным образом вели себя и исследованные в разные годы популяции *A. dioica* в Ульяновской и Кировской областях. У растений популяции из Ульяновской области в 2010 г. обнаружены цитоэмбриологические признаки апомиксиса в виде преждевременной эмбрионии на уровне ($12,9 \pm 0,5 \%$). В популяции 672 из Кировской области также в 2010 г. выявлены эмбриологические признаки апомиксиса, правда, в форме апоспорических инициалей в семязачатках, – причём рядом с дегенерировавшим эуспорическим мегагаметофитом, в то время как в 2011 г. такие признаки отсутствовали. В популяции, произрастающей в Республике Чувашии выявлены цитоэмбриологические признаки гаметофитного апомиксиса в форме преждевременной эмбрионии с частотой $1,1 \pm 0,2 \%$, а у растений популяции из Республики Мари-Эл – с частотой $3,00 \pm 0,21 \%$.

В ряде семязачатков у растений *A. dioica* были выявлены и случаи развития в одном семязачатке двух мегагаметофитов. Правда, по результатам исследования ничего нельзя сказать о природе этих мегагаметофитов. Однако на том основании, что в семязачатках растений данного вида с достаточно высокой частотой обнаруживались апоспорические инициалы в присутствии мегагаметофитов эуспорической природы, логично предположить, что один из таких мегагаметофитов имеет эуспорическую, а другой – апоспорическую природу.

Таким образом, в популяциях *A. dioica*, исследованных в Ульяновской области, Республиках Чувашия и Мари-Эл, и в одной из популяций, исследованной на юге Кировской области, с различной частотой, варьирующей по годам, по крайней мере, в отдельные года наблюдения обнаружены цитоэмбриологические признаки апомиксиса (в популяции из Ульяновской области – в 2 из трёх лет наблюдения, Республики Чувашия – в оба года наблюдения, Республики Мари-Эл – в один из двух лет наблюдения, на юге Кировской области – в один из 3-х лет наблюдения). Только в популяциях севера Кировской области и популяции Республики Коми способность к апомиксису даже на уровне цитоэмбриологических признаков не обнаружена. Фактически речь идёт о популяциях, находящихся вблизи северной границы ареала исследуемого вида.

Из всего вышеизложенного напрашивается вывод о том, что в отношении склонности к гаметофитному апомиксису, а, скорее, и в отношении реализации апомиксиса как способа семенной репродукции по градиенту географических широт в европейской части России ближе к южной и северной границам ареала растения *A. dioica* ведут себя как облигатно амфимиктичные, а в центральной части ареала – как факультативно апомиктичные.

Половая структура популяций *A. dioica*. Известно, что *A. dioica* свойственна диэция. Как показали наши исследования, популяции вида существенно различаются по половой структуре, как между собой, так и внутри одной популяции по годам. Так в 2008 г. в популяции Татищевского района Саратовской области доля цветущих «мужских» растений составила около 80% от числа проанализированных растений, а в популяциях Б.-Карабулакского и Хвалынского районов – лишь около 2/5 и 1/3 цветущих растений, соответственно, были «мужскими».

В 2009 г. в популяции Татищевского района доля цветущих «мужских» и «женских» растений была примерно равной, в популяции Б.-Карабулакского района доля «мужских» растений составила около 2/3 от общего числа цветущих в ней растений. В популяции Хвалынского района доля таких растений составила почти 90%, а в популяции Вольского района – все 100% цветущих особей.

В 2010 г. в популяциях Татищевского и Хвалынского районов соотношение цветущих «мужских» и «женских» особей сохранилось на уровне 2009 г. Однако в популяции Хвалынского района доля цветущих «мужских» и «женских» растений была относительно близкой, притом, что в 2009 г. «мужские» растения составили почти 90% от общего числа цветущих особей. В популяции Вольского района в этот год цвели только «женские» растения.

После чрезвычайно засушливых условий 2010 г. во всех четырёх исследуемых популяциях Саратовской области в 2011 г. отсутствовали цветущие растения.

В 2012 г. в популяции Татищевского района среди цветущих растений доля «мужских» составила 90%. В популяции Б.-Карабулакского района доля таких растений составила лишь около 1/3, в Хвалынском и Вольском районах цвели только «мужские» растения. Причём в Вольском районе «женские» растения в популяции после засухи 2010 г.

элиминировали полностью, а в популяции Хвалынского района – в подавляющем большинстве.

В популяциях *A. dioica* из Пензенской области соотношение цветущих «мужских» и «женских» растений изменялось по годам скоррелированно и в каждый из лет наблюдений было близким. Так в 2009 и 2010 гг. это соотношение было смещено в сторону «мужских» растений (около 2/3 от числа цветущих). В 2011 г., – после засухи 2010 г., – растения в популяциях фактически не цвели, а в 2012 г. в обеих исследованных популяциях соотношение «мужских» и «женских» цветущих растений было близко к 1:1.

Интересная картина с половой структурой популяций *A. dioica* складывалась в годы исследования и в регионах европейской части России, расположенных севернее выше описанных. Так в 2011 г., в котором в популяциях Саратовской области растения вообще не цвели, а в популяциях Пензенской области цвели лишь отдельные растения, в популяциях Ульяновской и Кировской областей, а также Республики Мари-Эл не очень обильное цветение растений всё же наблюдалось, причём более 2/3 цветущих растений составляли «мужские» особи.

В 2012 г. во всех этих популяциях баланс цветущих «мужских» и «женских» особей был близок к соотношению 1 : 1. Только в самой северной популяции из Республики Коми он был смещён в сторону «мужских» особей и был близок к соотношению 2 : 3.

Таким образом, популяции *A. dioica* из Саратовской области очень нестабильны в отношении половой структуры. Это, вероятно, связано с ограниченным размером этих популяций и экстремальностью условий обитания для растений данного вида на юго-восточной границе его ареала в европейской части России. При этом чаще всего в популяциях Саратовской области доминируют цветущие «мужские» особи. Это может быть одной из причин того, что южнее Татищевского района для существования растений нет приемлемых условий обитания, в т.ч. и за счёт резкого снижения числа женских особей, а соответственно и резкого снижения семенной продуктивности популяций вида.

Экстремально засушливый 2010 год по широтному градиенту в европейской части России всюду сказался на численности цветущих растений в популяциях *A. dioica* и на балансе «мужских» и «женских» растений в

последующий за ним год, сместив последний в сторону «мужских» особей. При этом на южной границе ареала условия этого года привели к тому, что в 2011 г. в популяциях имело место не развитие генеративных органов, т.е. цветение растений в них было полностью подавлено. В более северных районах условия 2010 года снизили общую численность цветущих растений в последующий год, сместив баланс цветущих растений в сторону доли «мужских» особей.

Выводы

Изучена частота апомиксиса и половая структура в популяциях *A. dioica* в европейской части России по градиенту географической широты. Показано, что растения *A. dioica* ближе к южной и северной границам ареала ведут себя

как облигатно амфимиктичные, а в центральной части ареала – как факультативно апомиктичные. Выявлено, что в аридных условиях южных регионов в последующий после засухи год цветение растений *A. dioica* полностью подавляется, а в регионах с меньшей аридностью климата – баланс цветущих растений смещается в сторону «мужских» особей. Относительно не засушливые условия предыдущего цветения года приводят к тому, что в последующий год в популяциях наблюдается относительный баланс цветущих «мужских» и «женских» особей. «Женские» особи в неблагоприятных условиях засухи элиминируются из популяции первыми.

Литература

1. Иконников С.С. Кошачья лапка – *Antennaria* Gaertn. // Флора европейской части СССР. – СПб.: Наука, 1994. – 7. – С. 92–94.
2. Маевский П.Ф. Флора средней полосы европейской части СССР. – М.: Тов-во науч. изд. КМК, 2006. – 600 с.
3. Березуцкий М.А., Серова Л.А. Кошачья лапка двудомная – *Antennaria dioica* (L.) Gaertn. // Красная книга Саратовской области: Грибы. Лишайники. Растения. Животные. – Саратов: Изд-во Торгово-промышл. палаты Сарат. обл., 2006. – С. 224–225.
4. Хохлов С.С., Зайцева М.И., Куприянов П.Г. Выявление апомиктичных растений во флоре цветковых растений СССР. – Саратов, 1978. – 224 с.
5. Carman J.G. Gametophytic angiosperm apomicts and the occurrence of polyspory and polyembryony among their relatives // *Apomixis Newsletter*. – 1995. – № 8. – P. 39–53.
6. Carman J.G. Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony // *Biol. J. Linn. Soc.* – 1997. – 61. – P. 51–94.
7. Noyes R.D. Apomixis in the Asteraceae: Diamonds in the Rough // *Functional plant science and biotechnology*. – 2007. – 1, N 2. – P. 207–222.
8. Herr J.M. A new clearing-squash technique for study of ovule, development in angiosperms // *Amer. J. Bot.* – 1971. – 20, N 8. – P. 785–790.
9. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1999. – 459 с.
10. Зайцев Г.Н. Математическая статистика в экспериментальной ботанике. – М.: Наука, 1984. – 424 с.

KASHIN A.S., KOCHANOVA I.S., LYSYTSKAYA N.M., UGOLNIKOVA E.V., POLYAKOVA YU.A.

Saratov State University,

Russia, 410010, Saratov, Astrakhanskaya str., 83, e-mail: kashinas2@yandex.ru

APOMIXIS RATE VARIABILITY AND SEX STRUCTURES OF POPULATION OF *ANTENNARIA DIOICA* OF EUROPEAN RUSSIA

Aims. 13 populations of *A. dioica*, growing in Saratov, Penza, Ulyanovsk, Kirov Regions and the Republic of Chuvashia, Mari-El, Komi were studied to identify apomixis rate variability and sex structure along a gradient of geographical coordinates (51°30' NL, 45°30' EL – 60°00' NL, 49°30' EL). **Methods.** Frequency of apomixis was diagnosed on the basis of comparative data on seed production of plants in the free pollination and flowering pollenless mode, as well as featured cytoembryologically. For cytoembryological analysis inflorescences were fixed 1–3 days before flowering in the latch Clark. The enlightening liquid Guerra (Herr, 1971) was used to enlighten ovules. Methodology of preparation of "enlightened" ovules was modified by us. **Results.** The frequency of apomixis and sex structure of populations of *Antennaria dioica* were studied in the European part of Russia on the gradient of latitude. It was shown that closer to the southern and northern boundaries of the range plants *A. dioica* behave as obligatory amfimictic, while in the central part of the area – as facultatively apomictic. It was revealed that under arid conditions in the southern regions a year after a drought flowering of *A. dioica* plants is completely suppressed, and in regions with the less arid climate the

balance of flowering plants shifts towards "male" individuals. Relatively dry conditions of the previous before the flowering year led to the fact that in the following year the populations featured a relative balance of flowering for "male" and "female" individuals. Under the adverse conditions of drought "female" items get eliminated from the population first. **Conclusions.** *A. dioica* populations at the northern and southern boundaries of the range behave as amfimictic, while in the central part of the area – as facultatively apomictic. The ratio of flowering of "female" and "male" individuals in the populations of this species is essentially dependent on the latitude and weather conditions.

Key words: *Antennaria dioica*, gametophytic apomixis, dioecious, sex structure of populations.

УДК 575.23:62.37.29

НУРМИНСКАЯ Ю.В., МАКСИМОВА Л.А., КОПЫТИНА Т.В., ЕНИКЕЕВ А.Г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,

Россия, 664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, e-mail: nurminskaya@sifibr.irk.ru

УСТОЙЧИВОСТЬ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА К НЕБЛАГОПРИЯТНОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ В РЯДУ ПОКОЛЕНИЙ

С развитием сельскохозяйственного применения ГМР активно ведутся исследования об экологических рисках, связанных с возделыванием этих культур. Выяснилось, что существует угроза рисков снижения биологического разнообразия в связи с переопылением ГМР с дикорастущими близкородственными видами [1]. Возможность необратимого изменения диких популяций, несомненно, требует всестороннего изучения, так как последствия таких изменений необратимы.

Для разработки подходов к безопасному применению трансгенных растений необходимы знания об особенностях физиологии и биохимии ГМР как новой искусственно созданной биологической системы.

Механизмы встраивания, копияность и наследование вставки молекулярными биологами изучены достаточно детально, однако эти исследования, к сожалению, не позволяют увидеть реакцию растения на внедрение в свой геном чужеродной ДНК в целом, как единого организма.

На данный момент предпринято несколько попыток гипотетически обрисовать особенности физиологии трансгенного растения.

Так, Еникеев А.Г. с соавторами предложили концепцию агробактериальной трансформации как комплексного стресс-сигнализирующего фактора [2].

Известно, что воздействие стрессовых факторов приводит к увеличению рекомбинаций и количества мутаций, к усилению онтогенетического шума [3, 4]. Это приводит к

увеличению различий между величиной признака у билатеральных структур с правой и с левой стороны (флуктуирующая асимметрия, ФА) [4].

Жученко А.А. предполагал, что вставка ДНК может приводить к нарушению работы коадаптированных генных комплексов. Эти комплексы, сформированные в процессе эволюции, выполняют важную роль в процессах адаптации у растений [5]. Косвенным признаком разбалансировки коадаптированных комплексов генов у трансгенных растений может служить снижение устойчивости к неблагоприятным факторам.

Таким образом, изучение уровня флуктуирующей асимметрии у трансформантов, а также их устойчивости к неблагоприятным факторам могло бы дать первичные экспериментальные данные об особенностях таких растений на уровне физиологии.

Целью настоящей работы было исследовать изменчивость морфометрических параметров и величину ФА у растений *Nicotiana tabacum* L., трансформированных агробактериальным штаммом А699 (без целевых генов) в ряду семенных поколений в нормальных условиях и в условиях пониженной и повышенной температуры.

Материалы и методы

Трансгенные растения табака (сорт Самсун) получали по стандартным протоколам [6] с использованием штамма *Agrobacterium tumefaciens* А699, содержащего вектор CNL 65 с селективным геном *nptII*, кодирующим белок неомицинофосфотрансферазы. Отбор трансген-