

УДК 582.998 + 575.22 : 581.163

ИССЛЕДОВАНИЕ АПОМИКСИМНОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ В ПОЛОВЫХ И АПОМИКТИЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ *TARAXACUM* И *PILOSELLA* (*ASTERACEAE*): ПОЛИМОРФИЗМ ПО ПЕРОКСИДАЗЕ, СУПЕРОКСИДИДСМУТАЗЕ, ТИРОЗИНАЗЕ И ЭСТЕРАЗЕ

А.С. Кашин, В.Э. Анфалов, Ю.А. Демочко

Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского

Проблема гаметофитного апомиксиса у покрытосеменных по-прежнему приковывает к себе пристальное внимание. Более того, в последнее десятилетие интерес к ней значительно возрос. Но и использование самых современных методов исследования (молекулярно-генетических, геноинженерных) в сочетании с традиционными, такими как гибридологический, цитозбриологический, цитогенетический методы, пока не прибавляют ясности в отношении большинства вопросов, связанных с этой проблемой. Не более как гипотетичными остаются, например, представления о характере генетического контроля явления, хотя определенный прогресс в этом направлении очевиден (Savidan, 1982; Nogler, 1984; Kindiger, Dewald, 1996; Grimanelli et al., 1998; Koltunow, Johnson, Bicknell, 1999; Grossniklaus, Nogler, van Dijk, 2001; Bantin, Matzk, Dresselhaus, 2001). Много неясностей остаётся в ответах на вопрос о характере и природе генетической изменчивости в апомиктичных популяциях (Richards, 1986) и о роли гаметофитного апомиксиса в эволюции (Поддубная-Арнольди, 1984; Кашин, Куприяшов, 1993).

Доминирует представление о том, что апомикты уступают половым формам в эволюционной и адаптационной пластичности (Грант, 1984), хотя это плохо согласуется с тем, что в агамных комплексах предковые половые формы всегда имеют ограниченные ареалы, а нередко – эндемики, в то время как многие апомиктичные виды имеют обширнейшие ареалы. Последнее, очевидно, без эволюционной и адаптационной пластичности невозможно.

Одним из основных современных критериев оценки изменчивости в популяциях является степень биохимического полиморфизма. Как правило, молекулярно-генетические методы анализа дают более точные и объективные представления о характере изменчивости (Глазко, Созинов, 1993). В последнее два десятилетия появился ряд публикаций по результатам исследования биохимического полиморфизма в апомиктичных популяциях растений (Ford, Richards, 1985; Ellstrand, Roose, 1987; Bayer e.a., 1990; Yahara e.a., 1991; Morita, 1994; Menken et al., 1995; Noyes, Soltis, 1996; Schmelzer, Renno, 1999; Chapman et al., 2000; Horandl et al., 2001, Storchova et al., 2002, и др.). Однако, проведённые в этом направлении исследования явно недостаточны, и пока не выработан какой-либо единый универсальный критерий оценки параметра. Остаётся неясным, насколько приложимы критерии оценки полиморфизма, используемые в отношении половых популяций, к апомиктичным популяциям.

В этой связи было интересно провести сравнительное изучение методом гелеэлектрофореза характера изменчивости энзимов в естественных популяциях половых и апомиктичных форм родов *Pilosella* и *Taraxacum* (*Asteraceae*), - по сути классических объектов исследований по проблеме апомиксиса.

Материал и методы

Объектом исследования служили популяции двух половых (*T. serotinum*, *P. echioides*) и двух апомиктичных (*T. officinale*, *P. officinarum*) видов *Asteraceae* (табл. 1). Сбор материала для исследования осуществляли случайным образом с площади 5 га по каждой популяции. Растения *T. officinale* брали из популяции в районе Ботанического сада СГУ (г. Саратов); *T. serotinum* – из популяции на склоне Лысой горы (г. Саратов). Растения *P. echioides* в равных пропорциях брали из двух популяций: на склоне Лысой горы (г. Саратов) и в окрестностях поселка Кр. Октябрь, Саратовского района. Растения *P. officinarum* в равных пропорциях брали из двух популяций заказника «Алексеевские дачи» Б.-Карабулакского района: с влажного луга и из остепненного соснового бора.

По предварительным данным растения популяции *T. serotinum* – половые диплоиды ($2x = 16$), популяции *T. officinale* – апомиктичные триплоиды ($3x = 24$) (Кашин, Чернышова, 1997). При более подробном изучении в популяции обоих видов обнаружены растения иных уровней плоидности (Кашин и др., в печати). Это уже отмечалось в литературе для апомиктичных видов *Taraxacum* (Morita, 1994).

Таблица 1. Видовая принадлежность растений исследованных популяций

Род	Секция	Вид	Способ размножения
<i>Taraxacum</i> Wigg.	<i>Taraxacum</i>	<i>T. officinale</i>	апомиктичный
	<i>Serotina</i> <i>Soest.</i>	<i>T. serotinum</i> (Waldst. et Kit.) Poir	половой
<i>Pilosella</i> Tausch.	<i>Pilosella</i>	<i>P. officinarum</i> F. Schultz et Sch Bip.	апомиктичный
	<i>Echinina</i> (Naeg. et Peter.) Schljak.	<i>P. echioides</i> (Lumn) F. Schultz et Sch Bip.	половой

В половой популяции *P. echioides* встречаются растения двух уровней плоидности ($2x$; $4x$), а в апомиктичной популяции *P. officinarum* обнаружены растения пяти уровней плоидности ($2x-6x$) (Кашин и др., 2000б). Для *P. officinarum* отмечен высокий уровень гибридизации с другими видами рода. Участие в гибридизационном процессе, правда гораздо меньшей интенсивности, отмечено и для *P. echioides* (Кашин и др., 2000а).

Для анализа использовали листья, взятые у растений в фазе цветения. Навеску образца (300 мг) гомогенизировали в 0,5 мл Трис - HCl буфере для экстракции (pH 6,8) с защитными добавками: 0,5% аскорбиновая кислота, 0,01%

меркаптоэтанол и поливинилпирролидон для связывания фенолов. Тщательно гомогенизированную смесь помещали в холодильник на 15 мин для экстракции ферментов. Далее центрифугировали в течение 3 мин при 17 000 об./мин и $t=4^{\circ}\text{C}$. Отбирали 100 мкл надосадочной жидкости, которую использовали для разделения методом диск-электрофореза.

Диск-электрофорез проводили в вертикальных блоках полиакриламидного геля 150 x 150 мм, используя систему №1, предложенную Г. Маурером (1971). Концентрация разделяющего геля - 15%. Электрофорез проводили при 4°C и силе тока в стартовом режиме - 25 мА, в основном режиме - 35 мА.

Исследовали пероксидазу (Prx, КФ 1.11.1.7), эстеразу (Est, КФ 3.1.1), супероксиддисмутазу (Sod, КФ 1.15.1.1) и тирозиназу (Tir, КФ 1.10.3.1). Для обнаружения зон активности использовали в случае Sod - реакцию восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) кислородом (Гааль и др., 1982); Prx - гистохимическую окраску по методу Makinen, Brewbaker (1967), с использованием в качестве субстрата бензидина; Est - методику, предложенную Przybylska e.a. (1978); цитир по: Сарсенбаев и др., 1982); Tir - методику, предложенную Shaw и Prasad (1970); цит. по: Генетика изоферментов, 1977).

В качестве мер генетической изменчивости популяций, согласно руководству (Айала, Кайгер, 1988), использовали долю **полиморфных локусов**, или **полиморфность (P)** (полиморфными считали локусы с частотой наиболее распространённого аллеля, не превышающей 0.95) и **долю гетерозиготных локусов на особь**, или наблюдаемую **гетерозиготность (H)**. Рассчитывали **ожидаемую гетерозиготность ($H_{\text{ожид}}$)** для каждого локуса по формуле:

$$H_{\text{ожид}} = 1 - (I_1^2 + I_2^2 + \dots + I_m^2),$$

где I_m - частота каждого аллеля в отдельном локусе. Затем полученные значения усреднялись.

Результаты и обсуждение

1. Идентификация локусов изоферментов

Образцы электрофореграмм аллозимов представлены на рис. 1. Для идентификации локусов использовали литературные данные и характер расположения полос в спектрах изоферментов. Эстеразы у растений обычно контролируются большим числом локусов (до 10-12) и имеют в основном мономерную и лишь иногда димерную структуру. При этом по всем локусам обычно выявляются нуль-аллели. По большинству локусов выявлен множественный аллелизм (Левитес, 1986). При изучении эстераз у пентаплоидного *Taraxacum albidum*, таксономически близкого объектам нашего исследования, из общей совокупности локусов было идентифицировано четыре. Все эстеразы при этом имели мономерную структуру, один из локусов был **мноморфным** (Menken, Morita,

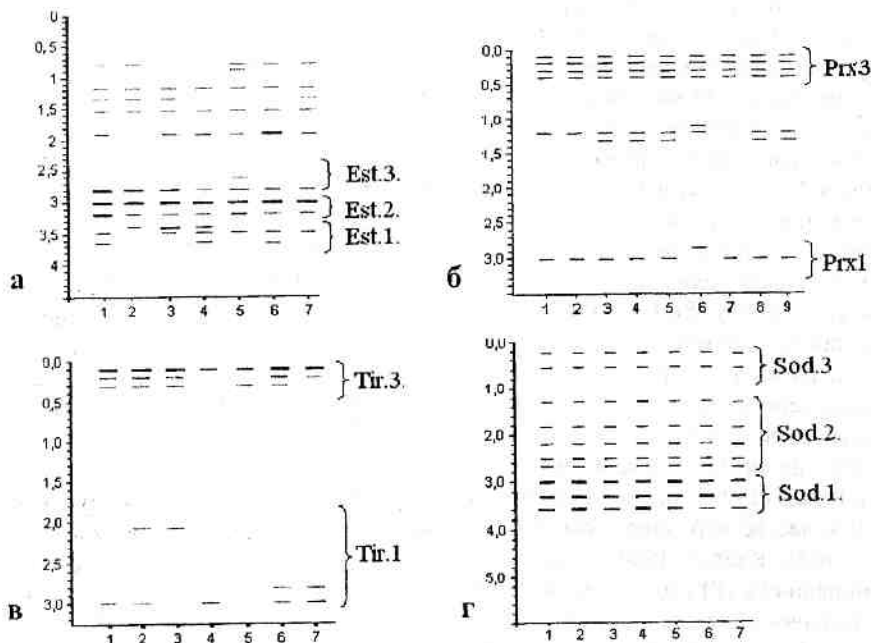


Рис. 1. Образцы электрофореграмм эстеразы (а), пероксидазы (б), супероксид-дисмутазы (в) и тирозиназы (г) в популяциях *T. officinale*

1989). У видов *Taraxacum* секции *Taraxacum (Vulgaria)* в эстеразном комплексе также идентифицировано четыре локуса (Est1 – Est4). При этом локус Est4 был мономорфным, мономерные эстеразы Est1 и Est3 имели активные аллели и нуль-аллель, локус Est2 был представлен тремя аллелями (Ford, Richards, 1985). Исходя из этого, в полученных нами спектрах эстераз в зависимости от видовой принадлежности мы выделили от 8 до 10 локусов эстераз, имеющих мономерную структуру: *T. serotinum* – 10 локусов; *T. officinale* – 9 локусов; *P. echinoides* – 8 локусов; *P. officinarum* – 10 локусов. Большинство из них представлены множественными и нуль-аллелями. При этом локусы Est1–Est3 представлены наиболее яркими полосами, остальные – проявляются слабо (рис. 1а). Фракции, соответствующие отмеченным трём локусам, совпадают по электрофоретической подвижности с указанными для *T. albidum* (Mencken, Morita, 1989). В дальнейшем при подсчёте частоты аллелей, а также при определении полиморфизма и гетерозиготности мы учитывали результаты, полученные именно по этим трём локусам эстераз.

По пероксидазам во многих работах отмечено большое число локусов, причём эти ферменты имеют почти исключительно мономерную структуру (Huang et al., 1994). Лишь у некоторых видов покрытосеменных выявлены димеры (Левитес, 1986). На рис. 1б хорошо видно, что спектр пероксидаз иссле-

дованных нами форм распадается на три блока полос, каждый из которых соответствует отдельному мономерному локусу. Все они содержат множественные и нуль-аллели, причём локус Prx3 чаще всего представлен четырьмя полосами, а Prx1 и Prx2 – одной или двумя полосами. В анализе полиморфизма и гетерозиготности нами используются данные, полученные по локусам Prx1 и Prx3.

Sod обычно представлена локусами, контролирующими димерные формы фермента. Их, как правило, - три. У ржи один локус контролирует тетрамерную форму фермента, остальные – димерные (Левитес, 1986). У *Taraxacum albidum* также идентифицировано три локуса, два из которых (Sod1; Sod2) были мономорфны, а третий (Sod3) – гетерозиготный локус димерной формы фермента с тремя аллелями (Menken, Morita, 1989). Спектры Sod у растений исследованных популяций мы интерпретировали как состоящие из трёх локусов, контролирующих димерную форму фермента. У *P. echioides* локус Sod1 гомозиготен (рис. 1в). В расчётах полиморфизма и гетерозиготности использовали данные по всем локусам Sod.

Tir у *Taraxacum lacistophyllum* и *T. brachyglossum* была представлена тремя мономорфными локусами, один из которых был гомозиготным и два – гетерозиготными (Ford, Richards, 1985). Картина спектров изоформ Tir убеждает в том, что у исследованных видов Tir представлена также тремя мономерными локусами. Все локусы имеют множественные и нуль-аллели. В анализе полиморфизма и гетерозиготности учитывали данные по всем трём локусам.

Трудные для прочтения локусы, например, контролирующие димерную форму фермента в случае присутствия не одной или трёх, а двух полос, мы объясняли полиплоидностью форм или наличием нуль-аллелей. Полиплоидия без гибридогенеза, как правило, не изменяет число полос, но существенно влияет на активность ферментов и на интенсивность проявления полос (Левитес, 1986). В части случаев подавление активности ферментов за счёт полиплоидии могло быть столь сильным, что при димерной форме фермента, контролируемого локусом, одна из полос не проявлялась. В случаях, когда при димерной форме фермента в локусе вместо трёх полос наблюдали четыре-пять, а при тетрамерной форме фермента - вместо пяти – шесть, происхождение лишних полос мы объяснили гибридной полиплоидностью растений или наличием у них кроме основных, ещё и мутантных аллелей. Во всех таких случаях полагали, что речь может идти только о гетерозиготах. Градацию зон активности по интенсивности проявления на минорные и мажорные в анализе не учитывали, хотя по интенсивности проявления окраски зоны активности различались существенно. Это связано, вероятно, с дозой генов у полиплоидных форм, каковыми в большинстве своём являются исследованные виды.

2. Частота встречаемости и число спектров изоформ в популяциях *Taraxacum* и *Pilosella*

На рис. 2 приведены диаграммы частот встречаемости различных спектров изоферментов. Показано, что наибольшее число спектров эстераз имело место в половой популяции *T. serotinum* (24 спектра). В апомиктической популя-

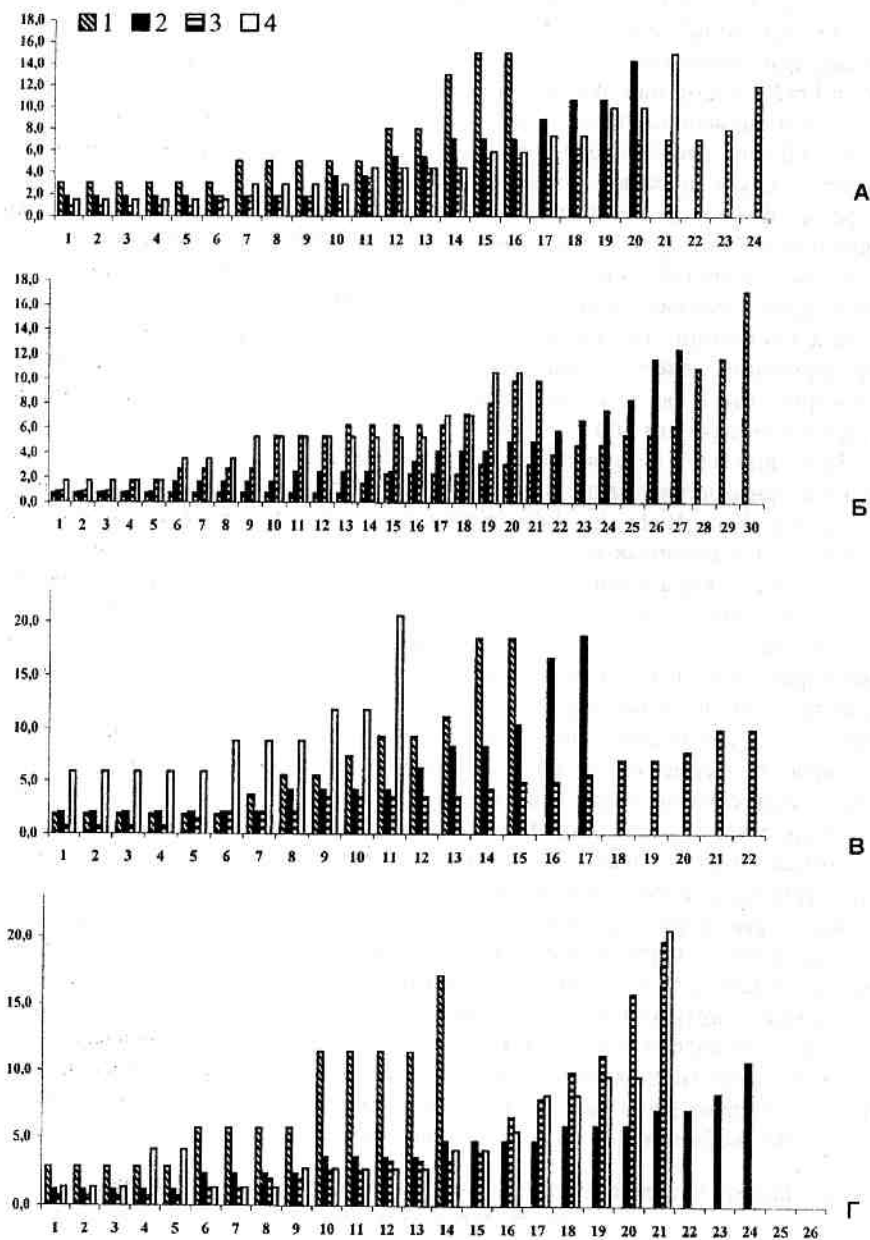


Рис.2. Частота встречаемости и число спектров Sod (А), Prx (Б), Tir (В), Est (Г) в популяциях *T.officinale* (1), *T.serotinum* (2), *P.officinatum* (3), *P.echioides* (4). По оси абсцисс - номер спектра, по оси ординат - частота встречаемости спектра, %

ции *P. officinarum* и в половой популяции *P. echioides* обнаружено по 21 спектру Est. Наименьшее число спектров выявлено в апомиктической популяции *T. officinale*. Редкие спектры эстераз (с частотой встречаемости ниже 5%) у *T. officinale* составляют 35 %, и они отмечены у 15% исследованных в популяции особей. В популяциях остальных трёх видов редкие спектры составляют более 70 % от общего числа спектров эстеразы в популяции. Они отмечены у 20% растений в половых популяциях *T. serotinum* и *P. echioides* и всего у 10% растений апомиктической популяции *P. officinarum*.

Довольно сходная картина распределения редких спектров наблюдается в популяциях исследованных видов по Sod и Tir. Правда, в отношении тирозиназы исключением является половая популяция *P. echioides*, в которой редкие спектры вообще не обнаружены. Редкие спектры пероксидаз в популяциях обоих видов *Taraxacum* составляют одинаково высокую (около 80%), а в популяциях видов *Pilosella* — значительно меньшую долю (около 40%). Они отмечены у 17-19% и у 8-15% растений, соответственно.

Таким образом, редкие спектры в исследованных половых популяциях обоих родов в целом составляют большую долю, чем в апомиктических популяциях. По всем четырём популяциям процент редких изозимных спектров значителен и позволяет говорить о том, что популяции по изозимным спектрам чрезвычайно полиморфны. В среднем на каждый изозимный спектр приходится три-четыре растения в каждой исследованной популяции.

3. Полиморфизм и гетерозиготность в исследованных популяциях

В популяциях половых и апомиктических форм *Taraxacum* и *Pilosella* по результатам исследования 11 локусов ферментов доля полиморфных локусов у *T. officinale*, *P. officinarum* и *P. echioides* оказалась равной 1.000, у *T. serotinum* - 0.875 (табл. 2, 3, 5).

Доля полиморфных локусов, как уже отмечалось, является не очень надёжной мерой генетической изменчивости популяций. Однако, в нашем случае она по всем исследованным популяциям высока. Это свидетельствует в пользу того, что все исследованные популяции как апомиктических, так и половых видов чрезвычайно полиморфны. Степень их полиморфизма превышает обычно выявляемый полиморфизм в популяциях растений. Известно, что у растений доля полиморфных локусов редко превышает 0.5 (Айала, Кайгер, 1988; Левонтин, 1978). Чаше же всего она близка к 1/3 (Алтухов, 1989). Однако не исключено, что полученные нами данные по полиморфизму популяций половых и апомиктических видов *Taraxacum* и *Pilosella* завышены по той причине, что в анализ включено малое число локусов (11 локусов 4-х ферментов), среди которых непропорционально высок процент полиморфных и высоковариабельных. Пероксидазы и эстеразы, в частности, известны как одни из самых полиморфных ферментов (Левитес, 1986). Как правило, достоверными в популяционно-генетических исследованиях считаются данные, полученные не менее чем по 20 локусам и не менее чем на 100 растениях из каждой популяции (Айала, Кайгер, 1988).

Таблица 2. Частота аллелей по 11 аллозимным локусам в популяциях половых и апомиктических форм *Taraxacum*

Локус	Частота аллелей								Исследовано растений	
	A	B	C	D	E	F	G	H		
<i>T. officinale</i>										
Prx1	0.796	0.052	0.028	0.124						129
Prx4	0.559	0.441								129
Est1	0.414	0.114	0.100	0.371						35
Est2	0.115	0.461	0.423							35
Est3	0.205	0.151	0.379	0.068	0.152	0.046				35
Tir1	0.614	0.114	0.272							54
Tir2	0.614	0.114	0.272							54
Tir3	0.355	0.319	0.259	0.067						54
Sod1	0.173	0.212	0.193	0.115	0.038	0.038	0.038	0.193		39
Sod2	0.392	0.102	0.010	0.019	0.445	0.032				39
Sod3	0.200	0.130	0.210	0.460						39
<i>T. serotinum</i>										
Prx1	1.000									124
Prx4	0.214	0.153	0.314	0.319						124
Est1	0.487	0.052	0.461							84
Est2	0.103	0.144	0.288	0.103	0.137	0.226				84
Est3	0.205	0.151	0.379	0.068	0.152	0.045				84
Tir1	0.823	0.161	0.016							48
Tir2	0.040	0.100	0.020	0.280	0.100	0.260	0.180	0.020		48
Tir3	0.669	0.138	0.193							48
Sod1	0.141	0.095	0.005	0.126	0.382	0.251				56
Sod2	0.288	0.005	0.137	0.312	0.258					56
Sod3	0.230	0.370	0.050	0.350						56

Таблица 3. Частота аллелей по 11 аллозимным локусам в популяциях половых и апомиктических форм *Pilosella*

Локус	Частота аллелей									Исследовано растений
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
<i>P. officinarum</i>										
Prx1	0.920	0.067	0.013							112
Prx4	0.626	0.096	0.106	0.172						112
Est1	0.037	0.075	0.047	0.377	0.470					152

Продолжение таблицы

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Est2	0.844	0.009	0.150						152
Est3	0.073	0.009	0.579	0.032	0.307				152
Tir1	0.840	0.160							141
Tir2	0.173	0.359	0.141	0.141	0.010	0.032	0.014	0.141	141
Tir3	0.078	0.058	0.055	0.546	0.264				141
Sod1	0.357	0.137	0.006	0.022	0.462	0.016			113
Sod2	0.198	0.275	0.453	0.074					113
Sod3	0.433	0.199	0.122	0.246					113
<i>P. echioides</i>									
Prx1	0.714	0.214	0.072						56
Prx4	0.081	0.173	0.428	0.318					56
Est1	0.048	0.315	0.075	0.500	0.062				73
Est2	0.097	0.368	0.083	0.451					73
Est3	0.038	0.392	0.038	0.012	0.155	0.366			73
Tir1	0.882	0.118							34
Tir2	0.467	0.133	0.067	0.033	0.033	0.067	0.100	0.100	34
Tir3	0.031	0.141	0.828						34
Sod1	0.039	0.471	0.059	0.431					68
Sod2	0.430	0.070	0.050	0.400	0.050				68
Sod3	0.238	0.148	0.025	0.110	0.279	0.160	0.040		68

Реальную и ожидаемую частоту гетерозигот в популяциях половых и апомиктических видов мы определяли также для 11 локусов (табл. 4). При этом максимальная доля гетерозиготных локусов выявлена в популяции апомиктического вида *T. officinale*. Реальная гетерозиготность равнялась 0.641, а ожидаемая – 0.611. В популяции его полового сородича (*T. serotinum*) средняя гетерозиготность, как реальная, так и ожидаемая, была несколько ниже (0.547 и 0.579, соответственно). В популяциях полового и апомиктического видов рода *Pilosella* гетерозиготность примерно соответствовала таковой в популяции *T. serotinum*.

Так же как и в случае с полиморфностью, доля гетерозиготных локусов в исследованных популяциях оказалась значительно выше среднего уровня гетерозиготности, известного для растений. Средняя гетерозиготность у растений обычно не превышает 0.200 (Айала, Кайгер, 1988), хотя у ржи, например, при анализе по 10 локусам аспарат-аминотрансфераз и эстераз реальная гетерозиготность равнялась 0.405, а ожидаемая по Харди-Вайнбергу – 0.440 (Забродина и др., 1998), т.е. была довольно близкой к уровню данного параметра, выявленного в наших исследованиях.

Исследуемые виды входят в состав соответствующих агамных комплексов. Именно с этим и может быть связана чрезвычайная полиморфность и гетерозиготность популяций, выявленная на уровне аллозимных спектров. Извест-

но, что в агамных комплексах чрезвычайно сложна таксономическая структура. Наши данные говорят в пользу того, что сложная картина изменчивости не ограничивается только таксономической сложностью. Чрезвычайный биохимический полиморфизм свидетельствует о сложной структуре самих популяций

Таблица 4. Реальная и ожидаемая (в скобках) частота гетерозигот в популяциях половых и апомиктичных форм *Taraxacum* и *Pilosella*

Локус	Частота гетерозигот			
	<i>T. officinale</i>	<i>T. serotinum</i>	<i>P. officinarum</i>	<i>P. echioides</i>
Prx 1	0.240 (0.347)	0.000 (0.000)	0.161 (0.150)	0.571 (0.439)
Prx 4	0.829 (0.494)	0.718 (0.819)	0.910 (0.558)	0.946 (0.679)
Est 1	0.771 (0.768)	0.922 (0.548)	0.171 (0.633)	0.822 (0.639)
Est 2	0.846 (0.595)	0.466 (0.809)	0.276 (0.266)	0.750 (0.648)
Est 3	0.682 (0.761)	0.405 (0.600)	0.599 (0.159)	0.352 (0.686)
Tir 1	0.318 (0.535)	0.355 (0.297)	0.214 (0.267)	0.235 (0.208)
Tir 2	0.581 (0.537)	0.400 (0.988)	0.261 (0.780)	0.303 (0.746)
Tir 3	0.870 (0.712)	0.667 (0.499)	0.922 (0.620)	0.344 (0.293)
Sod1	0.654 (0.833)	0.407 (0.746)	0.876 (0.640)	0.000 (0.587)
Sod2	1.000 (0.636)	1.000 (0.734)	0.558 (0.674)	1.000 (0.645)
Sod3	0.258 (0.687)	0.678 (0.685)	0.775 (0.698)	0.639 (0.804)
Средняя	0.641 (0.611)	0.547 (0.579)	0.520 (0.495)	0.543 (0.579)

Таблица 5. Генетическая изменчивость локусов Est, Prx, Sod и Tir в популяциях исследованных видов

Вид	Доля полиморфных локусов	Число аллелей на локус	Гетерозиготность	
			реальная	ожидаемая по Харди-Вайнбергу
<i>T. officinale</i>	1.000	3.630	0.641	0.611
<i>T. serotinum</i>	0.875	4.250	0.547	0.579
<i>P. officinarum</i>	1.000	4.380	0.520	0.495
<i>P. echioides</i>	1.000	4.380	0.543	0.579

видов агамного комплекса. Отчасти это связано, вероятно, с высоким уровнем геномной изменчивости и отдаленной гибридизации, обнаруженными ранее в исследованных популяциях (Кашин и др., 2000а, б). Все они, за исключением *T. serotinum*, - полиплоиды. Именно с полиплоидной природой апомиктичных форм и может быть связан высокий уровень гетерозиготности. В пользу этого говорит то, что, в частности, у позвоночных (рыбы, амфибии), у полиплоидных форм (3х-4х) гетерозиготность значительно выше, чем у диплоидных и сравнима с обнаруженной в наших исследованиях (0.30-0.80) (Dawley, 1987, Межегин, Писанец, 1995). Высокий уровень гетерозиготности обнаружен и у беспозвоночных с апомиктичным типом партеногенеза, в частности, в полиплоидных

(3х-4х) партеногенетических популяциях долгоносика *Otiorrhynchus scaber* (Coleoptera) (Суомалайнен и др, 1977). Одни авторы (Dawley, 1987, Межжерин, Писанец, 1995) связывают это с гибридной природой полиплоидов и фиксированной за счёт этого гетерозиготностью, другие (Суомалайнен и др, 1977) – с мутационным процессом. Почти во всех случаях при этом речь идёт об унипарентальных (партеногенетических) видах. Наиболее вероятно, что для эволюции партеногенетических форм важными оказываются оба эти фактора. О вкладе каждого из них на настоящий момент сказать что-либо определённое невозможно. Необходимо проведение специальных исследований для выяснения роли того и другого фактора в обеспечении изменчивости в апомиктичных популяциях.

Таким образом, результаты нашего исследования показали, что популяции апомиктичных форм в агамных комплексах *Taraxacum* и *Pilosella* по полиморфизму лишь незначительно уступают популяциям половых видов этих же агамных комплексов. Ранее высокая степень полиморфности у апомиктичных форм была показана на межпопуляционном уровне (Akhter et al., 1993). В нашей работе показано, что не меньший полиморфизм имеет место и на внутривидовом уровне. Этот вывод перекликается с результатами ряда работ (Ford, Richards, 1985; Yahara et al., 1991).

Апомиктичные формы стали объектом молекулярно-генетических исследований с использованием биохимических маркёров с конца 70-х гг.. Сделать какие-то однозначные выводы по их результатам трудно. Так, в одной из ранних работ (Ford, Richards, 1985) при выявлении характера изосимной изменчивости в популяциях и клонах 10 агамных видов *Taraxacum* (*Asteraceae*) на площади 100 м² по трем генетическим локусам показано, что агамные виды отличались между собой по эстеразной зимограмме, но по зимограммам кислой фосфатазы и тирозиназы не отличались. При этом пять из десяти агамовидов характеризовались и внутривидовой изменчивостью. Более того, даже в потомстве отдельных растений изменчивость по эстеразе в среднем была выше 45%.

Иная картина аллозимной изменчивости была обнаружена у пентаплоидного вида *Taraxacum albidum*, считающегося облигатно апомиктичным. Было изучено 109 растений 12 популяций этого вида по 19 локусам 10 ферментов. Гетерозиготными оказались 84 % локусов. Все образцы имели одинаковое распределение полос по всем 19 локусам, за исключением одного. Этот единственный мутант отличался от остальных растений по одному аллелю одного локуса (Menken, Morita, 1989). Авторы вслед за другими исследователями (Mototani, 1978; Yamaguchi, 1978; цитир. по: Menken, Morita, 1989) связывают низкую степень изменчивости у данного вида с недавностью и моноклональностью его возникновения. При этом они полагают, что исследованный вид является облигатно апомиктичным.

Т. Яхара с соавт. (Yahara et al., 1991) провели сравнительное исследование степени генетической гетерозиготности (H) в половых и апомиктичных популяциях *Eupatorium altissimum* (*Asteraceae*) по четырем локусам (фосфоглюкозомеразы, триозо-фосфатизомеразы, алкогольдегидрогеназы и фосфоглюкомутаза). Так же как и в более ранних работах (Bayer, Cracoford, 1986; Watano,

Jcoastri, 1998; Bayer, 1989 и др.; цитир по: Yahara et al., 1991), у апомиктов была обнаружена в целом более высокая гетерозиготность, чем у половых форм. Это противоречило теоретическим представлениям о степени гетерозиготности у апомиктичных форм (Мэйнард Смит, 1981).

Ш. Актер с соавторами (Akhter et al., 1993) изучили аллозимную изменчивость в 74 полиплоидных апомиктичных популяциях *Taraxacum hondoense* северной части острова Хонсю (Япония). Большая часть популяций (94,4%) состояла из триплоидов ($2n = 24$). Около 42,6% содержали тетраплоиды ($2n = 32$), а пять растений были пентаплоидами ($2n = 40$). Электрофоретический анализ 6-фосфоглюконатдегидрогеназы растений совокупности всех популяций выявил 12 фенотипов по 4 локусам. Гетерозиготными были 82,4% триплоидов и все тетра- и пентаплоиды. При этом по каждой популяции в среднем электрофоретически исследовано 7 растений, а кариологически – 3 растения. Обнаружено, что только 5% популяций содержали множественные фенотипы по 6-фосфоглюконатдегидрогеназе. Все из 21 исследованных клонов различались по 3 из 8 изученных локусов (6-фосфоглюконатдегидрогеназе, глутаматоксалоацетат трансферазе и малатдегидрогеназе), а значительное число клоновой изменчивости было обнаружено внутри и между полиплоидными популяциями. Сделан вывод о том, что естественные популяции *T. hondoense* когда-то были моноклональными, но позднее стали мультиклональными, состоящими из 2-4-х клонов (Morita, 1994). Исследования Minken et al. (1995; цит. по: Morita, 1994) с помощью электрофореза трех энзимных локусов показали, что у этого вида в популяциях триплоидных растений число клонов было ещё более значительным (от 6 до 17 – в каждой популяции).

Таким образом, при всей неоднозначности полученных разными авторами результатов приходится говорить о том, что апомиктичные популяции характеризуются высокой степенью аллозимной изменчивости. Она зависит от времени возникновения и степени облигатности апомиктичных форм. При этом исследованные нами популяции не только апомиктичных, но и половых видов *Taraxacum* и *Pilosella* характеризуются высокой долей полиморфных (0.875 – 1.000) и гетерозиготных (реальная гетерозиготность – 0.439–0.642; ожидаемая – 0.429–0.701) локусов. Они существенно превосходят средние уровни полиморфности и гетерозиготности, обнаруженные у растений (0.179–0.511 и 0.058–0.185, соответственно). Это может свидетельствовать о том, что агамные комплексы, к которым относятся исследованные популяции, характеризуются не только чрезвычайным таксономическим полиморфизмом, но и обладают более сложной генетической структурой как апомиктичных, так и половых популяций, чем популяции видов, не входящих в состав агамных комплексов. Исследованные популяции половых и апомиктичных видов характеризуются большим числом спектров изоформ (более 11 на популяцию), множественным аллелизмом (средняя частота аллелей – 3.63–4.38, максимальная – 8 на локус). Показано, что в популяциях и половых, и апомиктичных форм *Taraxacum* и *Pilosella* высок процент редких (с частотой встречаемости ниже 5 %) спектров по большинству исследованных ферментов (35–80 %). Однако следует отметить,

что сделанные выводы носят предварительный характер, так как изучена нерепрезентативная выборка локусов для каждой популяции.

Тем не менее, это позволяет говорить о том, что априорное представление о том, что генетическое разнообразие у клональных растений, в частности у апомиктов, ниже, чем у половых видов, не соответствует действительности. К такому выводу приводят не только приведённые выше данные, но и результаты исследований целого ряда авторов, причём как теоретических (Капин, 1998), так и морфологических и изозимных (Ellstrand, Roose, 1987; Chapman et al., 2000), а в последнее время - и исследований с использованием различных маркеров ДНК (Widen et al., 1994; Diggle et al., 1998; Wittzell, 1999; Campbell, Alice, Wright, 1999; Larson, 2001). Эти исследования показывают, что бесполое популяции генетически разнообразны, причём во многих случаях - не менее чем половые. Значительный генетический полиморфизм изоферментов обнаружен и в популяциях унипарентальных видов животных - например, у видов *Daphnia* (Crustaceae) (Toline, Linch, 1994; Giessler, 1997), *Pycnoscelus* (Insecta) (Gade, Parker, 1997), *Prionocypris* и *Candona* (Ostracoda) (Little, Hebert, 1997), *Lacerta* (Reptilia) (Murphy et al., 1997; Куприянова, 1999) и др. Это, на наш взгляд, полностью снимает аргументы популяционных биологов (Darlington, 1939; Stebbins, 1950; Mayr, 1970; Grant, 1981; Richards, 1986), приводимые ими в пользу того, что апомиктические виды являются эволюционными тушиками.

Справедливости ради следует отметить, что в популяциях апомиктических форм, вероятно, не только выявление доли полиморфных локусов, но и выявление доли гетерозиготных локусов, даёт картину изменчивости, неадекватную реальной. Гетерозиготность у апомиктов является фиксированной как в силу полиплоидности этих форм, так и благодаря самому апомиктическому способу размножения, а потому, скорее всего, не может являться корректным показателем степени полиморфизма апомиктических популяций. Необходимо найти какой-то более универсальный параметр, адекватно характеризующий биохимическую изменчивость в апомиктических популяциях. Из использованных нами параметров, вероятно, более адекватно характеризуют изменчивость в апомиктических популяциях число аллозимных спектров и частота редких спектров в популяциях.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 00-04-49376) и гранта № Е 00-6.0-42 МО РФ по фундаментальным исследованиям в области естественных наук.

Литература

- Айала Ф., Кайгер Д. Современная генетика Т.3. М., 1988. 331с.
 Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. М., 1989. 326 с.
 Гааль Э., Медьеша Г., Верецкеи Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. М., 1982. 432 с.
 Генетика изоферментов / Корочкин Л.И. и др. М., 1977. 275 с.
 Глазко В.И., Созинов И.А. Генетика изоферментов животных и растений. Киев, 1993. 528 с.

Грант В. Видообразование у растений. М., 1984. 528с.

Забродина М.В., Силис Д.Я., Хавкин Э.И. Сравнение многолетней и однолетней ржи и их гибридов с помощью изоферментного анализа // Генетика. 1998. Т. 34. № 6. С. 778-787.

Кашин А.С. Половое размножение, агамоспермия и видообразование у цветковых // Журн. общ. биол. 1998. Т. 59. № 2. С. 171—191.

Кашин А.С., Куприянов П.Г. Апомиксис в эволюции цветковых растений: онто- и филогенетические аспекты проблемы. Саратов, 1993. 196 с.

Кашин А.С., Чернышова М.П. Частота апомиксиса в популяциях некоторых видов *Taraxacum* и *Hieracium* // Бот. журн. 1997. Т. 82, № 9. С. 14-24.

Кашин А.С., Залесная С.В., Титовец В.В., Киреев Е.А. Потенциал формообразования агамного комплекса *Pilosella*. 2. Естественные межвидовые гибриды // Бот. журн. 2000а. Т. 85, № 3. С. 1-13.

Кашин А.С., Залесная С.В., Титовец В.В. Потенциал формообразования агамного комплекса *Pilosella*. 3. Геномная изменчивость в популяциях и потомстве отдельных растений // Бот. журн. 2000б. Т. 85. № 12. С. 13-28.

Кашин А.С., Демочки Ю.А., Маргынова В.С. Кариотипическая изменчивость в популяциях апомиксисных и половых видов агамных комплексов *Aspeggias* // Ботан. журн. (в печати).

Куприянова Л.А. Генетическое разнообразие гибридных однополых видов и форм рода *Lacerta* (*Lacertidae*, *Reptilia*): его возможные цитогенетические механизмы, цитогенетика мейоза природных полиплоидных форм // Цитология. 1999. Т. 41. № 12. С. 1038-1047.

Левитес Е. В. Генетика изоферментов растений. Новосибирск, 1986. 144 с.

Левонтий. Генетические особенности эволюции. М., 1978. 352 с.

Маурер Г. Диск-электрофорез. Теория и практика электрофореза в полиакриламидном геле. М., 1971. 247 с.

Межжерин С.В., Писанец Е.М. Генетическая структура и происхождение тетраплоидной жабы *Bufo danatensis* (*Amphibia*, *Bufo*) Средней Азии. Биохимический полиморфизм и сравнение уровней гетерозиготности диплоидных видов с тетраплоидным // Генетика. 1995. Т. 31. № 1. С. 43-53.

Мэйнард Смит Дж. Эволюция полового размножения. М., 1981.

Поддубная-Арнольди В.А. Цитоэбриология покрытосеменных растений. М., 1984. 528 с.

Сарсенбаев К.Н., Беков А.А.-Х., Рахимбаев И.Р. Изоферменты в хемосистематике высших растений. Алма-Ата, 1982. 160 с.

Суомалайнен Е., Саура А., Локки Ю. Полиморфизм генов и эволюция партогенетических насекомых // Проблемы экспериментальной биологии. М., 1977. С. 7-20.

Akhter S., Morita T., Yoshida Y., Clonal diversity in the agamospermous polyploids of *Taraxacum hondoense* in northern Honshu, Japan // J. Plant Res. 1993. Vol. 106, P. 167-179.

Bantin J., Matzk F., Dresselhaus T. *Tripsacum dactyloides* (*Poaceae*): a natural model system to study parthenogenesis // Sex Plant Reprod. 2001. Vol. 14. P. 219 – 226.

Bayer R., Ritland K., Purdy B. Evidence of partial apomixis in *Antennaria media* (Asteraceae: Inuleae) detected by the segregation of genetic markers // Botany. 1990. Vol. 77, №8. P. 1078-1083.

Chapman H.M., Parh D., Oragisic N. Genetic structure and colonizing success of a clonal, weedy species, *Pilosella officinarum* (Asteraceae) // Heredity. 2000. Vol. 84. P. 401-409.

Chapman H.M., Parh D., Oragisic N. Genetic structure and colonizing success of a clonal, weedy species, *Pilosella officinarum* (Asteraceae) // Heredity. 2000. Vol. 84. P. 401-409.

Darlington C.D. Apomixis: the escape // The evolution of genetic systems. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1939. P. 108-113.

Dawley R.M. Hybridization and polyploidy in a community of three sunfish species (*Pisces: Centrarchidae*) // Copeia. 1987. N 2. P. 326-335.

Diggle P.K., Lower S., Ranker T.A. Clonal diversity in alpine populations of *Polygonum viviparum* (Polygonaceae) // Int. J. Plant Sci. 1998. Vol. 159. P. 606-615.

Ellstrand N.C., Roose M.L. Patterns of genotypic diversity in clonal plant species. // Am. J. Bot. 1987. Vol. 74. P. 123-131.

Ford H., Richards A. J. Isozyme variation within and between *Taraxacum* agamospecies in a single locality // Heredity. 1985. Vol. 55. P. 285-291.

Gade B., Parker E.D. The effect of life cycle stage and genotype on desiccation tolerance in the colonizing parthenogenetic cockroach *Pycnoscelus surinamensis* and its sexual ancestor *P. indicus* // J. Evol. Biol. 1997. N 10. P. 479-493.

Giessler S. Analysis of reticulate relationships within the *Daphnia longispina* species complex. Allozyme phenotype and morphology // J. Evol. Biol. 1997. Vol. 10. P. 87-105.

Grimanelli D., Leblanc O., Espinosa E., Perotti E., Gonzalez L.D., Savidan Y. Non - Mendelian transmission of apomixes in maize-*Tripsacum* hybrids caused by a transmission ratio distortion // Heredity. 1998. Vol. 80, № 1. P. 40 - 47.

Grant V. Plant speciation. 2nd ed. New York, 1981. 563 p.

Grossniklaus U., Nogler G.A., van Dijk P.J. How to Avoid Sex: The genetic control of gametophytic apomixes // Plant Cell. 2001. Vol. 13. P. 1491-1498.

Horandl E., Jakubowsky G., Dobes C. Isozyme and morphological diversity within apomictic and sexual taxa of the *Ranunculus auricomus* complex // Plant Syst. Evol. 2001. Vol. 226. P. 165-185.

Huang H., Dane F., Norton J.D. Genetic analysis of 11 polymorphic isozyme loci in chestnut species and characterization of chestnut cultivars by multi-locus allozyme genotypes // J. Am. Soc. Hortic. Sci. 1994. Vol. 119. P. 840-849.

Kindiger B., Dewald C.L. A system for genetic change in apomictic eastern gamagrass // Crop Sci. 1996. Vol. 36. P. 250-255.

Koltunow A.M., Johnson S.D., Bicknell R.A. Apomixis is not developmentally conserved in related, genetically characterized *Hieracium* plants of varying ploidy // Sexual Plant Reproduction. 1999. Vol. 12, № 5. P. 253 - 260.

Larson S. R., Waldron B. L., Monsen S. B., et al. AFLP Variation in Agamosperous and Dioecious Bluegrasses of Western North America // Crop Science. 2001. Vol. 41. P. 1300-1305.

- Little T.J., Hebert P.D.N. Clonal diversity in high arctic ostracodes // *J. Evol. Biol.* 1997. Vol. 10. P. 233-252.
- Makinen Y., Brewbaker S.L. Isoenzyme patterns *Polonica* // *Physiol. Plantarum.* 1967. Vol.14, №1. P. 61-69.
- Mayr E. *Populations, Species and Evolution.* Belknap, Cambridge, MA, 1970.
- Menken S.B.J., Morita T. Uniclinal population structure in the pentaploid obligate agamosperm *Taraxacum albidum Dahlst.* // *Plant Species Biol.* 1989. Vol. 4. P. 29-36.
- Menken S.B.J., Smit E., Den Nijs H.J.C.M. Genetical population structure in plants: Gene flow between diploid sexual and triploid asexual dandelions (*Taraxacum* section *Ruderalia*) // *Evolution.* 1995. Vol. 49. P. 1108-1118.
- Morita T. Phytogeography and speciation *Taraxacum (Asteraceae)* in East Asia. // *Plant Tax.* 1994. Vol. 24, № 3. P. 145-155.
- Murphy R.W., Darevsky I.S., MacCulloch R.S., et al. Old age, multiple formations or genetic plasticity? Clonal diversity in the uniparental Caucasian rock lizard, *Lacerta Dahli* // *Genetica.* 1997. Vol. 101, № 2. P. 125-130.
- Noyes D.N., Soltis D.E. Genotypic variation in agamospermous *Erigeron compositus* (Asteraceae) // *Amer. J. Bot.* 1996. Vol 83. P. 1292-1303.
- Nogler G.A. Gametophytic apomixis // *Embryology of Angiosperms.* Berlin e.a., 1984. P. 475-518.
- Richards A.J. Chapter 11. Agamospermy // *Plant breeding systems.* L.: George Allen & Univ., 1986. P. 403-456.
- Savidan Y.H. Nature et heredite de L'apomixie chez *Panicum maximum Jacq.* // *Travaux et documents d L'ORSTOM.* 1982. V. 153. P. 3-159.
- Schmelzer G.H., Renno J.-F. Genotypic variation in progeny of the agamic grass complex *Pennisetum* section *Brevivalvula* in West Africa // *Plant Systematics and Evolution.* 1999. Vol. 215, N 1-4. P. 71-83.
- Stebbins G.L. *Variation and evolution in plants.* New York, 1950. 643 p.
- Storchova H., Chrtek J., Bartish I.V., et al. Genetic variation in agamospermous taxa of *Hieracium* sect. *Alpina* (Compositae) in the Tatry Mts. (Slovakia) // *Plant Systematics and Evolution.* 2002. Vol.235, N 1-4. P. 1-17.
- Toline C.A., Linch M. Mutational divergence of life-history traits in an obligate parthenogen // *Genome.* 1994. Vol. 37. P. 33-35.
- Yahara T., Ito M., Watanabe K. et al. Very low genetic heterozygosities in sexual and agamospermous populations of *Eupatorium altissimum (Asteraceae)* // *Botany.* 1991. Vol. 78, № 5. P. 706-710.
- Widen B., Cronberg N., Widen M. Genotypic diversity, molecular markers and spatial distribution of genetics in clonal plants, a literature survey // *Folia Geobot. Phytotax.* 1994. Vol 29. P. 245-263.
- Witzell H. Chloroplast DNA variation and reticulate evolution in sexual and apomictic sections of dandelions // *Molecular Ecology.* 1999. Vol. 8, N 12. P. 2023-2035.