

## ХРОМОСОМНЫЕ ЧИСЛА И ХЕМОСИСТЕМАТИКА CHROMOSOME NUMBERS AND CHEMOSYSTEMATICS

УДК 582.736:581.134+581.15

О.В. Дорогина  
Е.В. Жмудь  
Н.С. Звягина

O.V. Dorogina  
E.V. Zhmud`  
N.S. Zviagina

### ИЗМЕНЧИВОСТЬ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИХ СПЕКТРОВ ЗАПАСНЫХ БЕЛКОВ СЕМЯН ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ *ASTRAGALUS* (FABACEAE)

### ELECTROPHORETIC SPECTRA VARIABILITY AND SPECIFICITY OF THE SEED STORAGE PROTEINS OF SOME *ASTRAGALUS* SPECIES (FABACEAE)

**Аннотация.** Данные сравнительного анализа электрофоретических спектров полипептидов семян и межвидовая изменчивость у видов *Astragalus* подтверждают принятое деление на секции *Hemiphaca* и *Cenantrum*. Образцы *Astragalus frigidus* внутри видов секции *Cenantrum* на дендрограмме образовали отдельную кладу. Среди других трех видов этой же секции наиболее гетерогенны *A. propinquus* и *A. membranaceus*, образцы которых не разделились на отдельные кладу.

**Ключевые слова:** род *Astragalus*, эндемичные виды, изменчивость, электрофоретические спектры, запасные белки семян.

**Summary.** The date of the comparative analysis of electroforetic spectra of the seed storage proteins and the intra-specific variability for some *Astragalus* species proved their division into two sections *Hemiphaca* and *Cenantrum*. It was shown that *Astragalus frigidus* formed the separate branch within the section *Cenantrum*. *Astragalus propinquus* and *A. membranaceus* were indicated as the most heterogenous species and did not form separate branches.

**Key words:** *Astragalus*, endemic species, variability, electroforetic spectra, seed storage proteins

Род *Astragalus* L. (Fabaceae) на территории Сибири представлен 92 видами (Выдрина, 1994), из них от 11 до 17 видов являются эндемичными и подлежат охране на государственном уровне (Красная книга РФ, 2008; Редкие ..., 1980). Многие виды этого рода используются в качестве кормовых и лекарственных растений. (Растительные ..., 2010). Неоднократно предпринимались попытки определения объема видов, что было связано, в основном, с практическим их использованием (Сиднева, 2005; Tina et al., 2003; Yip, Kwan, 2006).

Однако с установлением объема видов некоторых представителей секций *Hemiphaca* – астрагал ольхонский (*A. olchonensis* Gontsch.), астрагал двунадрезанный (*A. bifidus* Turcz.) и *Cenantrum*, в том числе таких видов, как астра-

гал сходный (*A. propinquus* Schischk.) и астрагал перепончатый (*A. membranaceus* (Fisch.) Bunge), существуют определенные трудности. Диагностика этих видов базируется на комплексе количественных и качественных морфологических признаков (Выдрина, 1994). К первой группе признаков относятся высота побегов, число пар листочков и их размер, длина чашечки, ее зубцов и частей венчика, размер бобов. Количественные диагностические морфологические признаки этих двух видов, как и их ареалы, перекрываются. Качественные признаки (опушение побегов, листочков, бобов, чашечки и ее зубцов, а также форма чашечки и ее зубцов) в значительной степени носят субъективный характер. Для сравнения в работе приведены данные электрофоретического исследования образцов астрагала холодного (*A. frigidus* (L.) A. Gray), также пред-

.....

Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, ул. Золотодолинская, 101; 630090, Новосибирск, Россия;  
e-mail: olga-dorogina@yandex.ru, elenazhmu@ngs.ru, zviagnat@rambler.ru  
Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Zolotodolinskaya str., 101; 630090, Novosibirsk, Russia

Поступило в редакцию 13.09.2012 г.

Submitted 13.09.2012

ставителя секции *Cenantrum*, морфологически хорошо дифференцированного от *A. propinquus* и *A. membranaceus*.

Важным критерием для определения объема вида является его ареал. Так, *A. olchonensis* и *A. bifidus* характеризуются высоким уровнем морфологического сходства, однако распространение и экологический ареал *A. bifidus* шире. Его ареал охватывает, помимо острова Ольхон, Маломорское побережье Байкала и Южную Бурятию.

Что касается *A. propinquus*, он произрастает в основном в Западной и Средней Сибири, Монголии и Северном Китае, тогда как *A. membranaceus* – преимущественно в Восточной Сибири, Монголии, Западном Китае. Однако их ареалы перекрываются (Выдрина, 1994). Необходимо отметить, что *A. sericeocanus* занесен в Красную книгу Республики Бурятия (2002) как редкий вид, для которого на территории России известно лишь 2 местонахождения. *Astragalus olchonensis* – эндемик прибрежных песков и дюн острова Ольхон и восточного побережья Байкала. Вид занесен в Красную книгу Иркутской области (2001) и Российской Федерации (2008), где он причислен к группе узколокальных эндемиков, находящихся под угрозой исчезновения.

Лимитирующими факторами, ограничивающими численность двух указанных редких видов, является слабая конкурентоспособность и неустойчивое состояние локальных популяций, зависящее от подвижности песчаного субстрата, на фоне хозяйственной и рекреационной нагрузки.

Таким образом, отсутствие четких морфологических различий между представителями этих видов и в значительной степени общие места произрастания затрудняют идентификацию растений этих видов и установление их объема. Кроме того, морфологическая изменчивость, особенно у видов с перекрестным опылением, спонтанная межвидовая и межродовая гибридизация значительно затрудняют таксономическую классификацию внутри рода.

Появляется необходимость в применении дополнительных методов для решения спорных вопросов, касающихся идентификации близкородственных видов, образцов, отклоняющихся от типовых экземпляров, и гибридных форм, возникающих при интрогрессии генетического материала.

Некоторыми исследователями была предпринята попытка проведения хемотаксономического исследования видов секции *Cenantrum* с использованием таких признаков-маркеров, как

состав и содержание флавоноидов. Эти исследования выявили видоспецифичность «флавоноидных профилей» и самостоятельность видов комплекса *A. membranaceus*, *A. propinquus* и *A. mongholicus* (Сиднева, 2006; Tina et al., 2003).

Преимущества запасных белков заключаются в значительном внутривидовом полиморфизме, независимости от условий произрастания растений и разной степени специфичности, которую можно использовать как фактор видовой идентификации растений (Агафонова (Дорогина) и др., 2004).

Целью данной работы явилось изучение специфичности и изменчивости электрофоретических спектров полипептидов семян у растений видов *Astragalus* из секций *Hemifaca* и *Cenantrum*, включая байкальские эндемики *A. olchonensis* и *A. sericeocanus*.

**Материалы и методы.** В работе использовали выборки семян (15–30 шт.) двух видов *Astragalus* секции *Hemifaca*: *A. olchonensis* и *A. bifidus* (Иркутская область) и четырех видов из секции *Cenantrum*: *A. propinquus* (Горный Алтай, Тува, Бурятия, Иркутская область); *A. membranaceus* (Читинская область); *A. frigidus* (Горный Алтай и Иркутская обл.); *A. sericeocanus* (Бурятия) (табл. 1).

Для разделения запасных белков 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 (Дорогина), Агафонов, 1991). Использовали трис-глициновую буферную систему для SDS-электрофореза в 15 % полиакриламидном геле. Для лучшего разделения белковых компонентов при приготовлении экстрактов в качестве редуцирующего агента был применен 2-меркаптоэтанол.

Молекулярную массу каждой полипептидной фракции оценивали по стандартному образцу – эталонному спектру, состоящему из компонентов, промаркированных белками с известными молекулярными массами. Образцом называли белковый экстракт, полученный из одного семени и представленный на электрофореграмме в виде 1 спектра. Для количественной оценки уровня изменчивости белковых спектров использовали среднее значение коэффициента сходства (Kсх), характеризующего уровень изменчивости популяции и рассчитанный по формуле (Ladizinsky, Hymovits, 1979):

Таблица 1

Места сбора семян растений рода *Astragalus*

Вид	Происхождение образцов
<i>Astragalus bifidus</i>	Иркутская область, (обл.), Иркутский район (р-н), окрестности села (окр. с.) Сарма
<i>A. olchonensis</i>	Иркутская обл., Иркутский р-н, остров Ольхон
<i>A. frigidus</i>	Горный Алтай (ГА), Кош-Агачский р-н, окр. с. Джазатор
	Иркутская обл., Иркутский р-н, окр. пос. Сарма
<i>A. membranaceus</i>	Читинская обл., Приаргунский р-н, окр. с. Олочи
	Читинская обл., Карымский р-н, окр. с. Урульга
	Читинская обл., Даурский заповедник, Адон-Челон
<i>A. propinquus</i>	ГА, Кош-Агачский р-н, окр. с. Джазатор
	ГА, Кош-Агачский р-н, окр. с. Кокоря
	Тува, заповедник Азас
	Бурятия, Улан-Удэ, окр. с. Верхняя Березовка
<i>A. sericeocanus</i>	Бурятия, Прибайкальский р-н, окр.с. Турка

$$K = N_1 / (N_1 + N_2) \times 100 \%,$$

где  $N_1$  – количество пар гомологичных белковых компонентов двух сравниваемых образцов,  $N_2$  – количество различающихся компонентов. Вычисления проводили для каждой пары спектров внутри и между выборками. Построение матрицы проводили по наличию (1) или отсутствию (0) белкового компонента для каждого из образцов. Расчеты выполняли с использованием компьютерной программы “Statistica 8”.

**Результаты и обсуждение.** На основании анализа электрофоретических спектров представителей изученных видов *Astragalus* было обнаружено, что все они состоят из компонентов, величина молекулярных масс которых составила от 14 до 116 кД (рис. 1). Наиболее консервативные компоненты отмечались в области около 18–20 кДа, которые можно рассматривать как инвариантные. Общими для всех видов секции *Hemiphaca* следует считать компоненты в области 116 кДа, а для секции *Cenantrum* – в об-

ласти 22 кДа (на рис. 1 – отмечены стрелками). В целом характер распределения полипептидов для всех образцов внутри каждой из этих секций можно считать весьма сходным.

По нашему мнению, образцы *A. bifidus*, произрастающие на берегу Сарайского залива и исследованные нами, имели переходные признаки между *A. olchonensis* и *A. bifidus* (Жмудь и др., 2011). Как видно из рисунка 1, в структуре белковых спектров обоих этих видов существует значительное сходство, которое просматривается и в характере распределения основных диагностических компонентов. Кроме того, у этих видов и внутривидовая, и межвидовая изменчивость была минимальной (табл. 2). Электрофоретические спектры *A. olchonensis* и *A. bifidus* довольно четко отличаются по архитектонике от *A. sericeocanus*, *A. propinquus*, *A. membranaceus* и *A. frigidus*.

Анализ изменчивости, основанный на величине коэффициентов сходства, показал, что почти у всех видов внутривидовая изменчивость меньше, чем межвидовая. Исключение соста-

Таблица 2

Значения внутри- и межвидовых коэффициентов сходства (Ксх, %) у представителей рода *Astragalus* из секций *Cenantrum* и *Hemiphaca*

Вид	Секция <i>Hemiphaca</i>		Секция <i>Cenantrum</i>			
	<i>A. olchonensis</i>	<i>A. bifidus</i>	<i>A. propinquus</i>	<i>A. membranaceus</i>	<i>A. sericeocanus</i>	<i>A. frigidus</i>
<i>A. olchonensis</i>	<b>67.7*</b>	48.4	10.8	11.0	12.2	8.0-
<i>A. bifidus</i>	48.4	<b>57.5</b>	10.5	11.0	17.1	10.1
<i>A. propinquus</i>	10.8	10.5	<b>32.8</b>	26.0	26.8	9.7
<i>A. membranaceus</i>	11.0	11.0	26.0	<b>26.7</b>	19.5	22
<i>A. sericeocanus</i>	12.2	17.1	26.8	19.5	<b>56.0</b>	10.9
<i>A. frigidus</i>	6.9	10.1	9.7	12.3	10.9	<b>46.5</b>

\* жирным шрифтом выделены значения внутривидовых Ксх.

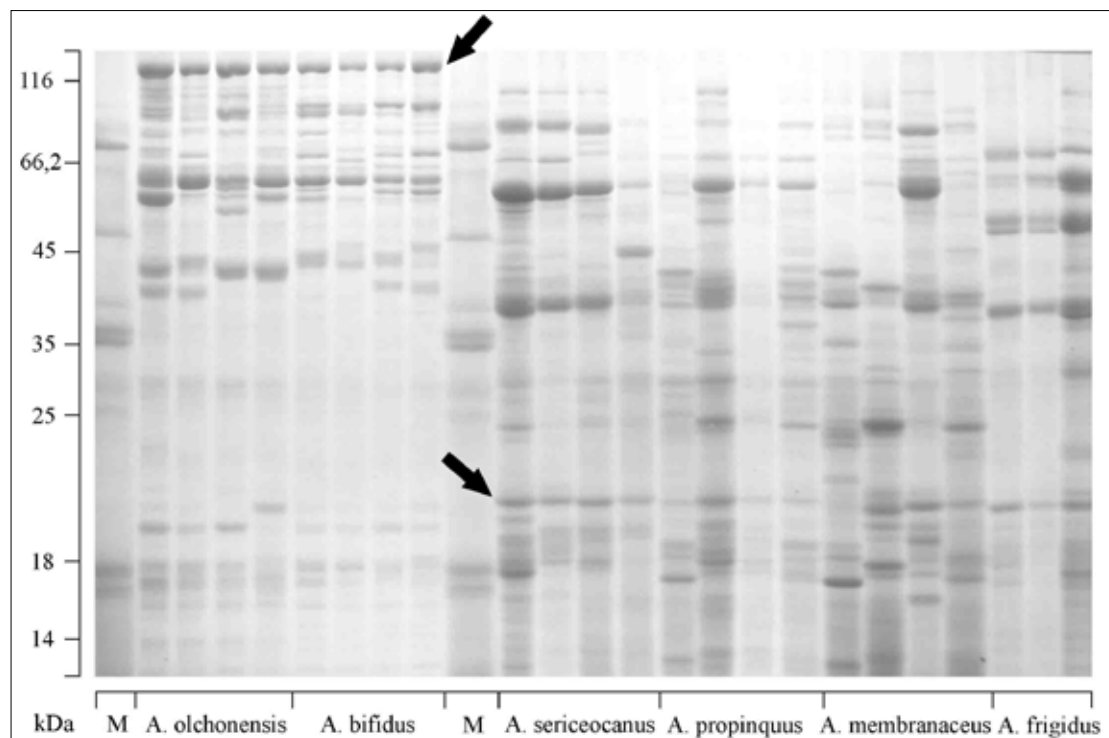


Рис. 1. Электрофореграмма спектров запасных белков семян растений у видов р. *Astragalus*.

вили две пары видов: *A. propinquus* – *A. membranaceus* и *A. olchonensis* – *A. bifidus*, у которых коэффициенты сходства между видами приближались к величине, соответствующей внутривидовой изменчивости. При этом уровень сходства между этими и остальными видами значительно меньше (табл. 2), что также подтвердилось и по расположению компонентов на спектрах этих

видов (рис. 1). В то же время, было установлено, что величины Ксх между *A. sericeocanus* – *A. propinquus* и *A. membranaceus* внутри секции *Cenanthrum* значительно выше, чем у этих же видов с *A. frigidus*. Это также подтвердилось отличием архитектуры спектров на электрофореграммах этих видов от *A. frigidus*, хотя при этом не исключено наличие внутри- и межвидовой изменчивости.

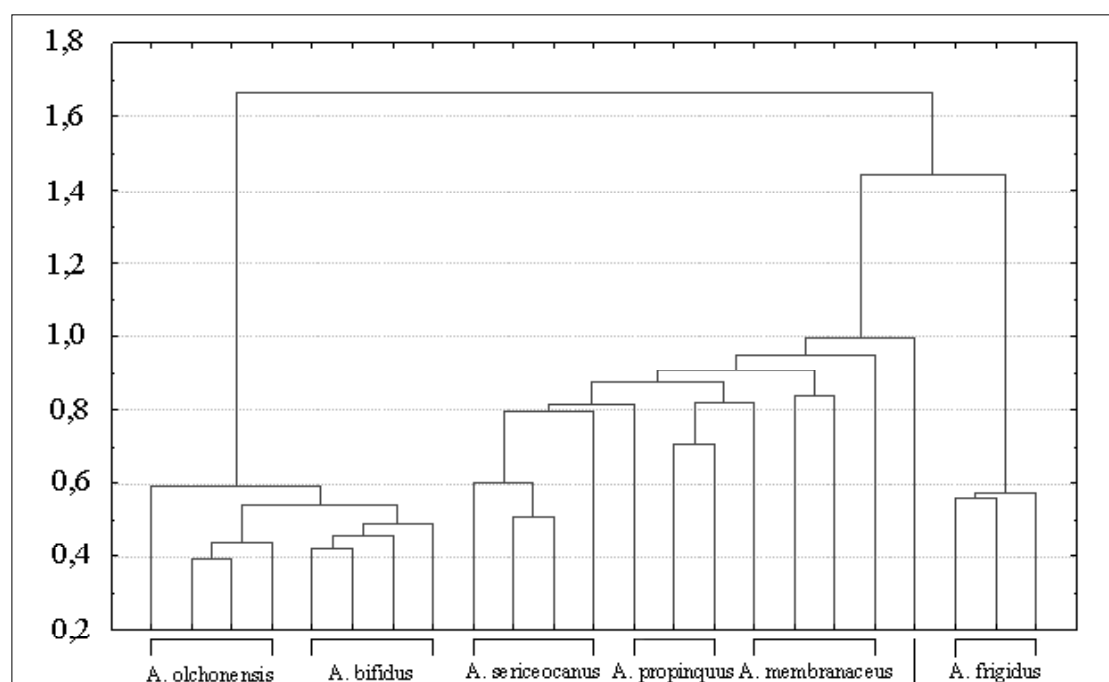


Рис. 2. Дендрограмма взаимосвязи состава запасных белков семян некоторых видов р. *Astragalus*.

Сравнительный анализ электрофоретических спектров по запасным белкам семян внутри популяций эндемичных видов *A. olchonensis* и *A. sericeocanus* показал, что спектры внутри каждого из этих видов идентичны по расположению на них компонентов (см. рис. 1). Поэтому величины внутривидовой изменчивости, вычисленные по среднему значению коэффициентов сходства у этих видов, по сравнению с другими видами невысокие ( $K_{сх} = 67.6$  и  $57.5$  %), что является одной из характеристик редких и исчезающих видов и является доказательством процессов (возможно, инбридинга), приводящих к деградации популяций.

Исходя из этого, в программах по восстановлению редких видов необходимо учитывать исторически сложившуюся внутривидовую генетическую подразделенность, уровень ее изменчивости, и включать исследование изменчивости и её динамики в популяциях редких и близких к ним полиморфных видов.

На дендрограмме (рис. 2), построенной на основании электрофоретических спектров полипептидов семян видов из секций *Hemiphaca* и *Cenantrum*, все исследованные виды разделились на две клады, что соответствует двум секциям (Дорогина и др., 2011). В одной кладе разместились *A. olchonensis* и *A. bifidus*, а в другой – *A. sericeocanus*, *A. propinquus*, *A. membranaceus* и *A. frigidus*. Такое разделение соответствует более высоким величинам  $K_{сх}$  между видами внутри каждой клады и наличию на электрофореграммах двух различных типов полипептидных спектров, что согласуется с принятым в настоящее время делением на эти две секции.

На дендрограмме среди видов секции *Cenantrum* отделяется от прочих *A. frigidus*, формирующий отдельную кладу (см. рис. 2). Нами обнаружено, что образцы *A. sericeocanus*, характеризующиеся высоким уровнем внутривидового сходства, были несколько обособлены на дендрограмме, но вошли в состав общей клады с родственными видами из этой же секции – *A. propinquus* и *A. membranaceus*. Величина коэффициентов сходства внутри видов этой секции варьирует в значительной степени. Так, очень высокие показатели были получены для двух видов – *A. frigidus* и *A. sericeocanus*. Оба имеют высокий и очень высокий коэффициенты внутривидового сходства (см. табл. 2). Первый из них – широко распространенный вид с узким экологическим ареалом, второй – эндемичный вид с узким эколо-

гическим и географическим ареалом. Возможно, большое внутривидовое генетическое сходство обусловлено узкой экологической приуроченностью видов. Нами обнаружено, что *A. frigidus* и *A. sericeocanus*, представленные на дендрограмме отдельными кладами и характеризующиеся высокими  $K_{сх}$  внутри вида, имеют очень небольшие величины  $K_{сх}$  с *A. propinquus* и *A. membranaceus*. Необходимо отметить, что изменчивость как внутри, так и между видами *A. propinquus* и *A. membranaceus* близка по величине (см. табл. 2). В свою очередь, эти близкородственные виды на дендрограмме не разделились на две клады. Их образцы сформировали единую кладу.

**Выводы.** Данные сравнительного анализа электрофоретических спектров полипептидов семян видов *Astragalus* подтвердили принятое деление на секции *Hemiphaca* и *Cenantrum*. В результате проведенных нами исследований установлено, что уровень сходства между видами секции *Hemiphaca* выше, чем секции *Cenantrum*, что отражает более тесные эволюционные связи между *A. olchonensis* и *A. bifidus*.

Внутри секции *Cenantrum* отделяется от прочих *A. frigidus*, формирующий отдельную кладу. Среди других трех видов этой же секции наиболее гетерогенны *A. propinquus* и *A. membranaceus*, образцы которых не образовали отдельных клад. Внутривидовая изменчивость этих двух представителей секции по полипептидным спектрам семян практически такая же, как и межвидовая, что подтверждается средними значениями  $K_{сх}$  внутри и между этими видами. Тем не менее, их сходство с двумя другими представителями этой же секции в среднем вдвое ниже.

Выявленный низкий белковый полиморфизм семян эндосперма *A. olchonensis* и *A. sericeocanus* соответствует представлениям об эндемичных видах, имеющих узколокальное распространение. Можно предположить, что усилению гомогенной структуры этих видов способствует значительная антропогенная нагрузка в местах их произрастания, что должно послужить предпосылкой для усиления мер их охраны.

Авторы выражают благодарность к. б. н. О.В. Сидневой за предоставленные образцы семян *A. membranaceus* из Читинской области и *A. propinquus* из Тувы (заповедник Азас).

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов: Интеграционный проект № 20 и Программы 30 Президиума РАН.

## ЛИТЕРАТУРА

- Агафонова (Дорогина) О.В.** Существует ли геномная специфичность в роде пырейник? // Докл. Акад. Наук, 1997. – Т. 355, № 6. – С. 838–840.
- Агафонова (Дорогина) 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. в ВИНТИ 23.10.91, N 2467 - В91).
- Агафонова (Дорогина) О.В., Агафонова М.А.** Идентификация близкородственных видов *Hedysarum theinum*, *H. neglectum*, *H. austrosibiricum* (Fabaceae) с помощью запасных глобулинов семян // Бот. журн., 2004. – Т. 89, № 10. – С. 1637–1645.
- Выдрина С.Н.** Астрагал (*Astragalus* L.) // Флора Сибири. Т. 9: Fabaceae (Leguminosae). – Новосибирск: Наука, 1994. – С. 20–151.
- Дорогина О.В., Жмудь Е.В., Звягина Н.С.** Изменчивость электрофоретических спектров запасных белков семян некоторых представителей рода *Astragalus* (Fabaceae) // Матер. X Междунар. науч.-практ. конф. «Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии». – Барнаул, 2011. – С. 37–39.
- Жмудь Е.В., Елисафенко Т.В., Верхозина А.В., Кривенко Д.А., Звягина Н.С., Дорогина О.В.** Состояние популяции эндемичного вида *Astragalus olchonensis* (Fabaceae) на острове Ольхон (Байкал) // Бот. журн., 2011. – Т. 96, № 2. – С. 245–256.
- Красная книга Иркутской области: Сосудистые растения / Под ред. А.М. Зарубина. – Иркутск, 2001. – 200 с.
- Красная книга Республики Бурятия. Растения и грибы. – Новосибирск, 2002. – 340 с.
- Красная книга Российской Федерации (растения и грибы) / Гл. редколл.: Ю.П. Трутнев и др.; сост. Р.В. Камелин и др. – М., 2008. – 885 с.
- Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т. 3. Семейства Fabaceae – Ариасеae / Отв. Ред. А.Л. Буданцев. – СПб.-М.: Товарищество научных изданий КМК, 2010. – 601 с.
- Редкие и исчезающие растения Сибири. – Новосибирск, 1980. – 223 с.
- Сиднева О.В.** Биохимическая специфичность сибирских видов секции *Cenantrum* Koch рода *Astragalus* L. (Fabaceae) // Turczaninowia, 2005. – Т. 8, вып. 4. – С. 73–82.
- Сиднева О.В.** Хемотаксономическое исследование видов секции *Cenantrum* Koch рода *Astragalus* L. (Fabaceae Lindl.) Сибири: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Новосибирск, 2006. – 16 с.
- Dong T.T., Ma X.Q., Clarke C., Song Z.H., Ji Z.N., Lo C.K., Tsim K.W.** Phylogeny of *Astragalus* in China: Molecular Evidence from the DNA Sequences of 5S rRNA Spacer, ITS, and 18S rRNA // J. Agric. Food Chem., 2003. – Vol. 51. – P. 6709–6714.
- Ladizinsky G., Hymovits T.** Seed protein electrophoresis in taxonomic and evolutionary studies // Theor. Appl. Genet., 1979. – Vol. 54. – P. 145–151.
- Laemmli U.K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature, 1970. – Vol. 227, № 5259. – P. 680–685.
- Yip P.Y., Kwan H.Sh.** Molecular identification of *Astragalus membranaceus* at the species and locality levels // Journal of Ethnopharmacology, 2006. – № 106. – P. 222–229.