

ДЫМШАКОВА Ольга Сергеевна

**ЕСТЕСТВЕННАЯ И ИСКУССТВЕННАЯ
ГИБРИДИЗАЦИЯ В КОМПЛЕКСЕ
SAXIFRAGA CERNUA L. – *S. SIBIRICA* L.
НА УРАЛЕ**

03.00.05 – ботаника

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Екатеринбург – 2010

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук
Институте экологии растений и животных Уральского отделения РАН

Научный руководитель: доктор биологических наук
Семериков Владимир Леонидович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Позолотина Вера Николаевна

кандидат биологических наук
Князев Михаил Сергеевич

Ведущая организация: **ГОУ ВПО Марийский
государственный университет**

Защита состоится «6» апреля 2009 г. в ___ часов на заседании диссертационного
совета Д 004.005.01 при Институте экологии растений и животных УрО РАН по
адресу: 620144, г. Екатеринбург, ул. 8 Марта, 202

Факс: 8 (343) 260-82-56; E-mail: dissovet@ipae.uran.ru

URL: <http://ipae.uran.ru>

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской
академии наук Института экологии растений и животных УрО РАН.

Автореферат разослан «__» марта 2010 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат биологических наук



Н. В. Золотарева

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы: Гибридизация является одним из важнейших факторов видообразования у растений [Грант, 1984; Цвелев, 1972, 2000; Першина, 2009; и др.]. К настоящему времени накоплена обширная литература по данному вопросу [Викторов, 2000; Lebens-Mack, Milligan, 1998; Lowe, Abbott, 2000; Mooring, 2002; и др.]. Главным образом, в этих работах предлагается описание того или иного гибрида. Исследований, в которых проводилось искусственное моделирование процесса естественной гибридизации, известно меньше [Svejda, 1974; Vargas, 1996; Kaplan, Fehrer, 2006; Trojak-Goluch, Verbeć, 2007]. Однако именно такие работы важны для лучшего понимания процесса гибридизации.

На территории горного Урала обитают два родственных вида камнеломки: Камнеломка поникающая (*Saxifraga cernua* L.) и камнеломка сибирская (*S. sibirica* L.), отличающиеся по уровню пloidности. На Среднем Урале были обнаружены растения камнеломки с промежуточным внешним обликом. Предполагалось, что они появились в результате межвидовой гибридизации между *S. cernua* и *S. sibirica* [Капралов, 2004]. Таким образом, существование комплекса *S. cernua* – *S. sibirica* на Урале предоставляет возможность для искусственного моделирования естественной гибридизации между этими камнеломками и сравнения искусственных гибридов со среднеуральскими растениями.

Цель работы – моделирование процесса гибридного видообразования у видов рода *Saxifraga*.

Задачи исследования:

1. Провести скрещивание между растениями *S. cernua*, *S. sibirica* и их F_1 гибридов в разных комбинациях.
2. Сравнить морфометрические, репродуктивные, кариологические и генетические параметры *S. cernua*, *S. sibirica*, растений с промежуточным обликом (далее среднеуральские растения) и искусственных гибридов.
3. Изучить результаты гетеропloidного скрещивания и оценить вероятность такого скрещивания в естественных условиях.

Защищаемые положения:

1. Образование фертильных гибридов возможно как при прямом скрещи-

вании *S. cernua* и *S. sibirica*, так и при возвратном скрещивании гибридов первого поколения и растений родительских видов.

2. Искусственные гибриды прямого и возвратного скрещивания имеют высокую изменчивость морфологических, кариологических и репродуктивных признаков.

3. При гетероплоидном скрещивании ($2x$ и $4x$) основная доля гибридного потомства имеет триплоидный уровень, в меньшей степени образуется ди- и тетраплоидное потомство.

4. Наблюдается зависимость между уровнем пloidности и фертильностью пыльцы: триплоиды имеют низкую фертильность пыльцы, тогда как ди- и тетраплоиды – высокую.

Научная новизна и теоретическая значимость результатов исследования: Впервые проведено искусственное моделирование процесса гибридизации между *S. cernua* и *S. sibirica* в лабораторных условиях, получены F_1 и B_1 поколения растений. Исследованы морфометрические, репродуктивные, кариологические и генетические признаки у искусственных гибридов. Показана возможность такого скрещивания в естественных условиях.

Полученные данные расширяют знания о гибридном видообразовании.

Практическая значимость: Разработана методика скрещивания, проращивания семян и выращивания гибридных растений камнеломки в лабораторных условиях. Полученные результаты важны для разработки стратегии охраны реликтовых видов флоры Урала. Результаты работы включены в теоретический и практический курс «Методы экологических исследований» (УрГПУ, географо-биологический факультет).

Апробация работы: Результаты исследований были представлены на Всероссийских конференциях молодых ученых в ИЭРиЖ УрО РАН в 2003-2009 гг.; VII Всероссийском популяционном семинаре «Методы популяционной биологии» (Сыктывкар, 2004); Демидовских чтениях (Екатеринбург, 2006); IX международной конференции молодых ботаников (Санкт-Петербург, 2006); Международной конференции «Устойчивость экосистем и проблема сохранения разнообразия на Севере» (Кировск, 2006); XII съезде русского ботаническо-

го общества «Фундаментальные и прикладные проблемы ботаники XXI века» (Петрозаводск, 2008); на семинаре лаборатории биоразнообразия и генетики университета Упсалы (Швеция, 2008); Международной конференции «Молодежь в науке – 2009» (Минск, 2009).

Личный вклад автора: Автором выполнена работа по сбору полевого материала (выборки из популяций на р. Серга, р. Юрюзань, р. Чусовая), проведению искусственного скрещивания в течение 4 лет. Анализ полученных результатов проведен автором лично.

Публикации: По материалам исследования опубликовано 7 печатных работ, в том числе 2 в журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации: Диссертация состоит из введения, семи глав, выводов, списка литературы, включающего 244 наименования, из которых 141 на иностранных языках. Работа изложена на 141 странице, содержит 19 таблиц и 18 рисунков.

Благодарности: Благодарю моего научного руководителя – д-р. биол. наук В. Л. Семерикова; очень признательна коллегам канд. биол. наук О. Е. Сушенцову и канд. биол. наук А. Г. Быструшкину за помощь в сборе материала и статистической обработке полученных данных; д-р. биол. наук, проф. А. В. Родионову и канд. биол. наук Е. О. Пуниной за помощь в постановке методики и подсчете хромосом; канд. биол. наук, доц. Н. А. Кутлуниной и канд. биол. наук, доц. С. А. Зимницкой за помощь при выполнении работ по репродуктивной биологии и обсуждении результатов работы; проф. М. Ласко (Martin Lascoux), Ч. Сантессон (Kerstin Santesson), асп. К. Онге (Kate St. Onge) за возможность выполнения ДНК-анализа, проточной цитометрии и всемерную поддержку; науч. сотр. А. Руду (Andreas Rudh) за теоретическую помощь в проведении AFLP-анализа и интерпретацию полученных данных; канд. биол. наук С. А. Семериковой, канд. биол. наук А. Ю. Беляеву, канд. биол. наук М. В. Капралову, канд. биол. наук М. В. Модорову за обсуждение работы; И. В. Братцевой за помощь при составлении библиографического списка.

ГЛАВА 1. ГИБРИДИЗАЦИЯ В МИРЕ РАСТЕНИЙ

В главе приводится краткий обзор литературы, посвященный истории изучения гибридизации, ее роли в эволюции растений. Рассматриваются условия протекания гибридизации и характеристики, используемые при изучении гибридов.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ И РАЙОН ИССЛЕДОВАНИЯ

S. sibirica L. – вид, занимающий горные местообитания от островов в Эгейском море, через горы Кавказа и Средней Азии до Гималаев. Растения, как правило, образуют сильноветвящиеся генеративные побеги, несущие многочисленные цветки (около 10). Обычно размножаются семенами, однако обнаружены растения, образующие столоны и выводковые почки в пазухах стеблевых листьев – бульбочки (псевдовивипария) [Капралов, Дымшакова, 2006]. Характеризуются наличием хромосомного полиморфизма: $2n = 16-28$.

S. cernua L. – арктоальпийский вид, имеющий обширный циркумполярный ареал. Растения, как правило, образуют неветвящиеся генеративные побеги с одним цветком. Семенное размножение возможно только в годы с благоприятным вегетационным периодом. Основное размножение – вегетативное (псевдовивипария). Характеризуется наличием хромосомного полиморфизма: $2n = 24-72$. Считается, что *S. cernua* имеет три предковых вида: *S. sibirica*, *S. debilis* и *S. radiata* [Checklist of the..., 2007].

Между предковыми видами и *S. cernua* обнаружены промежуточные формы растений. Так, на Среднем Урале обнаружены растения с промежуточным морфологическим обликом. Растения имеют слабо ветвящиеся побеги с несколькими цветками (3-5). Размножаются семенами и бульбочками. Обнаружено хромосомное число $2n = 24$. В работе изучаются растения, собранные в популяциях от Южного до Полярного Урала.

ГЛАВА 3. ИСКУССТВЕННОЕ СКРЕЩИВАНИЕ

3.1 Материал и методика искусственного скрещивания. Скрещивание между *S. cernua* и *S. sibirica* проводили однократно. Полученные семена хранили при температуре +2...+5°C, затем проращивали, проростки высаживали в смесь торфа и почвы (1:1) и выращивали в лаборатории при круглосуточном освеще-

нии, постоянной температуре (+18°C) и обильном поливе. Скрещивание гибридов первого поколения (F_1) с одним из родительских видов, проращивание семян и выращивание гибридов возвратного скрещивания (B_1) проводили по методике, описанной для получения гибридов F_1 .

3.2 Продуктивность искусственного скрещивания. В период 2005-2008 гг. было проведено 560 скрещиваний. При прямом скрещивании потомство было получено в 46,4% случаев, при возвратном – в 33,4% (табл. 1). Гейтоногамия (скрещивание в пределах одного растения) для растений F_1 составила 9,1%, скрещивание между гибридами и самоопыление гибридов не давало результатов.

Таблица 1 – Скрещивание между родительскими видами и гибридами

Растение-донор	Опыляемое растение	Результат скрещивания	
		успешные скрещивания (число попыток)	доля удачных скрещиваний, %
Скрещивания <i>S. cernua</i> и <i>S. sibirica</i>			
<i>S. sibirica</i>	<i>S. cernua</i>	11 (46)	23,9
<i>S. cernua</i>	<i>S. sibirica</i>	28 (38)	73,7
Общее		39 (84)	46,4
Возвратное скрещивание			
<i>S. sibirica</i>	F_1	82 (216)	38,0
<i>S. cernua</i>	F_1	15 (41)	36,6
F_1	<i>S. sibirica</i>	37 (76)	48,7
F_1	<i>S. cernua</i>	3 (41)	7,3
Общее		137 (410)	33,4
Скрещивание гибридов			
F_1	F_1 (самоопыление)	0 (27)	0,0
F_1	F_1 (гейтоногамия)	2 (20)	9,1
F_1	F_1 (растение той же семьи)	0 (21)	0,0
F_1	F_1 (растение другой семьи)	0 (1)	0,0
Общее		2 (69)	2,3

Так, при гетероплоидном скрещивании *S. cernua* (4x) и *S. sibirica* (2x) менее чем в половине случаев были получены семена. Наиболее высокая доля завязывания семян наблюдалась при опылении растений F_1 пыльцой *S. sibirica* (48,7% случаев). Низкая доля завязывания семян наблюдалась при опылении

растений F_1 пыльцой *S. cernua* – 7,3%. Примерно одинаковый уровень завязывания семян (38,0% и 36,6% соответственно) наблюдался при опылении родительских растений пыльцой гибридных растений.

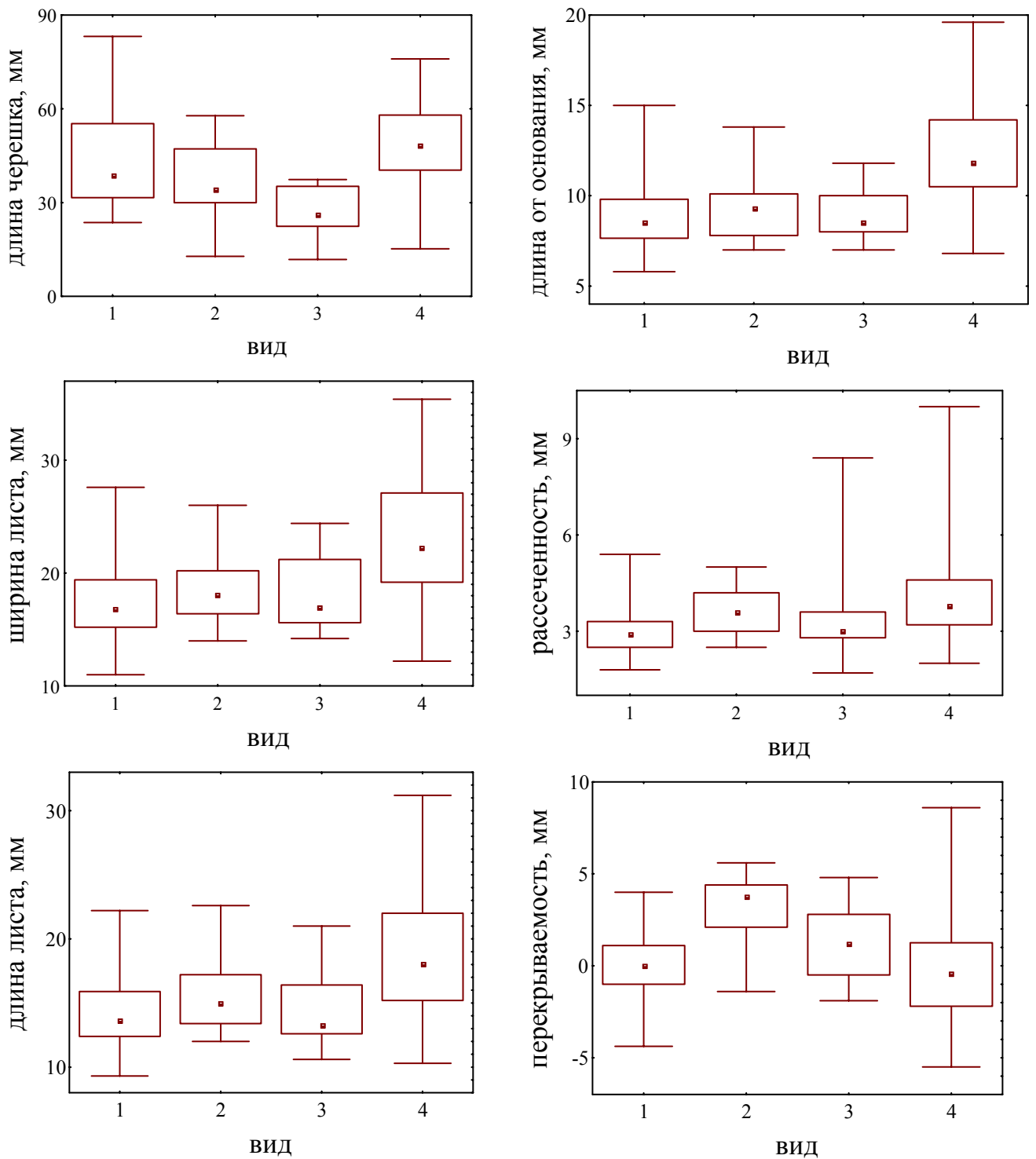
ГЛАВА 4. МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ *S. CERNUA*,
S. SIBIRICA, СРЕДНЕУРАЛЬСКИХ РАСТЕНИЙ И ИСКУССТВЕННЫХ ГИБРИДОВ
4.1 Материал и методика исследования морфологических признаков. С

каждого исследуемого растения использовали по пять листьев прикорневой розетки. Для каждого листа измеряли следующие параметры: длина черешка, длина листа, ширина листа, длина листа от основания (основание – точка прикрепления черешка), рассеченность листа (глубина выреза верхней доли листа), перекрываемость (положительные значения при перекрывании нижних долей листа, отрицательные при отсутствии перекрывания, равен нулю при смыкании долей). Измерения проводили с помощью штангенциркуля (точность 0,1 мм).

Всего было исследовано 241 растение: *S. cernua* (100 особей), *S. sibirica* (18), среднеуральские растения (26), растения F_1 (97). В качестве исходных данных брали усредненные промеры пяти листьев одного растения.

4.2 Анализ морфометрической изменчивости листа. Распределения значений исследованных морфометрических параметров приведены на рисунке 1. Наиболее высокие средние значения для всех морфометрических признаков наблюдались для искусственных гибридов (за исключением признака «перекрываемость»), наиболее низкие – для *S. sibirica* и *S. cernua*. Среднеуральские растения занимают промежуточное положение относительно родительских видов по признакам «длина черешка», «ширина листа» и «длина листа от основания».

Для анализа значимости различий морфометрических признаков между группами растений был проведен непараметрический тест Манна-Уитни. Обнаружен только один признак – «длина черешка» – по которому все группы растений достоверно отличаются друг от друга ($p < 0,05$). Также он является единственным признаком, по которому различаются родительские виды *S. cernua* и *S. sibirica*. По другим признакам группы растений перекрываются в той или иной степени.



Показаны средние значения, 50% интервал, минимальные и максимальные значения; 1 – *S. cernua*, 2 – среднеуральские растения, 3 – *S. sibirica*, 4 – искусственные гибриды прямого скрещивания

Рисунок 1 – Морфометрические признаки в четырех группах растений

Исследуемые группы растений были проанализированы по комплексу морфометрических признаков. Проведен дискриминантный анализ (не показан) и анализ главных компонент. Все группы исследуемых растений перекрываются (рис. 2).

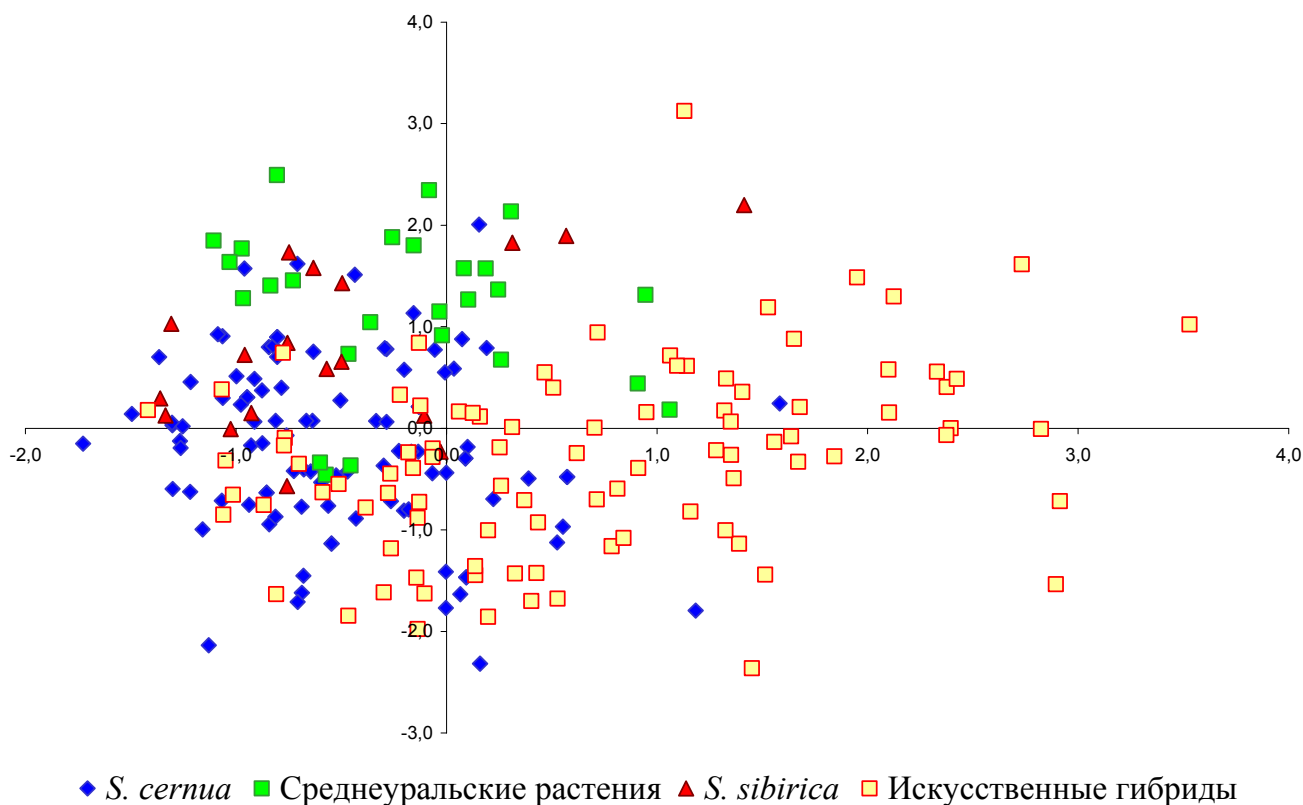


Рисунок 2 – Исследуемые группы растений в плоскости главных координат на основе координат факторов

Тем не менее, имеются достоверные различия между всеми группами растений по комплексу признаков (дискриминантный анализ, $p < 0,05$). *S. cernua* по комплексу признаков наиболее близка к *S. sibirica* (квадрат расстояний Махаланобиса 2,6, $p < 0,01$), и одинаково удалена от среднеуральских растений и искусственных гибридов (3,2, $p < 0,01$). Растения *S. sibirica* наиболее близки к среднеуральским растениям (1,8, $p < 0,01$), и удалены от искусственных гибридов (5,2, $p < 0,01$). На такое же расстояние удалены друг от друга среднеуральские растения и искусственные гибриды.

По комплексу морфометрических признаков искусственные гибриды более близки к *S. cernua*, чей уровень пloidности выше ($4x$), а, следовательно, выше вероятность передачи большей части генома, как было отмечено в других

подобных исследованиях [Brysting, 1998].

По всем изученным морфологическим признакам наблюдается повышенная изменчивость у искусственных гибридов (рис. 1), что отражается также на плоскости главных компонент (рис. 2). Близость среднеуральских растений к *S. sibirica* (2x), вероятно, указывает на интрогрессивную гибридизацию в природе, когда происходили неоднократные скрещивания гибридов на *S. sibirica*. Или это явление указывает на то, что среднеуральские растения являются прямыми потомками *S. sibirica* при продвижении ее на север, подвергаясь процессам полиплоидизации и естественного отбору.

Слабые отличия между *S. cernua*, *S. sibirica* и среднеуральскими растениями, вероятно, объясняются их близкородственностью. Отличие искусственных гибридов от других исследуемых групп растений, вероятно, связано с явлением гетерозиса [Дымшакова, 2007]. Среднеуральские растения более близки к *S. cernua* и *S. sibirica*, чем к искусственным гибридам, что может быть связано с длительным воздействием отбора.

ГЛАВА 5. РЕПРОДУКТИВНЫЕ ПРИЗНАКИ *S. CERNUA*,

S. SIBIRICA, СРЕДНЕУРАЛЬСКИХ РАСТЕНИЙ И ИСКУССТВЕННЫХ ГИБРИДОВ

5.1 Материал и методика исследования репродуктивных признаков.

В работе исследовано 489 растений: *S. cernua* (10 популяций, 94 особи), *S. sibirica* (3 популяции, 39 особей), среднеуральские растения (4 популяции, 36 особей), искусственные гибриды F_1 (144 особи) и B_1 (176 особей).

Для всех растений были исследованы репродуктивные признаки, в качестве которых использовались: 1) количество цветков на генеративный побег, 2) количество бульбочек на генеративный побег, 3) фертильность пыльцы.

Для сравнения групп по исследованным репродуктивным признакам были использованы дискриминантный анализ и непараметрический тест Манна-Уитни.

5.2 Анализ изменчивости репродуктивных признаков.

Тест Манна-Уитни показал достоверное различие ($p < 0,05$) по исследуемым репродуктивным признакам всех групп растений (рис. 3).

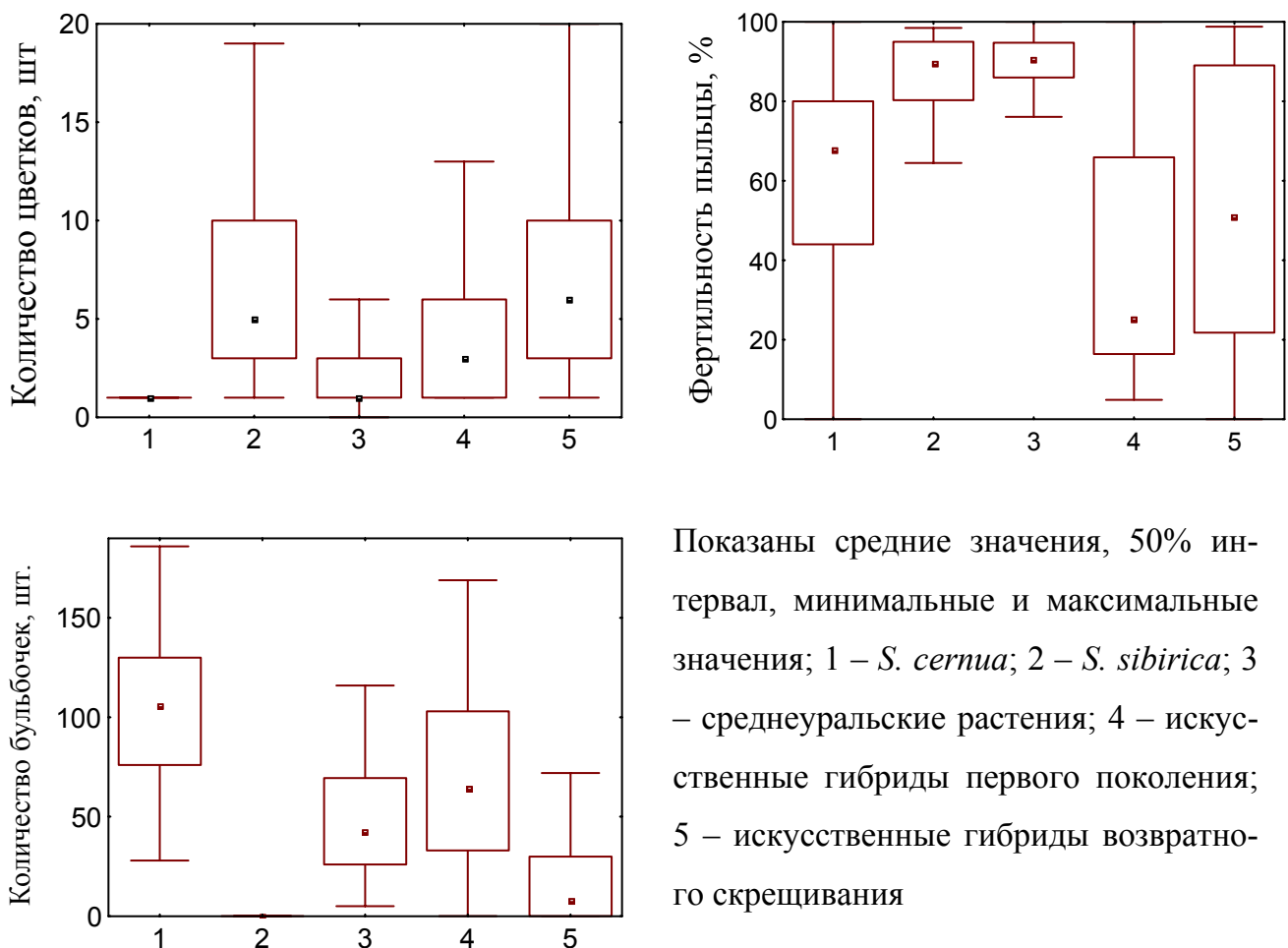


Рисунок 3 – Количество цветков, бульбочек на генеративный побег, фертильность пыльцы в исследуемых группах растений

По признакам «количество цветков и бульбочек» на побег среднеуральские растения занимают промежуточное положение относительно *S. cernua* и *S. sibirica*, перекрываясь с ними. По признаку «фертильность пыльцы» группа растений *S. sibirica*, имеющая повышенную фертильность, не отличалась от среднеуральских растений, а искусственные гибриды F_1 , обладающие наименьшей фертильностью, достоверно не отличаются от *S. cernua*, но отличаются от искусственных гибридов возвратного скрещивания (тест Манна-Уитни $p < 0,05$). Низкая фертильность пыльцы искусственных гибридов, вероятно, объясняется несбалансированным кариотипом, получившимся в результате гетероплоидного скрещивания (между $2x$ и $4x$). Сниженная фертильность пыльцы *S. cernua*, вероятно, связана с более высоким уровнем ploидности, чем у *S. sibirica* и среднеуральских растений.

При исследовании групп растений по комплексу репродуктивных призна-

ков (дискриминантный анализ, не показан) наблюдали промежуточное положение среднеуральских растений и искусственных гибридов относительно первой оси (основной вклад – количество цветков (0,66) и бульбочек (– 0,88)). По второй оси наблюдалась слабая тенденция к отделению искусственных гибридов от других групп, более того, наблюдалась тенденция к разделению внутри B_1 (вклад во вторую ось «фертильность пыльцы» (– 0,94)). По большинству изученных репродуктивных признаков наблюдается тенденция к увеличению изменчивости у искусственных гибридов по сравнению с остальными группами растений.

Таким образом, значение признаков фертильности пыльцы, «количество цветков» и «количество бульбочек на побег» у среднеуральских растений свидетельствует в пользу их гибридного происхождения.

ГЛАВА 6. КАРИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ *S. CERNUA*,

S. SIBIRICA, СРЕДНЕУРАЛЬСКИХ РАСТЕНИЙ И ИСКУССТВЕННЫХ ГИБРИДОВ

6.1 Методика подсчета хромосомных чисел. Числа хромосом подсчитывали в делящихся клетках (на стадии метафазы) верхушечной меристематической ткани корня. Для изготовления препаратов использовали обработку корешков холодом, близкую к способу Делоне, 1931 [см. Навашин, 1936]. Препараты окрашивали кармином, а затем А-Т специфичным флуорохромом Хехста (Hoechst – 33258).

6.2 Методика проведения проточной цитометрии. Проточная цитометрия использовалась для определения уровня ploидности. Технология основана на измерении интенсивности флуоресцентного свечения ядра клетки, окрашенного ДНК-специфичным красителем. В исследование было включено 102 растения.

6.3 Анализ кариологической изменчивости. Были подсчитаны числа хромосом у 23 особей (12 растений *S. cernua*, 5 растений с промежуточными признаками, 4 искусственных гибрида первого поколения). Хромосомы отличались мелким размером, что было отмечено некоторыми исследователями [A chromosome study..., 1998].

Для исследуемых растений *S. cernua* были обнаружены хромосомные

числа $2n = 24, 36$ и 48 ; для среднеуральских единственное число $2n = 24$; для искусственных гибридов – $2n = c.20$ и $c.28$; для *S. sibirica* число хромосом $2n = 16$ было определено М. В. Капраловым [2004] для растений этих популяций.

С помощью проточной цитометрии была определена ploидность растений *S. cernua* (13 особей), *S. sibirica* (10), среднеуральские растения (4), F_1 (45) и B_1 (30). Как в прямом, так и возвратном скрещивании наибольшая доля гибридов являлась триплоидами (84,1% и 66,7% соответственно, рис. 4). Диплоидные и тетраплоидные растения встречались реже.

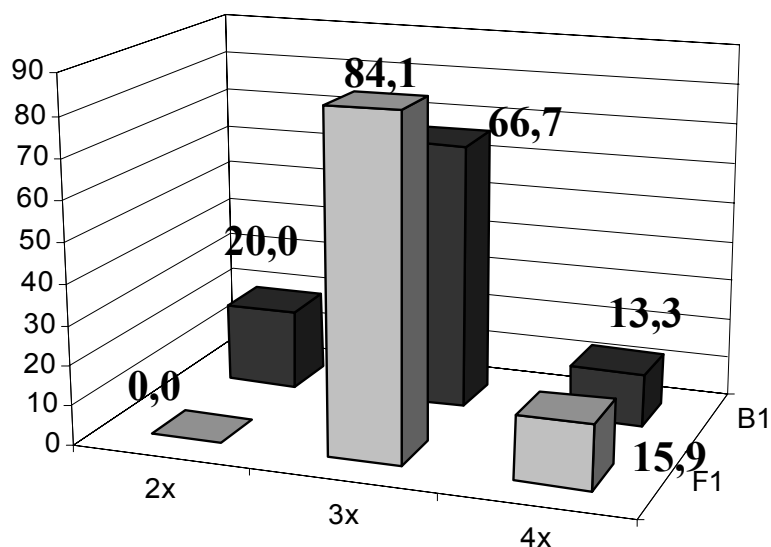


Рисунок 4 – Доля (в %) гибридных растений с разным уровнем ploидности в поколениях F_1 и B_1

6.4 Связь репродуктивных признаков и уровня ploидности. Была изучена зависимость уровня ploидности исследуемых растений и их репродуктивных параметров [Дымшакова, 2009]. Всего исследовано 78 растений (*S. cernua* – 6, *S. sibirica* – 6 F_1 – 39, B_1 – 27), также включены в анализ 29 среднеуральских растений с известными репродуктивными признаками и уровнем ploидности [Капралов, 2004].

Соотношения признаков «количество цветков на генеративный побег» и «количество бульбочек на генеративный побег» не зависело от уровня ploидности (тест Манна-Уитни).

По признаку «фертильность пыльцы» не наблюдалось достоверных отли-

чий между диплоидными растениями *S. sibirica* и диплоидами B_1 , между триплоидами поколений F_1 и B_1 , между тетраплоидами F_1 , B_1 и *S. cernua* (тест-Манна-Уитни, $p < 0,05$). Однако наблюдались достоверные различия между тетраплоидами среднеуральских популяций, F_1 и B_1 .

Средняя фертильность пыльцы для триплоидных искусственных гибридов составила 23,0% (табл. 2). Искусственные гибридные растения с уровнем плоидности $2x$ и $4x$ имели более высокую фертильность пыльцы, чем растения $3x$ (среднее значение 65,8% и 57,1% соответственно), хотя среди растений $4x$ наблюдались стерильные особи (фертильность пыльцы 0%).

Таблица 2 – Сравнение групп растений с разной плоидностью по фертильности пыльцы (тест Манна-Уитни)

Группы растений	N	Среднее значение, %	Медиана, %	CV , %	U -тест
Диплоиды $2x$ (<i>S. sibirica</i> , B_1)	10	77,7	84,0	5,8	$U_{2-3} = 21,0^{**}$
Триплоиды $3x$ (F_1 , B_1)	50	23,0	16,5	18,7	$U_{2-4(1)} = 80,0$
Тетраплоиды $4x$ (<i>S. cernua</i> , F_1 , B_1)	18	62,0	74,9	10,0	$U_{3-4(1)} = 218,0^*$ $U_{2-4(2)} = 137,5^*$
Тетраплоиды $4x$ (CP)	28	95,1	97,1	2,4	$U_{3-4(2)} = 225,0^{**}$ $U_{4(1)-4(2)} = 94,5$

Примечание – N – количество растений; CV – коэффициент вариации; U – коэффициент Манна-Уитни, где 2 – диплоиды, 3 – триплоиды, 4(1) – тетраплоиды, искусственное скрещивание, 4(2) – тетраплоиды, среднеуральские растения; уровень значимости: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$

Обычно триплоидные растения считают стерильными, но в настоящей работе показано, что они способны скрещиваться и давать жизнеспособные семена [Дымшакова, 2008]. Так, при опылении гибридов пыльцой *S. cernua* семена получили в 3 случаях из 8, при опылении пыльцой *S. sibirica* – в 24 случаях из 46. При опылении *S. cernua* пыльцой гибридов семена получены в 1 случае из 15, при опылении *S. sibirica* – в 5 случаях из 9. Как правило, триплоидные гибридные растения существуют благодаря вегетативному размножению [Грант, 1984], что и подтверждается в настоящей работе [Дымшакова, 2006а; 2006б].

ГЛАВА 7. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ *S. CERNUA*,

S. SIBIRICA, СРЕДНЕУРАЛЬСКИХ РАСТЕНИЙ И ИСКУССТВЕННЫХ ГИБРИДОВ

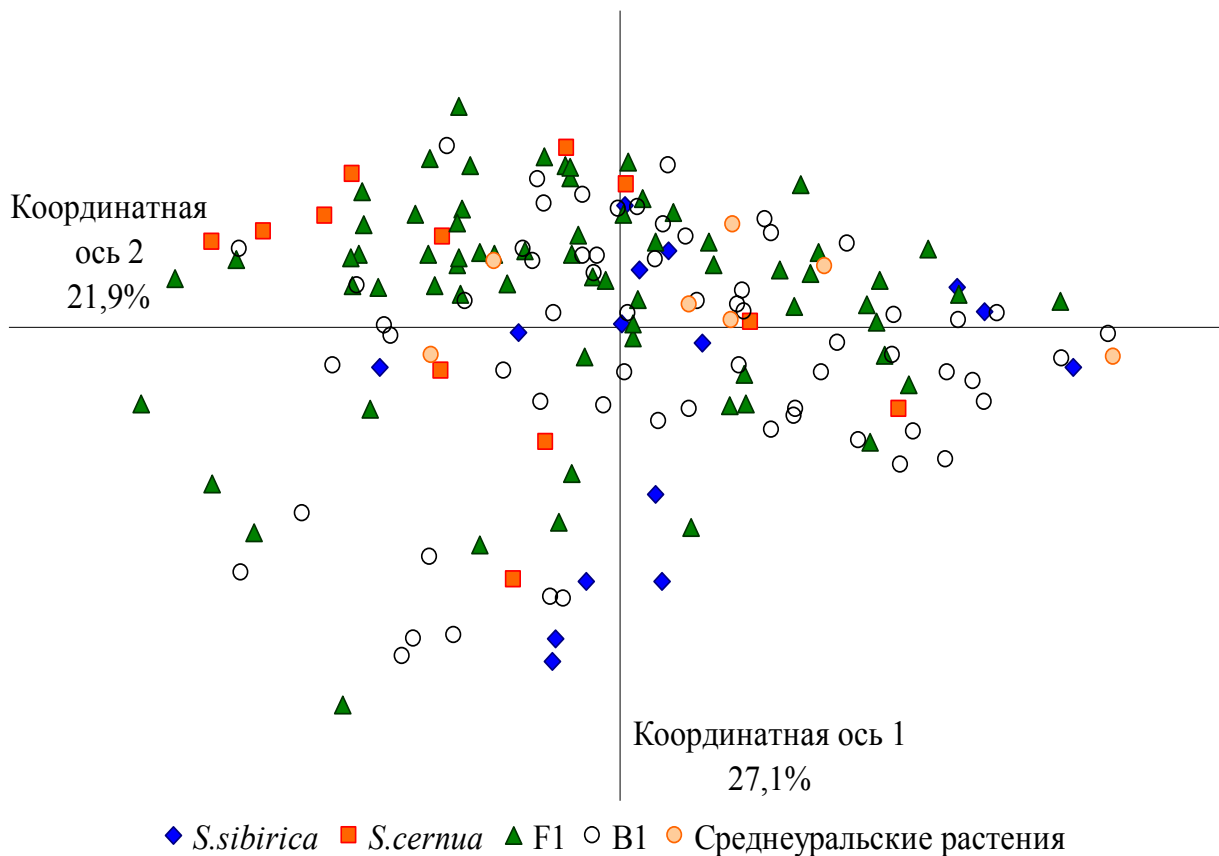
7.1 Материал и методика AFLP-анализа ДНК. Анализ AFLP (Amplified

Fragments Length Polymorphism) [AFLP: a new..., 1995] для растений из одних и тех же выборок был проведен дважды: 1) в лаборатории биоразнообразия и генетики в центре биологической эволюции университета г. Уппсалы (Швеция) и 2) в лаборатории молекулярной экологии растений Института экологии растений и животных УрО РАН (г. Екатеринбург). В первом случае использовано три комбинации селективных праймеров, во втором случае – одна.

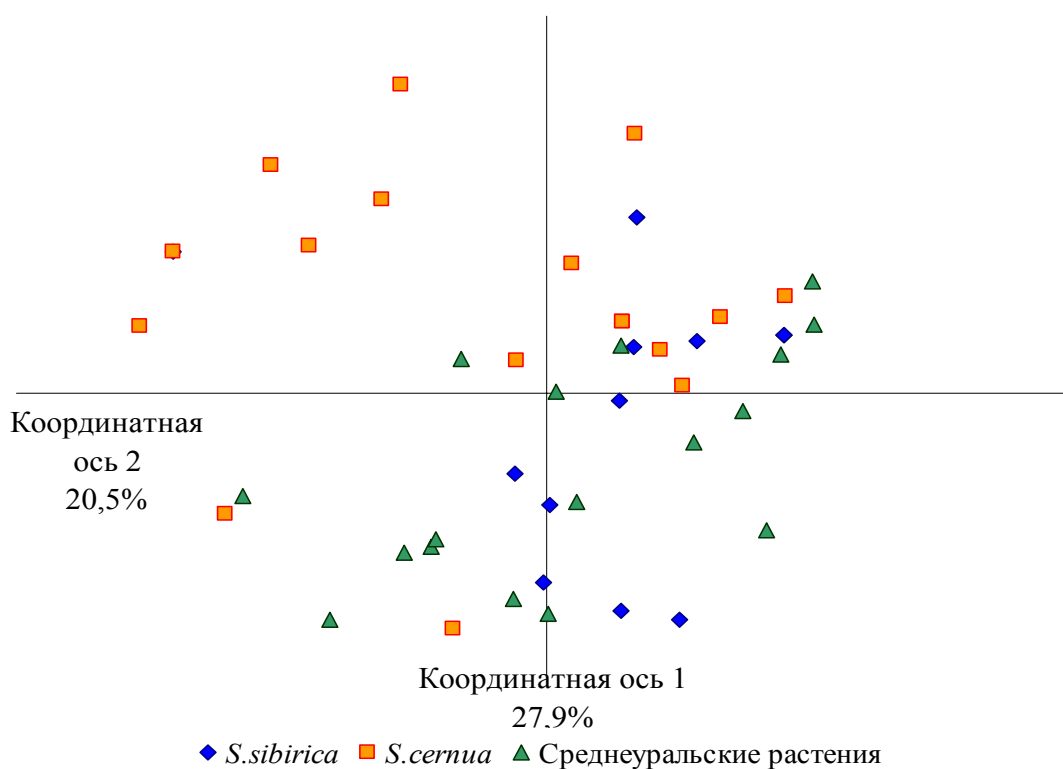
7.2 Анализ генетической изменчивости. В первом варианте анализа после селективной амплификации было рассмотрено 176 получившихся образцов из 200. На основании стабильности проявления фрагмента и его дискретности было выбрано 83 изменчивых AFLP-фрагмента. Общими для всех групп (*S. cernua*, *S. sibirica*, искусственные гибриды F_1 , B_1 , среднеуральские растения) являются 45 фрагментов (54,2%). Не обнаружено уникальных фрагментов для родительских растений. Выявлены два общих фрагмента (2,4%) для родительских растений и искусственных гибридов F_1 , но отсутствующих у B_1 и среднеуральских растений; 13 общих фрагментов (15,7%) для родительских растений, F_1 и B_1 , но отсутствующих у среднеуральских растений.

Во втором варианте было проанализировано 49 получившихся образцов из 96, представлены три группы: *S. cernua*, *S. sibirica* и среднеуральские растения. Обнаружено 19 (55,8%) общих фрагментов для всех групп. Для *S. sibirica* выявлено 2 (5,9%) уникальных фрагмента, тогда как для *S. cernua* уникальных не было; 4 (11,8%) фрагмента для *S. cernua* и среднеуральских растений; 2 (5,9%) – для *S. sibirica* и среднеуральских растений; 1 (2,9%) для *S. cernua* и *S. sibirica*; 5 (14,7%) фрагментов специфичны для среднеуральских растений.

На основе бинарной матрицы присутствия/отсутствия AFLP-фрагментов были вычислены генетические расстояния для выявления степени различия между исследуемыми особями. Для визуализации результата использовали анализ главных координат (РСА, рис. 5).



А



Б

А – первый набор данных AFLP-анализа, Б – второй набор данных

Рисунок 5 – *S. cernua*, *S. sibirica*, среднеуральские растения и искусственные гибриды в плоскости главных координат на основе бинарных генетических дистанций

Как в первом, так и во втором случае по первой оси группы растений четко не разделяются, хотя наблюдается тенденция к разграничению *S. cernua* и *S. sibirica*. Не обнаружено разделения между искусственными гибридами и среднеуральскими растениями. По второй оси в обоих случаях не выявляется четкого разграничения между всеми группами, более того, нет и тенденции к их разделению. В первом анализе искусственные гибриды и среднеуральские растения не были близки ни к одному из родительских видов. Во втором случае среднеуральские растения располагались ближе к *S. sibirica*. Вероятно, данный факт связан с интрогрессивной гибридизацией с этим видом. Все результаты анализа ДНК, полученные в настоящей работе, подтверждают генетическую близость родительских растений *S. cernua* и *S. sibirica*, а также группы среднеуральских растений. Поскольку AFLP не обнаруживает существенных различий между родительскими видами, то, естественно, что он не позволяет оценить вклад родителей в геном искусственных гибридов.

Таким образом, наши результаты AFLP анализа допускают две основные альтернативные интерпретации в отношении эволюционного взаимоотношения популяций *S. cernua* и *S. sibirica* на Урале. Первая интерпретация предусматривает вторичный контакт на Урале двух самостоятельных видов с формированием гибридной зоны (среднеуральских популяций переходного облика). В этом случае отсутствие разрешающей способности AFLP есть следствие эволюционной молодости данных видов.

Другое возможное «негибридное» объяснение основывается на полифилетической теории происхождения *S. cernua* от *S. sibirica* [Капралов, Дымшакова, 2006] и предполагает недавний генезис уральских популяций *S. cernua* от уральских же популяций *S. sibirica* в результате адаптации к условиям севера. Так, можно предположить, что среднеуральские растения являются переходным звеном эволюции от камнеломки сибирской к камнеломке понижающей. Иначе, можно предположить независимое существование *S. cernua* и *S. sibirica* на Урале, при этом среднеуральские растения промежуточного облика рассматриваются как уклоняющиеся формы первого или второго вида.

ВЫВОДЫ

1. Между растениями *S. cernua* и *S. sibirica*, а также между родительскими растениями и искусственными гибридами, имеющими разные уровни плоидности, возможно искусственное скрещивание, однако самоопыление искусственных гибридов первого поколения и скрещивание между ними затруднено.

2. Единственный диагностический морфометрический признак листа, дифференцирующий родительские и гибридные группы растений – длина черешка. По комплексу всех морфометрических признаков листа имеются существенные отличия между всеми группами растений.

3. Искусственные гибриды полностью перекрываются с родительскими и среднеуральскими растениями по репродуктивным признакам «количество цветков на побег» и «количество бульбочек на побег».

4. Искусственные гибриды характеризуются наибольшей изменчивостью по морфологическим и репродуктивным признакам среди изученных групп растений.

5. Искусственные гибриды характеризуются низкими значениями фертильности пыльцы (ниже 25%), в то время как родительские и среднеуральские растения имеют фертильность пыльцы выше 70%.

6. Для прямого и возвратного скрещивания между *S. cernua* (4x) и *S. sibirica* (2x) наибольшая доля полученных гибридов имеет триплоидный уровень (77% случаев), тетраплоидный и диплоидный уровень наблюдается реже (14,9% и 8,1% соответственно).

7. Фертильность пыльцы зависит от уровня плоидности: она значительно ниже у триплоидов, в отличие от диплоидных и тетраплоидных растений. Для количества цветков и пропагул на побег зависимость с плоидностью нет.

8. Не выявлено различий между родительскими видами, среднеуральскими растениями и искусственными гибридами по AFLP-маркерам.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

– в изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Капралов М. В. О видах подсекции *Mesogine* (*Saxifraga*, Saxifragaceae) флоры полуострова Ямал / М. В. Капралов, **О. С. Дымшакова** // Бюл. МОИП Отд. Биол. – 2006. – Т. 111, вып. 2. – С. 103-104.

2. **Дымшакова О. С.** Искусственная гибридизация между *Saxifraga cernua* L. и *S. sibirica* L. / О. С. Дымшакова // Экология. – 2009. – N 6. – С. 465-467.

– в прочих изданиях:

3. Капралов М. В. Изменчивость репродуктивных признаков в широтном градиенте на примере комплекса *Saxifraga cernua* - *sibirica* / М. В. Капралов, **Дымшакова О. С.** // Методы популяционной биологии: материалы докл. VII Всерос. популяц. семинара. – Сыктывкар, 2004. – Ч. 2. – С. 156-157.

4. **Дымшакова О. С.** Гибридизация как один из факторов увеличения биологического разнообразия: комплекс *Saxifraga cernua* L. – *S. sibirica* L. на Урале / О. С. Дымшакова // Устойчивость экосистем и проблема сохранения биоразнообразия на севере: материалы междунар. конф. – Кировск, 2006а. – Т. 1. – С. 78-81.

5. **Дымшакова О. С.** Репродуктивная биология растений с различной ploидностью: комплекс *Saxifraga cernua* L. – *S. sibirica* L. на Урале / О. С. Дымшакова // Материалы IX международной конференции молодых ботаников в Санкт-Петербурге. – СПб., 2006б. – С. 26-27.

6. **Дымшакова О. С.** Морфологическая изменчивость в комплексе *Saxifraga cernua* L. – *S. sibirica* L. (Saxifragaceae) на Урале / О. С. Дымшакова // Экология: от Арктики до Антарктики: материалы конф. молодых ученых. – Екатеринбург, 2007. – С. 77-81.

7. **Дымшакова О. С.** Естественная и искусственная гибридизация в комплексе *Saxifraga cernua* L. – *S. sibirica* L. (Saxifragaceae) на Урале / О. С. Дымшакова // Фундаментальные и прикладные проблемы ботаники в начале XXI века: материалы всерос. конф. – Петрозаводск, 2008. – Ч. 3. – С. 91-93.

Подписано в печать 15.01.2009 г. Формат 60x84 1/16
Усл. печ. л. 1,0. Тираж 120 экз. Заказ № 14

Отпечатано в типографии Института экономики УрО РАН
620014, г. Екатеринбург, ул. Московская, 29.
Тел. (343) 371-16-12