

УДК 575.222.73:582.734.3

## Система размножения и дифференциация *Sorbocotoneaster pozdnjakovii* в сравнении с *Sorbus sibirica* и *Cotoneaster melanocarpus*

### Reproductive system and differentiation of *Sorbocotoneaster pozdnjakovii* in comparison with *Sorbus sibirica* and *Cotoneaster melanocarpus*

С. В. Асбаганов, Е. В. Кобозева, А. В. Агафонов

S. V. Asbaganov, E. V. Kobozeva, A. V. Agafonov

Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения РАН, г. Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101, 630090  
E-mail: cryonus@mail.ru, ekobozeva87@mail.ru, agalex@mail.ru

**Реферат.** Приводятся данные о характере репродуктивных отношений между биотипами *Sorbocotoneaster pozdnjakovii*, *Sorbus sibirica* и *Cotoneaster melanocarpus*. На основании выявленной в природе изменчивости морфотипов *Sorbocotoneaster*, а также по результатам SDS-PAGE анализа запасных белков семян предполагается, что *Sorbocotoneaster* выступает составной частью современного агамного комплекса. Гибридные биотипы *Sorbocotoneaster* за счет апозиготического способа размножения сохраняют в поколениях свой рекомбинантный гетерозиготный генотип, формируют фертильную пыльцу и продолжают нераспространенные репродуктивные отношения преимущественно с *S. sibirica*.

**Summary.** Traits of reproductive relationship between biotypes of *Sorbocotoneaster pozdnjakovii*, *Sorbus sibirica* and *Cotoneaster melanocarpus* are presented. On the basis of revealed variation in natural *Sorbocotoneaster* morphotypes, as well as on the results of SDS-PAGE analysis of cotyledon proteins, it was assumed that *Sorbocotoneaster* was a part of an agamic complex. Hybrid biotypes *Sorbocotoneaster* retain as heterozygous ones in generations by the apozygotic (apomictic) way of reproduction, produce fertile pollen and continue non-reciprocal reproductive relationships mainly with *S. sibirica*.

#### Введение

Многие современные перекрестно опыляемые (ксеногамные) виды рябины (*Sorbus* L.) характеризуются слабыми межвидовыми и межродовыми репродуктивными барьерами (Поляркова, 1953; Габриэлян, 1978; Liljefors, 1953, 1955; Robertson et al., 2010). Нередко в гибридизации участвуют виды с различающимися гапломными составами геномов (амфиплоиды) и пloidностью (авто- и амфилоиплоиды). Образующиеся спонтанные отдаленные гибриды либо репродуктивно изолируются, либо сохраняют частичную фертильность и продолжают скрещиваться с исходными видами. В любом случае гибридные морфотипы могут создавать видимость морфологической непрерывности между исходными таксонами. При возникновении репродуктивной изоляции гибридные рябины воспроизводят свой новый морфотип, формируя семена бесполом путем (апомиксис, агамоспермия, апозиготия). Если такие гибриды получают селективное преимущество за счет удачной комбинации признаков, то происходит «мгновенное» образование нового таксона – микровида. При смешанном (симпатричном) произрастании эволюционно молодых микровидов с исходными видами бывает крайне сложно найти границы таксонов в рамках сравнительно-морфологических методов классификации. Задачи такого рода намного проще решаются с помощью комплексного подхода с использованием гибридологического и молекулярно-генетического анализов. В случае, когда отдаленные гибриды продолжают скрещиваться с исходными видами, классические таксономические критерии оказываются размытыми, протекают активные процессы современной эволюции с образованием сложных гибридных сетей (агамных комплексов). Выявление генетической структуры популяций симпатричных таксонов по пloidности, геномному составу и системам размножения значительно упрощает решение задач филогенетики и классификации в таких сложных таксономических комплексах как род *Sorbus*. Руководствуясь этим принципом, мы проводим изучение структуры и дифференциации естественной популяции узколокального эндемика Южной Якутии – гибридогенного рода  $\times$ *Sorbocotoneaster* Pojark. (рябинокизильник).

На предыдущих этапах исследований нами было установлено, что *Sorbocotoneaster pozdnjakovii* Pojark. формирует фертильную пыльцу и может выступать в качестве опылителя для *Sorbus sibirica* Hedl. Были получены искусственные гибриды  $F_1$  ♀ *S. sibirica*  $\times$  ♂ *Sorbocotoneaster pozdnjakovii*, и методами электрофореза запасных белков семядолей (SDS PAAG) и межмикросателлитных последовательностей ДНК

(ISSR) выявлена рекомбинация молекулярно-генетических и морфологических маркеров (Асбаганов и др., 2014). Анализ последовательностей ITS1-5.8S-ITS2 rDNA подтвердил близкое родство *Sorbocotoneaster pozdnjakovii* с видами рода *Sorbus* из Азиатской части России. В геноме искусственных гибридов  $F_1$  *S. sibirica* × *Sorbocotoneaster pozdnjakovii* обнаружен рекомбинантный фрагмент последовательности между современными видами *Sorbus* и *Cotoneaster* Medik., что подтверждает происхождение *Sorbocotoneaster* путем гибридизации между представителями этих родов (Асбаганов и др., 2015).

### Результаты

В 2015 г. при экспедиционном обследовании района произрастания *Sorbocotoneaster pozdnjakovii* в долине р. Алдан от пос. Томмот до устья р. Суннагин было обнаружено множество промежуточных и переходных форм между местными видами *Sorbus sibirica* и *Cotoneaster melanocarpus* (рис. 1). Отмечена широкая вариабельность морфотипов по габитусу, морфологии плодов, листьев и других вегетативных органов. При этом рекомбинантные растения характеризовались выраженной эндогенной (в пределах одного растения) изменчивостью морфологических признаков в диапазоне лимитов родительских видов. Например, у морфотипов, уклоняющихся в сторону кизильника, в пределах одного побега формировались как цельные, так и рассеченные листья.

Причины такого многообразия переходных морфологических форм могут быть обусловлены продолжающимися репродуктивными отношениями *Sorbocotoneaster* с *S. sibirica* и *C. melanocarpus* в рамках единого рекомбинационного комплекса. Известно, что хромосомный набор *Sorbocotoneaster pozdnjakovii* может быть  $2n = 51, 68, 85$  (Гладкова, 1967; Крюгель, 1990), что в случае гибридогенной природы рябинокизильника характеризует его как амфиполиплоид, и, соответственно, допускает возможность существования различных способов размножения. Однако гаметофитный апомиксис остается наиболее вероятным вариантом репродукции у полиплоидных биотипов в агамных комплексах рябины (Liljefors, 1953, 1955). Агамоспермное (однородительское) размножение одновременно создает репродуктивную изоляцию и обеспечивает генетическую и морфологическую стабильность гибридных биотипов в поколениях, что в совокупности с достаточно обширным ареалом позволяет относить каждый из агамных морфотипов *Sorbocotoneaster* к самостоятельному микровиду. В качестве примера такого близкородственного комплекса видов и гибридогенных микровидов (агамный комплекс) можно привести популяцию симпатричных таксонов *Sorbus* в английском ущелье Эйвон (Robertson et al., 2010), где всё многообразие описанных видов является результатом межвидовой гибридизации и дальнейшей рекомбинации геномов трех исходных ксеногамных диплоидных видов с дальнейшей репродуктивной изоляцией амфиполиплоидов посредством агамоспермного размножения. Каждая из таких морфологических форм зачастую рассматривается как самостоятельный таксономический вид. Стоит заметить, что регистрация нового вида, как правило, не подкрепляется данными о его системе размножения и механизме стабилизации морфологической формы.

Для определения системы размножения биотипа *Sorbocotoneaster*, который представлен в коллекции ЦСБС СО РАН несколькими взрослыми растениями в генеративной фазе развития, была выполнена его искусственная гибридизация с *S. sibirica*, *C. melanocarpus* и *Cotoneaster lucidus* Schlecht. По причине неблагоприятных погодных условий во время цветения рябинокизильника в 2015 г. гибридизацию не удалось выполнить в полном объеме, часть эмаскулированных (с удаленными пыльниками) цветков погибла. Поэтому полученные данные (табл.) следует считать предварительными.

Наиболее интересным результатом является образование плодов и семян в реципрокных комбинациях скрещиваний *Sorbocotoneaster* с *S. sibirica*. Анализ электрофоретических спектров запасных белков семян,



Рис. 1. Вариабельность формы и рассеченности листовой пластинки у *Sorbocotoneaster pozdnjakovii*, выявленная в природных популяциях в долине р. Алдан (Якутия).

полученных в этих комбинациях, подтвердил гибридную природу семян ♀ *S. sibirica* × ♂ *Sorbocotoneaster* (рис. 2); наблюдалась рекомбинация молекулярных и морфологических маркеров (Асбаганов и др., 2014). В обратной комбинации скрещивания ♀ *Sorbocotoneaster* × ♂ *S. sibirica* рекомбинация полипептидных компонентов отсутствовала, электрофоретические профили были мономорфны и идентичны семенам от самоопыления и свободного опыления (рис. 3, треки 1–4; рис. 6, треки 21–25). Сеянцы, выращенные из семян от свободного опыления, по своим морфологическим характеристикам не отличались от материнского морфотипа. На данном этапе исследований можно предположить, что задействованный в гибридизации биотип рябинокизильника характеризуется агамоспермным способом репродукции, но нуждается в стимулирующем влиянии своей или чужеродной пыльцы (стимулятивный апомиксис, псевдогамия).

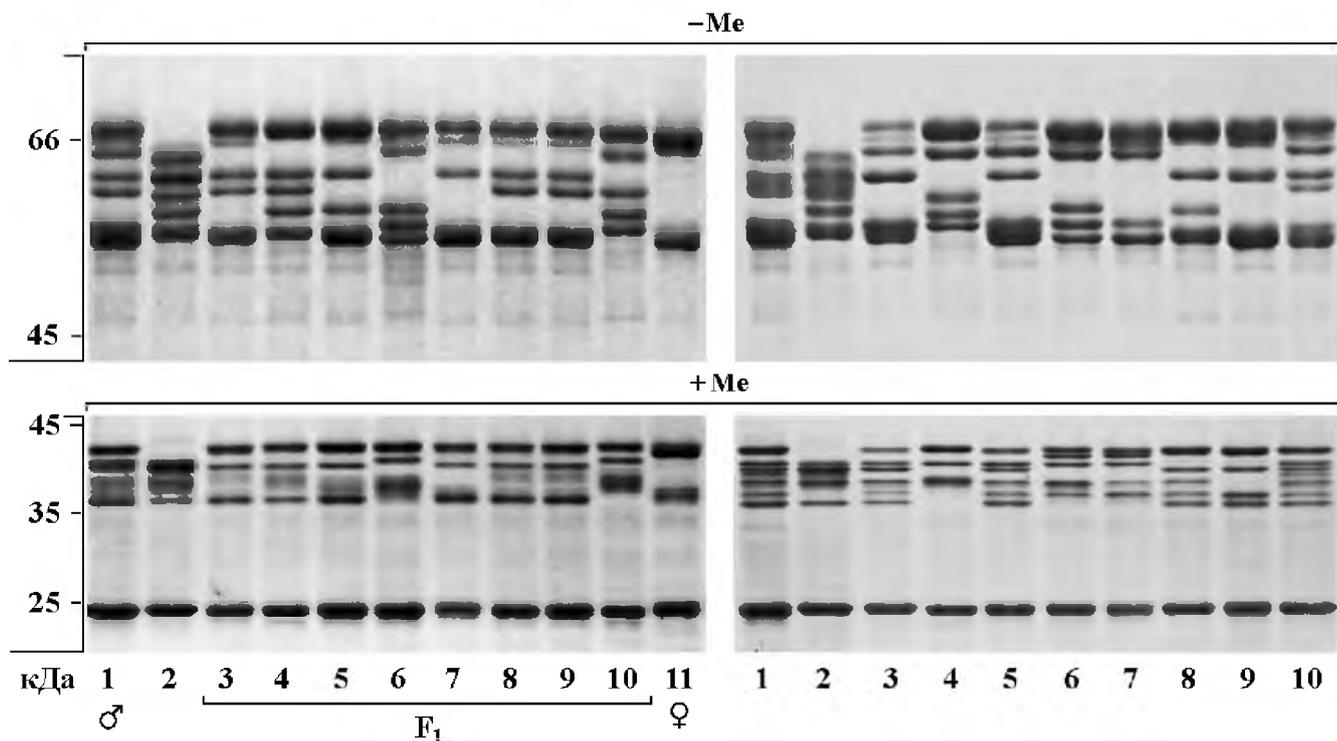


Рис. 2. SDS-электрофореграммы белков семядолей. Полипептидные спектры отдельных семян в вариантах –Me и +Me: Слева: гибридные семена  $F_1$  (*S. sibirica* × *S. pozdnjakovii*) в сравнении с родительскими формами. 1. ♂ – отцовская форма *S. pozdnjakovii*. 2. *C. lucidus*; 3–10.  $F_1$  – выборка гибридных семян; 11. ♀ – Материнская форма *S. sibirica*. Справа: 1, 2. Те же образцы, что и на рисунке слева. 3–10. Природные образцы *S. pozdnjakovii*.

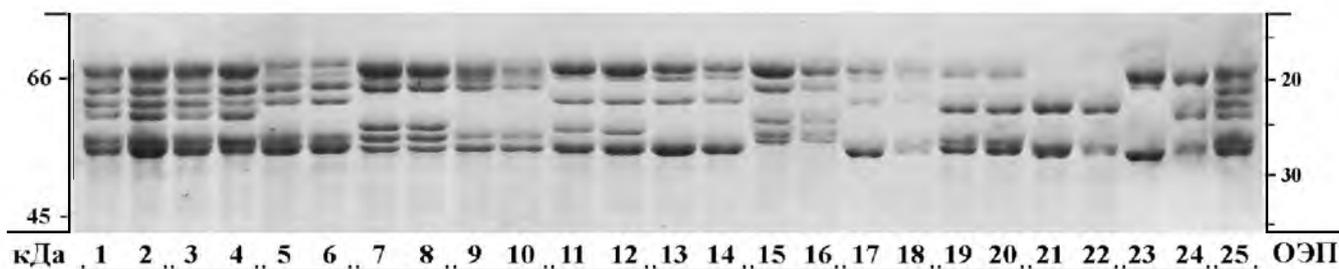


Рис. 3. SDS-электрофореграммы белков семядолей семян морфотипов *S. pozdnjakovii* промежуточных между *C. melanocarpus* и *S. sibirica* (1–6, 25) и морфотипов уклоняющихся в сторону *S. sibirica* (7–20) в сравнении с *C. melanocarpus* (21–22) и *S. sibirica* (23–24).

1–2, 25. SRCT-CSBG-9002 (семена от псевдогамного опыления в комбинации ♀ *S. pozdnjakovii* × ♂ *S. sibirica*); 3–4. SRCT-CSBG-9002 (семена от автогамного опыления); 5–6. SRCT-SNG-1525 (\*); 7–8. SRCT-SNG1-1527 (\*); 9–10. SRCT-SNG1-1529 (\*); 11–12. SRCT-SNG1-1530 (\*); 13–14. SRCT-SNG-15506 (\*); 15–16. SRCT-UNG-1502 (\*\*); 17–18. SRCT-UNG2-15400 (\*\*); 19–20. SRCT-UNG2-15563 (\*\*); 21–22. MELA-SNG-1526 (\*); 23–24. SIBI-SNG-1502 (\*).  
Происхождение образцов: \* – Якутия, лев. бер. р. Алдан, окр. устья р. Суннагин; \*\* – Якутия, прав. бер. р. Алдан, окр. п. Угино. Полипептидные спектры отдельных семян в варианте –Me.

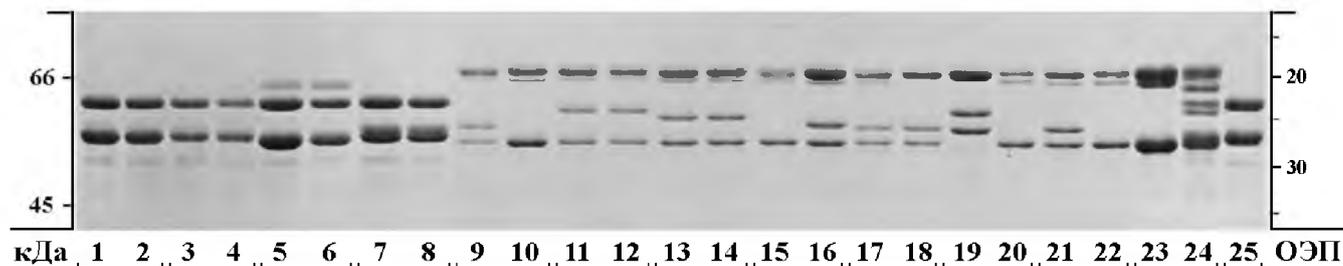


Рис. 4. SDS-электрофореграммы белков семядолей семян *C. melanocarpus* (1-8, 25) и *S. sibirica* (9-22) в сравнении с *S. aucuparia* s. str. (23) и *S. pozdnjakovii* (24): 1-2. MELA-NSR-1301 (Новосибирская обл., окр. с. Лесниковское); 3-4. MELA-NSR-1302 (Новосибирская обл., окр. с. Лесниковское); 5-6. MELA-TUV1-1501 (Тыва, окр. оз. Азас); 7-8. MELA-TUV2-1502 (Тыва, Каа-Хемский р-он, окр. с. Бояровка); 9-10. SIBI-LENA-1503 (Якутия, пр.б. р. Лена, Ленские столбы); 11-12. SIBI-TIM1-1555 (Якутия, устье р. Тимптон); 13-14. SIBI-UGN1-1556 (Якутия, прав. бер. р. Алдан, окр. п. Угино); 15-16. SIBI-UGN1-1550 (Якутия, прав. бер. р. Алдан, окр. п. Угино). 17-18. SIBI-SNG1-1526 (Якутия, устье р. Суннагин); 19-20. SIBI-SNG1-15103 (Якутия, устье р. Суннагин); 21-22. SIBI-TIM2-1553 (Якутия, устье р. Тимптон). Полипептидные спектры отдельных семян в варианте –Ме.

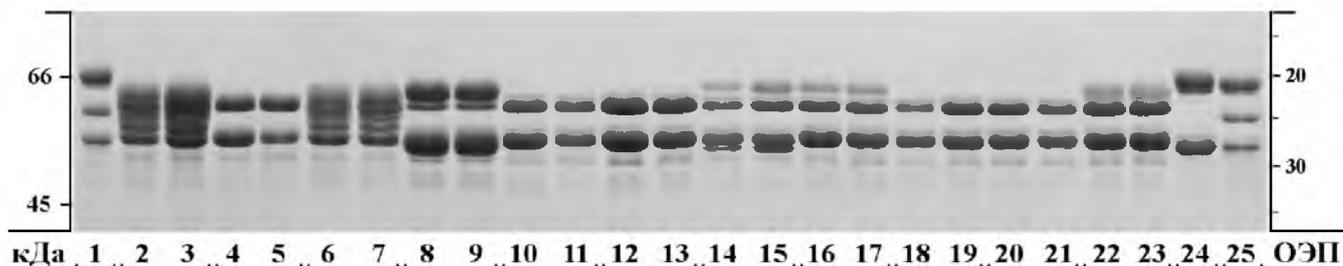


Рис 5. SDS-электрофореграммы белков семядолей семян *C. melanocarpus* (4-5, 8-23) в сравнении с *C. lucidus* (2-3, 6-7) и *S. sibirica* (1, 24-25): 1, 24-25. SIBI-SNG-1502 (Якутия, лев. бер. р. Алдан, окр. устья р. Суннагин); 2-3. LUCI-CSBG-9652 (репродукция ЦСБС); 4-5. MELA-CSBG-1316 (репродукция ЦСБС); 6-7. LUCI-TCHN-0701 (Приморский край, бухта Тачингоуз); 8-9. MELA-CSBG-7540 (репродукция ЦСБС, красноплодная форма); 10-11. MELA-CSBG-1502 (репродукция ЦСБС); 12-13. MELA-LENA-1501 (Якутия, пр.б. р. Лена, Ленские столбы); 14-15. MELA-TIM1-1554 (Якутия, устье р. Тимптон); 16-17. MELA-TIM1-1555 (Якутия, устье р. Тимптон); 18-19. MELA-UGN1-1574 (Якутия, прав. бер. р. Алдан, окр. п. Угино); 20-21. MELA-UGN1-1575 (Якутия, прав. бер. р. Алдан, окр. п. Угино); 22-23. MELA-BRYA-15154 (Якутия, устье р. Бырая). Полипептидные спектры отдельных семян в варианте –Ме.

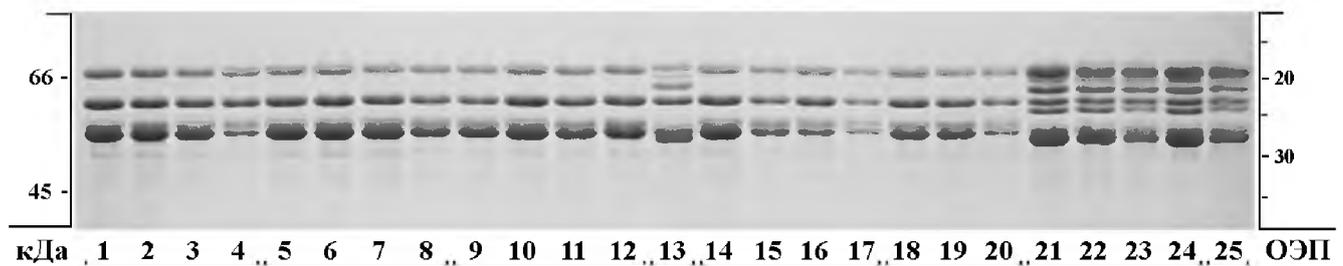


Рис. 6. SDS-электрофореграммы белков семядолей семян: 1-20. Морфотипы *S. pozdnjakovii*, уклоняющиеся в сторону *C. melanocarpus*, 21-25. Промежуточный морфотип между *C. melanocarpus* и *S. sibirica*. 1-4. SRCT-R2SNG-15494 (Якутия, лев. бер. р. Алдан, окр. устья р. Суннагин); 5-8. SRCT-UGN2-15404 (\*); 9-12. SRCT-UGN1-15952 (\*); 13. SRCT-UGN1-1582; 14-17. SRCT-UGN2-15402; 18-20. SRCT-UGN1-15300. 21-24. SRCT-CSBG-9002 (Якутия, репродукция ЦСБС биотипа SRCT-JAK-1501, семена от свободного опыления); 25. SRCT-CSBG-9002 (семена от автогамного опыления). Происхождение образцов: \* – Якутия, прав. бер. р. Алдан, окр. п. Угино. Полипептидные спектры отдельных семян в варианте обработки без β-меркаптоэтанола (–Ме).

Таблица

Результаты гибридизации (2015 г.) *Sorbocotoneaster pozdnjakovii* с *Sorbus sibirica*,  
*Cotoneaster lucidus* и *Cotoneaster melanocarpus*

№ п/п	Материнское растение	Опылитель	Опылено цветков	Процент завязываемости плодов	Число выполненных семян
1.	<i>Sorbocotoneaster pozdnjakovii</i>	<i>S. sibirica</i>	171	18,1	42
		Смесь пыльцы <i>C. lucidus</i> и <i>C. melanocarpus</i>	185	0,0	-
		Свободное опыление	100	52,0	94
		Самоопыление	5	40,0	4
2.	<i>S. sibirica</i>	<i>S. pozdnjakovii</i>	300	75,0	521
		<i>C. melanocarpus</i>	350	4,3	6
		Смесь пыльцы <i>C. lucidus</i> и <i>C. melanocarpus</i>	400	0,0	-
		Свободное опыление	150	56,0	-
		Самоопыление	150	1,3	-

Анализ электрофоретических профилей запасных белков у семян, собранных в природной популяции с отдельных растений *Sorbocotoneaster*, не выявил эндогенных различий (в пределах одного растения) в полипептидных спектрах (рис. 3), что, как и в случае с биотипом из коллекции ЦСБС, свидетельствует о преимущественно агамоспермной системе размножения у природных биотипов рябинокизильника. Для большинства природных биотипов *S. sibirica* экспериментально подтверждена ксеногамия, что отражается в эндогенном полиморфизме полипептидных спектров семян у исследованных образцов (рис. 4). Биотипы рябины сибирской, задействованные в искусственной гибридизации, автостерильны (не завязывают семена при самоопылении).

Нами была предпринята попытка искусственного ресинтеза *Sorbocotoneaster* путем прямой гибридизации *S. sibirica* с *C. melanocarpus*. При опылении 350 цветков рябины сибирской удалось получить только шесть выполненных семян. Четыре семени оказались жизнеспособными и проросли после холодной стратификации при температуре +1...+3 °С. Два проростка по морфологическим признакам были патроклинными (уклонялись в сторону отцовского морфотипа), что можно объяснить эффектом двойной дозы генов, поскольку *C. melanocarpus* является тетраплоидом ( $2n = 68$ ), а *S. sibirica* – диплоид (Гладкова, 1967). Гибридные сеянцы были депрессивными и погибли на ранней стадии развития. Тетраплоидный *C. melanocarpus* вероятнее всего завязывает семена путем облигатного или факультативного апомиксиса, что характерно для полиплоидов подсемейства Яблоневые (Dickinson et al., 2007). Анализ электрофоретических профилей запасных белков у семян, собранных с отдельных растений *C. melanocarpus*, не выявил эндогенных различий в полипептидных спектрах (рис. 4 и 5), что может свидетельствовать об автогамном (при самоопылении) или апозиготическом (без опыления) происхождении семян. Всего было обнаружено два фенотипа полипептидных спектров, характерных для популяций *C. melanocarpus*. Причем оба спектра встречаются как в популяциях при совместном произрастании с рябинокизильником (рис. 5, треки 12–23), так и в популяциях, где не наблюдается признаков гибридизации кизильника с рябиной (рис. 4, треки 1–8). Если предположить, что кизильник, как и рябина, является агамным комплексом, то не исключено, что в рамках одного морфотипа *C. melanocarpus* на территории Сибири могут существовать несколько симпатричных полиплоидных агамных микровидов, геномы которых более или менее совместимы с геномом рябины сибирской. Данное обстоятельство необходимо учитывать в дальнейших экспериментах по искусственной гибридизации *S. sibirica* с *C. melanocarpus*.

Таким образом, можно предположить, что в популяциях при совместном произрастании *S. sibirica*, *S. pozdnjakovii*, *C. melanocarpus* генный поток в основном направлен в сторону *S. sibirica*. Такая нересипрокность в репродуктивных отношениях должна отражаться в виде большей индивидуальной гомогенности морфотипов, уклоняющихся в сторону кизильника и, соответственно, в большей гетерогенности «рябино-

вых» морфотипов, что удалось экспериментально подтвердить SDS-PAGE анализом. Было установлено, что большинство природных морфотипов рябинокизильника, уклоняющихся в сторону кизильника, характеризуются почти идентичными полипептидными спектрами (рис. 6), а морфотипы, уклоняющиеся в сторону рябины, напротив – индивидуальным полиморфизмом полипептидных спектров (рис. 3). Экспериментальное моделирование репродуктивных отношений *S. sibirica*, *S. pozdnjakovii*, *C. melanocarpus* хорошо согласуется с выявленными в природе закономерностями. При искусственной гибридизации в направлении *S. pozdnjakovii* × *S. sibirica* наблюдается единообразное апомиктическое образование семян, тогда как при обратном скрещивании *S. sibirica* × *S. pozdnjakovii* наблюдается генетическая рекомбинация и образование различающихся форм (рис. 2.), которые по характеристикам морфологических признаков и молекулярных маркеров соответствуют обнаруженным в природе биотипам.

В естественных условиях такие биотипы за счет апомиксиса (апозиготического способа размножения) сохраняют в поколениях свой рекомбинантный гетерозиготный генотип, формируют фертильную пыльцу и продолжают нересипрочные репродуктивные отношения преимущественно с *S. sibirica*. Таким образом, выявленные особенности репродуктивных взаимоотношений и их моделирование в экспериментальных условиях подтверждают гибридогенное происхождение и продолжающуюся дифференциацию *Sorbocotoneaster* в рамках межродового агамного комплекса с участием биотипов *Sorbus* L. и *Cotoneaster* Medik.

#### ЛИТЕРАТУРА

**Асбаганов С. В., Кобозева Е. В., Агафонов А. В.** Анализ нуклеотидных последовательностей ITS1-5.8S-ITS2 rDNA *Sorbocotoneaster pozdnjakovii* Pojark. в сравнении с видами из родов *Cotoneaster* Medik. и *Sorbus* L. // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии: Сб. науч. ст. по материалам XIV междунар. науч.-практ. конф. (25–29 мая 2015 г., Барнаул). – Барнаул: Изд-во АлтГУ, 2015. – С. 323–327.

**Асбаганов С. В., Кобозева Е. В., Агафонов А. В.** Применение электрофореза запасных белков семядолей и ISSR-маркеров для идентификации гибридов между *Sorbus sibirica* Hedl. и *Sorbocotoneaster pozdnjakovii* Pojark. // Вавилов. журн. генет. и селекции, 2014. – Т. 18, № 3. – С. 486–496.

**Габриэлян Э. Ц.** Рябины (*Sorbus* L.) Западной Азии и Гималаев. – Ереван: АН. Арм. ССР, 1978. – 264 с.

**Гладкова В. Н.** Цитологическое изучение спонтанного гибридогенного рода *Sorbocotoneaster* Pojark. // Бот. журн., 1967. – Т. 52, № 3. – С. 981–983.

**Крюгель Т. С.** Числа хромосом некоторых видов рода *Cotoneaster* и межродового гибрида ×*Sorbocotoneaster pozdnjakovii* (Rosaceae) // Бот. журн., 1990. – Т. 75, № 3. – С. 437.

**Пояркова А. И.** ×*Sorbocotoneaster* Pojark. – новый естественный межродовой гибрид // Ботанические материалы гербария Бот. института АН СССР, 1953. – Т. 15. – С. 92–108.

**Dickinson T. A., Lo E., Talent N.** Polyploidy, reproductive biology, and Rosaceae: understanding evolution and making classifications // Plant Syst. Evol., 2007. – Vol. 266. – P. 59–78.

**Liljefors A.** Studies on propagation, embryology and pollination in *Sorbus* // Acta Horti Bergiani, 1953. – Vol. 16. – P. 277–329.

**Liljefors A.** Cytological studies in *Sorbus* // Acta Horti Bergiani, 1955. – Vol. 17. – P. 47–113.

**Robertson A., Rich T. C. G., Bridle J. R., Harris S. A., Hiscock S. J.** Hybridization and polyploidy as drivers of continuing evolution and speciation in *Sorbus* // Molecular Ecology, 2010. – Vol. 19, No. 8. – P. 1675–1690.