

**ОСОБЕННОСТИ ПРОРАСТАНИЯ И ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЕ СПЕКТРЫ
ПОЛИПЕПТИДОВ СЕМЯН, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО ЦВЕТУ,
В ПОПУЛЯЦИЯХ *HEDYSARUM THEINUM* KRASNOB.**

О.В. ДОРОГИНА, Н.А. КАРНАУХОВА

**PECULIARITIES OF GERMINATION AND ELECTROPHORETIC SPECTRA
OF POLYPEPTIDES OF SEEDS DIFFERENT IN COLOUR IN TWO POPULATIONS
OF *HEDYSARUM THEINUM* KRASNOB.**

O.V. DOROGINA, N.A. KARNAUKHOVA

Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, 630090 Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101

Central Siberian Botanical Garden, SB RAS, 630090 Novosibirsk, Zolotodolinskaya st., 101

Fax: +7 (383) 330–19–86; e-mail: olga-dorogina@yandex.ru

Обсуждаются вопросы прорастания семян, отличающихся цветом семенной кожуры (зеленые, бежевые, коричневые и фиолетовые). Установлена зависимость компонентного состава электрофоретических спектров запасных полипептидов семян от цвета их кожуры в двух популяциях *Hedysarum theinum* Krasnob. В результате проведенных исследований обнаружена различная всхожесть семян и жизнеспособность растений в зависимости от окраски кожуры и условий произрастания вида, а также присутствие дополнительного альбуминового компонента на электрофоретических спектрах семян с фиолетовой окраской кожуры.

Ключевые слова: *Hedysarum theinum*, всхожесть, цвет, полипептиды семян, электрофоретические спектры запасных белков, популяции.

Germination of seeds different in colour of seed coats (green, beige, brown and purple) is discussed. Dependence of the component composition of electrophoretic spectra of seed storage polypeptides on colour of seed coats was established in two populations of *Hedysarum theinum* Krasnob. As a result of conducted research different germination of seeds and viability of plants depending on seed coat colour and growth conditions, as well as presence of an additional albumin component on electrophoretic spectra of seeds with purple seed coats were revealed.

Key words: *Hedysarum theinum*, germination, colour, seed polypeptides, electrophoretic spectra of storage proteins, populations.

Hedysarum theinum Krasnob. (копеечник чайный, красный корень) (Красноборов и др., 1985) издавна используется в народной медицине при целом комплексе заболеваний, связанных с нарушением обмена веществ, иммунной и нервной систем, при острых желудочно-кишечных и вирусных заболеваниях, а также просто как общеукрепляющий чай (Агафонова, Володарская, 2000). Ведутся активные заготовки красного корня в качестве лекарственного сырья и для чая. Копеечник встречается в высокогорном поясе, в прилегающих районах лесного пояса на альпийских, субальпийских лугах, каменистых склонах, вдоль ручь-

ев, на лесных лугах Алтайского края (Тигеревский хребет), Горного Алтая, а также в Средней Азии и Западной Монголии (Флора Сибири, 1994). Местообитания его приурочены к пологим крутым склонам бортов долин различной ориентации, выровненным участкам вершин гольцов и водораздельных пространств: от 1200 до 2100 м над ур. м. Растения развиваются очень медленно: первое цветение наступает лишь на 11–18-й годы жизни, а наибольшая масса корня (до 5 кг) накапливается лишь к 30 годам. Интродукция копеечника чайного затруднена: вырастить его в условиях культуры чрезвычайно сложно (Карнаухова, 2007).

Оказалось, что особенностью этого вида является хорошая всхожесть семян, но чрезвычайно слабая жизнеспособность всходов и массовая их гибель в первые же дни после прорастания семян. В настоящее время известно, что помимо внешних условий (тепло, свет, влажность) при прорастании семян и выживании всходов огромное значение имеют и внутренние, свойственные тому виду, к которому принадлежат семена. Сюда относятся как чисто морфологические свойства семени (кожура, наличие или отсутствие тканей с запасами питательных веществ, величина зародыша и степень его развития), так и биохимические (характер белков, в том числе фитохромов и ферментов, присутствие тормозителей). Последние факторы обусловлены филогенетическим развитием соответствующего растения (Благовещенский, 1966).

Белки — это сложные системы, связанные со всеми метаболическими, морфогенетическими и

генетическими процессами. В связи с этим, чтобы глубже понять возможности белков как биологических или генетических маркеров и полнее использовать в решении актуальных проблем прикладной ботаники, генетики и селекции, необходимо рассматривать их на фоне современных представлений о том, как организованы генетические и морфогенетические процессы у растений. Наиболее важной и интересной задачей с этой точки зрения, является поиск корреляций между компонентами на электрофоретических спектрах запасных белков и рядом признаков, включая морфологические.

В связи с этим, мы предприняли попытку проанализировать зависимость всхожести семян и жизнеспособности всходов от цвета семян и условий произрастания вида в природе и поиска возможных корреляций между цветом кожуры семян и полипептидами на электрофоретических спектрах.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Образцы семян *Hedysarum theinum* собраны в августе 1998 г. в двух популяциях одновременно в Рудном Алтае (Казахстан) на хр. Ивановском близ с. Поперечное на склоне северо-восточной экспозиции: 1 — на высоте 1700 м над ур. м. на субальпийском дугу в лиственнично-кедровом редколесье и 2 — на высоте 2100 м над ур. м. на альпийском дугу.

При определении всхожести семян использовали общепринятую методику (ГОСТ 5055–56) и придерживались приведенных там основных понятий и правил учета всхожести семян. Всхожесть семян мы определяли в чашках Петри (по 100 шт. каждого цвета в двух повторностях) при комнатной температуре (20–25° С). Семена копеечника чайного довольно крупные, масса 1000 семян в среднем равна 9.6 г, поэтому была проведена скарификация опасной бритвой каждого семени вручную и тщательно отбракованы все неполноценные семена. Отбирали по цвету и проращивали отдельно зеленые, светло-коричневые (бежевые), темно-коричневые (коричневые) и темно-фиолетовые (фиолетовые) семена. Подсчет семян для определения энергии прорастания производили через 3 дня после замачивания, для определения всхожести — через 10 дней. Проросшие из семян растения высаживали в землю в 1-литровые сосуды и выращивали в специальной камере при искусственном освещении лампами РБФР-1000 с режимом 17 ча-

сов. Учет проростков, выращенных из семян разного цвета, производили через 7 и 14 дней после высаживания в вегетационные сосуды.

Для разделения запасных белков семян применили метод электрофореза в полиакриламидном геле (Laemmli, 1970), модифицированный нами для изучения полиморфизма полипептидов семян у представителей рода *Hedysarum* L. (Дорогина и др., 2003). Использовали трис-глициновую буферную систему для SDS-электрофореза в 10 и 14 %-ных полиакриламидных гелях, в экстракты белков добавляли редуцирующий агент 0.2 М 2-меркаптоэтанол. В качестве маркеров были выбраны глобулины и альбумины семян.

Для оценки молекулярной массы полипептидных фракций использовался стандартный образец линии *Elymus sibiricus* ALT-1 — эталонный спектр, состоящий из компонентов промаркированных белками с известными молекулярными массами.

Альбуминовую и глобулиновую фракции разделяли диализом против дистиллированной воды (Гаврилюк и др., 1981). Экстракцию белков и дальнейшие процедуры выполняли, как описано (Гаврилюк и др., 1973). Выпавшие в осадок глобулины растворяли в 0.05 М трис-НСl буфере (рН 7.0–7.5) и добавляли 2-меркаптоэтанол. Альбумины оставались после диализа в надосадочной жидкости, к которой также добавляли редуцирующий агент.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Впервые Осборн (Osborn, 1924) разделил белки зерна злаков на 4 фракции: альбумины, глобулины, проламины и глютелины. Все они с некоторой долей условности делятся на 2 группы: метаболические и запасные (Конарев, 1975). В семенах двудольных преобладают запасные белки, которые образуются в семядолях и контролируются генетическими системами диплоидного ядра в отличие от эндосперма зерновки злаков (он триплоидный). В биохимическом отношении запасные белки двудольных представляют собой глобулины с довольно сложной четвертичной структурой молекулы. Для выявления внутривидовой изменчивости у некоторых бобовых наиболее значим генетический полиморфизм, обусловленный аллельной изменчивостью. Эта изменчивость хорошо выявляется электрофорезом субъединиц или полипептидов после расчленения макромолекул с помощью соответствующих детергентов или редуцирующих агентов, ослабляющих водородные и гидрофобные взаимодействия между субъединицами и разрывающих ковалентные дисульфидные связи между полипептидами в субъединицах. Так, спектр запасных полипептидов семян у представителей выборки из 16 популяции *H. theinum* представлен компонентами, основная часть которых расположена в диапазоне молекулярных масс от 30 до 150 кДа (рис. 1). Спектры очень изменчивы и насыщены компонентами, распределение которых, практически для каждого образца индивидуально. Высокой степенью полиморфизма по полипептидным спектрам характеризовались обе изученные выборки. Несмотря на высокую степень изменчивости, выявились некоторые общие закономерности в интенсивности и распределении компонентов на спектрах. На электрофореграммах исследованных образцов можно выделить 4 зоны (I-IV). В зоне IV у всех образцов в области 36,5 кДа присутствует группа, состоящая из 1-3 компонентов, характеризующихся разной интенсивностью.

Анализ семян проводили, разделив их по цвету. При этом обнаружилось, что эти морфологические признаки в некоторых случаях были обусловлены изменениями в полипептидных спектрах, а именно компонент с молекулярной массой около 32 кДа, расположенный в IV зоне, присутствует только на спектрах семян с фиолетовой окраской. В представленных выборках кроме семян с фиолетовой окраской имелись также зеленые, коричневые и бежевые семена. Тем не менее, зависимость между компонентами на электрофоретических спектрах с

зеленой, коричневой и бежевой окраской кожуры не была выявлена. Таким образом, в выборке 1 популяции был выявлен компонент, маркирующий морфологический признак — фиолетовый цвет кожуры семени.

Из литературных источников известно, что основная часть компонентов, представленных на электрофоретических спектрах бобовых, является глобулинами. Глютелины практически не извлекаются нейтральными растворами солей, а альбуминовая фракция белков, выделяющаяся в данных условиях, также количественно невелика. Для выяснения природы компонента, коррелирующего с фиолетовым цветом семени, мы отделяли с помощью диализа против дистиллированной воды альбумины от глобулинов и подвергли полученные экстракты электрофорезу. На рис. 2 видно, что после разделения спектр компонентов глобулиновой природы (G) почти полностью совпадает со спектром компонентов суммарных солерастворимых белковых фракций, взятых до проведения диализа. Альбуминовая фракция представлена несколькими слабо выраженными компонентами (A), самые интенсивные из которых расположены в зонах I

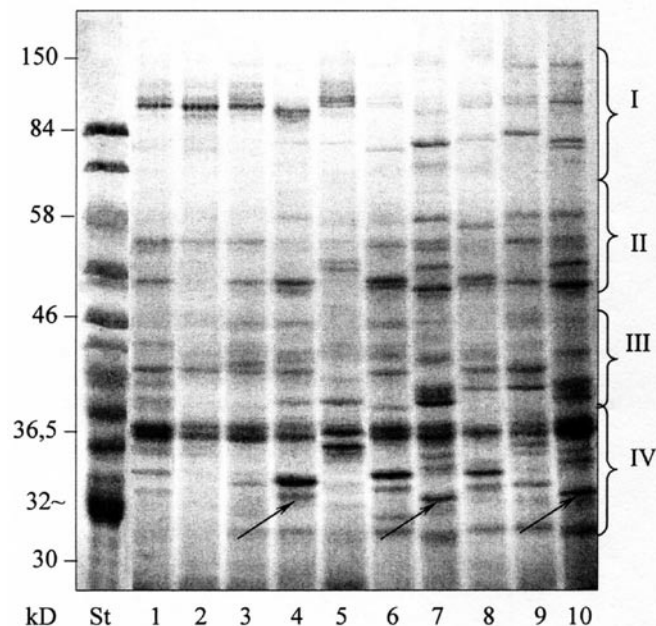


Рис. 1. Электрофоретические спектры полипептидов отдельных семян, различающихся по цвету кожуры, в популяции 1 *Hedysarum theinum*.

SDS-система, +Me-вариант, St — стандартный образец линии *E. sibiricus* (ALT-1).

1-3 — зеленые семена; 4, 7, 10 — фиолетовые; 5, 6 — бежевые; 8, 9 — коричневые

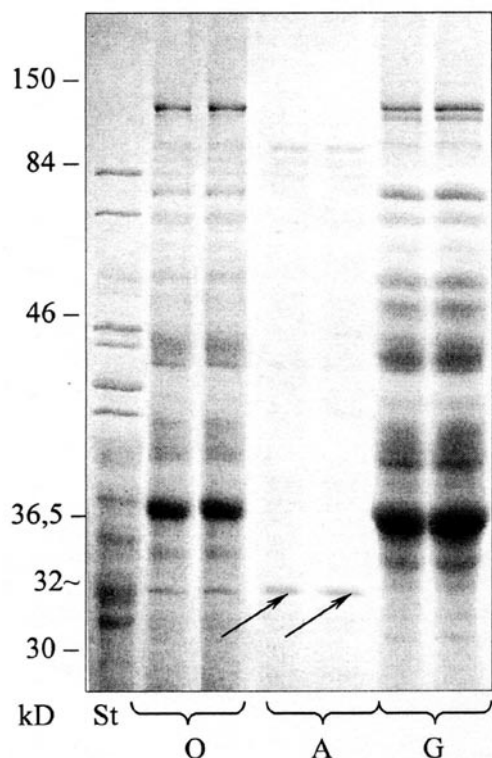


Рис. 2. Электрофоретические спектры полипептидов средней пробы семян в популяции 1 *Hedysarum theinum* до и после диализа. SDS-система, +Me-вариант, St — стандартный образец линии *E. sibiricus* (ALT-1); O — суммарный экстракт солерастворимых белков; A — альбумины; G — глобулины

и IV. Таким образом, можно заключить, что выделенные в данных условиях и представленные на электрофоретических спектрах белковые фракции семян в основном соответствуют полипептидам запасных глобулинов, а компонент, коррелирующий с фиолетовым цветом семян, является альбумином.

Для копеечника чайного, так же как и для других копеечников характерны высокая потенциальная и низкая реальная семенная продуктивность (Карнаухова, 1994; Сыева, Карнаухова, Дорогина, 2008). Это особенно резко проявляется в экстремальных условиях высокогорий, где семена вызревают не каждый год. Реальная семенная продуктивность

зависит также от степени повреждения семян личинками насекомых.

Всхожесть семян связана с длительностью их хранения. В отличие от других видов копеечников, у которых в связи с твердокаменностью семян, характерных для бобовых (Попцов, 1974), всхожесть сохраняется в течение многих лет, у *Hedysarum theinum* она теряется быстрее.

Лабораторная всхожесть копеечника чайного, собранного в сентябре 2008 г., по результатам испытаний от 20.03.2009 г. Филиала ФГУ «Россельхозцентр» по Республике Алтай достигает 72–86 %, энергия прорастания — 45–61% (условия проращивания соответствуют ГОСТ Р51096–97: НБ; Т; t = 20° С, за 16 суток). Жизнеспособность скарифицированных наждачной бумагой семян после 5–13 лет хранения оказалась низкой: от 0 до 20 %. Образцы с наиболее высоким процентом жизнеспособных семян были использованы для определения всхожести семян, разобранных по окраске семенной кожуры.

В результате, в популяции 1 были обнаружены семена темных оттенков (фиолетовый и коричневый) и зеленые, но нет бежевых, а в популяции 2 из альпийского пояса — нет фиолетовых, обнаружены только коричневые, зеленые и бежевые семена. Проращивание семян в чашках Петри показало, что всхожесть их значительно выше, если они собраны в лесном поясе, чем в альпийском поясе (табл. 1). Это, по-видимому, связано с условиями высокогорий (2100 м над ур. м.), где полное созревание семян затруднено. Семена с зеленой окраской, которые были отобраны в обеих популяциях, также имеют более высокую энергию прорастания и всхожесть в 1-й популяции (63 и 57 %), чем во 2-й (45 и 25 % соответственно).

Проросшие семена были высажены в вегетационные сосуды. Выживаемость растений, полученных из семян разного цвета, учитывали через 1 и 2 недели после посадки. Из зеленых семян выросло только по 6–8 растений в каждой повторности (табл. 2) в обеих популяциях. Значительно больше выращено растений из коричневых семян 1-й популяции (16–20 шт.), чем 2-й (2 шт.). Во 2-й популя-

Таблица 1

Всхожесть семян *Hedysarum theinum* разного цвета

Цвет семенной кожуры	1700 м, субальпийский луг		2100 м, альпийский луг	
	Энергия прорастания, %	Всхожесть, %	Энергия прорастания, %	Всхожесть, %
Фиолетовый	86	72		
Коричневый	64	32	42	14
Зеленый	63	57	45	25
Бежевый			62	48

Жизнеспособность проростков, выросших из семян разного цвета

Цвет семенной кожуры	1700 м, субальпийский луг		2100 м, альпийский луг	
	7 дней, %	14 дней, %	7 дней, %	14 дней, %
Фиолетовый	38	32		
Коричневый	20	16	2	2
Зеленый	8	6	7	7
Бежевый			2	2

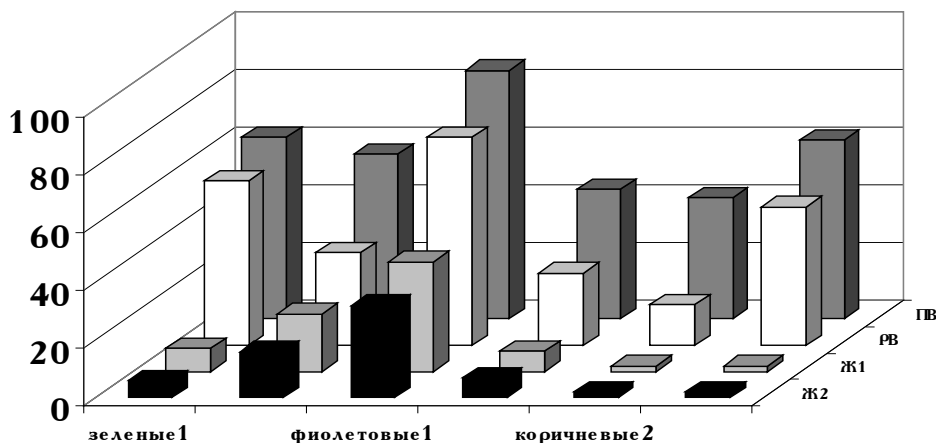


Рис. 3. Всхожесть семян и жизнеспособность проростков *Hedysarum theinum* в зависимости от цвета семян в двух популяциях. 1 — в субальпийском редколесье на высоте 1700 м над ур. м.; 2 — на альпийском лугу на высоте 2100 м над ур. м. ПВ — всхожесть за 3 дня (энергия прорастания); РВ — всхожесть за 10 дней; Ж1 — жизнеспособность проростков через неделю после посадки в грунт; Ж2 — жизнеспособность проростков через 2 недели после посадки в грунт

ции оказалась такая же низкая жизнеспособность (2 шт.) у растений, выращенных из бежевых семян, хотя энергия прорастания и всхожесть их были выше, чем у зеленых и коричневых семян в этой популяции (см. табл. 1).

Итак, в альпийской популяции наиболее жизнеспособными оказались растения, выращенные из зеленых семян. Наиболее полноценные, всхожие и, по-видимому, зрелые семена — семена фиолетового цвета, из которых выживает наибольшее число растений, были отобраны в субальпийской популяции на высоте 1700 м над ур. м.

Таким образом, опыт по проращиванию различных по цвету семян копеечника чайного из двух популяций, произрастающих на одном склоне северо-восточной экспозиции на высоте 1700 и 2100 м над ур. м., показал, что их всхожесть и жизнеспособность растений, выращенных из них, зависят как от условий произрастания вида, так и от окраски семян (рис. 3). По-видимому, наиболее полноценные семена темных (особенно фиолетовых) расцветок успевают вызревать в более благо-

приятных условиях субальпийского редколесья. Именно в этой популяции был выявлен компонент альбуминовой природы, маркирующий морфологический признак — фиолетовый цвет кожуры семени.

В более суровом климате альпийского пояса, где семена, по-видимому, не успевают полноценно вызревать, темно-коричневая окраска не может служить показателем спелости, так как больше жизнеспособных растений вырастает там из семян зеленого цвета.

Таким образом, в результате проведенных исследований обнаружена корреляция между фиолетовой окраской кожуры семени и полипептидом на электрофоретическом спектре, а также всхожестью семян и жизнеспособностью выросших из этих семян растений.

Авторы выражают благодарность Нечепуренко С.Б. за любезно предоставленный семенной материал.

Исследования выполнены при поддержке гранта № 23 по Программе Президиума РАН «Биологическое разнообразие» и Интеграционному проекту СО РАН № 28.

ЛИТЕРАТУРА

- Агафонова О.В., Володарская С.Б. Продуктивность и содержание олигомерных катехинов у *Hedysarum theinum* Krasnob. в Центральном и Юго-Западном Алтае // Раст. ресурсы. 2000. Вып. 4. С. 47–52.
- Благовещенский А.В. Биохимическая эволюция цветковых растений. М., 1966. 325 с.
- Гаврилюк И.П., Губарева Н.К., Конарев В.Г. Выделение, фракционирование и идентификация белков, используемых в геномном анализе культурных растений // Тр. по прикл. бот., ген. и сел. 1973. Т. 52. Вып. 1. С. 249–281.
- Гаврилюк И.П., Зайцева Л.Н., Телеуца А.С., Черненко А.П. Иммунохимический анализ в оценке качества белка сои // Тр. по прикл. бот., ген. и сел. 1981. Т. 70. Вып. 2. С. 82–102.
- Дорогина О.В., Цевелева И.Н., Агафонова М.А. Полиморфизм электрофоретических спектров полипептидов семян некоторых видов сем. *Fabaceae*, характеризующихся перекрестным типом опыления // Сиб. экол. журн. 2003. Т. 10. № 1. С. 9–16.
- Карнаухова Н.А. Биоэкологическое разнообразие копеечников флоры Хакасии и оценка их позиций в природе и при интродукции // Сиб. экол. журн. 1994. Т. 1. № 6. С. 581–587.
- Карнаухова Н.А. Особенности развития *Hedysarum theinum* (*Fabaceae*) Krasnob. в природных условиях и при интродукции в Центральный сибирский ботанический сад (г. Новосибирск) // Раст. ресурсы. 2007. Т. 43. Вып. 3. С. 14–25.
- Конарев В.Г. Проблема кормовой и пищевой ценности растительных белков // Растительные белки и их биосинтез. М., 1975. С. 5–20.
- Красноборов И.М., Азовцев Г.Р., Орлов В.П. Новый вид рода *Hedysarum* (*Fabaceae*) из Южной Сибири // Бот. журн. 1985. Т. 70. № 7. С. 968–973.
- Сыева С.Я., Карнаухова Н.А., Дорогина О.В. Копеечники Горного Алтая. Горно-Алтайск, 2008. 184 с.
- Попцов А.В. Твердосемянность как особый тип органического покоя семян // Раст. ресурсы. 1974. Т. 10. Вып. 3. С. 454–466.
- Флора Сибири. Т. 9: *Fabaceae* (*Leguminosae*). Новосибирск, 1994. 280 с.
- Laemmli U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 // Nature. 1970. Vol. 227. № 5259. P. 680–685.
- Osborn T.B. The vegetable proteins. London, 1924. 154 p.