

БОТАНИКА

УДК 58.009

DOI: 10.17072/1994-9952-2019-3-217-226.

А. Е. Артюхин^а, Е. В. Михайлова^б, Б. Р. Кулуев^б

^а Башкирский государственный университет, Уфа, Россия

^б Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение ФГБНУ УФИЦ РАН, Уфа, Россия

**ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ ПОПУЛЯЦИЙ
ВОДЯНОГО ОРЕХА *TRAPA SIBIRICA* FLER. (*LYTHRACEAE*)
В РЕСПУБЛИКЕ БАШКОРТОСТАН**

Водяной орех (*Trapa L.*) – редкое и реликтовое для России водное растение из сем. *Lythraceae* со съедобными плодами. В Республике Башкортостан он произрастает только в двух небольших оз. Упканкуль и Бильгиляр. Цель нашей работы – анализ состояния популяций водяного ореха в этих озерах, морфологический и молекулярно-генетический анализ растений, а также обследование близлежащих озер на предмет возможности его интродукции. Численность популяции в оз. Упканкуль в 2017 г. оказалась самой большой за последние 60 лет – 5 722 плавающих розеток. В оз. Бильгиляр в 2017 г. было всего 28 растений. В 2018 г. численность популяции оз. Упканкуль сократилась более чем на две тысячи розеток, тогда как таковая в оз. Бильгиляр незначительно увеличилась. Если в 2017 г. диаметр розеток был больше в оз. Упканкуль, то в 2018 – в оз. Бильгиляр. Морфометрический анализ плодов водяных орехов оз. Упканкуль показал высокую схожесть с байкальскими популяциями *Trapa L.* Методами RAPD- и ISSR-анализов были подтверждены литературные данные о произрастании в Башкирии одного вида водяного ореха, предположительно относящегося к виду *T. sibirica* Fler. Исследование 15 близлежащих озер показало, что некоторые из этих водоемов подходят для интродукции водяного ореха. Нами был осуществлен сбор и стратификация семян водяного ореха и проведены работы по его интродукции в нескольких озерах южной части Нуримановского р-на Республики Башкортостан.

Ключевые слова: *Trapa L.*; водяной орех; чилим; *Trapa sibirica*; Республика Башкортостан; Упканкуль; Бильгиляр; RAPD-анализ; ISSR-анализ.

A. E. Artyukhin^a, E. V. Mikhaylova^b, B. R. Kuluev^b

^a Bashkir State University, Ufa, Russian Federation

^b Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa FRC of the RAS, Ufa, Russian Federation

**STUDY OF ISOLATED POPULATIONS OF THE WATER
CALTROP *TRAPA SIBIRICA* FLER. (*LYTHRACEAE*) IN THE
REPUBLIC OF BASHKORTOSTAN**

The water caltrop (*Trapa L.*) is a rare and relict annual aquatic plant from the family Lythraceae. Its fruits are edible and contain a lot of starch and protein. In the Republic of Bashkortostan, the water caltrop grows only in two small lakes Upkankul and Bilgilyar. The purpose of our study was the analysis of the water caltrop populations in these two lakes in 2017 and 2018, morphological and molecular-genetic analysis of plants from different points of these lakes, and introduction of the water caltrop seeds in the nearby lakes. The population size in Lake Upkankul in 2017 was the biggest in the last 60 years - 5722 floating rosettes, most of them growing on the eastern side of the middle part of the lake. In the lake Bilgilyar, we found only 28 plants in one single point in 2017. The next year population size in Upkankul decreased by more than two thousand rosettes, and in lake Bilgilyar it slightly increased. Morphometric analysis of fruits of water caltrop of the lake Upkankul showed high similarity with Transbaikalian populations of *Trapa L.* RAPD and ISSR analyzes confirmed that only one species, supposedly *T. sibirica* Fler., is growing in these two lakes. A study of 15 nearby lakes has shown that some of them are suitable for introduction of a water caltrop. We collected and stratified the *Trapa L.* seeds and introduced them in several lakes in the southern part of the Nurimanovsky district of the Republic of Bashkortostan.

Key words: *Trapa L.*; water caltrop; water chestnut; *Trapa sibirica*; Republic of Bashkortostan; Upkankul; Bilgilyar; RAPD; ISSR.

Водяной орех (*Trapa L.*) – однолетнее водное растение, относящееся согласно современной классификации к сем. Дербенниковые (*Lythraceae*), имеющее длинный тонкий стебель с

подводными корнями, розетки надводных листьев и односемянные плоды с отростками в виде рогов [Кулуев и др., 2017]. Виды рода *Trapa L.* растут, в основном, в озерах, заводях и медленно текущих

реках, предпочитают илистое дно. На территории России водяной орех относится к реликтовым и редким растениям, имеет дизъюнктивный ареал и встречается от западных границ (Смоленская область) до Тихого океана (Приморский край). Водяной орех в нашей стране на сегодняшний день сохранился лишь в небольшом числе озер отдельных регионов и формирует четыре фрагмента ареала, разделенных значительными расстояниями: Европейская часть России, юг Западной Сибири, Забайкалье и Дальний Восток [Кулуев и др., 2017].

Семена водяных орехов съедобны и питательны. Они содержат 20% белка, 52% крахмала и 0.7% жира, то есть по содержанию крахмала и белка не уступают пшенице и превосходят кукурузу и картофель [Келлер, 1941]. *Trapa L.* культивируется и употребляется в пищу во многих странах Азии (Япония, Китай, Индия и др.). Также его разводят на юге Африки до устья р. Замбези [Сисейкин, 2007]. Плоды едят сырыми, отварными и запеченными. Из разломанных плодов получают муку и крупу. В дореволюционной России тоже проводили массовые заготовки водяного ореха и продавали возами на рынках [<http://plantcare.ru>]. На сегодняшний день в России плоды водяного ореха в качестве пищевого продукта не используют, в том числе из-за вымирания или сокращения размеров популяций этого растения в водоемах нашей страны. В связи с этим, актуальными являются работы по интродукции местных популяций водяного ореха в другие водоемы России с целью восстановления их численности. Также представляется весьма актуальной организация аквакультуры водяного ореха в России. Его плоды могут стать неплохим углеводно-белковым подспорьем в формировании общего баланса продуктов питания, а также, вероятно, могут быть использованы в качестве отечественного заменителя некоторых видов импортируемых орехов для пищевой и кондитерской промышленности.

В.Н. Васильев в середине XX в. описал с территории СССР около 30 видов водяного ореха; при этом основным критерием вида служила лишь форма плода [Васильев и др., 1960], однако нельзя исключать вариативность этого морфометрического параметра в зависимости от условий произрастания. В зарубежной литературе иногда выделяют всего лишь один полиморфный вид *Trapa natans L.*, представленный несколькими подвидами [Hummel, Kiviat, 2004]. В связи с этим, становится актуальным вопрос изучения видового разнообразия водяного ореха на территории России с привлечением методов молекулярной генетики. На сегодняшний день подобные работы начали только индийские и китайские исследователи, которые достигли лишь небольших успехов по изучению генетического внутривидового полиморфизма своих собственных местных популяций *Trapa L.* методами RAPD-анализа [Kachare et al., 2013] и AFLP-анализа [Li et al., 2017]. Судя по литерату-

рым данным, методы молекулярной генетики еще не применялись для оценки видового разнообразия водяного ореха. Данное направление исследований является наиболее актуальным именно для территории России, где произрастает множество изолированных и уникальных северных популяций водяного ореха, претендующих на статус вида, многие из которых находятся под угрозой исчезновения.

В Республике Башкортостан водяной орех на сегодняшний день отмечен только в двух близко расположенных небольших озерах – Упканкуль (Упканнукуль, Упкан) и Бильгиляр (Бильгеляр), первое из которых является старицей р. Уфы (приток р. Белой, бассейн р. Волги), а второе имеет карстовое происхождение [Мулдашев, 2011; Кулуев и др., 2017]. Наибольшее значение для сохранения популяции водяного ореха в Башкирии имеет оз. Упканкуль. Ранее были опубликованы данные о том, что в нем произрастают два вида водяного ореха – уральский (*T. uralensis V. Vassil.*) и алатырский (*T. alatyrica Spryg.*) [Кучеров и др., 1991]. Отмечалось, что водяной орех уральский и алатырский отличаются между собой только по строению плода [Кучеров и др., 1987], однако каких-либо более тщательных исследований видовой принадлежности и молекулярно-генетического анализа этого растения в оз. Упканкуль никогда не проводилось. В то же время в Красной книге Республики Башкортостан [2011] для оз. Упканкуль приводится только один, причем другой вид водяного ореха – сибирский (*T. sibirica Fler.*) [Мулдашев, 2011]. В связи с этими противоречивыми литературными данными представляется большой актуальностью проведение молекулярного анализа генетического полиморфизма башкирских популяций водяного ореха в оз. Упканкуль и Бильгиляр.

Целью нашей работы был анализ состояния популяций водяного ореха в оз. Упканкуль и Бильгиляр в 2017 и 2018 гг., морфологический и молекулярно-генетический анализ растений из разных точек исследуемых озер, сбор плодов и стратификация семян, а также обследование условий произрастания водяного ореха и изучение близлежащих озер на предмет возможности интродукции и аквакультуры водяного ореха.

Материалы и методы

Озеро-старица Упканкуль (55°47'N 56°30'52"E) находится примерно в 60 км севернее г. Уфы, в южной части Нуримановского р-на Республики Башкортостан между с. Нимислярово и Истриково (рис. 1). Длина озера по оси составляет 2.5 км, наибольшая ширина его достигает 180 м, глубина не более 5 м. С севера и северо-запада озеро защищено густым заболоченным лесом, с юго-востока располагаются луга, используемые преимущественно в качестве сенокосных угодий. В 1965 г. оно было объявлено памятником природы.

Карстовое оз. Бильгиляр (55°3'9"N 56°31'40"E) находится в том же районе, в 1.2 км к юго-востоку от оз. Упканкуль. Почти со всех сторон оно окружено заболоченным лесом. Несмотря на небольшой размер, глубина его может достигать 25 м. Озеро и болото Бильгиляр объявлены памятником природы в 2011 г.

Анализ состояния популяций, морфологический анализ и сбор листьев водяного ореха проводили в июле 2017 и 2018 г. Подсчет плавающих розеток водяного ореха и примерную оценку видового разнообразия водной растительности проводили визуально. Морфологический анализ заключался в измерении диаметра, ширины, длины и числа листьев материнской розетки живых растений. Морфометрический анализ плодов заключался в измерении высоты (параметр 1), ширины по верхним рогам (параметр 2) и по основанию верхних рогов (параметр 3), ширины по нижним рогам (параметр 4) и по основанию нижних рогов (параметр 5) и массы плода [Лесков, 2010]. На гистограммах приведены средние значения морфометрических параметров для пяти основных точек в оз. Упканкуль и для одной точки в оз. Бильгиляр, где нами были обнаружены наибольшие скопления водяного ореха. Выборка для каждой точки составила по 20 растений. Барами обозначали стандартную ошибку среднего. Достоверность различий во всех экспериментах оценивали при помощи *U*-критерия Манна-Уитни.

Для оценки условий произрастания водяного ореха и поиска подходящего водоема для его интродукции и аквакультуры проводили измерение температуры и pH на глубине 50 см в 3–4 м от берега в оз. Упканкуль, Бильгиляр и 15 близлежащих озерах с 12.00 до 14.00 в теплый солнечный день (22–24 июля 2017 г.), а также оценивали видовой состав преобладающих водных растений в этих озерах.

Для последующего генетического анализа водяного ореха проводили сбор розеточных листьев, промывали их дистиллированной водой и сушили в течение 2 сут. при комнатной температуре. Сухие листья водяного ореха были использованы для выделения тотальной ДНК СТАВ-методом [Rogers, Bendich, 1985]. Выборка составила по пять растений из каждой точки с большим скоплением водяных орехов (5 точек в оз. Упканкуль и одна точка в оз. Бильгиляр). Качество выделенной тотальной ДНК определяли при помощи электрофореза в 1%-ном агарозном геле. RAPD-анализ проводили с использованием универсальных праймеров LMBD, AFK1, AFK3, OPAI-04, OPAI-05, OPC-06, OPAB-08, OPAC-14 (табл. 1), которые были синтезированы в ООО “Евроген” (Россия). Выбор данных RAPD-праймеров объясняется тем, что именно они давали наибольшее число полиморфных локусов при генетическом анализе индийских популяций водяного ореха [Kachare et al., 2013]. В работе были использованы четыре ISSR-праймера (IS1, IS3,

HB12, HB14), синтезированные ООО “Биоскрин” (Россия), последовательности которых приведены в табл. 1. Так как до наших исследований ISSR-анализ водяного ореха никогда не проводился, выбор соответствующих праймеров объясняется нашими предварительными неопубликованными эмпирическими данными об их эффективности для анализа различных видов *Trapa* L., произрастающих на территории России.

Реакционные смеси для RAPD- и ISSR-анализов объемом 30 мкл содержали следующие компоненты: 1 ед. Taq-полимеразы (“Евроген”, Россия), 3 мкл 10-кратного буфера Taq-полимеразы, 5 mM MgCl₂, 0.25 mM каждого dNTP, 90 пМ праймера, 0.2–0.5 мкг тотальной ДНК. Смесь покрывали 20 мкл минерального масла и оставляли для проведения реакции в термоциклере производства компании “ДНК-технология” (Россия) с использованием следующих протоколов. RAPD-анализ: начальная денатурация – 3 мин. при 94°C; 35 циклов: денатурация при 94°C – 50 сек., температура отжига при 35°C – 50 сек. и элонгация при 72°C – 1 мин. 40 сек.; заключительная элонгация – 7 мин. при 72°C. ISSR-анализ: начальная денатурация – 5 мин. при 94°C; 35 циклов: денатурация при 94°C – 50 сек., температура отжига 53°C – 50 сек. и элонгация при 72°C – 1 мин. 40 сек.; заключительная элонгация – 7 мин. при 72°C. Полиморфизм RAPD- и ISSR-фрагментов определяли аналитическим электрофорезом в 1.7%-ном агарозном геле. Агарозный гель-электрофорез проводили в приборах модели Sub-Cell GT WIDE MINI (“Bio-Rad Laboratories”, США). Все гели фотографировали с помощью фотодокументационной системы Gel Camera System (“UVP”, Inc., США). Для анализа использовались следующие праймеры (табл. 1):

Таблица 1

Список использованных RAPD- и ISSR-праймеров

Название праймера	Последовательность 5'–3'
LMBD	GGGCGCTG
AFK1	ACGGTGGACC
AFK3	GCGTCCATTC
OPAI-04	CTATCCTGCC
OPAI-05	GTCGTAGCGG
OPC-06	GAACGGACTC
OPAB-08	GTTACGGACC
OPAC-14	GTCGGTTGTC
IS1	AGAGAGAGAGAGAGAGYG
IS3	GAGAGAGAGAGAGAGAC
HB12	CACCACCACGC
HB14	CTCTCTCTCTCTCTTG

Результаты исследования

Уникальность популяций водяного ореха оз. Упканкуль и Бильгиляр заключается в их изолированности от основных районов произрастания это-

го растения. Более того, данные популяции, наряду с некоторыми другими популяциями нашей страны, являются одними из наиболее северных в мире, причем произрастающих в довольно суровых условиях континентального климата севера Башкирии [Кулуев и др. 2017]. Ближайшими к оз. Упканкуль водоемами с водяным орехом являются оз. Лебяжье в Оренбургской обл., затон Грязный в Самарской обл. и оз. Старица в Чувашской Республике, удаленных на 396, 457 и 646 км соответственно. Таким образом, в оз. Упканкуль и Бильгиляр произрастают самые северо-восточные популяции *Trapa L.* в европейской части России.

В оз. Упканкуль произрастает относительно небольшое число водяных орехов, причем числен-

ность этого растения сильно варьирует в разные годы исследований (табл. 2). Например, в 60-е гг. прошлого века в озере насчитывалось около 3 000 розеток, тогда как в 1992 г. во всем озере было зафиксировано всего лишь 18 розеток. Последние данные о численности популяции водяного ореха в оз. Упканкуль относятся к 2011 г., когда было зафиксировано 3 000 плавающих розеток (табл. 2). Так как размеры данной популяции водяного ореха не оценивались уже шесть лет, мы провели подсчет числа плавающих розеток во всем озере. В нем водяной орех произрастал лишь в пяти основных точках, которые нами были обозначены цифрами 1–5 (рис. 1).

Таблица 21

Численность популяции водяного ореха в оз. Упканкуль и Бильгиляр в различные годы исследований

Водоемы	Число розеток водяного ореха в годы исследований										
	1961 ¹	1981 ⁴	1982 ²	1987 ²	1992 ⁴	2004 ³	2006 ³	2010 ⁴	2011 ³	2017 ⁵	2018 ⁵
Оз. Упканкуль	3 000	100	200	200	18	320	1 198	300	3 000	5 722	3 506
Оз. Бильгиляр	-	-	-	-	-	-	-	-	-	28	140

Примечание. Данные из публикаций: ¹[Кучеров и др., 1987]; ²[Кучеров, 1989]; ³[Вязевская, Морозова, 2011]; ⁴[Мулдашев, 2011]; ⁵наши данные.

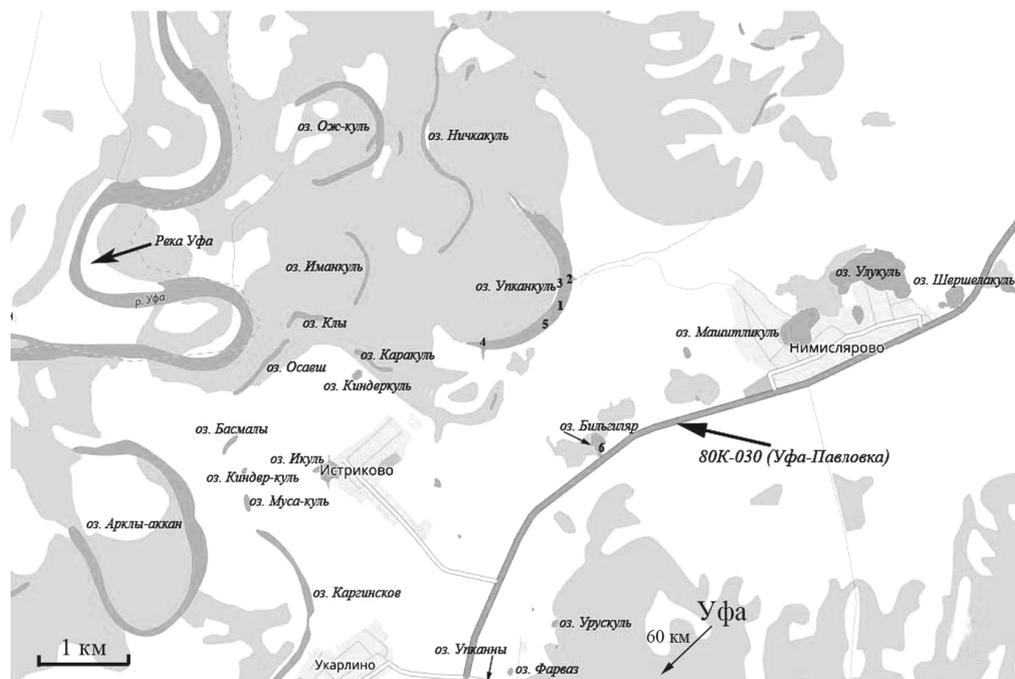


Рис. 1. Места произрастания водяного ореха в оз. Упканкуль (1–5) и Бильгиляр (6)

В 2017 г. наибольшее количество водяных орехов было зафиксировано в точке 2 – 3 561 плавающих розеток. Довольно много растений также было обнаружено в точке 4 – 1 318 розеток. В точках 1, 3 и 5 мы насчитали всего лишь 66, 100 и 372 розеток соответственно. В 2018 г. тенденция сохранилась – в точке 2 мы насчитали 2 329 плавающих розеток, а в точке 4 – 658. Таким образом, водяной орех в оз. Упканкуль произрастает в основном на восточной стороне средней части (район базы отдыха «Упкан») и на южном конце озера.

Кроме этих точек, единичные экземпляры (по 2–3 штуки) водяного ореха встречались почти по всему периметру озера, но ни одного растения мы не нашли на северном конце озера.

Необходимо отметить, что наиболее здоровые растения обнаруживались в точке 2, тогда как в точке 4 было зафиксировано наибольшее количество растений с красными листьями и со следами поедания фитофагами. Именно в этой точке в 2018 г. количество растений значительно снизилось, а также обнаруживалось большое количество пло-

дов, всплывших на поверхность озера. В целом общее число плавающих розеток водяного ореха в оз. Упканкуль в 2017 г. составило 5 722, что почти в два раза больше, чем по данным Кучерова с соавт. за 1961 г. [Кучеров и др., 1987] и воспитанников ДЭБЦ



Рис. 2. Плавающие розетки водяного ореха в оз. Упканкуль в июле 2017 г.:

а – сообщество водяного ореха с кубышкой желтой; б – произрастание *T. sibirica* без других водных растений

В оз. Бильгиляр водяной орех появился лишь в начале 1980-х гг., вероятнее всего, в результате заноса высоким весенним половодьем, либо интродукции из оз. Упканкуль человеком. По материалам А.А. Мулдашева [2011], в 1992 г. в этом водоёме насчитывалось около 450–500 растений. В дальнейшем популяция резко сократила численность до 60 экземпляров и менее в 2008–2010 гг., а также занимаемую площадь с 300 до ≈ 100 м². Мы при обследовании оз. Бильгиляр в 2017 г. обнаружили только 28 экземпляров водяного ореха. Как и прежде [Мулдашев 2011], все растения произрастали в одной точке в южной части озера. Эта точка получила обозначение б. В 2018 г. орех обнаруживался в той же точке в количестве 140 плавающих розеток, при этом они были более крупными, чем в оз. Упканкуль.

Большое значение для оценки состояния популяций *Trapa* L. имеет морфометрический анализ плавающих розеток. Во всех пяти точках оз. Уп-

ганкуль в 2017 г. диаметр розетки составил в среднем около 25 см (рис. 3а). В ходе статистического анализа достоверных различий между пятью точками по данному параметру не обнаруживалось. Однако в оз. Бильгиляр диаметр розетки водяных орехов составил в среднем лишь 15 см (рис. 3а). Похожая картина была выявлена и при сравнении ширины (рис. 3б), длины (рис. 3в) и числа листьев (рис. 3г). Например, у растений из оз. Бильгиляр листья были меньше по длине в среднем на 45%, чем у водяных орехов оз. Упканкуль (рис. 3в). Таким образом, водяные орехи оз. Бильгиляр в 2017 г. по всем основным морфометрическим параметрам розетки уступали растениям из оз. Упканкуль. Вероятнее всего, эти различия были связаны с условиями произрастания водяного ореха в этих двух озерах, однако нельзя было исключать и наличия генетического полиморфизма по данному признаку.

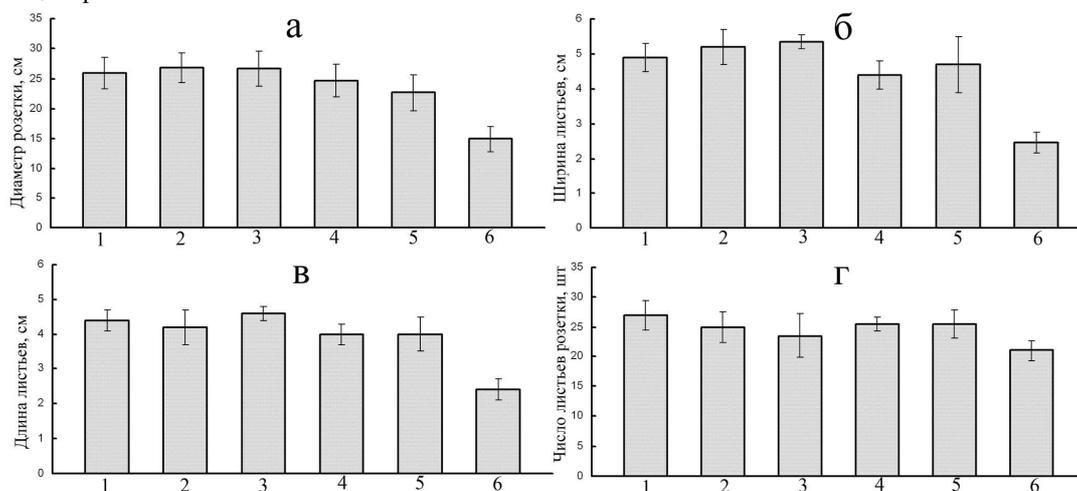


Рис. 3. Морфометрический анализ розетки водяных орехов в пяти точках оз. Упканкуль (1–5) и в оз. Бильгиляр (6) в 2017 г.:

а – диаметр розетки, см; б – ширина листьев, см; в – длина листьев, см; г – число листьев розетки, шт.

Важным фенотипическим признаком для оценки состояния растений *Trapa L.* являются также морфометрические параметры плодов, измеренных по пяти общепринятым параметрам [Leskov, 2010]. В оз. Бильгиляр сбор плодов нами не осуществлялся в связи с малочисленностью растений водяного ореха, и любое наше вмешательство могло оказать негативный эффект. Сбор семян для последующей их стратификации проводился нами в начале сентября 2017 г. только из точек 1, 2 и 4 оз. Упканкуль, где наблюдалась наибольшая численность водяного ореха. В целом было измерено 50 плодов, и по каждому из пяти параметров были получены следующие средние данные: параметр 1 – 24.6 ± 3.2 мм; параметр 2 – 39.6 ± 3.5 мм; параметр 3 – 18.6 ± 4.1 мм; параметр 4 – 37.3 ± 2.8 мм; параметр 5 – 11.9 ± 3.1 мм. Масса одного плода в среднем составила 4246 ± 863 мг. Большинство собранных нами плодов водяного ореха имели четыре крупных рога: два верхних и два нижних (рис. 4). Рога были снабжены гарпунами разного размера (рис. 4г). Нами также были обнаружены «орехи» с пятью рогами, что, вероятнее всего, является следствием аномалий развития плода.

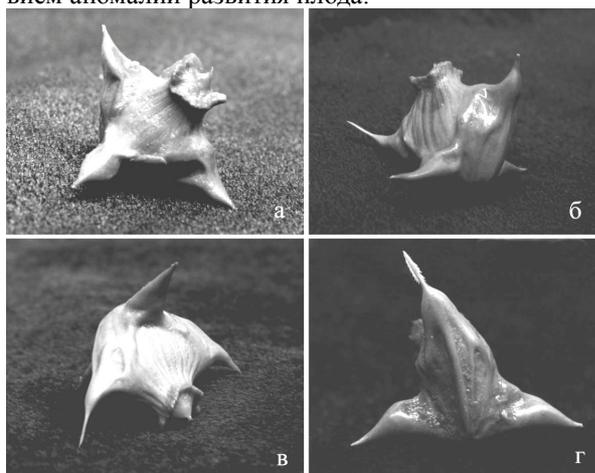


Рис. 4. Плоды водяного ореха *T. sibirica*. из оз. Упканкуль

Сбор плодов проводили в пятилитровые пластиковые бутылки с озерной водой. На следующий день воду в бутылках заменяли на чистую водопроводную холодную воду и помещали собранные плоды в холодильник на $+5^{\circ}\text{C}$ для последующей стратификации семян [Берестенко 2011]. Воду в бутылках меняли каждый месяц, поскольку происходило загнивание экзо- и мезокарпия плодов, что является нормой для водяного ореха.

По литературным данным в оз. Упканкуль может произрастать не один, а два вида водяного ореха – *T. uralensis* и *T. alatyrica* [Кучеров и др., 1991]. Учитывая это и то, что водяной орех в исследуемом районе произрастает в двух отдельных озерах, представляла большой интерес оценка ге-

нетического полиморфизма исследуемых популяций *Trapa L.* методами молекулярной генетики. Наиболее простым и дешевым способом выявления мультилокусного полиморфизма ДНК могут служить методы случайного праймирования (RAPD-анализ) и микросателлитного праймирования (ISSR-анализ). Исходя из этого, нами была поставлена задача провести RAPD- и ISSR-анализ образцов водяного ореха из исследуемых озер.

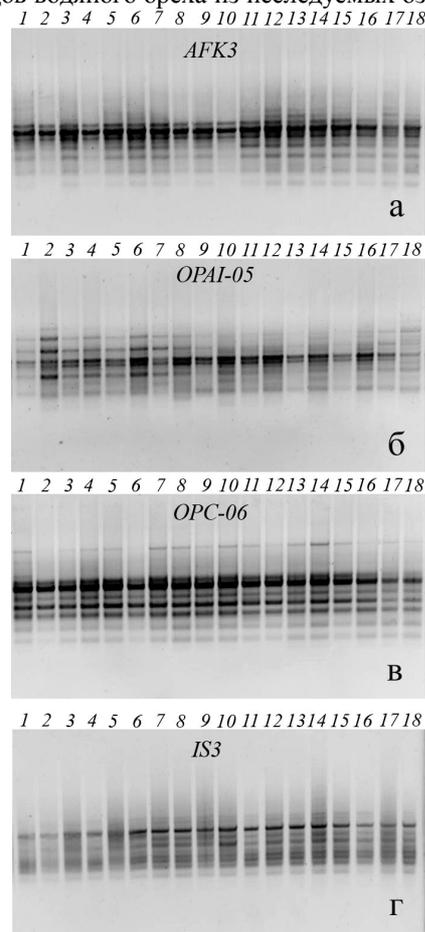


Рис. 5. Результаты RAPD- и ISSR-анализов образцов водяного ореха из оз. Упканкуль и Бильгиляр:

а – результаты RAPD-анализа с праймером AFK3; б – результаты RAPD-анализа с праймером OPAl-05; в – результаты RAPD-анализа с праймером OPC-06; г – результаты ISSR-анализа при помощи праймера IS3. Для анализа использованы образцы листьев из точки 1 (дорожки 1–3), точки 2 (дорожки 4–6), точки 3 (дорожки 7–9), точки 4 (дорожки 10–12), точки 5 (дорожки 13–15) оз. Упканкуль и оз. Бильгиляр (дорожки 16–18)

Из сухих листьев 18 растений водяного ореха (по три растения из каждой точки) была выделена тотальная ДНК. В результате проведенного агарозного гель-электрофореза было показано, что СТАВ-методом выделяется высокомолекулярная и нефрагментированная ДНК *Trapa L.*, пригодная для RAPD- и ISSR-анализа. При RAPD-анализе с

праймером AFK3 в серии экспериментов выявлялось не менее семи четко различимых ампликонов, которые по размеру не отличались во всей анализируемой группе водяных орехов (рис. 5а). RAPD-анализ с праймером OPAI-05 тотальной ДНК водяного ореха приводил к амплификации шести локусов разного размера (рис. 5б). При этом среди 18 образцов водяного ореха не удалось выявить ни одного полиморфного локуса. При использовании праймера OPC-06 амплифицировалось семь фрагментов ДНК, и также среди всей анализируемой группы водяных орехов полиморфные локусы не обнаруживались (рис. 5в). Полиморфизм в образцах анализируемых растений *Trapa* L. не выявлялся также при использовании RAPD-праймеров LMBD, AFK1, OPAI-04, OPAB-08 и OPAC-14. При ISSR-анализе образцов водяного ореха также во всех экспериментах выявлялись четко различимые ампликоны, число которых в случае с праймером IS3, к примеру, составило 7 (рис. 5г). В то же время при использовании всех четырех ISSR-праймеров не было выявлено ни одного полиморфного локуса, который позволил бы говорить о генетической гетерогенности анализируемых растений водяного ореха из обоих исследуемых озер. Исходя из результатов морфометрического анализа плодов и генетического анализа, можно предполагать произрастание в исследуемых озерах всего лишь одного вида водяного ореха, причем, согласно данным А.А. Мулдашева [2011], *T. sibirica*.

Большой интерес представляет интродукция водяного ореха в подходящие для этого водоемы. Это важно как для сохранения этого редкого вида, так и для использования его аквакультуры с целью

получения урожая плодов в промышленных масштабах. Поэтому нами была поставлена задача исследовать условия произрастания его в оз. Упканкуль и Бильгиляр, а также в 15 близлежащих озерах с целью поиска подходящих водоемов для его интродукции; рН воды в оз. Упканкуль и Бильгиляр составил 6.7–6.8 (табл. 3). Однако во всех других близлежащих озерах рН был немного выше и варьировал от 7.5 до 8.9 (табл. 3). Самые близкие к оз. Упканкуль показатели рН были характерны для оз. Муса-куль, Фарваз и Упканны. В остальных озерах рН был около 8 и выше, а по данным Л.Е. Каршиной с соавт. [1951], проростки водяного ореха погибают в слабощелочной среде (рН = 8–9). Наиболее близкие к оз. Упканкуль значения температуры воды были характерны для оз. Муса-куль, Киндеркуль и Ож-куль, тогда как в других озерах температура воды была немного ниже (табл. 3). Наибольшее видовое разнообразие водной растительности, как показатель хорошего состояния экосистемы, было характерно для озер, отдаленных от дорог и населенных пунктов (например, оз. Муса-куль, Аркылы-аккан, Каракуль и Ничкакуль) (табл. 3). Исходя из проведенного нами анализа ближайших водоемов, наиболее подходящим для интродукции водяного ореха является оз. Муса-куль, однако это озеро не защищено лесами и болотами, в связи с чем местные жители и отдыхающие имеют свободный доступ к этому водоему. Поэтому по различным соображениям для интродукции водяного ореха нами были выбраны оз. Аркылы-аккан, Басмалы-куль и Киндер-куль, которые в большей степени удалены от населенных пунктов.

Таблица 3

Данные по 17 исследованным озерам южной части Нуримановского р-на Республики Башкортостан

Название озера	рН воды	t°C	Преобладающая водная растительность	Географические координаты
Упканкуль	6.8	27	<i>Trapa sibirica</i> , <i>Nuphar lutea</i> , <i>Nymphaea candida</i> , <i>Salvinia natans</i> , <i>Potamogeton natans</i> , <i>Lemna minor</i> , <i>Ceratophyllum demersum</i>	55°47'N, 56°30'52"E
Бильгиляр	6.7	25	<i>Nuphar lutea</i> , <i>Nymphaea candida</i> , <i>Trapa sibirica</i>	55°3'9"N 56°31'40"E
Муса-куль	7.5	26	<i>Salvinia natans</i> , <i>Hydrocharis morsus-ranae</i> , <i>Sagittaria sagittifolia</i> , <i>Elodea canadensis</i> , <i>Lemna minor</i> , <i>Nuphar lutea</i> , <i>Alisma plantago-aquatica</i> , <i>Potamogeton natans</i>	55°2'50"N, 56°28'1"E
Киндер-куль	7.7	23	<i>Salvinia natans</i> , <i>Lemna minor</i> , <i>Nuphar lutea</i>	55°3'0"N, 56°28'0"E
Басмалы-куль	7.7	23	<i>Salvinia natans</i> , <i>Lemna minor</i> , <i>Nuphar lutea</i>	55°3'10"N, 56°27'52"E
Аркылы-аккан	7.7	24	<i>Nuphar lutea</i> , <i>Sagittaria sagittifolia</i> , <i>Ceratophyllum demersum</i> , <i>Hydrocharis morsus-ranae</i> , <i>Lemna trisulca</i> , <i>Potamogeton natans</i>	55°2'40"N, 56°26'49"E
Осаеш	7.7	23	<i>Salvinia natans</i> , <i>Lemna minor</i> , <i>Nuphar lutea</i> , <i>Ceratophyllum demersum</i>	55°3'31"N, 56°27'59"E
Шершелакуль	7.6	23	<i>Nuphar lutea</i> , <i>Potamogeton natans</i> , <i>Sagittaria sagittifolia</i> , <i>Hydrocharis morsus-ranae</i>	55°4'0"N, 56°35'18"E
Зуркуль	8.8	25	<i>Nuphar lutea</i> , <i>Ceratophyllum demersum</i>	55°4'8"N, 56°34'29"E
Упканны	7.5	22	<i>Potamogeton natans</i> , <i>Hydrocharis morsus-ranae</i>	55°1'44"N, 56°30'35"E

Окончание табл. 3

Название озера	pH воды	t°C	Преобладающая водная растительность	Географические координаты
Фарваз	7.5	23	<i>Nuphar lutea</i> , <i>Potamogeton natans</i>	55°1'49"N 56°30'45"E
Урускуль	7.7	23	<i>Nuphar lutea</i> , <i>Potamogeton natans</i> , <i>Hydrocharis morsus-ranae</i>	55°2'6"N, 56°31'13"E
Киндеркуль	8.9	26	<i>Sagittaria sagittifolia</i> , <i>Hydrocharis morsus-ranae</i> , <i>Alisma plantago-aquatica</i> , <i>Elodea canadensis</i> , <i>Nuphar lutea</i> , <i>Potamogeton crispus</i> , <i>Najas minor</i>	55°3'29"N, 56°29'17"E
Каракуль	8.4	25	<i>Salvinia natans</i> , <i>Hydrocharis morsus-ranae</i> , <i>Nuphar lutea</i> , <i>Lemna minor</i> , <i>Ceratophyllum demersum</i> , <i>Lemna trisulca</i>	55°3'38"N, 56°29'21"E
Иманкуль	8.4	24	<i>Salvinia natans</i> , <i>Hydrocharis morsus-ranae</i> , <i>Nuphar lutea</i> , <i>Lemna minor</i> , <i>Ceratophyllum demersum</i> , <i>Lemna trisulca</i>	55°4'12"N, 56°29'9"E
Ничкакуль	8.7	22	<i>Salvinia natans</i> , <i>Hydrocharis morsus-ranae</i> , <i>Nuphar lutea</i> , <i>Lemna minor</i> , <i>Ceratophyllum demersum</i> , <i>Lemna trisulca</i> , <i>Sagittaria sagittifolia</i> , <i>Potamogeton lucens</i> , <i>Nymphaea candida</i>	55°4'54"N, 56°29'56"E
Ож-куль	7.9	26	<i>Salvinia natans</i> , <i>Hydrocharis morsus-ranae</i> , <i>Lemna minor</i> , <i>Lemna trisulca</i> , <i>Persicaria amphibia</i> , <i>Sagittaria sagittifolia</i>	55°4'54"N, 56°28'52"E

Обсуждение результатов

Озера Упканкуль и Бильгиляр – это единственные водоемы с водяным орехом в Республике Башкортостан. Численность его популяции в первом озере стабильна, хотя и с ежегодными вариациями. В оз. Бильгиляр, по результатам многолетних наблюдений, происходит уменьшение численности водяного ореха, что может в ближайшем будущем привести к его полному вымиранию в этом водоеме. В связи с этим, большое внимание природоохранных организаций региона в ближайшие годы должно быть обращено к памятнику природы «Озеро и болото Бильгиляр». Наилучшие условия для произрастания водяного ореха сложились на восточной стороне средней части оз. Упканкуль в районе базы отдыха «Упкан», где и произрастает большая часть всех растений *T. sibirica*. К сожалению, именно этот участок озера является излюбленным местом отдыхающих. Поэтому водяной орех оз. Упканкуль также весьма уязвим и нуждается в усилении охраны [Кулуев и др., 2017].

Морфометрический анализ плавающих розеток показал нормальные параметры роста во всех точках оз. Упканкуль. По всем основным показателям исследованные растения превосходили представителей забайкальских популяций *Trapa L.* [Лесков, 2010]. Возможно, это связано с тем, что климат в Восточном Забайкалье еще более холодный, чем в северной Башкирии. В то же время, по всем морфометрическим параметрам плода исследованные нами растения были весьма схожи с забайкальскими водяными орехами [Лесков, 2010]. Вероятно, что в Башкирии и в Восточном Забайкалье произрастает один и тот же или близкие виды во-

дяного ореха, а форма плода в меньшей степени зависит от условий произрастания, чем параметры роста плавающих розеток.

Результаты проведенного нами генетического анализа в целом подтверждают точку зрения А.А. Мулдашева о произрастании в Башкирии одного вида водяного ореха, который был определен им как водяной орех сибирский *Trapa sibirica* [Мулдашев, 2011]. Имеются сведения, что ISSR-анализ, в отличие от RAPD-анализа, вполне эффективен для выявления внутривидового полиморфизма [Kal'ko, 2015]. Однако нам не удалось выявить ни одного полиморфного локуса при молекулярном анализе водяного ореха Республики Башкортостан. Это свидетельствует о том, что в оз. Упканкуль произрастает генетически гомогенная популяция водяного ореха, и именно из этого озера происходит популяция водяного ореха оз. Бильгиляр.

В связи с полученными нами данными представляет большой интерес продолжение этого направления генетических исследований с целью выяснения родственных отношений между разными популяциями водяного ореха и видовой разнообразия этого растения по всей территории России, причем такие работы еще ни разу не проводились в нашей стране. Например, вызывает вопрос, к европейским или же к западно-сибирским популяциям *Trapa L.* наиболее близок водяной орех из Башкирии. Генетическая паспортизация российских популяций водяного ореха также имеет большое значение при подготовке к интродукции и аквакультуре водяного ореха. Это связано с высоким инвазионным потенциалом *Trapa L.* [Hummel, Kiviat, 2004], поэтому для интродукции стоит использовать местные популяции водяного ореха, которые с меньшей вероятностью будут приводить к

полному зарастанию водоемов этим растением.

Заключение

В двух небольших оз. Упканкуль и Бильгиляр в Республике Башкортостан произрастают уникальные и довольно уязвимые северные популяции водяного ореха, нуждающиеся в усиленной охране. Водяной орех в этих озерах представлен одним видом и двумя популяциями с низким уровнем генетического полиморфизма. Для сохранения этих уникальных популяций нами начаты работы по интродукции этого растения в близлежащие водоемы. Также имеются большие перспективы для организации аквахозяйства по выращиванию водяного ореха в Республике Башкортостан. Видовая принадлежность водяного ореха из Башкирии к *T. sibirica* требует более тщательной проверки в ходе дальнейших исследований.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 18-74-00056).

Библиографический список

- Берестенко Е.Н. Жизнеспособность семян видов рода *Trapa* Приморского края при различных условиях хранения // Вестник ДВО РАН. 2011. Т. 2. С. 151–154.
- Васильев В.Н. Водяной орех и перспективы его культуры в СССР. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1960. 97 с.
- Вяземская А., Морозова И.М. Динамика популяции реликтового вида *Trapa sibirica* Fler. на территории памятника природы «Озеро Упканкуль». Исследовательская работа детского эколого-биологического центра Демского района г. Уфы. Уфа, 2011. 19 с.
- Дикие съедобные растения / под ред. акад. В.А. Келлера. М., 1941. 40 с.
- Калько Г.В. ДНК-маркеры для оценки генетических ресурсов ели и сосны // Труды Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства. 2015. № 4. С. 19–34.
- Каршина Л.Е., Трофимов М.М. О возможности культуры чилима в дельте р. Волги // Бюллетень МОИП. Отд. биол. 1951. Т. 56, № 1. С. 94–96.
- Кулуев Б.Р. и др. Водяной орех плавающий *Trapa* L.: биология, ареал распространения и исследование его изолированных популяций в озерах Нуримановского района Республики Башкортостан // Биомика. 2017. Т. 9, № 2. С. 101–118.
- Кучеров Е.В., Мулдашев А.А., Галеева А.Х. Охрана редких видов растений на Южном Урале. М., 1987. 205 с.
- Кучеров Е.В. Сем. 86. Trapaceae Dumort. // Определитель высших растений Башкирской АССР. М.: Наука, 1989. С. 148–149.
- Кучеров Е.В., Мулдашев А.А., Галеева А.Х. Ботанические памятники природы Башкирии. Уфа, 1991. 144 с.
- Лесков А.П. Экология и биология *Trapa natans* L. (Восточное Забайкалье). // Ученые записки Забайкальского государственного университета. Сер. Биол. науки. 2010. Т. 1. С. 140–146.
- Мулдашев А.А. Водяной орех сибирский *Trapa sibirica* Fler. // Красная книга Республики Башкортостан: в 2 т. Уфа: МедиаПринт, 2011. Т. 1: Растения и грибы. С. 182.
- Сусейкин А. Чилим // В мире растений. 2007. № 11. С. 36–37.
- Hummel M., Kiviat E. Review of world literature on water chestnut with implications for management in North America // The Journal of Aquatic Plant Management. 2004. Vol. 42. P. 17–28.
- Kachare S., Tiwari S., Tripathi N. Morphological and molecular assessment of genetic diversity of water chestnut (*Trapa natans*) from different ponds of central India // World Research Journal of Cell Biology. 2013. Vol. 1. P. 028–031.
- Li X.L. et al. Genetic delimitation and population structure of three *Trapa* taxa from the Yangtze River, China // Aquatic Botany. 2017. Vol. 136. P. 61–70.
- Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // Plant Molecular Biology. 1985. Vol. 5. P. 69–76.

References

- Berestenko Ye.N. [The seeds viability of *Trapa* species of the Primorsky krai under different storage conditions]. *Vestnik Dal'nevostochnogo otdelenija RAN*. V. 2 (2011): pp. 151–154. (In Russ.).
- Hummel M., Kiviat E. Review of world literature on water chestnut with implications for management in North America. *The Journal of Aquatic Plant Management*. V. 42 (2004): pp. 17–28.
- Kachare S., Tiwari S., Tripathi N. Morphological and molecular assessment of genetic diversity of water chestnut (*Trapa natans*) from different ponds of central India. *World Research Journal of Cell Biology*. V. 1 (2013): pp. 028–031.
- Karshina L.Ye., Trofimov M.M. [On the possibility of chilima culture in the Delta of the Volga river]. *Bjulleten' MOIP. Otdelenie Biologii*. V. 56, N 1 (1951): pp. 94–96. (In Russ.).
- Keller V.A., ed. *Dikie s'edobnye rastenija* [Wild edible plants]. Moscow, 1941. 40 p. (In Russ.).
- Kuchеров Ye.V., Muldashev A.A., Galeyeva A.Kh. *Ochrana redkich vidov rastenij na Južnom Urale* [Protection of rare plant species in the South Urals]. Moscow, 1987. 205 p. (In Russ.).

- Kucherov Ye.V. [Fam. Trapaceae]. *Opredelitel' vysšich rastenij Baškirskoj ASSR* [Key to higher plants of the Bashkir ASSR]. Moscow, Nauka Publ., 1989, pp. 148–149. (In Russ.).
- Kucherov Ye.V., Muldashev A.A., Galejeva A.Kh. *Botaničeskie pamjatniki prirody Baškirii* [Botanical monuments of nature of Bashkiria]. Ufa, 1991. 144 p. (In Russ.).
- Kuluev B.R., Artyukhin A.E., Shevchenko A.M., Mikhaylova E.V. [Water chestnut *Trapa* L.: biology, habitat and the study of its isolated populations in the lakes of Nurimanovsky district in the republic of Bashkortostan]. *Biomics*. V. 9, N. 2 (2017): pp. 101–118. (In Russ.).
- Leskov A.P. [Ecology and biology of *Trapa natans* L. (East Transbaikalia)]. *Učenyje zapiski Zabajkal'skogo gosudarstvennogo universiteta. Ser. Biol. nauki*. V. 1 (2010): pp. 140–146. (In Russ.).
- Li X.L., Fan X.R., Chu H.J., Wei Li., Chen Y.Y. Genetic delimitation and population structure of three *Trapa* taxa from the Yangtze River, China. *Aquatic Botany*. V. 136 (2017): pp. 61–70.
- Muldashev A.A. [Water caltrop *Trapa sibirica* Fler.] *Krasnaja kniga Respubliki Baškortostan* [The Red Book of the Republic of Bashkortostan]. V. 1: Rasteniya i griby. Ufa, MediaPrint Publ., 2011, p. 182. (In Russ.).
- Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Molecular Biology*. V. 5, N. 2 (1985): pp. 69–76.
- Siseykin A. [Water caltrop]. *V mire rastenij*. N. 11 (2007): pp.36-37. (In Russ.).
- Vasil'yev V.N. *Vodjanoj orech i perspektivy ego kul'tury v SSSR* [Water caltrop and its culture prospects in the USSR]. Moscow, Leningrad, AN SSSR Publ., 1960. 97 p. (In Russ.).
- Vyazemskaya A., Morozova I.M. *Dinamika populyacii reliktoвого vida Trapa sibirica Fler. na territorii pamjatnika prirody «Ozero Upkannykul'»*. [Population dynamics of the relict species *Trapa sibirica* Fler. on the territory of the monument of nature "Lake Upkankul". Research work of the children's ecological and biological center of the Demsky district of the Ufa city]. Ufa. 2011. 19 p. (In Russ.).

Поступила в редакцию 19.04.2019

Об авторах

Артюхин Александр Евгеньевич, соискатель ФГБОУВО «Башкирский государственный университет»
450076, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Заки Валиди, 32; alextourist0304@rambler.ru

Михайлова Елена Владимировна, кандидат биологических наук, научный сотрудник Института биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН
ORCID: 0000-0001-7374-8405
450054, Уфа, Проспект Октября, 71; mikhele@list.ru; +79991341854

Кулуев Булат Разяпович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией геномики растений Института биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН
ORCID: 0000-0002-1564-164X
450054, Уфа, Проспект Октября, 71; kuluev@bk.ru; +79273563156

Информация для цитирования:

Артюхин А.Е., Михайлова Е.В., Кулуев Б.Р. Исследование изолированных популяций водяного ореха *Trapa sibirica* Fler. (*Lythraceae*) в Республике Башкортостан // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2019. Вып. 3. С. 217–226. DOI: 10.17072/1994-9952-2019-3-217-226.

Artyukhin A.E., Mikhaylova E.V., Kuluev B.R. [Study of isolated populations of the water caltrop *Trapa sibirica* Fler. (*Lythraceae*) in the Republic of Bashkortostan]. *Vestnik Permskogo universiteta. Biologija*. Iss. 3 (2019): pp. 217-226. (In Russ.). DOI: 10.17072/1994-9952-2019-3-217-226.

About the authors

Artyukhin Alexander Evgenievich, applicant Bashkir State University.
450076, Russia, Ufa, st. Zaki Validi, 32.
alextourist0304@rambler.ru

Mikhailova Elena Vladimirovna, candidate of biology, Research Fellow Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center of the RAS.
ORCID: 0000-0001-7374-8405
450054, Russia, Ufa, Prospect Oktyabrya, 71; mikhele@list.ru; +79991341854

Kuluev Bulat Razyapovich, Doctor of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Plant Genomics Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center of the RAS.
ORCID: 0000-0002-1564-164X
450054, Russia, Ufa, Prospect Oktyabrya, 71; kuluev@bk.ru; +79273563156

