

Кариологическое и молекулярно-цитогенетическое изучение видов лиственницы Монголии и Южной Сибири

Karyological and molecular cytogenetical studies on *Larix* species of Mongolia and Southern Siberia

Муратова Е. Н., Горячкина О. В., Седельникова Т. С., Пименов А. В.

Muratova E. N., Goryachkina O. V., Sedel'nikova T. S., Pimenov A. V.

Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Красноярский научный центр СО РАН»,
г. Красноярск, Россия. E-mail: elena-muratova@ksc.krasn.ru, kvitko@ksc.krasn.ru, tss@krasn.ru, pimenov@ksc.krasn.ru
V. N. Sukachev Institute of Forest SB RAS, Federal Research Center «Krasnoyarsk Science Center SB RAS», Krasnoyarsk, Russia

Реферат. Впервые проведены сравнительно-цитогенетические исследования популяций двух видов лиственницы и естественного гибрида между ними из нескольких местопроизрастаний Монголии и прилегающих районов Южной Сибири. Отмечена кариологическая изменчивость в популяциях лиственницы у южной границы ареала, представленная различными типами мутаций – геномными (миксоплоидия, анеуплоидия, добавочные хромосомы) и хромосомными (кольцевые и полицентрические хромосомы, фрагменты, перичентрические инверсии) различного типа. С использованием классических методов и флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) изучен полиморфизм нуклеолярных районов хромосом, выявлены особенности локусов генов 45S и 5S рибосомной РНК лиственниц сибирской и Гмелина. Установлено значительное сходство популяций двух видов лиственницы в Монголии и на прилегающих территориях Южной Сибири по кариологическим признакам. По сравнению с популяциями из центральных частей ареалов частота хромосомных аномалий здесь значительно повышена, что, по-видимому, объясняется экстремальными условиями произрастания.

Ключевые слова. Кариологические особенности, лиственница, нуклеолярные районы, флуоресцентная гибридизация *in situ*, хромосомные мутации, число и морфология хромосом, экстремальные условия.

Summary. For the first time, comparative cytogenetical studies on two larch species populations and a natural hybrid between them from several places in Mongolia and adjacent regions of Southern Siberia have been carried out. Karyotype variability in larch populations at the southern borders of their ranges such as genome (mixoploidy, aneuploidy, B chromosomes) and chromosome mutations (ring and polycentric chromosomes, fragments, pericentric inversions) of different types has been noted. Using classic methods and fluorescence *in situ* hybridization (FISH), a polymorphism of nucleolar regions of chromosomes was studied, characteristics of 45S and 5S of ribosomal DNA loci of Siberian and Gmelin larches were revealed. A significant similarity of two larch species populations in Mongolia and adjacent territories of Southern Siberia on karyological features has been established. In comparison with populations from the central parts of the range, the frequency of chromosome anomalies here is significantly increased, which is apparently explained by extreme environment conditions.

Key words. Chromosome number and morphology, chromosome mutations, extreme conditions, fluorescence *in situ* hybridization, karyological features, *Larix*, nucleolar regions.

Введение. На территории Южной Сибири и Монголии находятся пределы распространения многих лесообразующих видов хвойных, в том числе и лиственницы. Лиственница сибирская *Larix sibirica* Ledeb. произрастает во многих регионах Южной Сибири – на Алтае, в Саянах, Прибайкалье и Южном Забайкалье. Лиственница Гмелина *L. gmelinii* (Rupr.) Rupr. встречается в Средней и Восточной Сибири, за исключением северо-восточной части (Бобров, 1978). В северо-западной Монголии лиственница сибирская является наиболее распространенной древесной породой в горах Хэнтэя и Хангая и занимает около 80 % покрытой лесом территории. Лиственница Гмелина в Монголии занимает небольшую территорию в северо-восточной части страны на горном хребте Эрэн-Даба. В зоне контакта этих двух видов формируются гибридные популяции, объединяемые в комплекс под названием лиственница Чекановского *L. czekanowskii* Szafer. В Южной Сибири и МНР лиственница Чекановского

встречается как самостоятельно, так и совместно с каким-либо исходным видом (Милютин и др., 1988). Большие массивы древостоев лиственницы приурочены к континентальным районам и находятся под воздействием экстремальных условий среды. У них часто образуются изолированные «островные» популяции, в которых формирование структуры популяций имеет свою специфику. Цитогенетические исследования видов у южных пределов произрастания необходимы для познания особенностей их эволюции и разработки практических мероприятий по селекции и семеноводству.

Материалы и методы. Семена лиственницы сибирской для кариологических исследований были собраны в трех местообитаниях Монголии – в центральной части хр. Хангай (Дзавханский и Архангайский аймаки) и в Восточном Хэнтэе в районе с. Мунгун Морьт. Кроме того, анализ популяций этого вида проводился в прилегающих к Монголии районах Тувы (окр. пос. Шагонар, оз. Чагытай), Южного Забайкалья (Бурятия, окр. г. Закаменск), а также в Хакасии (окр. пос. Сонский Богградского р-на, пос. Туим, Соленоозерное и Малчергаш Ширинского р-на). Материал для изучения лиственницы Гмелина был собран в окрестностях с. Баян-Уул (Хэнтийский аймак) Монголии и в Читинской обл. (пос. Карымское); лиственницы Чекановского – в горах Хух Чулуут, около пос. Баян-Адарга МНР. В работе также были использованы данные монгольских исследователей для лиственницы сибирской из Национального парка Богдхан-Уул недалеко от Улан-Батора (Ariunbaatar, Jamyansuren, 2015).

Определение числа и анализ морфологии хромосом, выявление хромосомных перестроек проводилось в меристематических тканях проросших семян (проростков) по стандартным для кариологического изучения хвойных методикам. Семена проращивали в чашках Петри, проростки длиной 0,5–1,0 см обрабатывали 1 % раствором колхицина и фиксировали спиртово-уксусной смесью (3 : 1). Материал окрашивали 1 % раствором ацетогематоксилина после предварительной обработки в 4 % железноаммонийных квасцах. Для исследований использовали давленные препараты: кончик корешка помещали на предметное стекло в насыщенный раствор хлоралгидрата и раздавливали под покровным стеклом. Препараты просматривали под микроскопом (окуляр $\times 10$, объектив $\times 90$). Хромосомы классифицировали по методике В. Г. Грифа и Н. Д. Агаповой (1986). Кроме стандартных методов, был использован метод флуоресцентной гибридизации *in situ* с пробами рибосомных генов 5S и 45S рДНК. Двухцветную FISH проводили по стандартной методике (Badaeva et al., 1996) с некоторыми модификациями (Goryachkina et al., 2013). В работе использовали клонированные последовательности генов рTa794 (5S рДНК) и рTa71 (45S рДНК) пшеницы (Gerlach, Bedbrook, 1979; Gerlach, Dyer, 1980). Пробы метили методом ник-трансляции с использованием наборов для мечения ДНК.

Результаты и обсуждение. Кариологические исследования показали, что популяции *L. sibirica* и *L. gmelinii* Монголии и Южной Сибири содержат по 24 хромосомы ($2n = 2x = 24$) и являются диплоидами с основным числом $x = 12$. В популяциях лиственницы сибирской из Хакасии и лиственницы Гмелина из Читинской области обнаружено по одной добавочной (В-) хромосоме. Во всех изученных происхождениях наблюдалась миксоплоидия: чаще всего наряду с диплоидными клетками с числом хромосом $2n = 24$ встречались тетраплоидные клетки с $2n = 48$. Кроме того, наблюдались миксоплоиды с 24/23, 24/25, 24/25/48, 24/33, 24/36, 24/36/48. У *L. gmelinii* отмечены единичные триплоидные проростки, в которых все доступные для анализа клетки содержали 33 хромосомы ($2n = 33$).

В кариотипах обоих видов выделяются 6 пар длинных метацентрических хромосом (I–VI пары) и 6 пар более коротких субмета- и интерцентрических хромосом (VII–XII пары). Абсолютная длина хромосом первой группы в популяциях лиственницы сибирской составляет от $10,1 \pm 0,13$ до $15,3 \pm 0,19$ мкм; второй группы – от $6,8 \pm 0,07$ до $11,5 \pm 0,21$ мкм. Центромерные индексы (отношение короткого плеча к длине хромосомы) метацентрических хромосом составляют от $44,5 \pm 0,29$ до $47,3 \pm 0,19$ %; субметацентрических от $30,8 \pm 0,34$ до $33,7 \pm 0,26$ %, интерцентрических – от $27,8 \pm 0,39$ до $29,4 \pm 0,40$ %. В некоторых популяциях выделяются пары самых длинных хромосом, а также наиболее асимметричных хромосом среди мета- или субметацентриков. Хромосомные наборы трех видов лиственницы даны на рис. 1.

У лиственницы Гмелина хромосомы первой группы (I–VI пары) имеют длину от $11,1 \pm 0,26$ мкм до $15,1 \pm 0,21$ мкм, центромерный индекс от $46,6 \pm 0,25$ % до $49,2 \pm 0,37$ %. Хромосомы второй группы (VII–XII пары) имеют размеры от $7,6 \pm 0,18$ до $10,1 \pm 0,10$ мкм; центромерный индекс от $30,4 \pm 0,30$ % до $33,0 \pm 0,27$ %. Размеры В-хромосом $4,8 \pm 1,13$ – $5,3 \pm 0,23$ мкм, что составляет около 40 % от средней длины хромосом основного набора. По центромерному индексу добавочные хромосомы *L. gmelinii* метацентрические ($47,4 \pm 1,60$ %) или субметацентрические ($39,9 \pm 1,05$ %); у *L. sibirica* встречались добавочные хромосомы только метацентрического типа.



Рис. 1. Метафазные пластинки трех видов лиственницы: а – *Larix sibirica* Ledeb. ($2n = 24$); б – *L. czekanowskii* Szafer ($2n = 24$); в – *L. gmelinii* (Rupr.) Rupr. ($2n = 24 + 1B$). Добавочная хромосома указана стрелкой. Масштабная линейка 10 мкм.

У *L. sibirica* вторичные перетяжки локализованы на двух парах метацентрических хромосом (III и IV). У *L. gmelinii*, кроме III и IV пар, перетяжка имеется на длинном плече субметацентрической VII пары. У гибрида *L. czekanowskii* из Монголии встречались как кариотипы лиственницы сибирской (без вторичной перетяжки в VII хромосоме), так и лиственницы Гмелина (с перетяжкой в этой хромосоме). Такие же результаты были получены ранее М. В. Круклис (1974) для *L. czekanowskii* из Читинской области. По числу и типам хромосом кариотипы *L. sibirica* и *L. gmelinii* имеют сходство с другими видами рода *Larix* (Šimak, 1966; Ильченко, 1973; Zhang et al., 1985; Li, 1993; Hizume et al., 1995; Wang et al., 1998; Liu et al., 2006), за исключением наличия у изученных видов В-хромосом.

У *L. sibirica* в популяциях Монголии и Южной Сибири наблюдались различные структурные аномалии хромосом: ацентрические кольца, кольцевые и полицентрические хромосомы, кольца, надетые на обычные хромосомы, фрагменты (рис. 2). Отмечено остаточное ядрышко, которое функционирует в метафазе митоза. В насаждениях Хакасии хромосомные мутации чаще всего встречались в семенном потомстве редких и аномальных по габитусу и морфологическим признакам форм. У лиственницы Гмелина выявлены фрагменты, кольцевые и полицентрические хромосомы. В популяции из Читинской обл. отмечена гомозиготная перичентрическая инверсия, затрагивающая субметацентрические VIII и IX пары хромосом; эти хромосомы оказались метацентрическими.

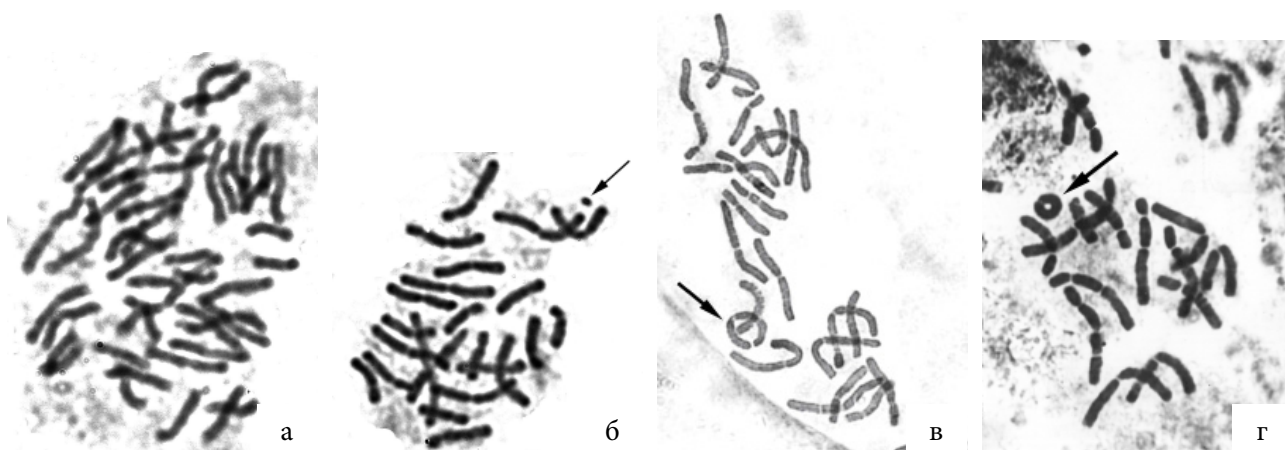


Рис. 2. Хромосомные аномалии у видов лиственницы: а – тетраплоидное число хромосом $2n = 48$ у *L. sibirica* из Хакасии; б – метафазная пластинка с фрагментом у *L. sibirica* из Хакасии; в – кольцевая хромосома у *L. sibirica* из Монголии; г – кольцевая хромосома у *L. gmelinii* из Монголии. Хромосомные мутации указаны стрелками.

Известно, что постоянные вторичные перетяжки хромосом являются ядрышкообразующими районами и местами локализации рибосомных локусов ДНК (Brown, Carlson, 1977). Проведено молекулярно-цитогенетическое исследование геномов *L. sibirica* и *L. gmelinii* методом флуоресцентной

гибридизации *in situ* с пробами 5S и 45S рРНК генов. У *L. sibirica* выявлено два мажорных локуса 45S рДНК в дистальных районах метацентрических хромосом III и IV в местах постоянных вторичных перетяжек. *L. gmelinii* имеет дополнительный мажорный локус 45S рДНК в дистальном районе хромосомы VII, где также находится вторичная перетяжка. Кроме того, на хромосомах обоих видов лиственницы имеются четыре минорных локуса 45S рДНК в перичентромерных локусах трех пар метацентриков (I, II, VI) и у наиболее коротких субметацентриков (XII пара). Сайт 5S рДНК у лиственниц сибирской и Гмелина находится на хромосоме III, которая на другом плече несет локус 45S рДНК. После гибридизации *in situ* в перичентромерных районах хромосом проявляются DAPI-бэнды, которые позволяют идентифицировать гомологичные пары (рис. 3). Особенно выделяются широкие полосы этого рисунка в проксимальных районах обоих плеч хромосомы II. DAPI-бэнды субметацентриков, локализованные в перичентромерных районах коротких плеч, были значительно менее контрастными. Рисунок DAPI-бэндинга в целом у двух видов сходный с некоторыми различиями по локализации на длинных и коротких плечах хромосом.

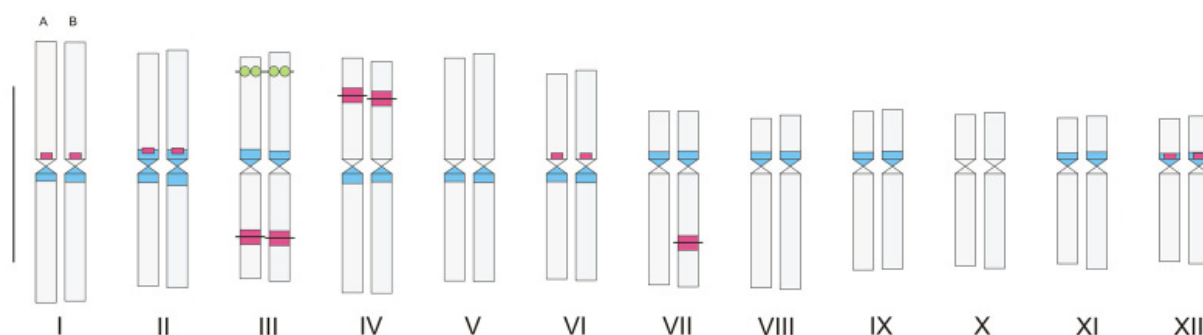


Рис. 3. Сравнительная идиограмма *Larix sibirica* Ledeb. (A) и *L. gmelinii* (Rupr.) Rupr. (B) с локализацией генов 45S рРНК (красный цвет), 5S рРНК (зеленый цвет) и DAPI-бэндов (голубые полосы) на метафазных хромосомах. I–XII – номера хромосом. Масштабная линейка 10 мкм.

В интерфазных ядрах лиственницы сибирской максимально содержится, как правило, до 4 ядрышек; поскольку они часто сливаются, то в разных ядрах их может быть от 1 до 4. Но большинство клеток содержит 3 ядрышка, а среднее значение составляет $2,9 \pm 0,03$. У лиственницы Гмелина содержится от 1 до 6 ядрышек, чаще всего наблюдается 3 или 4 ядрышка, среднее – $3,9 \pm 0,08$. Анализ количества ядрышек в ядрах показал, что у *L. sibirica* и *L. gmelinii* функционально активными могут быть все ядрышкообразующие районы хромосом, соответствующие мажорным сайтам 45S рДНК. Наличие единичных клеток с 5 ядрышками у лиственницы сибирской и с 7 ядрышками у лиственницы Гмелина, свидетельствует о возможной активации минорных локусов 45S рДНК.

Таким образом, в популяциях лиственниц сибирской и Гмелина из Монголии и Южной Сибири отмечены миксоплоидия и анеуплоидия, многочисленные структурные аномалии хромосом. По сравнению с популяциями из центральных частей ареалов частота хромосомных аномалий здесь значительно повышена, что, по-видимому, связано с экстремальными условиями произрастания. По многим цитогенетическим признакам, таким как число нуклеолярных районов в хромосомах, ядрышек в интерфазных ядрах, сайтов 45S рДНК и 5S рДНК и другим, монгольские популяции видов лиственницы имеют сходство с южно-сибирскими. Во многом это объясняется общностью территорий Монголии и Южной Сибири и флористической близостью регионов, составляющих единую монголо-южносибирскую группу (Малышев, 1965).

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ИЛ СО РАН, проект № FWES 2024-0028. Авторы выражают особую благодарность нашей коллеге д.б.н. Е. Д. Бадаевой из Института общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН за помощь в разработке FISH протокола применительно к хвойным.

ЛИТЕРАТУРА

- Бобров Е. Г. Лесообразующие хвойные СССР. – Л.: Наука, 1978. – 189 с.
 Ильченко Т. П. Сравнительный кариологический анализ лиственниц Приморья // Лесоведение, 1973. – № 6. – С. 69–72.
 Гриф В. Г., Агапова Н. Д. К методике описания кариотипов растений // Бот. журн., 1986. – Т. 71, № 4. – С. 550–553.

- Круклис М. В.** Кариологические особенности лиственницы Чекановского (*Larix czekanowskii* Sz.) // Изменчивость древесных растений Сибири // Красноярск, 1974. – С. 11–19.
- Мальшиев Л. И.** Высокогорная флора Восточного Саяна. – М.–Л.: Наука, 1965. – 367 с.
- Милютин Л. И., Сунцов А. В., Жамъянсурен С.** Генетико-селекционные особенности основных лесообразующих пород Восточного Хэнтэя // Леса МНР. Лиственничные леса Восточного Хэнтэя. – М.: Наука, 1988. – С. 75–120.
- Ariunbaatar T., Jamiyansuren S.** Seeds and karyological study of Siberian larch (*Larix sibirica* Ldb.) from Bogd Khan mountain // Ecosystems of Central Asia under current conditions of socio-economic development. Proc. Inter. Conf. (September 8–10, 2015, Ulaanbaator, Mongolia). – Ulaanbaator, 2015. – Vol. 1. – P. 63–66.
- Badaeva E. D., Friebe B., Gill B. S.** Genome differentiation in *Aegilops*. I. Distribution of highly repetitive DNA sequences on chromosomes of diploid species // Genome, 1996. – Vol. 39, N 2. – P. 293–306. DOI: 10.1139/g96-04
- Brown G. R., Carlson J. E.** Molecular cytogenetics of the genes encoding 18s-5.8s-26s rDNA and 5s rRNA in two species of spruce (*Picea*) // Theoretical and Applied Genetics, 1997. – Vol. 95, N 1–2. – P. 1–9.
- Gerlach W. L., Bedbrook J. R.** Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley // Nucleic Acids Research, 1979. – Vol. 7, N 7. – P. 1869–1885.
- Gerlach W. L., Dyer T. A.** Sequence organization of the repeated units in the nucleus of wheat which contain 5S rRNA genes // Nucleic Acids Research, 1980. – Vol. 8, N 21. – P. 4851–4865.
- Goryachkina O. V., Badaeva E. D., Muratova E. N., Zelenin A. V.** Molecular cytogenetic analysis of Siberian *Larix* species by fluorescence in situ hybridization // Plant Systematics and Evolution, 2013. – Vol. 299, N 2. – P. 471–479. DOI: 10.1007/s00606-012-0737-y
- Hizume M., Kuzukawa Y., Kondo K., Yang Q., Hong D., Tanaka R.** Localization of rDNAs and fluorescent bandings in chromosomes of *Larix potaninii* var. *macrocarpa* collected in Sichuan, China // La Kromosomo, 1995. – Vol. II, N 78. – P. 2689–2694.
- Li L.-ch.** Karyotype studies and systematic position of *Larix* Mill. (Pinaceae) // Acta Phytotaxonomica Sinica, 1993. – Vol. 31, N 5. – P. 405–412.
- Liu B., Chen Ch.-b., Li X.-L., Zhang Sh.-g., Qi L.-w., Han S.-y.** The karyotype analysis of some *Larix* Mill. // Guihaia, 2006. – Vol. 26, N 2. – P. 187–191.
- Šimak M.** Karyotype analysis of *Larix griffithiana* Carr. // Hereditas, 1966. – Bd. 56, Hf. 1. – S. 137–141.
- Wang G., Xu A.-s., Cai X.-x., Li L.-c.** Karyotype analysis of *Larix chinensis* Meissn. and *L. griffithiana* Hort. // Journal of Fudan University, Natural Sciences, 1998. – Vol. 37, N 4. – P. 481–484.
- Zhang X. F., Zhuo L. N., Li M. X.** A study of karyotypes of 5 species in *Larix* // Hereditas (Beijing), 1985. – Vol. 7, N 3. – P. 9–11.