

АНАЛИЗ КАРИОТИПА ЛИСТВЕННИЦЫ ГМЕЛИНА (*LARIX GMELINII*)

Сычева Е. В.¹, Квитко О. В.²

Научный руководитель – д. б. н. Муратова Е. Н.

¹Сибирский федеральный университет

²Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН

Лиственница Гмелина (*Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr.) является одним из основных лесообразующих видов Восточной Сибири. Несмотря на широкое распространение и большую экологическую значимость, генетическое разнообразие данного вида изучено недостаточно. Кариологические исследования являются составной частью изучения генетических ресурсов и необходимы для использования генофонда мирового разнообразия хвойных. Кариотип лиственницы Гмелина ранее изучался в Эвенкии, Читинской области и Монголии. Между тем, у видов с обширным ареалом может наблюдаться межпопуляционная кариотипическая изменчивость, для выявления которой необходимо изучение структуры кариотипа в разных районах естественного распространения вида. Результаты кариологических исследований широко применяются при изучении биоразнообразия растений, структуры и состава популяций, помогают понять процессы микроэволюции и видообразования.

Работа с хромосомами *Larix* представляет большие сложности из-за сходства кариотипов разных видов и отсутствия методов дифференциального окрашивания. Метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) позволяет картировать определенные последовательности ДНК на хромосомах с помощью различно окрашенных маркеров. Анализ локализации маркеров на хромосомных плечах помогает идентифицировать хромосомы в кариотипе и подбирать пары гомологов. Применение этого метода для хвойных открывает ряд новых возможностей при анализе генетического разнообразия, внутривидовой и межвидовой дифференциации.

Целью работы являлось изучение кариотипа лиственницы Гмелина с использованием стандартных для хвойных методик и FISH с пробами рибосомных генов 5S и 45S рРНК. В качестве материала для исследований использовали семена *L. gmelinii* из Олекминского улуса (Западная Якутия).

Всего было исследовано более 140 проростков лиственницы Гмелина. Хромосомный набор данного вида содержит 24 хромосомы ($2n=24$). В результате исследований у *L. gmelinii* выявлен высокий уровень миксоплоидии. 39,1 % проростков содержали единичные клетки с измененным числом хромосом: 12/24 (2,9 %); 24/26 (1,4 %); 24/25/48; 12/24/48 (1,4 %). Кроме того, 21,7 % проростков содержали клетки с различными типами хромосомных мутаций. Были обнаружены хромосомные фрагменты, ацентрические кольца, кольцевые и дицентрические хромосомы. Такие аномалии задерживают клеточный цикл, приводят к потере генетического материала и формированию клеток с измененным числом хромосом. Общая частота встречаемости клеток с хромосомными перестройками у лиственницы Гмелина составила 2,1 %. Все аномалии относятся к общему типу и ранее отмечались как у данного вида, так и у других видов хвойных.

Для исследования кариотипа лиственницы Гмелина использовали 63 метафазные пластинки, для статистической обработки были отобраны 39 пластинок с интервалом суммарной длины от 235 до 285 мкм. Суммарная длина хромосом всех

исследованных пластинок варьировала от 206,9 до 311,7 мкм и в среднем составила $262,2 \pm 3,15$ мкм (коэффициент вариации 8,9 %).

На поликариограмме видны две группы точек (рис 1). В соответствии с этим, в кариотипе лиственницы Гмелина были выделены две группы хромосом: 6 пар длинных метацентрических (I-VI) и 6 пар более коротких субмета- и интерцентрических (VII-XII) хромосом. Морфометрические параметры выделенных групп хромосом представлены в таблице.



Рис. 1. Поликариограмма лиственницы Гмелина из Якутии.

Таблица. Морфометрические параметры хромосом лиственницы Гмелина

Группы хромосом	Абсолютная длина (L^a), %		Относительная длина (L^r), %		Центромерный индекс (I^c), %	
	M+m	CV, %	M+m	CV, %	M+m	CV, %
I-VI	$13,16 \pm 0,09$	12,2	$5,03 \pm 0,03$	10,95	$46,73 \pm 0,13$	4,98
VII-VIII	$9,7 \pm 0,07$	7,49	$3,7 \pm 0,02$	4,91	$32,24 \pm 0,14$	7,15
IX-XII	$8,15 \pm 0,05$	9,4	$3,11 \pm 0,02$	8,14	$32,34 \pm 0,14$	6,65

В пределах указанных групп отдельные хромосомы не идентифицируются. Постоянные вторичные перетяжки, наблюдавшиеся более чем в 50 % метафазных пластинок, содержат две пары метацентрических хромосом. Они локализованы в дистальных районах хромосомных плеч. В медиальном районе плеча IV пары хромосом наблюдается непостоянная вторичная перетяжка с частотой встречаемости 38,7 %. VII пара субметацентрических хромосом также содержит непостоянную вторичную перетяжку в дистальном районе длинного плеча. Известно, что некоторые вторичные перетяжки являются ядрышкообразующими районами и местом локализации рибосомных локусов ДНК. Идиограмма хромосом лиственницы Гмелина из Якутии с учетом выделенных групп хромосом и распределения вторичных перетяжек приведена на рисунке 2.

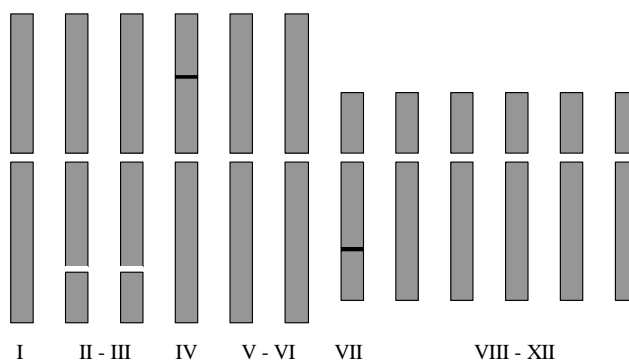


Рис. 2. Идиограмма хромосом лиственницы Гмелина из Якутии. I-XII – номера хромосом. Неокрашенным блоком показаны постоянные вторичные перетяжки,

черным блоком – непостоянные.

Для исследования ядрышкообразующих районов хромосом нами был использован метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). В качестве маркеров использовались пробы рибосомных генов 5S и 45S рРНК (рис. 3.).

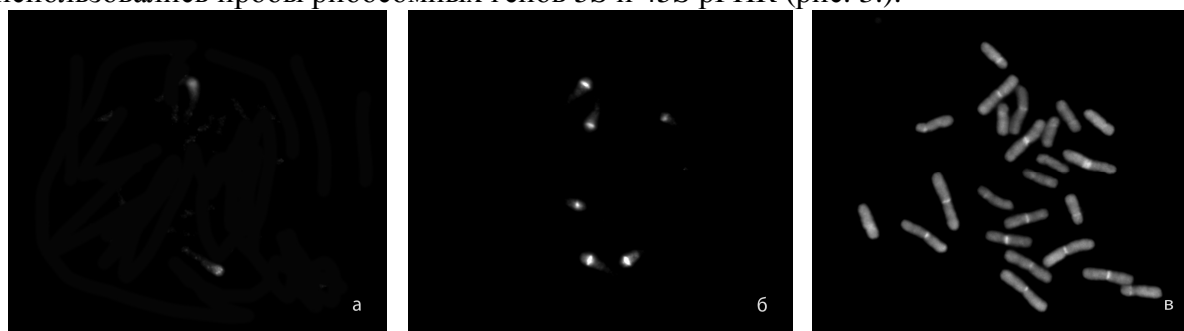


Рис. 3. Гибридизация *in situ* с пробами генов 5S (а) и 45S (б) рРНК на хромосомах *L. gmelinii* (в, DAPI-окраска)

Сигналы 45S рДНК выявлены на семи парах хромосом, они значительно различались по интенсивности и району локализации. Более выраженные (мажорные) локусы 45S рДНК обнаружены в дистальных районах трех пар хромосом: на коротких плечах IV пары, на длинных плечах III и VII пар. Менее выраженные (минорные) сайты 45S рДНК выявлены в перичентромерных районах хромосомных пар I, II, VI и XII. Локусы 5S рДНК локализованы терминально на одной паре метацентриков (III).

Таким образом, мажорные сайты 45S рДНК совпадают с районами локализации постоянных вторичных перетяжек и являются ядрышкообразующими районами (ЯОР) хромосом. Морфологическим выражением активности ядрышкового организатора является ядрышко – специализированный пуф, образующийся в телофазе митоза. Известно, что функционально активные ЯОР специфически окрашиваются нитратом серебра, которое взаимодействует с рибонуклеиновыми продуктами их транскрипционной активности. Окрашивание цитологических препаратов листовенницы Гмелина нитратом серебра показало, что функционально активными могут быть все мажорные сайты 45S рДНК, поскольку максимальное количество ядрышек равно 6 (рис. 4). В большинстве клеток содержится $3,72 \pm 0,03$ ядрышка.

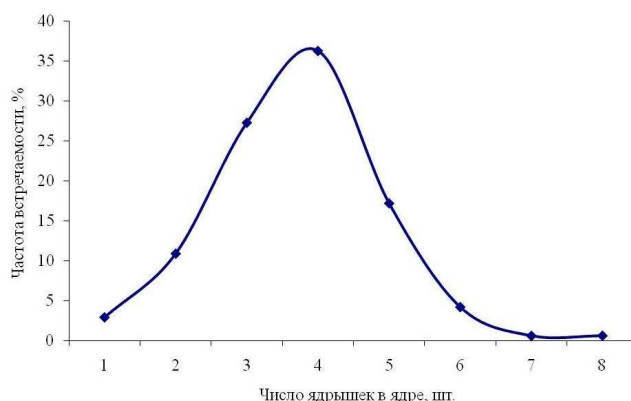


Рис. 4. Анализ ядрышек в интерфазных ядрах

Таким образом, проведенные исследования позволяют сделать следующие выводы:

1. В диплоидном наборе лиственницы Гмелина содержится 24 хромосомы. Частота встречаемости миксоплоидных проростков, содержащих единичные клетки с измененным числом хромосом ($2n=12$, $2n=26$, $2n=48$) у лиственницы Гмелина выше, чем у других видов хвойных по литературным данным, и составляет 39,1 %.
2. Частота встречаемости клеток с хромосомными мутациями у лиственницы Гмелина составляет 2,1 % и соответствует уровню естественного мутагенеза, установленному для других видов хвойных.
3. Кариотип изученной популяции содержит 6 пар (I-VI) длинных метацентрических и 6 пар (VII-XII) более коротких субмета- и субacroцентрических хромосом. В пределах выделенных групп хромосомы имеют сходные морфометрические параметры.
4. Использование FISH с пробами рибосомных генов показало, что у лиственницы Гмелина локусы 5S рДНК расположены терминально на коротком плече III пары хромосом. Гены 45S рРНК локализованы в дистальных районах III, IV и VII пар хромосом и соответствуют постоянным вторичным перетяжкам. Минорные сигналы 45S рДНК наблюдаются в перицентромерных районах I, II, VI, XII пар хромосом.
5. Максимальное количество ядрышек в интерфазных ядрах лиственницы Гмелина равно 6, что соответствует числу постоянных вторичных перетяжек и свидетельствует о функциональной активности мажорных локусов 45S рДНК.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (проект № 11-04-00063).