

ФОРМОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И КАРИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЛИСТВЕННИЦЫ СИБИРСКОЙ (*LARIX SIBIRICA* LEDEB.) ЮГА СИБИРИ

УДК 630.17:576.316.353.7:582.475

© О.А. Сизых, О.В. Квитко, Е.Н. Муратова, И.В. Тихонова

Институт леса им. В. Н. Сукачева СО РАН, Красноярск, Россия

Работа поддержана РФФИ (грант № 06-04-81026), ККФН-РФФИ «Енисей-2005» (грант № 05-04-97717), Интеграционным проектом СО РАН № 5.18, Программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Биоразнообразие и динамика генофондов растений, животных и человека».

Лиственница сибирская характеризуется высокими показателями роста и устойчивостью к неблагоприятным факторам окружающей среды, включая и сухие условия степей. Изучен кариотип *Larix sibirica* Ledeb. в условиях Хакасии (природная популяция и искусственное насаждение). Хромосомный набор ( $2n=24$ ) содержит 6 пар метацентрических (I-VI), 1 пару интерцентрических (VII) и 5 пар субметацентрических (VIII-XII) хромосом. В природной популяции обнаружена добавочная хромосома. Установлена локализация вторичных перетяжек и различия по данному признаку в двух популяциях. Количество ядрышек в интерфазных ядрах варьирует от 1 до 6. Наряду с типичным набором хромосом выделены хромосомные и геномные (миксоплоидия) мутации, а также митотические нарушения.

*Larix sibirica* L. is characterized by high values of growth and sustainability to unfavorable environmental factors including arid conditions of steppe. Karyotype of *Larix sibirica* Ledeb. was studied in natural and artificial populations of Khakasia. Chromosome set ( $2n=24$ ) consist of 6 pairs of metacentric (I-VI), 1 pair of intercentric (VII) and 5 pairs of submetacentric (VIII-XII) chromosomes. B-chromosome was found in natural population. Difference in localization of secondary constrictions and numbers of nucleoli in the interphase nuclei were determined. Chromosome and genome mutations, mitotic pathologies were revealed in the both populations.

**Введение**

Предполагаемое в ближайшее время изменение климата, уничтожение лесов может привести к смещению границ лесной и лесостепной зоны, усилению дефляционных процессов. Особенно сильно это может коснуться степных районов Сибири, где ветровая эрозия является одной из причин гибели растений. Так как в последние десятилетия интенсивная эксплуатация лесов в лесостепной зоне привела к их массовому уничтожению на большой территории, а естественное лесовосстановление здесь затруднено, лесостепные экосистемы

нуждаются в искусственном облесении нарушенных участков. Поэтому возникает необходимость подбора быстрорастущих, долговечных и устойчивых древесных видов, к которым относится лиственница сибирская (*Larix sibirica* Ledeb.). Вид имеет большой ареал и является одним из немногих, способных расти в условиях сухой Ширинской степи. Лиственница сибирская занимает около 13% лесопокрытой площади в Хакасии [8].

В нашей стране накоплен богатый опыт степного лесоразведения, основанный на изучении динамики роста деревьев, их изменчивости и адаптации под влиянием

отбора в неблагоприятных условиях окружающей среды. Существует необходимость повышения продуктивности и устойчивости лесов, что тесно связано с изучением, сохранением и использованием генетического потенциала лесных древесных растений, их формового разнообразия и экологической изменчивости в жестких климатических условиях. Известно, что рост деревьев и способность адаптироваться к изменяющимся условиям среды во многом зависит от его генотипических особенностей.

Кариологический анализ лиственницы сибирской позволяет изучать механизмы и генетические процессы, лежащие в основе успешного приспособления и выживания лиственницы в неблагоприятных условиях обитания. Изучение генетических особенностей лиственницы и ее формового разнообразия позволит выявить наиболее подходящие из них для создания устойчивых лесных защитных или рекреационных насаждений.

#### **Материал и методы**

Объектом исследования служили популяции лиственницы сибирской в Хакасии: природная в Туиме и искусственное насаждение в Ширинской степи. В каждой популяции было отобрано по 30 деревьев. Для определения формы лиственницы с каждого дерева собирали по 15-20 шишек в средней части кроны. Выделяли три формы деревьев по окраске шишек: 1 - красная, 2 - красно-зеленая (переходная), 3 - зеленая.

В обеих популяциях был собран семенной материал. Семена очищали от крылаток, проращивали в чашках Петри. Кариологический анализ проводился на меристематических тканях кончиков корешков проросших семян. Обработка материала, окрашивание, приготовление препаратов производились по общепринятой для хвойных методике [23]. После предварительной обработки 1%-ным раствором колхицина в течение 4-6 часов проростки фиксировали спиртово-уксусной смесью (3:1), окрашивали ацетогематоксилином и готовили давленные препараты стандартным способом. Ядрышки окрашивали 50%-м раствором азотнокислого серебра при температуре 60° С в течение 5-6 часов [21].

Цитологические препараты просматривали под микроскопом МБИ-6. Пластинки с хорошим разбросом хромосом фотографировали в иммерсионной системе, определяли число хромосом. Хромосомы

измеряли на микрофотографиях: определяли абсолютную ( $L^a$ , мкм) и относительную ( $L^r$ , %) длину хромосомы, центромерный индекс ( $I^c$ , %), как отношение короткого плеча к длине хромосомы и суммарную длину набора ( $\Sigma L^a$ , мкм). У хромосом с вторичными перетяжками вычисляли локализацию перетяжки - отношение расстояния от перетяжки до центромеры к длине плеча ( $sc$ , %). Классификацию хромосом по центромерному индексу производили в соответствии с рекомендациями В.Г. Грифа и Н.Д. Агаповой [1986]. Уровень изменчивости признаков определяли по шкале С.А. Мамаева [1972]. Статистическая обработка данных проводилась по общепринятым методикам [13].

#### **Результаты и их обсуждение**

Отмечено, что на территории Красноярского края (как и в других регионах) у лиственницы сибирской выделены следующие формы по цвету молодых женских шишек: красно- и зеленошишечные, а также переходные. Эти формы встречаются практически повсеместно, но их соотношение специфично для каждой популяции. Отмечено, что в популяциях сибирской лиственницы преобладают красношишечные особи, которые в ряде случаев составляют свыше 90 % всех деревьев, зеленошишечные формы встречаются редко [7, 11]. Литературные данные о скорости роста разных форм противоречивы. Одни авторы [1, 2] считают наиболее быстрорастущей зеленошишечную форму лиственницы сибирской, другие полагают, что показатели роста этих форм довольно близки, а наиболее быстрорастущие особи чаще встречаются среди переходных по цвету шишек форм [7]. Кроме того, некоторые авторы считают, что деревья красношишечной формы лиственницы сибирской имеют семеношение более обильное, чем деревья зеленой формы [14].

В результате проведенных исследований установлено, в насаждениях лиственницы сибирской в Хакасии преобладает форма лиственницы с красной окраской шишек (рисунок 1). В лесополосе она составляет 80%. Зеленошишечная форма встречается редко и составляет 9%. Деревья с переходной окраской шишек (красно-зеленой) составляют 11%. В природной популяции также преобладает красношишечная форма лиственницы. Она составляет 79%, переходная форма - 15% и зеленошишечная - 6%.

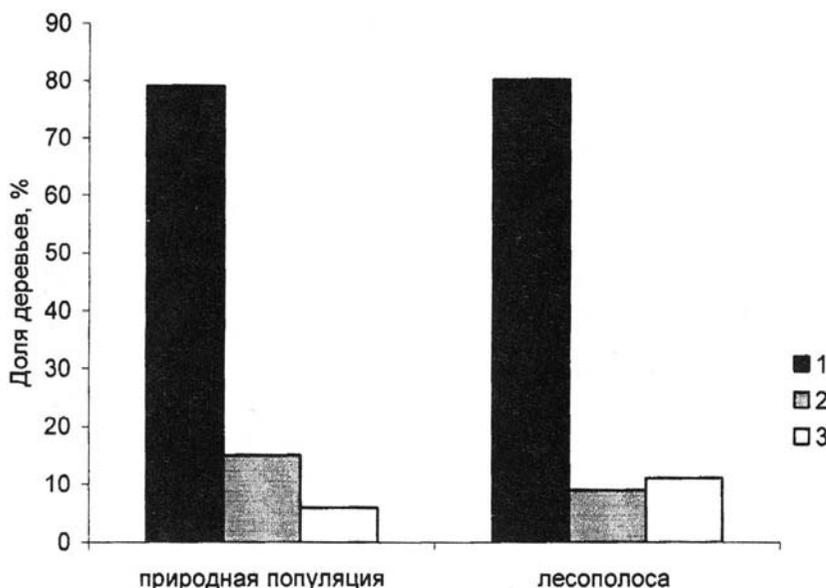


Рисунок 1 - Число деревьев в насаждениях, различающихся по окраске шишек: 1 - красная, 2 - переходная (красно-зеленая), 3 - зеленая.

Проведенный кариологический анализ показал, что в диплоидном наборе лиственницы сибирской на изучаемой территории содержится 24 хромосомы ( $2n=24$ ,

рисунок 2а), что согласуется с ранее полученными результатами исследований популяций вида [3, 10, 17, 18].



Рисунок 2 - Метафазные пластинки лиственницы сибирской: а - норма ( $2n=24$ ), б - анеуплоидная клетка ( $2n=25$ ), в - фрагмент пластинки с добавочной хромосомой (В-хромосома указана стрелкой).

В некоторых проростках была выявлена миксоплоидия: отдельные клетки имели удвоенный набор  $2n=48$ , также отмечены единичные анеуплоидные клетки с  $2n=23$  и  $2n=25$  (рисунок 2б). Считается, что миксоплоидия может наблюдаться при изменении и особенно резком ухудшении условий произрастания и, возможно, таким образом, выражается адаптация растений к неблагоприятным факторам среды [12]. Частота встречаемости клеток с измененным числом хромосом - по обеим популяциям не превышает 1,1%.

При изучении образцов из природной популяции была обнаружена В-хромосома

метацентрического типа (рисунок 2в). В-хромосомы хорошо отличаются от хромосом основного кариотипа меньшей величиной. Они довольно часто встречаются в кариотипе некоторых видов рода *Picea*, а среди видов рода *Larix* отмечались в единичных случаях у *L. gmelinii* и *L. sukaczewii* [19, 20, 26]. Роль В-хромосом у хвойных пока неизвестна, но предполагается, что они оказывают влияние на адаптацию и жизнеспособность организмов к неблагоприятным условиям среды [5, 22].

Суммарная длина хромосом ( $\Sigma L^a$ ) лиственницы сибирской в искусственном насаждении варьирует от 172,4 до 335,11 мкм, среднее значение  $\Sigma L^a=253,68 \pm 6,79$  мкм

( $Cv=10,3\%$ ). В природной популяции  $\Sigma L^a$  от 266,65 до 380,03 мкм. Среднее значение  $\Sigma L^a=310,52\pm 4,7$  мкм ( $Cv=8,14\%$ ). Для вычисления средних морфометрических показателей хромосом, построения поликариограмм и идиограмм отбирали

пластинки, попадающие в интервал спирализации  $\Sigma L^a=250-300$  мкм для Ширинской популяции лиственницы и  $\Sigma L^a=280-340$  мкм - для природной популяции (рисунок 3).

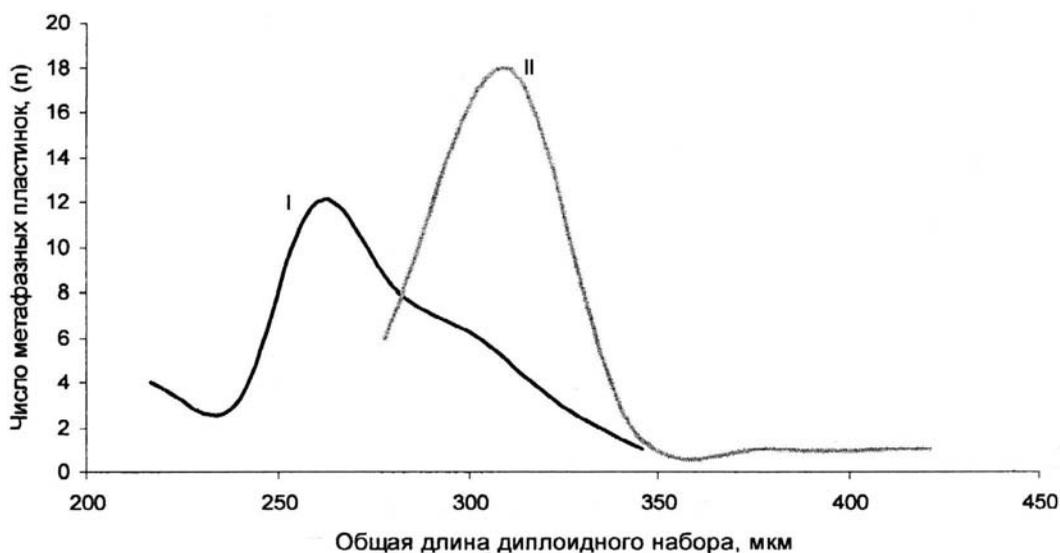


Рисунок 3 - Вариация суммарной длины набора хромосом лиственницы сибирской (I - искусственное насаждение, II - природная популяция)

С помощью метода поликариограммного анализа в обеих популяциях было выделено 3 группы хромосом (рисунок 4). I-VI пары длинных метацентрических хромосом объединяются в группу со сходными параметрами, отдельно идентифицируется VII пара интерцентриков, и третью группу (VIII-XII) составляют короткие субметацентрические хромосомы. Данные поликариограммного анализа позволили построить систематизированный кариотип лиственницы сибирской (рисунок 5).

Некоторые авторы [10, 16, 17, 18] выделяют в кариотипе лиственницы сибирской 2 группы хромосом: I-VI пары длинных метацентриков и VII-XII пары коротких субметацентриков. По данным других авторов [25] в кариотипе лиственницы сибирской отдельно выделяется VII пара интерцентрических хромосом. В таблице 1 представлена сравнительная характеристика морфологических параметров хромосом трех групп в двух популяциях. Различия по относительной длине и центромерному индексу между выделенными группами

хромосом статистически достоверны (для проверки достоверности различий использовался *t*-критерий Стьюдента).

Вторичная перетяжка является очень важным локусом хромосомы. У большинства растений в районе вторичной перетяжки находится ядрышковый организатор [9]. Здесь локализуются гены рибосомной РНК. Морфологическим выражением активности этих генов является образование ядрышек в телофазе митоза.

Установлено, что в кариотипе лиственницы в изученных популяциях на территории Ширинской степи две пары метацентриков (II и III по средним параметрам) имеют вторичные перетяжки в дистальных районах на длинном плече, IV пара метацентриков имеет перетяжку в медиальном районе на длинном плече. Также у VIII пары субметацентрических хромосом отмечена вторичная перетяжка в медиальном районе длинного плеча. Кроме того, в кариотипе лиственницы из природной популяции отмечена перетяжка в дистальном положении на длинном плече у VII пары интерцентриков.

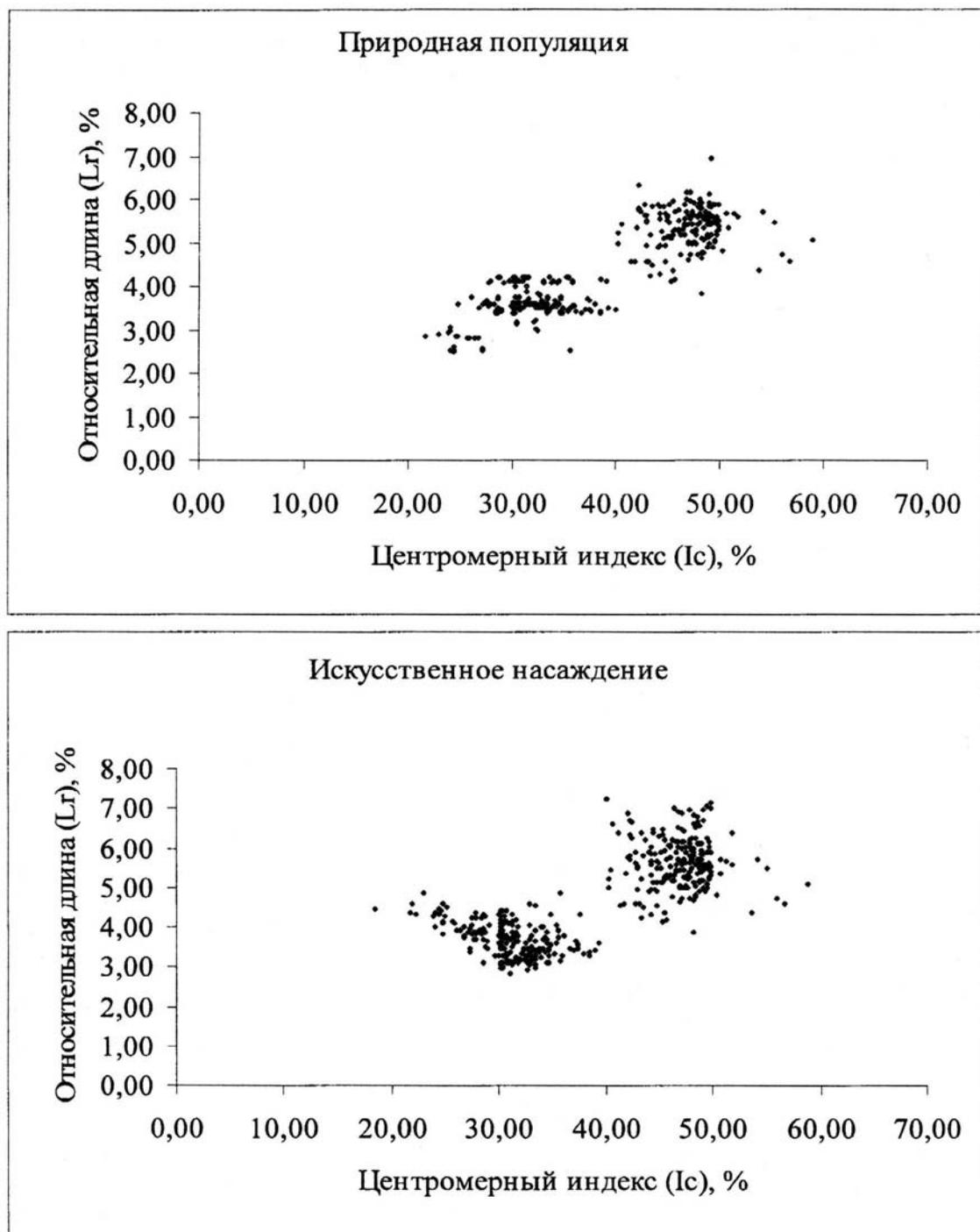


Рисунок 4 - Поликариограмма хромосом лиственницы сибирской в природной популяции и искусственном насаждении.

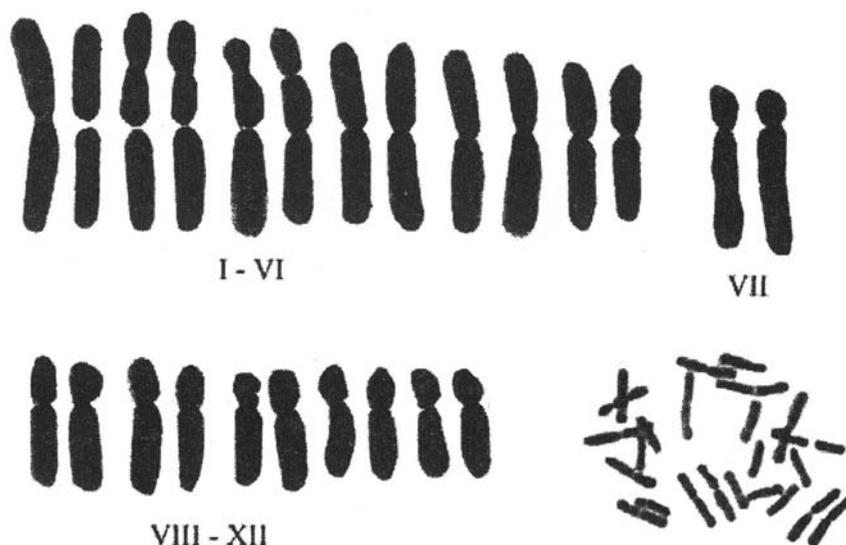


Рисунок 5 - Кариотип лиственницы сибирской, систематизированный по результатам поликариограммного анализа ( $2n=24$ )

Таблица 1 - Морфометрические параметры хромосом лиственницы сибирской

Номера хромосом	Абсолютная длина ( $L^a$ ), мкм		Относительная длина ( $L^r$ ), %		Центромерный индекс ( $I^c$ ), %	
	$x \pm mx$	CV, %	$x \pm mx$	CV, %	$x \pm mx$	CV, %
Искусственное насаждение						
I-IV	$13,74 \pm 0,1$	11,2	$5,65 \pm 0,04$	11,2	$47,03 \pm 0,18$	6
VII	$9,74 \pm 0,11$	9,02	$4 \pm 0,04$	9,02	$26,72 \pm 0,29$	8,9
VIII-XII	$8,8 \pm 0,08$	12,9	$3,62 \pm 0,03$	12,9	$32,41 \pm 0,17$	7,03
Природная популяция						
I-IV	$15,3 \pm 0,19$	17,9	$3,12 \pm 0,04$	22,1	$45,76 \pm 0,23$	7,2
VII	$11,5 \pm 0,21$	15,7	$3,01 \pm 0,08$	22,9	$27,38 \pm 0,25$	7,7
VIII-XII	$10,37 \pm 0,15$	17,3	$3,11 \pm 0,06$	23,3	$33,75 \pm 0,23$	8

Анализ образцов показал, что в популяциях 37,7 % метафазных пластинок имеет по 4 хромосомы с вторичными перетяжками, 25% - по 5 хромосом, 21% - по 6 хромосом с вторичными перетяжками, остальные - 1, 2, 3 перетяжки. В редких случаях (2%) отмечены пластинки, в хромосомах которых вторичные перетяжки не просматривались.

Результаты изучения морфометрических параметров хромосом, распределение вторичных перетяжек и выделение на поликариограмме трех групп хромосом позволили построить сравнительную идиограмму лиственницы сибирской в искусственном насаждении и природной популяции (рисунок 6).

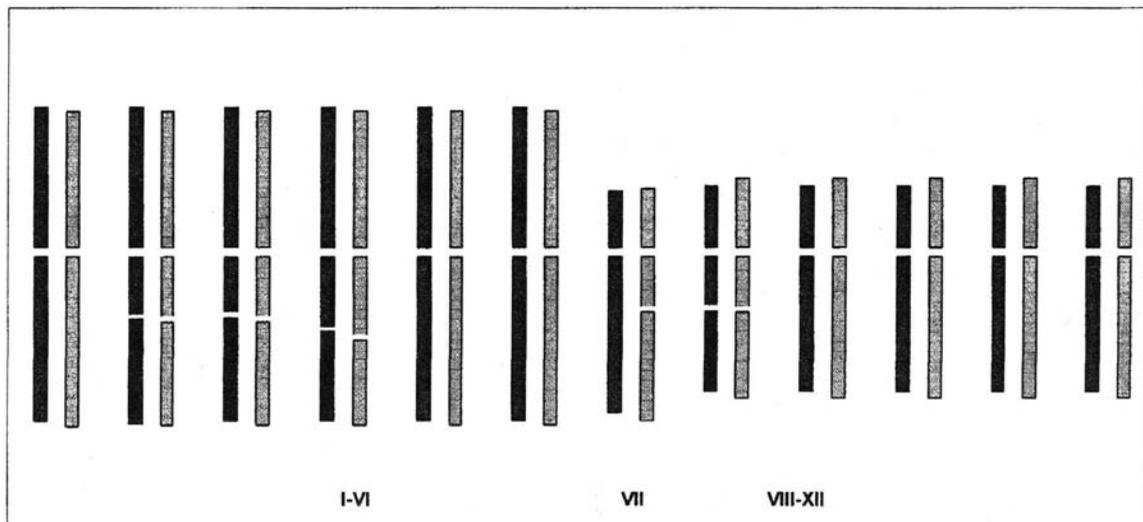


Рисунок 6 - Сравнительная идиограмма лиственницы сибирской: I-XII - номера хромосом.

Отмечено, что в кариотипе лиственницы сибирской в лесополосе имеется 4 пары хромосом с вторичными перетяжками, а в природной популяции - 5 пар. Количество ядрышек в интерфазных ядрах в данных популяциях колеблется от 1 до 6 (рисунок 7).

Среднее число ядрышек в ядрах лиственницы составляет в лесополосе -  $3,4 \pm 0,04$ , в природной популяции -  $2,8 \pm 0,06$ . Разное число ядрышек в интерфазных ядрах представлено на рисунок 8.

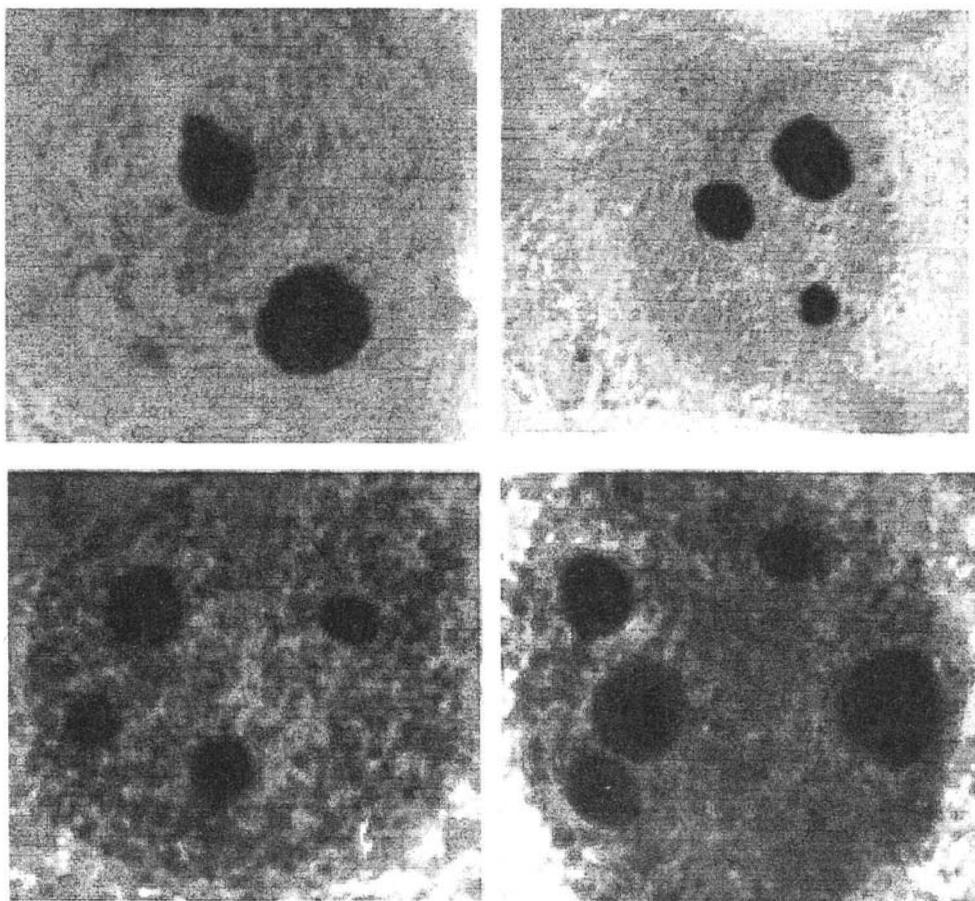


Рисунок 7 - Разное число ядрышек в интерфазных ядрах лиственницы сибирской.

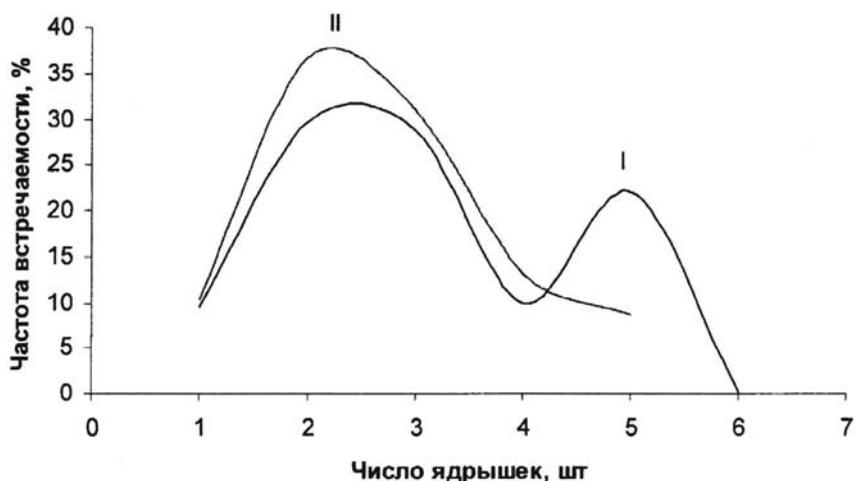


Рисунок 8 - Разное число ядрышек в интерфазных ядрах лиственницы сибирской.

По литературным данным известно, что максимальное число ядрышек у лиственницы сибирской может достигать 6-8 [25]. Существует мнение, что высокое число вторичных перетяжек и ядрышек, возможно, может играть адаптивную роль для растений в неблагоприятных климатических условиях [4, 24].

В популяциях лиственницы сибирской были выявлены хромосомные перестройки, представленные фрагментами, кольцевыми хромосомами, ацентрическими кольцами, а также кольцевыми хромосомами, надетыми на обычные палочковидные. Некоторые типы аномалий представлены на рисунок 9.

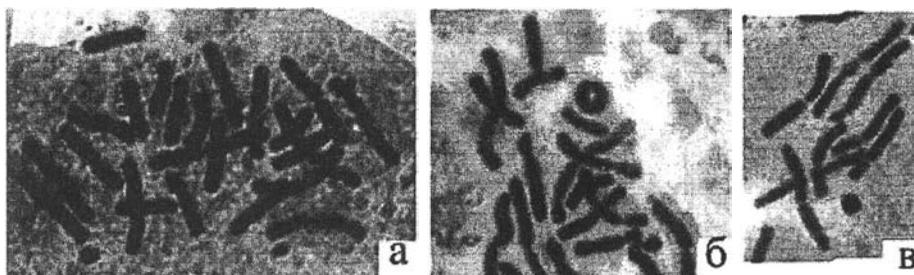


Рисунок 9 - Хромосомные перестройки у лиственницы сибирской (показаны стрелками): а - хромосомные фрагменты, б - кольцевая хромосома, в - ацентрическое кольцо.

Исследование митоза показало, что в целом деление клеток проходит нормально с правильным расхождением хромосом к полюсам. Отмечен такой спектр аномалий, как преждевременное расхождение хромосом и выброс хромосом в метафазе, трехполюсный митоз и мосты в анафазе. Частота встречаемости данных нарушений низкая:  $1,34 \pm 0,68$  % на стадии метафазы и  $1,33 \pm 0,59$  % на стадии анафазы. Считается, что возникновение хромосомных мутаций может свидетельствовать о перестройке и дифференцировке генотипов растений в разных условиях произрастания, а спектр встречаемости хромосомных аномалий имеет адаптивное значение, позволяющее лиственнице занимать различные экоотопы в

пределах ареала. Результаты кариологических исследований свидетельствуют о высокой устойчивости выделенных форм лиственницы сибирской в условиях Ширинской сухой степи.

#### Библиографический список

1. Альбенский А.В. Гибридизация деревьев. Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М., 1948. - 316 с.
2. Бирюков В.И. О морфологических формах лиственницы сибирской // Лесной журнал. - 1964. - № 5. - С. 28-31
3. Буторина Л.К., Мурая Л.С., Сиволапов И. Цитологические особенности гетерозисной лиственницы // Лесоведение. - 1987. - № 4. - С. 82-86.

4. Буторина А.К. Факторы эволюции кариотипов древесных // Успехи соврем. биол. - 1989. - Т. 108, вып. 3 (6). - С. 342-357.
5. Владимирова О.С., Муратова Е.Н. Оценка встречаемости В-хромосом ели сибирской в условиях антропогенного стресса // Хвойные бореальной зоны. 2006. - Вып. 3. - С. 114-120.
6. Гриф В.Г., Агапова Н.Д. К методике описания кариотипов растений // Бот. журн. - 1986. - Т. 71, № 4. - С. 550-553.
7. Ирошников А.И. Изучение полиморфизма популяций древесных пород // В кн.: Лесная генетика, селекция и семеноводство. Петрозаводск: "Карелия", 1970. - С. 80-85.
8. Ирошников А.И. Лиственницы России. Биоразнообразие и селекция. М.: ВНИИЛМ, 2004. - 182 с.
9. Круклис М.В. Кариологические особенности лиственницы Чекановского // Изменчивость древесных растений Сибири. Красноярск: ИЛИД СО РАН СССР, 1974. - С. 11-19.
10. Круклис М.В., Милютин Л.И. Лиственница Чекановского. М.: Наука, 1977. - 211 с.
11. Кунах В.А. Геномная изменчивость соматических клеток растений и факторы, регулирующие этот процесс // Цитология, генетика. - 1980. - Т. 14, № 1. - С. 73-81.
12. Лакин Г.Ф. Биометрия. Учебное пособие, 3-е издание. - М.: Высшая школа, 1980. - 293 с.
13. Лобанов А.И., Тихонова И.В. Фенологические формы лиственницы сибирской в защитных насаждениях Степной зоны Средней Сибири // Бот. иссл. в Сибири. Вып. 1. - Красноярск, 1992. - С. 110-111.
14. Муратова Е.Н., Кравцов Б.А., Любшина Е.В. Применение методов многомерного анализа в кариологии хвойных (на примере лиственницы) // Изв. АН СССР. Сер. Биол. - 1988 а. - № 4. - С. 594-601.
15. Муратова Е.Н., Круклис М.В. Хромосомные числа голосеменных растений. Новосибирск: Наука, Сиб. отделение, 1988 б. - 117 с.
16. Муратова Е.Н. Кариологическое исследование *Larix sibirica* (Pinaceae) в различных частях ареала // Бот. журн. 1991 а. - Т. 76. № 11. - С.1586-1595.
17. Муратова Е.Н. Добавочные хромосомы у лиственницы Гмелина *Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr. // Докл. АН СССР. - 1991 б. - Т. 318, № 6. - С. 1511-1514.
18. Муратова Е.Н. Хромосомный полиморфизм в природных популяциях лиственницы Гмелина // Цитология и генетика. 1994. - Т. 28, № 4. - С. 14-22.
19. Муратова Е.Н. Методика окрашивания ядрышек для кариологического анализа хвойных // Бот. журн. 1995. - Т. 80. № 2. - С. 82-86.
20. Муратова Е.Н. В-хромосомы голосеменных // Успехи соврем. биол. - 2000. - Т. 120, № 5. - С. 452-465.
21. Мамаев С.А. Формы внутривидовой изменчивости древесных растений. М., Наука, 1972. - 283 с.
22. Правдин Л.Ф., Бударрагин В.А., Круклис М.В. Методика кариологического изучения хвойных пород // Лесоведение. - 1972. - № 2. - С. 67-75.
23. Седелникова Т.С., Муратова Е.Н., Ефремов С.П. Кариологические особенности видов хвойных на болотах и суходолах Западной Сибири // Сиб. бот. журн. Krylovia. 2000. - Т. 2, № 1. - С. 73-80.
24. Седелникова Т.С., Пименов А.В. Кариологическое изучение болотной и суходольной популяции *Larix sibirica* (Pinaceae) из Западной Сибири. // Бот. журнал. 2005. - Т. 90, № 4. - С. 582-593.
25. Фарукшина Г.Г. Хромосомный полиморфизм лиственницы Сукачева и ели сибирской на Урале // Проблемы эволюционной цитогенетики, селекции и интродукции.: Матер. науч. чтений, посвящ. 100-летию проф. Чехова В.П. - Томск, 1997. - С. 58-59.

---

Поступило в редакцию 14 июня 2006 г.