

МУРАТОВА Е.Н., КАРПЮК Т.В., ВЛАДИМИРОВА О.С., СЕДЕЛЬНИКОВА Т.С., КВИТКО О.В.

Учреждение Российской академии наук Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН
Россия, 660036, Красноярск, Академгородок, e-mail: elena-muratova@ksc.krasn.ru

В-ХРОМОСОМЫ У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *PICEA*: РАСПРОСТРАНЕНИЕ И ВОЗМОЖНОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Каждый вид характеризуется определенным набором хромосом, которые называются постоянными хромосомами, хромосомами основного набора или А-хромосомами. В них находится вся генетическая информация. В кариотипе некоторых организмов наряду с А-хромосомами содержатся добавочные или В-хромосомы. Происхождение и функция добавочных хромосом изучены недостаточно; в настоящее время они являются объектом активного изучения. Добавочные хромосомы найдены у позвоночных и беспозвоночных животных, мхов, голосеменных и покрытосеменных растений.

1. Присутствие добавочных хромосом в кариотипе изменяет фенотип ядра, метаболизм всей клетки, оказывает влияние на функционирование генома и на многие фундаментальные биологические процессы (длительность клеточного цикла, генетическую активность хромосом, поведение хромосом в митозе и мейозе, содержание РНК и гистонов, размеры клеток, частоту клеточных делений). Имеются данные, что они могут влиять на фенотипические признаки, фертильность и жизнеспособность, темпы роста и развития. Сложившаяся система В-хромосом имеет значение для популяции и вида в целом. Появление и закрепление добавочных хромосом в эволюции дало возможность расширить лабильную систему генома для повышения адаптационных возможностей организма.

Долгое время считалось, что у древесных растений В-хромосомы отсутствуют. К настоящему времени среди древесных растений (голосеменных и покрытосеменных) известно более 150 видов, содержащих в кариотипе В-хромосомы. Среди голосеменных добавочные хромосомы наиболее широко распространены в роде *Picea*, где они обнаружены у 18 видов. Представители этого рода являются хорошими объектами, на примере которых можно изучить многие вопросы о роли и происхождении В-хромосом.

Материалы и методы

2. Объектами исследования являлось 16 видов ели – *P. abies*, *P. ajanensis*, *P. asperata*, *P. breweriana*, *P. crassifolia*, *P. engelmannii*, *P. glehnii*, *P. jezoensis*, *P. koraiensis*, *P. koyamae*, *P. mariana*, *P. meyeri*, *P. obovata*, *P. omorica*, *P. pungens*, *P. schrenkiana* и межвидовой гибрид *P. x fennica*. У некоторых видов изучено несколько происхождений; у ели сибирской изучались естественные популяции в разных частях ареала, в различных экологических условиях, а также декоративные формы в г. Красноярске.

В качестве материала для исследования использовали меристематические ткани корешков проростков семян или оснований молодой хвои. Кариологический анализ проводился на давленных препаратах по общепринятым методикам для хвойных видов. Семена проращивали в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге. Проростки длиной 1.0-1.5 см обрабатывали 1 % раствором колхицина в течение 5-6 ч, фиксировали уксуснокислым спиртом (1:3), окрашивали ацетогематоксилином. Затем готовили давленные препараты обычным способом. Препараты просматривали под микроскопом МБИ-6. Клетки с хорошим разбросом хромосом фотографировали.

Результаты и обсуждение

Изученные виды являются диплоидами с основным числом хромосом $x = 12$ и содержат в кариотипе 24 А-хромосомы ($2n=24$). У некоторых видов в кариотипе могут

присутствовать В-хромосомы, встречающиеся нерегулярно. Согласно полученным нами материалам и имеющимся литературным данным, у *P. schrenkiana*, *P. jezoensis*, *P. pungens*, *P. x fennica* и *P. breweriana* встречается 1 В-хромосома ($2n=24+1B$), у *P. koyamae* и *P. engelmannii* – 1-2 ($2n=24+1-2B$), у *P. ajanensis* и *P. meyeri* – 1-3 ($2n=24+1-3B$), у *P. obovata* – 1-4 ($2n=24+1-4B$), у *P. glehnii* 1-5 В-хромосом ($2n=24+1-5B$). У *P. breweriana*, *P. pungens* и *P. schrenkiana* В-хромосомы обнаружены нами впервые.

Размер А-хромосом рассматриваемых видов составляет 9,5-16,0 мкм; 8 пар относится к длинным метацентрикам и 4 пары к более коротким мета- или субметацентрикам. Размеры В-хромосом – 3,0-6,0 мкм, что составляет около 20-30% от средней длины А-хромосом. Обычно у ели встречается два морфологических типа добавочных хромосом: B_1 – метацентрические и B_2 – субметацентрические. У *P. schrenkiana*, *P. koyamae* и *P. breweriana* наблюдались только метацентрические, у *P. pungens* – субметацентрические, у *P. obovata* и *P. ajanensis* – оба типа В-хромосом. Наиболее часто встречаются добавочные хромосомы метацентрического типа. Предполагается, что субметацентрические В-хромосомы являются производными от метацентрических. У *P. glehnii*, впервые для голосеменных, найдены добавочные хромосомы разных размеров (от 1,5 до 8 мкм) и морфологически различных типов.

Согласно современным представлениям, добавочные хромосомы содержат гетерохроматин, являющийся постоянным компонентом хромосомного набора (Прокофьева-Бельговская, 1986). Следовательно, В-хромосомы не активны или малоактивны в отношении транскрипции РНК. Добавочные хромосомы ели сибирской также вероятно полностью или частично гетерохроматические; на это указывает присутствие хромоцентров в интерфазных ядрах. При окрашивании азотнокислым серебром на В-хромосомах были выявлены яркие блоки, что дает возможность предположить, что они могут обладать ядрышкообразующей активностью. Вполне вероятно, что В-хромосомы, подобно нуклеолярным А-хромосомам, играют определенную роль в биосинтетических процессах клетки.

На основании собственных исследований и литературных данных установлены некоторые закономерности распространения В-хромосом по ареалам ели сибирской и ели аянской. Ель сибирская в отношении добавочных хромосом является одним из наиболее изученных видов. К настоящему времени кариологически исследовано более 50 популяций, включая и гибридную зону. В-хромосомы обнаружены в 24 популяциях. Во многих частях ареала изучен близкородственный вид ель обыкновенная. Между елью сибирской и елью обыкновенной проходит широкая зона интрогрессивной гибридизации, в которой произрастает гибридная ель *P. x fennica*. В западной части ареала ели сибирской, а также у ели обыкновенной, В-хромосомы до сих пор не найдены. Сравнительно недавно В-хромосомы были обнаружены у *P. x fennica* на Урале. Эти популяции являются самыми западными, в которых найдены добавочные хромосомы. Невысокая частота встречаемости В-хромосом (17,0% растений) отмечена в Казахском Алтае, однако в близких территориально областях – Горном Алтае и Кемеровской обл., они не обнаружены совсем. В Западной Сибири В-хромосомы пока найдены только на болотах Томской области.

3. Максимальная встречаемость растений с В-хромосомами наблюдается в популяциях Восточной Сибири. К ним относятся популяции из Центральной части Красноярского края - Большая Мурта – 34,3% растений, Козулька – 25,6-32,0%, окр. Красноярска – 28,6-39,1%, Ачинск – 38,0%, Кежда – 29,7%; Тюхтет – 28,0%. Самый высокий процент добавочных хромосом (73,3%) отмечен в Хакасии, у интродуцентов, находящихся за пределами ареала. В популяциях Восточной Сибири найдено наибольшее число В-хромосом (до 4 на диплоидный набор). На севере Красноярского края и в Магаданской обл. добавочные хромосомы не найдены. Две популяции из Западной Якутии – самые восточные и северные, где найдены В-хромосомы, но частота их мала. Таким образом, имеющиеся материалы свидетельствуют, что встречаемость В-

хромосом приурочена к экстремальным районам восточной и юго-восточной частей ареала.

4. При проведении настоящих исследований изучались также декоративные формы в дендрарии Института леса: семиринская, длиннохвойная, светящаяся, желтая, плакучая. У этих форм обнаружены В-хромосомы двух морфологических типов – мета- и субметацентрического. Встречаемость В-хромосом у декоративных форм в целом составляет 56.2%. При изучении наследования добавочных хромосом на примере этих форм установлено, что у потомства преобладает кариотип материнского растения. Например, у *f. lutescens* в материнском кариотипе имеется две добавочные хромосомы и в потомстве более 90 % проростков содержит по 2 В-хромосомы. У двух растений *f. seminskiensis*, имеющих в материнском кариотипе одну В-хромосому, в потомстве наблюдалось преобладание этого цитотипа. Результаты проведенного исследования показали, что добавочные хромосомы передаются преимущественно от материнского растения, хотя имеет место и передача по мужской линии. Возможно, что различие в наследовании В-хромосом обеспечивает сохранение определенного уровня и частоты добавочных хромосом в популяции.

5. В городских насаждениях г. Красноярск добавочные хромосомы были отмечены во всех пяти изученных районах – около Большого концертного зала (БКЗ), автовокзала «Взлетка», в Центральном парке им. М. Горького, около здания ТЮЗа, на о. Отдыха. У растений в районах БКЗ, «Взлетки», Центрального парка и ТЮЗа наряду с типичным набором хромосом обнаружена В-хромосома метацентрического типа – $2n = 24 + 1V_1$. В кариотипе насаждений на о. Отдыха отмечены одна и две добавочные хромосомы V_1 - типа. В общей сложности В-хромосомы отмечены в кариотипе почти половины изученных деревьев из городских насаждений (42.3%),

6. Полученные результаты и анализ литературных данных показывает, что у ели сибирской в западной части ареала добавочных хромосом либо нет, либо частота их невысокая. Например, в трех популяциях ели сибирской из разных экологических условий (кедрово-еловая согра, евтрофное болото, суходол) установлено, что частота встречаемости В-хромосом составляет 3.4, 1.6 и 4.4% соответственно. Невысокая частота встречаемости В-хромосом отмечена в Казахском Алтае. Эти популяции ели сибирской являются самыми западными, в которых найдены добавочные хромосомы. У ели обыкновенной В-хромосомы до сих пор не описаны.

7. В целом, полученные данные свидетельствуют о более широком распространении добавочных хромосом в городских насаждениях ели сибирской по сравнению с естественными популяциями. Это подтверждает точку зрения авторов, считающих, что добавочные хромосомы являются адаптивным элементом вида и обеспечивают устойчивость организмов при неблагоприятных воздействиях (Прокофьева-Бельговская, 1986). Полученные результаты подтверждают, что добавочные хромосомы связаны с адаптивностью растений к условиям антропогенного загрязнения и могут считаться одним из критериев цитогенетического мониторинга. Ранее уже высказывалось предположение о связи В-хромосом со стрессовыми условиями произрастания и с адаптацией растений к ним (Мошкович, 1979; Дмитриева, Парфенов, 1991; Муратова, 2000; Жученко, 2001 и др.).

8. У ели аянской кариологически изучено 12 происхождений. В-хромосомы найдены в южно-сахалинской и дальнегорской популяциях, в верховье р. Большая Уссурка, в верхнем течении р. Правая Соколовка, в трех популяциях Хабаровского края (окр. с. Троицкое на р. Амур и в двух популяциях юга края – сукпайской и оборской). Не обнаружено В-хромосом у ели аянской на Камчатке, на хребте Тукурингра (Приамурье), на о. Шикотан (Курилы, бухта Крабовая), в Южной Якутии - в зоне предполагаемой гибридизации между елью аянской и елью сибирской. Не найдено добавочных хромосом также в корсаковской популяции близкородственного вида *P. microsperma* с Охотского побережья Южного Сахалина, в то же время у *P. microsperma*

из Северо-Восточного Китая имеется 1 В-хромосома. У *P. jezoensis*, в таксономическом отношении очень близкой к *P. ajanensis*, добавочные хромосомы найдены в одной из популяций на острове Хоккайдо в Японии, в остальных десяти популяциях их не оказалось. У *P. jezoensis* в Южной Корее В-хромосомы пока не обнаружены. Полиморфны по В-хромосомам также популяции *P. hondoensis* с острова Хонсю и *P. glehnii* с острова Хоккайдо.

9. Кроме вышеперечисленных видов ели, В-хромосомы описаны у следующих восточноазиатских видов: *P. schrenkiana*, *P. brachytyla* и *P. likiangensis* – $2n=24+1B$, *P. koyamae* и *P. wilsonii* – $2n=24+1-2B$, *P. meyeri* – $2n=24+1-3B$; В-хромосомы встречаются также у североамериканских видов ели – *P. breweriana* и *P. pungens* ($2n=24+1B$), *P. engelmannii* – ($2n=24+1-2B$), *P. sitchensis* ($2n=24+1-5B$), *P. glauca* ($2n=24+1-6B$). Сходство В-хромосом разных видов ели по морфологии, их наличие исключительно у сибирских, дальневосточных и североамериканских видов позволяет высказать предположение об их общем происхождении. Возможно, они возникли у прародительских видов в Восточной Азии и затем распространились в Северную Америку по древнему Берингийскому мосту, который в третичном периоде соединял оба континента. С этой точкой зрения согласуются ископаемые данные, согласно которым ель проникла в Северную Америку в середине третичного периода.

10. Имеющийся фактический материал позволяет предположить, что у разных видов ели В-хромосомы могут быть как древнего, так и недавнего происхождения. В популяциях ели сибирской В-хромосомы получили широкое распространение, в то время как у ели европейской они до сих пор не найдены. Однако добавочные хромосомы уже единично появились в популяциях гибридной зоны между этими видами и возможно в будущем распространятся по ареалу ели европейской. Недавнее происхождение можно предположить для добавочных хромосом *P. glehnii*, которые, вероятно, возникли в результате хромосомных перестроек разных типов.

Работа частично выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ-БелРФФИ (проект № 08-04-90001) и интеграционного проекта СО и УрО РАН № 49.

Литература

1. Дмитриева С. А., Парфенов В. И. Кариология флоры как основа цитогенетического мониторинга (на примере Березинского биосферного заповедника). - Минск: Наука и техника, 1991. - 230 с.
2. Жученко А. А. Адаптивная система селекции растений (эколого-генетические основы). – М.: Агрорус, 2001. – Т. 1,2. – 1491 с.
3. Мошкович А. М. Добавочные хромосомы покрытосеменных растений. Кишинев: Штиинца, 1979. – 163 с.
4. Муратова Е. Н. В-хромосомы голосеменных // Успехи соврем. биол. – 2000. – Т. 120, № 5. – С. 452-465.
5. Прокофьева-Бельговская А. А. Гетерохроматические районы хромосом. - М.: Наука, 1986. – 431 с.

Резюме

Проведен кариологический анализ 16 видов ели и одного межвидового гибрида. В диплоидном наборе изученных видов имеется 24 хромосомы - $2n = 24$. В кариотипе 11 видов отмечены добавочные хромосомы: у *P. schrenkiana*, *P. jezoensis*, *P. pungens*, *P. x fennica* и *P. breweriana* – одна В-хромосома ($2n=24+1B$), у *P. koyamae* и *P. engelmannii* – 1-2 ($2n=24+1-2B$), у *P. ajanensis* и *P. meyeri* – 1-3 ($2n=24+1-3B$), у *P. obovata* – 1-4 ($2n=24+1-4B$), у *P. glehnii* 1-5 В-хромосом ($2n=24+1-5B$). В большинстве случаев В-хромосомы относились к метацентрическому и субметацентрическому типам. У *P. glehnii* все 5В-хромосом отличались друг от друга по морфологии. Рассмотрены географическое распространение и возможное значение В-хромосом у представителей рода *Picea*.

Karyological analysis of 16 spruce species and interspecific hybrid have been carried out. Diploid complements of these species include 24 chromosomes ($2n=24$). In karyotypes of 11 species supernumerous (B-) chromosomes occur: *P. schrenkiana*, *P. jezoensis*, *P. pungens*, *P. x fennica* и *P. breweriana* – $2n=24+1B$, *P. koyamae* and *P. engelmannii* – $2n=24+1-2B$, *P. ajanensis* and *P. meyeri* – $2n=24+1-3B$, *P. obovata* – $2n=24+1-4B$, *P. glehnii* – $2n=24+1-5B$. Morphology of B-chromosomes mainly is metacentric or submetacentric. Geographical distribution and possible significance of B-chromosome in *Picea* representatives are presented.

**ПІРКО Я.В.¹, ТАРАНЕЦЬ Л. П.², ШАКУЛА О.О.³, КОРШИКОВ І.І.³,
БЛЮМ Я.Б.¹**

¹Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а, e-mail: yavp@mail.ru

²Національний університет Києво-Могилянська академія, Україна, 04070, м. Київ, вул. Г. Сковороди, 2, e-mail: itillia@rambler.ru

³Донецький ботанічний сад НАН України, Україна, 83059, м. Донецьк, пр. Ілліча, 110, e-mail: herb@herb.dn.ua

ДОСЛІДЖЕННЯ ГЕНЕТИЧНОЇ МІНЛИВОСТІ *ACHILLEA GLABERRIMA* КЛОК. ТА *ACHILLEA LEPTOPHILLA* ВІЕВ. ЗА ДОПОМОГОЮ RAPD МАРКЕРІВ

Збереження та прогнозування існування природних популяцій окремих видів рослин, які знаходяться під загрозою зникнення, вимагає проведення комплексних біологічних досліджень щодо визначення динаміки чисельності, просторової, вікової та генетичної структури популяцій. Оцінку генетичної різноманітності популяцій все частіше проводять із застосуванням молекулярно-генетичних методів аналізу, які базуються на використанні різного роду генетичних маркерів.

Achillea glaberrima (деревій голий) та *Achillea leptophilla* (деревій тонколистий (м'яколистий)) належать до жовтокріткових таксонів секції *Filipendulinae* (DC.) Afan. Ці два види поширені в Україні на порівняно невеликій території. Зокрема, *A. leptophilla* є причорноморським ендеміком кам'янистих оголень, а *A. glaberrima* відноситься до стенотопних ендеміків Приазов'я, який зустрічається тільки на гранітних оголеннях заповіднику «Кам'яні могили» (занесений до Червоної книги України). Слід зауважити, що деякі дослідники вважають *A. glaberrima* похідною від *A. leptophilla* расою, яка повністю втратила опушення. Обидва ці види заслуговують на всебічне вивчення та охорону [1].

Матеріали та методи

Для вивчення генетичної мінливості *A. leptophilla* та *A. glaberrima* був використаний RAPD-метод (Random Amplified Polymorphic DNA), перевагою якого є технічна простота та швидкість проведення аналізу. Метод не потребує будь-якої інформації про послідовність ДНК, яка, до речі, для аналізу може бути взята в невеликій кількості.

Для аналізу використовували рослини *A. glaberrima* та *A. leptophilla*, що були отримані в результаті пророщування насіння, яке було зібране в популяціях обох видів на території заповідника «Кам'яні могили». ДНК з листя кожної рослини виділяли за допомогою кіта (Gene Elute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit) фірми Sigma.

Ампліфікацію проводили з використанням чотирьох ОРП праймерів фірми Operon, USA (OPP 1, OPP 2, OPP 3, OPP 5). Реакційна суміш для проведення полімеразної ланцюгової реакції об'ємом 25 мкл містила: 50 нг геномної ДНК, 0,2 мкМ праймера, 200 мкМ кожного: dATP, dCTP, dGTP та dTTP, 2,5 мМ MgCl₂, 2,5 одиниці