

Молекулярно-цитогенетический анализ ели сибирской (*Picea obovata*) из Южной Сибири и Монголии

Molecular cytogenetical studies on *Picea obovata* in Southern Siberia and Mongolia

Горячкина О. В.

Goryachkina O. V.

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

Реферат. Приведены результаты цитогенетического исследования двух популяций ели сибирской (*Picea obovata* Ledeb.), произрастающих у южной границы ареала вида, в Южной Сибири (республика Тыва) и в Северной Монголии. В кариотипе ели сибирской содержится 24 хромосомы; добавочных, или В-хромосом в изученных популяциях обнаружено не было. С использованием стандартных кариологических методов и флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) изучен полиморфизм нуклеолярных районов хромосом, выявлены особенности локализации генов 45S и 5S рибосомной РНК на хромосомах ели, что позволило идентифицировать практически все пары гомологичных хромосом в кариотипе ели сибирской. У ели сибирской из Монголии и Южной Сибири отмечены миксоплоидия, структурные аномалии хромосом (acentric rings, ring and dicentric chromosomes, chromosome fragments). В клетках на стадии интерфазы были выявлены микроядра: в популяции из Тывы они были отмечены у 52,2 % проростков, а в монгольской популяции – у 17,4 %. Частота встречаемости всех типов нарушений была несколько выше в популяции из Тывы по сравнению с монгольской популяцией, а также с ранее изученными популяциями из центральных частей ареала ели сибирской, что, по-видимому, связано с экстремальными условиями произрастания.

Ключевые слова. Ель сибирская, кариотип, микроядра, миксоплоидия, нуклеолярные районы хромосом, флуоресцентная гибридизация *in situ*, хромосомные мутации, число и морфология хромосом.

Summary. The article gives the results of a cytogenetic study of two populations of Siberian spruce (*Picea obovata* Ledeb.), growing at the southern border of the species' range, in Southern Siberia (Tuva Republic) and Northern Mongolia. The karyotype of Siberian spruce contains 24 chromosomes; no additional or B-chromosomes were found in the studied populations. Using standard karyological methods and fluorescent *in situ* hybridization (FISH), the polymorphism of the chromosome nucleolar regions was studied, the localization features of the 45S and 5S ribosomal RNA genes on spruce chromosomes were identified, which made it possible to identify almost all pairs of homologous chromosomes in the Siberian spruce karyotype. In Siberian spruce from Mongolia and Southern Siberia, mixoploidy and structural abnormalities of chromosomes (acentric rings, ring and dicentric chromosomes, chromosome fragments) has been noted. Micronuclei were detected in cells at the interphase stage: in the population from Tyva they were noted in 52.2 % of seedlings, and in the Mongolian population – in 17.4 %. The frequency of occurrence of all types of disturbances was slightly higher in the population from Tyva compared to the Mongolian population, as well as to previously studied populations from the central parts of the Siberian spruce range, which is apparently due to extreme environment conditions.

Key words. Chromosome mutations, chromosome number and morphology, fluorescence in situ hybridization, karyotype, micronuclei, mixoploidy, nucleolar regions of chromosomes, *Picea obovata*.

Введение. Ель сибирская *Picea obovata* Ledeb. имеет обширный ареал, включающий северо-восток Европы, Заволжье, Сибирь до побережья Охотского моря и Среднего Амура, Северную Монголию и Северную Маньчжурию и является одним из доминантных видов темнохвойных лесов (Бобров, 1978). На территории Южной Сибири и Монголии находятся пределы распространения ели сибирской, как и многих других лесообразующих видов хвойных. Еловые леса встречаются в Северной Мон-

голии, в основном они приурочены к северным склонам гор и к долинам малых рек, образуя чистые и смешанные насаждения.

Детальные кариологические и цитогенетические исследования хвойных растений, проведенные в последние десятилетия, показали, что в экстремальных условиях существования, в том числе и у границ ареала, у многих видов наблюдаются аномалии, связанные с изменениями числа и морфологии хромосом (Муратова и др., 2023а). Ель сибирская хорошо исследована кариологически во многих частях своего ареала, однако на южной границе произрастания вида была изучена только одна популяция из республики Тыва (пос. Хайдагайты, граница с Монголией), где определялось число хромосом (Владимирова, 2007).

Материалы и методы. Семена ели сибирской для кариологических исследований были собраны в Монголии (в 10 км к юго-востоку от Улан-Батора, среднегорная часть урочища Богдо-Уула) и Республике Тыва (окр-ти с. Уюк в Пий-Хемском кужууне).

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 % железоаммонийных 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 Микмед-6 с помощью цифровой камеры-окуляра МС-12 (ЛОМО, Россия). Хромосомы классифицировали по методике В. Г. Грифа и Н. Д. Агаповой (1986). Кроме стандартных методов, был использован метод флуоресцентной гибридизации *in situ* с пробями 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 рТа794 (5S рДНК) и рТа71 (45S рРНК) пшеницы (Gerlach, Bedbrook, 1979; Gerlach, Dyer, 1980). Пробы метили методом ник-трансляции с использованием наборов для метения ДНК.

Результаты и обсуждение. Кариологические исследования показали, что обе популяции ели сибирской содержат по 24 хромосомы ($2n = 2x = 24$) и являются диплоидами с основным числом $x = 12$. Проведенные ранее исследования данного вида из других районов произрастания показали наличие во многих популяциях добавочных, или В-хромосом, которых может наблюдаться в клетке от 1 до 4 (Муратова и др., 2023б). Но в данном случае ни у одного из исследованных проростков добавочные хромосомы не были обнаружены.

Интересно, что у северной и северо-восточной границ ареала ели сибирской (на севере Красноярского края и в Магаданской области) добавочные хромосомы также не были найдены (Муратова, 2014). А ранее проведенные исследования у южной границы ареала (республика Тыва, пос. Хайдагайты) выявили крайне низкую частоту встречаемости В-хромосом, которые были отмечены только у 5,0 % исследованных деревьев (Владимирова, 2007).

Миксоплоидия была отмечена у 14 проростков ели из 23 исследованных в популяции из Тывы, а в монгольской популяции – в 5 из 23. Чаще всего наряду с диплоидными клетками с числом хромосом $2n = 24$ встречались тетраплоидные клетки с $2n = 48$ (рис. 1а). Кроме того, наблюдались миксоплоиды с 24/25, 24/36/48, 24/25/48. Частота встречаемости клеток с измененным числом хромосом составила 4,3 % в популяции из Тывы и 2,9 % из Монголии.

У *P. obovata* в популяции из Тывы обнаружена повышенная частота встречаемости структурных аномалий хромосом: они были отмечены у 43,2 % исследованных проростков. Наблюдались ацентрические кольца, кольцевые и дицентрические хромосомы, фрагменты хромосом (рис. 1б, в; рис. 2г). Как правило, такие аномалии отмечались в единичных клетках на препарате, но у некоторых проростков доля таких клеток достигала 8,3 % от общего числа доступных для анализа. Общая частота встречаемости клеток с хромосомными перестройками составила 1,4 %.

В популяции из Монголии у 8,7 % исследованных проростков наблюдались единичные клетки с кольцевыми хромосомами. Общая частота встречаемости структурных перестроек хромосом была значительно ниже, чем в тувинской популяции, и составила 0,5 %.

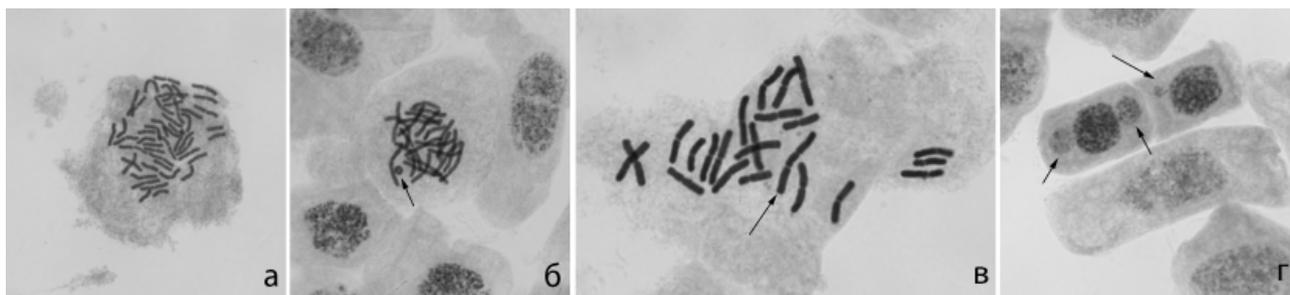


Рис. 1. Цитогенетические аномалии (указаны стрелками) у ели сибирской из республики Тыва: а – тетраплоидное число хромосом $2n = 48$; б – ацентрическое кольцо; в – дицентрическая хромосома; г – микроядра различного размера.

Важным инструментом для оценки цитогенетической стабильности является микроядерный тест. Микроядра чаще всего являются ацентрическими фрагментами, возникшими в результате структурных нарушений хромосом, и, как правило, лишены центромеры (Schmid, 1975). Крупные микроядра могут быть образованы целой хромосомой или группой хромосом. Микроядра в интерфазных клетках наблюдались у проростков из обеих изученных популяций, однако частота встречаемости их была различна. В популяции из Тывы они были отмечены у 52,2 % проростков, а в монгольской популяции – у 17,4 %. Как правило, на препарате наблюдалось от 1 до 4 клеток с микроядрами (рис. 1г, рис. 2а-в). Иногда микроядро наблюдалось в делящейся клетке (рис. 2в).

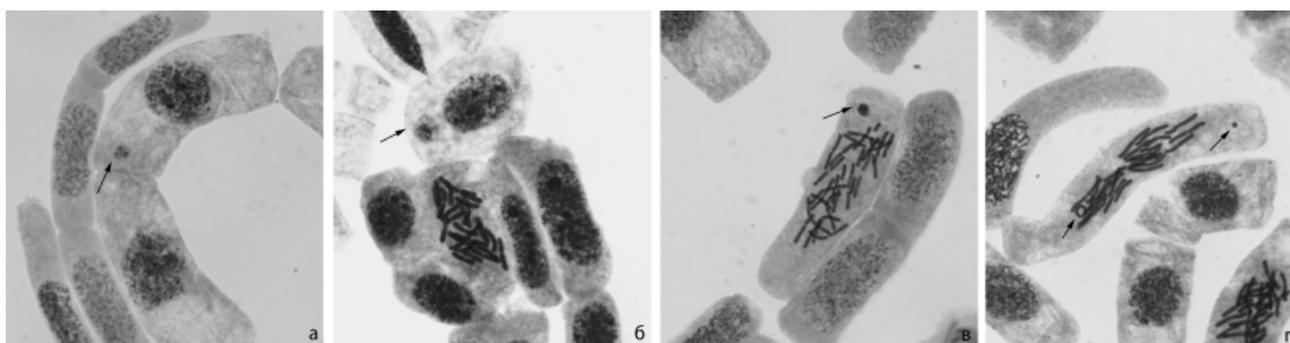


Рис. 2. Цитогенетические аномалии (указаны стрелками) у ели сибирской из Монголии: а, б – микроядра различного размера в клетках на стадии интерфазы; в – микроядро в делящейся клетке; г – кольцевая хромосома и точечный фрагмент в метафазной пластинке.

В кариотипе ели сибирской из обеих популяций выделялись 8 пар длинных метацентрических хромосом (I–VIII пары), 2 пары коротких метацентриков (X, XI пары) и 2 пары коротких субметацентрических хромосом (IX, XII пары). Использование современных методов исследования (флуоресцентная гибридизация *in situ* с пробами 5S и 45S рРНК генов и DAPI-бэндинг) наряду с анализом морфологии хромосом позволило идентифицировать практически все пары гомологичных хромосом в кариотипе ели сибирской. Определено общее число локусов рибосомных генов 45S и 5S рРНК, рассчитано их положение (локализация) на хромосомах, а также распределение и интенсивность Q-бэндов, выявляемых с помощью флуорохрома DAPI. На основании полученных данных построена идиограмма хромосом *Picea obovata* (рис. 3).

У *Picea obovata* имеется 6 мажорных локусов 45S рДНК в интеркалярных районах хромосом II, III, IV, V, VIII и X и минорный локус на хромосоме IX в районе центромеры. Количество мажорных локусов 45S рДНК совпадает с имеющимися литературными данными для данного вида из других местопроизрастаний (Shibata, Hizume, 2008). В районах хромосом, где располагаются мажорные локусы 45S рДНК, наблюдаются постоянные вторичные перетяжки.

Анализ количества ядрышек в интерфазных ядрах может свидетельствовать о некотором снижении активности ядрышкообразующих районов хромосом в популяции из Тывы. Число ядрышек в интерфазных ядрах здесь варьировало от 3 до 10 (в среднем $6,2 \pm 0,06$), что соответствует 5 парам активных ядрышкообразующих районов хромосом. В популяции из Монголии число ядрышек варьирует от 3 до 12 (в среднем $6,5 \pm 0,08$), что соответствует 6 парам активных ядрышкообразующих районов хромосом.

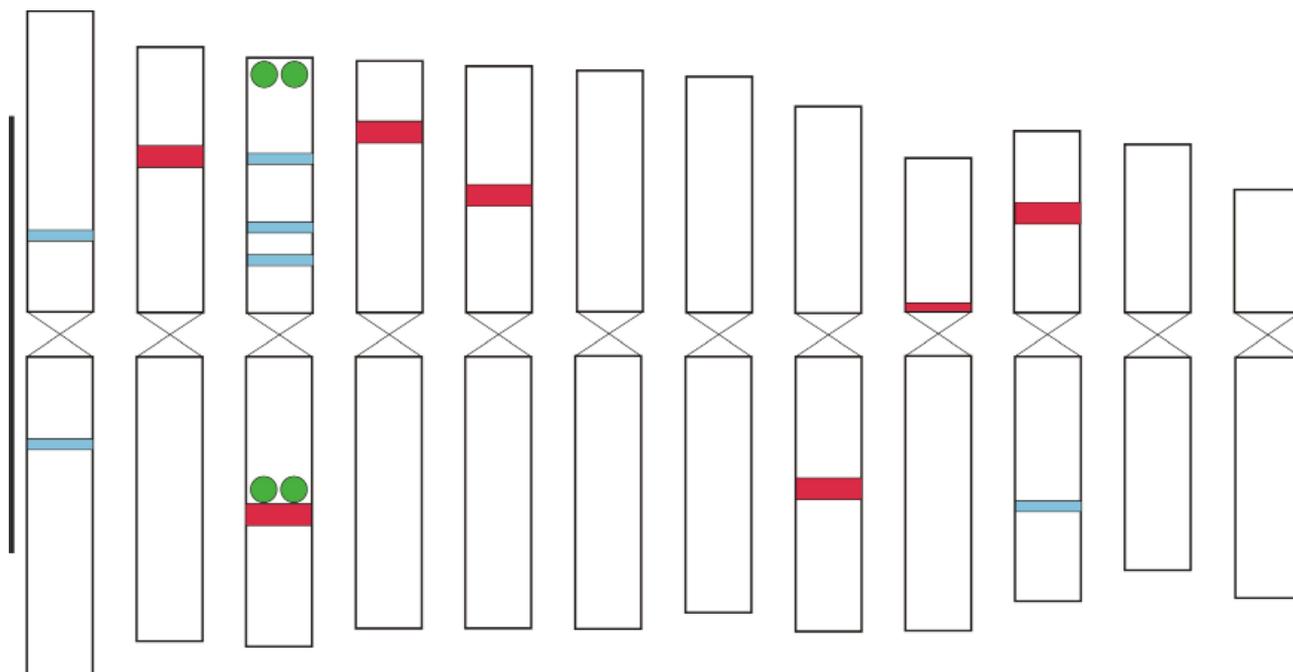


Рис. 3. Идиограмма хромосом *Picea obovata* Ledeb. с локализацией генов 45S рДНК (красный цвет), 5S рДНК (зеленый цвет) и DAPI-бэндов (голубые полосы) на метафазных хромосомах. I–XII – номера хромосом. Масштабная линейка 10 мкм.

Сайты 5S рДНК находятся на хромосоме III. Мажорный сайт локализован в медиальном районе длинного плеча хромосомы, минорный – в субтерминальном районе короткого плеча. Данная хромосома несет также мажорный локус 45S рДНК на длинном плече, рядом с локусом 5S рДНК (рис. 3). Хромосома III, вероятно, может считаться маркерной для видов рода *Picea*, поскольку к настоящему времени она обнаружена у всех исследованных видов. Ортологичная хромосома обнаружена в кариотипах других представителей семейства сосновых. У *Pinus* она имеет дополнительный минорный сайт 45S рДНК в центромержном районе, у *Larix* – содержит только один локус 5S рДНК на коротком плече.

После гибридизации *in situ* в интеркалярных районах некоторых хромосом проявляются DAPI-бэнды, которые помогают идентифицировать гомологичные пары (рис. 3). Наиболее четкие DAPI-бэнды наблюдаются на хромосомах I, III и X пар.

Таким образом, у ели сибирской из Монголии и Южной Сибири отмечены миксоплоидия, структурные аномалии хромосом, микроядра в интерфазных клетках. По сравнению с популяциями из центральных частей ареала, частота хромосомных аномалий повышена в популяции из Тывы, что, по-видимому, связано с экстремальными условиями произрастания. Полученные результаты вносят важный вклад в исследование организации хромосом хвойных растений и могут быть использованы при решении широкого спектра фундаментальных и прикладных цитогенетических задач.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ИЛ СО РАН, проект № FWES 2024-0028. Автор выражает благодарность д. б. н. Е. Д. Бадаевой из Института общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН за помощь в разработке FISH протокола применительно к хвойным, а также к. б. н. И. В. Тихоновой и С. Жамьянсурену за предоставление семян для исследований.

ЛИТЕРАТУРА

- Бобров Е. Г.** Лесообразующие хвойные СССР. – Л.: Наука, 1978. – 189 с.
- Гриф В. Г., Агапова Н. Д.** К методике описания кариотипов растений // Бот. журн., 1986. – Т. 71, № 4. – С. 550–553.
- Владимирова О. С.** Цитогенетические особенности ели сибирской на южной границе ареала // Проблемы молекулярной и клеточной биологии. Сб. матер. Межд. молодежной науч.-метод. конф. – Томск, 2007. – С. 46–47.
- Муратова Е. Н.** Кариологическое изучение ели сибирской (*Picea obovata*) Северо-Востока Азии // Вестник Северо-Восточного научного центра ДВО РАН, 2014. – № 4. – С. 95–100.
- Муратова Е. Н., Седельникова Т. С., Горячкина О. В., Пименов А. В.** Кариологические и цитогенетические исследования хвойных в экстремальных условиях произрастания // Сиб. экол. журн., 2023а. – Т. 5 – С. 591–602.

Муратова Е. Н., Седельникова Т. С., Горячкина О. В., Пименов А. В., Картюк Т. В. Добавочные хромосомы хвойных растений (на примере видов ели *Picea* A. Dietr.) // Журн. Сибирского федерального университета. Серия: Биология, 2023б. – Т. 16, № 4. – С. 403–419.

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

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.

Schmid W. The micronucleus test // *Mutation Research – Genet. Toxicol. and Environ. Mutagen*, 1975. – Vol. 31, N 1. – P. 9–15. DOI: 10.1016/0165-1161(75)90058-8.

Shibata F., Hizume M. Comparative FISH karyotype analysis of 11 *Picea* species // *Cytologia*, 2008. – Vol. 73(2). – P. 203–211.