

tions in Russia and neighboring countries, and specimens taken from the laboratory collection of t-complex mice belonging to Mammals Microevolution Laboratory of SIEE RAS. These results showed the factors that influence the frequency of t-haplotypes in wild populations of mice spreading in different ecological conditions and the study of t-haplotype frequencies in urban populations, also populations of mice exposed to radiation in the CHAS. These results will progress in addressing one of the most interesting and important problems in the biological indication of environmental conditions of the environment (ecological genetics).

*Key words:* t-complex model of *Mus musculus*, complementation analysis, cytogenetic analysis, ecological indication.

**СЕДЕЛЬНИКОВА Т.С., ПИМЕНОВ А.В.**

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт леса им. В.Н. Сукачева Сибирского отделения Российской академии наук*

*Российская Федерация, 660036, Красноярск, Академгородок, 50/28, e-mail: tss@ksc.krasn.ru*

### **КАРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ДНК КРАСНО- И ЖЕЛТОПЫЛЬНИКОВОЙ ФОРМ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ В БОЛОТНЫХ И СУХОДОЛЬНЫХ ЭКОТОПАХ**

У сосны обыкновенной описаны две внутривидовые формы по окраске микростробилов – *Pinus sylvestris* L. f. (var.) *sulfuranthera* Kozubow – желтопыльниковая и *Pinus sylvestris* L. f. (var.) *erythranthera* Sanio – краснопыльниковая, но процент их участия в составе популяций в различных регионах не одинаков [9]. Установлено, что в микростробилах краснопыльниковой формы содержится значительное количество антоциана [4], наличие которого у растений имеет приспособительное значение в условиях экстремальных температур. Действительно, доля краснопыльниковой формы в сосновых древостоях повышается с нарастанием континентальности климата, а также в условиях интразонального пессимума, связанного с ухудшением температурных условий местообитания, особенно в северных и бо-

лотных экотопах [6, 11, 12]. Показано, что желтопыльниковая и краснопыльниковая формы сосны различаются по эмбриологическим, морфологическим, и селекционным признакам, а также по устойчивости к неблагоприятным факторам среды [1, 2, 8]. Однако кариологический полиморфизм и количественные характеристики генома этих форм сосны, отражающие особенности их адаптации в различных условиях произрастания, не изучались. В настоящей работе приводятся данные сравнительного исследования желтопыльниковой и краснопыльниковой форм сосны обыкновенной, произрастающих в болотных и суходольных экотопах, по кариологическим признакам – числу хромосом, их морфологии, локализации вторичных перетяжек, а также по содержанию ядерной ДНК.

#### **Материалы и методы**

**Объекты исследования.** Исследования проводились в южно-таежной подзоне Западной Сибири на территории Томской области. Объектами исследования послужили экологически контрастные (в соответствии с температурными и почвенно-гидрологическими условиями среды) типы сосновых лесов: сосняки кустарничково-сфагновые Va класса бонитета (низкие ярымы) на глубокозалежных олиготрофных болотах («Киргизное», «Цыганово», «Бакчарское», «Инкинский ярым»); сосняки лишайниково-зеленомошные и зеленомошно-брусничные I-II классов бонитета на прилегающих к болотам минеральных суходолах. В исследованных популяциях сосны на олиготрофных болотах участие краснопыльниковой формы составляет в

среднем  $29 \pm 3.0\%$ , в суходольных популяциях данного вида –  $7 \pm 1.1\%$ .

**Методика кариологического исследования.** Для кариологического анализа использовали меристематические ткани кончиков корней. Проростки подвергали предфиксационной обработке 1% р-ром колхицина в течение 4-6 часов, промывали в дистиллированной воде, фиксировали спиртово-уксусной смесью (3:1). Окрашивали проростки 1% р-ром ацетогематоксилина после их предобработки 4% р-ром железоаммонийных квасцов в течение 10-15 мин. Для просмотра использовали «давленные» препараты, приготовленные стандартным способом. Препараты просматривали в проходящем свете под микроскопом Axiostar plus (Carl Zeiss), с использованием

системы формирования изображений AxioVision. Подсчет числа хромосом производился в метафазных клетках. Метафазные пластинки с полным набором хромосом, их хорошим разбросом и сходной степенью спирализации фотографировали в иммерсионной системе (объектив  $\times 90$ ). Для каждой хромосомы определяли: суммарную длину диплоидного набора хромосом ( $\Sigma L_a$ , мкм); абсолютную длину ( $L_a$ , мкм); относительную длину ( $L_r$ , %), центромерный индекс ( $I_c$ , %); локализацию вторичных перетяжек ( $sc$ ). Классификацию хромосом проводили в соответствии с методикой В.Г. Грифа и Н.Д. Агаповой (1986).

Методика количественного определения ДНК. Количественное определение ДНК проводили на спектрофотометре BioRad Smartspec Plus совместно с НП «Сибирский центр лесной сертификации», г. Красноярск. 1. Выделение ДНК. Образцы хвои в бумажных пакетах сушились в течение 40 часов при 40°C в сушильном шкафу Binder. Для количественного определения содержания ДНК брали 150 мг (0.15 г) измель-

### Результаты и обсуждение

В диплоидном наборе как желтопыльничковой, так и краснопыльничковой форм сосны обыкновенной, произрастающих в суходольных и болотных экотопах, имеется 24 хромосомы ( $2n = 24$ ). В отдельных случаях отмечалась миксплоидия – нарушение числа хромосом, при котором в проростках наряду с диплоидными содержатся полиплоидные клетки ( $2n = 36$ ,  $2n = 48$ ). На суходоле встречаемость полиплоидных клеток у желтопыльничковой формы сосны составляет 1.52%, у краснопыльничковой формы – 2.09%. На болоте полиплоидные клетки встречаются у желтопыльничковой формы сосны с частотой 6.02%, у краснопыльничковой – с частотой 2.52%. Очевидно, что отклонения числа хромосом от нормального наиболее распространены у желтопыльничковой формы сосны на болоте, а у краснопыльничковой формы – на суходоле.

Хромосомы сосны измеряли на 22 метафазных пластинках желтопыльничковой формы с суходола, на 29 – краснопыльничковой формы с суходола, на 25 – желтопыльничковой формы с болота, на 19 – краснопыльничковой формы с болота. Для вычисления средних параметров хромосом отбирали 13 пластинок желтопыльничковой формы с суходола, 14 пластинок краснопыльничковой формы с суходола, 15 пластинок желтопыльничковой формы с болота и 10 пластинок краснопыльничковой формы с болота, в соот-

венной хвои, помещали в ступки, гомогенизацию материал проводили жидким азотом, количественно переносили 1.5 мл буфера СТАВ в пробирки Eppendorf, встряхивали на Вортексе. Выделение ДНК проводили по протоколу [7]. 2. Растворение ДНК. Осадок растворяли в 100 мкл деионизированной воды. Пробирки встряхивали на Вортексе и помещали в термошейкер на 40 мин. при 1000 об./мин. при 40°C при периодическом встряхивании на Вортексе (2-3 раза). 3. Количественное определение ДНК. 100 мкл исследуемого раствора с растворенной ДНК помещали в стерильные одноразовые пластиковые кюветы BioRad (пропускная способность от 220 нм до 1100 нм), контролем служила деионизированная вода. Расчет производился по формуле:  $S_x = C \cdot 10 / \text{сухой вес навески} / 1000$ , где  $C$  – полученное значение концентрации ДНК (ОД260/ОД280), 10 – коэффициент пересчета на 1 мл (брали 100 мкл), 1000 – коэффициент пересчета концентрации ДНК из микрограмм в миллиграммы.

ветствии со значениями общей длины исследуемых хромосомных наборов в интервале спирализации  $x \pm 1\sigma$ . Этот интервал составляет для желтопыльничковой формы с суходола 340-400 мкм, краснопыльничковой формы с суходола – 380-440 мкм, желтопыльничковой и краснопыльничковой форм с болота – 320-380 мкм.

Суммарная длина диплоидного набора хромосом сосны с суходола составляет у желтопыльничковой формы  $371.3 \pm 4.22$  мкм, у краснопыльничковой формы –  $402.1 \pm 4.49$  мкм. На болоте суммарная длина диплоидного набора хромосом сосны составляет у желтопыльничковой формы  $342.8 \pm 4.71$  мкм, у краснопыльничковой формы –  $350.4 \pm 5.48$  мкм. Сравнительный анализ показывает, что суммарная длина хромосом диплоидного набора сосны на суходоле достоверно выше, чем на болоте, что согласуется с проведенными ранее исследованиями [10]. При этом как в суходольной, так и в болотной популяциях суммарная длина хромосом оказалась выше у краснопыльничковой формы, по сравнению с желтопыльничковой.

С помощью метода поликариограммного анализа в суходольной и болотной популяциях как желтопыльничковой, так и краснопыльничковой форм сосны обыкновенной выделяется большая группа, состоящая из 9 пар длинных равноплечих (I-IX) хромосом, индивидуально идентифицируются 3 пары более коротких не-

равноплечих (I-XII) хромосом. Все хромосомы относятся к метацентрическому типу. Морфометрические параметры хромосом желтопыльничковой и краснопыльничковой форм сосны, произрастающих в условиях болота и суходола, приведены в таблице. Достоверные отличия выявлены по абсолютной длине хромосом между

болотной и суходольной популяциями сосны. Краснопыльничковая и желтопыльничковая формы сосны различаются между собой по абсолютной и относительной длинам хромосом как в болотных, так и в суходольных условиях произрастания.

Таблица. Морфометрические параметры хромосом желто- и краснопыльничковой форм сосны обыкновенной на суходоле и на болоте

Номера хромосом	Абсолютная длина		Относительная длина		Центромерный индекс	
	$x \pm m_x$ , мкм	CV, %	$x \pm m_x$ , %	CV, %	$x \pm m_x$ , %	CV, %
Суходол (желтопыльничковая форма)						
I- IX	16.6±0.11	10.6	4.4±0.03	10.2	47.9±0.13	4.0
X	13.4±0.24	9.1	3.6±0.06	8.9	45.2±0.44	4.9
XI	12.3±0.28	11.5	3.3±0.07	11.2	42.3±0.49	5.9
XII	10.7±0.18	8.8	2.9±0.05	8.3	41.4±0.45	5.5
Суходол (краснопыльничковая форма)						
I- IX	17.9±0.12	10.6	4.5±0.03	9.6	47.8±0.12	4.1
X	14.4±0.24	9.0	3.6±0.06	8.3	46.0±0.51	5.8
XI	13.2±0.24	9.7	3.3±0.05	8.5	45.1±0.39	4.6
XII	12.0±0.23	10.0	3.0±0.05	9.7	41.6±0.51	6.4
Болото (желтопыльничковая форма)						
I- IX	15.3±0.09	10.2	4.4±0.02	8.9	48.0±0.11	3.7
X	12.6±0.21	9.0	3.7±0.05	7.0	47.0±0.33	3.8
XI	11.7±0.24	11.4	3.4±0.07	11.2	43.5±0.47	5.9
XII	9.8±0.16	9.0	2.9±0.04	8.3	41.6±0.42	5.6
Болото (краснопыльничковая форма)						
I- IX	15.6±0.12	10.8	4.5±0.03	9.6	48.1±0.12	3.3
X	12.7±0.26	9.1	3.6±0.05	6.4	45.8±0.39	3.8
XI	11.8±0.27	10.2	3.4±0.07	8.8	43.2±0.60	6.3
XII	10.1±0.23	10.1	2.9±0.06	9.3	41.9±0.49	5.2

При идентификации отдельных пар хромосом в качестве дополнительных маркеров использовались вторичные перетяжки, в зоне которых локализованы ядрышковые организаторы. В суходольных условиях произрастания у желтопыльничковой формы выявляется по одной перетяжке с локализацией  $sc = 45.9 \pm 1.28\%$ ,  $sc = 56.4 \pm 0.72\%$ ,  $sc = 64.7 \pm 0.74\%$  на длинных плечах, соответственно, II, III, IV пар хромосом, у краснопыльничковой формы – по одной перетяжке с локализацией  $sc = 35.3 \pm 0.81\%$ ,  $sc = 44.0 \pm 2.08\%$ ,  $sc = 56.2 \pm 0.53\%$ ,  $sc = 62.8 \pm 0.57\%$  на длинных плечах, соответственно, I, II, III, IV пар хромосом. В болотных условиях произрастания у желтопыльничковой формы отмечается наличие одной вторичной перетяжки с локализацией  $sc = 35.5 \pm 2.49\%$ ,  $sc = 57.5 \pm 0.37\%$ ,  $sc = 62.9 \pm 0.55\%$  на длинных плечах, соответственно, I, III, IV пар хромосом, а также наличие двух перетяжек с локализацией  $sc = 56.7 \pm 1.74\%$  на длинном пле-

че и  $sc = 62.5 \pm 1.52\%$  на коротком плече V пары хромосом. У краснопыльничковой формы на болоте выявляется по одной перетяжке с локализацией  $sc = 32.9 \pm 2.04\%$ ,  $sc = 57.5 \pm 0.48\%$ ,  $sc = 63.7 \pm 0.54\%$  на длинных плечах, соответственно, I, III, IV пар хромосом, а также две перетяжки с локализацией  $sc = 72.9 \pm 2.08\%$  на длинном плече и  $63.6 \pm 1.33\%$  на коротком плече V пары хромосом.

Следовательно, общее число вторичных перетяжек в хромосомах деревьев, произрастающих в болотном экотопе, выше по сравнению с суходольным. При этом локализация вторичных перетяжек в соответствующих парах хромосом желтопыльничковой и краснопыльничковой форм сосны в большинстве случаев совпадает. Однако были выявлены и некоторые различия. Так, в суходольном экотопе I пара хромосом краснопыльничковой формы сосны содержит вторичную перетяжку, а желтопыльничковой –

перетяжек не имеет. V пара хромосом сосны, содержащая в болотном экотопе две вторичные перетяжки, характеризуется их одинаковой локализацией у желтопыльниковой и краснопыльниковой форм на коротком плече и различной – на длинном плече. Ранее было показано, что наличие в кариотипе хромосом с «дополнительными» перетяжками, диагностирующее структурные перестройки ядрышковых организаторов типа инверсий или транслокаций, свойственно различным видам хвойных, произрастающим в болотных экотопах [Седельникова и др., 2010].

Сравнительный анализ содержания ядерной ДНК у 32 деревьев сосны обыкновенной в двух болотных экотопах показал, что тренд к увеличению ее количества наблюдается у краснопыльниковой формы по сравнению с желтопыльниковой. Так, концентрация ДНК на болоте «Бакчарское» у желтопыльниковой формы составляет  $13.0 \pm 0.10$  мг/г абсолютно сухого вещества (а.с.в.), у краснопыльниковой –  $13.2 \pm 0.14$  мг/г а.с.в., на болоте «Инкинский рям» –  $13.4 \pm 0.10$  мг/г а.с.в. и  $13.5 \pm 0.17$  мг/г а.с.в., соответственно. Внутрипопуляционная изменчивость содержания ядерной ДНК у краснопыльниковой формы по сравнению с желтопыльниковой также имеет тенденцию к возрастанию. Коэффициент вариации (CV) концентрации ДНК на болоте «Бакчарское» у желтопыльниковой формы составляет 2.2%, у краснопыльниковой – 3.1%, на болоте «Инкинский рям» – 2.0% и 3.5%, соответственно. Опубликованы свидетельства того, что незаметные, на первый взгляд, изменения ДНК у растений в неблагоприятных условиях произрастания могут быть результатом перестройки отдельных генов, обуславливающих

появление новых резистентных фенотипов [5].

Таким образом, проведенное исследование показало, что желтопыльниковая и краснопыльниковая формы сосны имеют ряд различий, проявляющихся как в болотных, так и в суходольных условиях произрастания. Нарушение числа хромосом (миксоплоидия) наиболее характерно для желтопыльниковой формы сосны на болоте и для краснопыльниковой формы на суходоле. В болотных и суходольных экотопах краснопыльниковая форма сосны обыкновенной отличается от желтопыльниковой большими размерами хромосом (суммарной длины диплоидного набора, абсолютной длины, относительной длины). Возможно, такая дифференциация связана с различиями данных форм по количеству ядерной ДНК – краснопыльниковая форма отличается большими значениями ее концентрации и более высокой внутривидовой изменчивостью по сравнению с желтопыльниковой. Общее число вторичных перетяжек, в зоне которых расположены ядрышковые организаторы, в хромосомах деревьев, произрастающих в болотных условиях, выше по сравнению с суходольными. Различия между желтопыльниковой и краснопыльниковой формами сосны на суходоле и на болоте проявляются в специфичности локализации вторичных перетяжек в I и V парах хромосом. Очевидно, что желтопыльниковая и краснопыльниковая формы сосны обыкновенной являются фенотипически и генетически дифференцированными компонентами внутривидового разнообразия, обладающими различным адаптивным преимуществом в гидротермически контрастных болотных и суходольных экотопах.

*Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН № 30 «Живая природа: современное состояние и проблемы развития» и Междисциплинарного интеграционного проекта СО РАН № 69.*

### **Литература**

1. Бабушкина Л.Г., Зуева Г.В., Анисеев Д.Р. Изменчивость окраски микростробилов сосны обыкновенной в условиях промышленного загрязнения // Лесоведение. – 1997. – №4. – С. 80–85.
2. Божок А.А. Внутривидовая изменчивость сосны обыкновенной в различных экологических условиях Львовской области: автореф. дис... канд. с.-х.н.: 06.03.01; Латвийский НИИ лесохозяйственных проблем. – Рига, 1979. – 16 с.
3. Гриф В.Г., Агапова Н.Д. К методике описания кариотипов растений // Ботан. журн. – 1983. – Т. 71, № 4. – С. 550–553.
4. Козубов Г.М. О краснопыльниковой форме сосны обыкновенной // Ботан. журн. – 1962. – № 2. – С. 276–280.
5. Кунах В.А. Пластичность генома соматических клеток и адаптивность растений // Молекулярная и прикладная генетика. – 2011. – Т. 12. – С. 7–14.
6. Новикова Т.Н. Сибирские климатипы сосны в географических культурах Западного Забайкалья: дифференциация по росту и цвету микростробилов // Хвойные бореальной зоны. – 2012. – Т. XXX, № 1-2. – С. 140–144.

7. Падутов В.Е., Баранов О.Ю., Воропаев Е.В. Методы молекулярно-генетического анализа. – Мн.: Юнипол, 2007. – 176 с.
8. Пименов А.В., Седельникова Т.С., Ефремов С.П. Морфология и качество пыльцы желто- и краснопыльничковой форм *Pinus sylvestris* в болотных и сухоходольных условиях произрастания (Томская область) // Ботанический журнал. – 2011. – Т. 96, № 3. – С. 367–376.
9. Правдин Л.Ф. Сосна обыкновенная. – М.: Наука, 1964. – 190 с.
10. Седельникова Т.С., Муратова Е.Н. Генеративные органы и кариотип сосны обыкновенной на олиготрофных болотах Западной Сибири // Лесоведение. – 1991. – № 3. – С. 34–43.
11. Седельникова Т.С., Пименов А.В., Ефремов С.П. Морфология пыльцы сосны обыкновенной на болотах и суходолах // Лесоведение. – 2004. – № 6. – С. 1–5.
12. Черепнин В.Л. Изменчивость семян сосны обыкновенной. – Новосибирск: Наука, 1980. – 183 с.

**SEDEL'NIKOVA T.S., PIMENOV A.V.**

*Sukachev Institute of Forest SB RAS*

*Russia, 660036, Krasnoyarsk, Akademgorodok, 50/28, e-mail: tss@ksc.krasn.ru*

### **KARYOLOGICAL INVESTIGATION AND ANALYSIS OF DNA CONTENT OF RED-AND YELLOW-COLORED MALE CONES FORMS OF SCOTS PINE IN BOG AND DRY VALLEYS ECOTOPES**

**Aims.** The comparative study of red- and yellow-colored male cones forms of Scots pine growing in bog and dry valleys ecotopes by karyological parameters and DNA content was conducted. **Methods.** The follow chromosomal parameters were determined: absolute length of chromosomes, total length of the diploid complement of chromosomes, relative length of chromosomes, centromeric index, localization of secondary constriction. Evaluation of DNA content was carried out in spectrophotometer BioRad Smartspec Plus by the standard technique (Padutov et al., 2007). **Results.** Red- and yellow-colored male cones forms of Scots pine have differences in length of chromosomes, localization of secondary constrictions, and DNA content both in bog and dry valleys ecotopes. **Conclusions.** Red- and yellow-colored male cones forms of Scots pine are components of intraspecific diversity, possessing different adaptive advantages in bog and dry valleys ecotopes.

*Key words:* *Pinus sylvestris*, intraspecific forms, karyotype, DNA content.

**СЕДЕЛЬНИКОВА Т.С., ПИМЕНОВ А.В., ЕФРЕМОВА Т.Т.**

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт леса им. В.Н. Сукачева Сибирского отделения Российской академии наук,*

*Российская Федерация, 660036, Красноярск, Академгородок, 50/28, e-mail: tss@ksc.krasn.ru*

### **ХРОМОСОМНЫЕ НАРУШЕНИЯ У СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ В ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ЭДАФИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ**

Исследование процессов мутагенеза в популяциях сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), произрастающих в условиях эдафической экстремальности, представляет актуальность для выявления закономерностей адаптации, полиморфизма и эволюции вида, а также может использоваться в качестве одного из методов биоиндикации экологической обстановки. Спектр и частота встречаемости структурных перестроек хромосом и патологий митоза являются одними из наиболее чувствительных критериев цитогенетического мониторинга состояния насаждений хвойных [3]. Хромосомные нарушения и аномалии митоза изучались в популяциях сосны обыкновенной, произрастающих в

неблагоприятных эдафических условиях на меловых субстратах Центрального Черноземья, на почвах, испытывающих влияние сильной засухи на фоне возрастающей аридизации и континентальности климата в Южном Забайкалье, Центральной Тыве и Хакасии, а также на почвах, подвергающихся комплексному техногенному загрязнению промышленными отходами на Южном Урале и в Алтайском крае [5, 6, 7, 9, 10]. В настоящем сообщении представлены результаты изучения хромосомных нарушений и патологий митоза в популяциях сосны обыкновенной в условиях эдафической экстремальности сухо-степного и болотного экотопов.