

УДК 630х165.3 :630*17:582.475.4 (571.5)

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ СЕМЕННОГО ПОТОМСТВА КАРЛИКОВЫХ СОСЕН НА ЮГЕ ВОСТОЧНОЙ СИБИРИ

О.С. Машкина¹, И.В. Тихонова², Е.Н. Муратова², Л.С. Мурая¹

¹ГОУ ВПО "Воронежский Государственный университет"

394006 Воронеж, Университетская пл., 1, E-mail: olga_mashkina@yahoo.com

²Учреждение Российской академии наук Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН
660036 Красноярск, Академгородок, 50/28, E-mail: selection@ksc.krasn.ru

В работе представлены результаты цитогенетического анализа семенного потомства контрастных по росту деревьев сосны обыкновенной в лесостепных борах Южной Сибири: карликовых, полукарликовых и высокорослых. Установлена более высокая частота и более широкий спектр патологий митоза на стадиях мета-, ана- и телофазы у деревьев южно-сибирских остепненных боров (особенно у карликов) по сравнению с сосной, произрастающей в Воронежской лесостепи. Отмечено существенное влияние генотипа материнского дерева, а также климатических условий на величину цитогенетической изменчивости проростков семян. Возникновение хромосомных перестроек (мостов, кольцевых хромосом и др.), геномных нарушений (миксоплоидии, приводящей к изменению дозы генов в клетках с различным уровнем плоидности), функциональных сбоях (появление остаточных ядрышек) свидетельствуют о повышении уровня генетической и эпигенетической изменчивости семенного потомства сосны в неблагоприятных условиях произрастания, что может иметь адаптивное значение.

Ключевые слова: сосна обыкновенная, граница ареала, низкорослость, патологии митоза, частота микроядер

It is shown the results of cytogenetic analysis of seed progeny of Scots pine trees contrasting on growth in the forest-steppe zone of Southern Siberia (dwarf, semi-dwarf, high growth). A high frequency and spectrum of pathologies in the stages of mitosis (metaphase, anaphase, and telophase) of the pine trees in South Siberian forest compared with Scots pine forests in Voronezh was established. A significant effect of the parent tree genotype, as well as climatic conditions on the value of cytogenetic variability of seedlings was marked. The highest frequency of genomic and chromosomal mutations was observed in the years characterized by the most adverse conditions of moisture during embryogenesis.

Key words: Scots pine, border area, dwarfism, mitosis pathology, micronuclei frequency

ВВЕДЕНИЕ

Сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.) является одним из основных видов - лесообразователей на территории России и имеет важное хозяйственное и природоохранное значение. Благодаря большой экологической пластичности она способна расти в разнообразных почвенно-климатических условиях. На южной границе ареала, в лесостепной зоне, условия произрастания сосны варьируют от благоприятных до экстремальных. Вероятно, поэтому южные островные боры отличаются большим формовым разнообразием (Правдин, 1964; Ирошников, 1978; Сунцов, 1984; Санников и др., 2002; Тихонова, 2003). Условия лесостепей Хакасии и Забайкалья на юге Сибири близки к пределу климатической нормы вида и отличаются довольно засушливым резко континентальным климатом. Остепненно-разнотравные сосняки здесь приурочены, как правило, к тенистым склонам, либо к неровностям рельефа.

Так как разнообразие растительного покрова в экстремальной среде является одним из ведущих факторов устойчивости экосистем, изучение формового разнообразия лесных насаждений в сухой лесостепи приобретает особую актуальность. В

этой связи особый интерес представляют карликовые формы сосны, встречающиеся только в крайне неблагоприятных, пограничных для вида условиях. В частности, достаточно перспективным в исследовании механизмов адаптации и генетических процессов, лежащих в основе приспособления древесных к неблагоприятным условиям произрастания, является цитогенетический анализ, что показали результаты исследования последних десятилетий (Буторина, 1989; Муратова, 1991; Муратова, Седельникова, 2004; Машкина и др., 2009).

Целью данного исследования было проведение сравнительного анализа хромосомных нарушений семенного потомства различных по типу роста (карликовых, полукарликовых и типичных высокорослых) деревьев сосны обыкновенной для выявления их цитогенетической реакции на засушливые условия произрастания в Хакасии и Забайкалье.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследовали популяции, произрастающие в контрастных почвенно-климатических условиях: в Ширинском бору (в Хакасии), в Нижнечикойском бору (в Забайкалье) и Усманском бору (в Воронежской области). Первые два сосновых массива растут в условиях резко континентального климата с холодной зимой и жарким засушливым летом на маломощных горных дерново-перегнойных и дерново-подзолистых почвах. Для Ширинской степи характерно большое число ветреных дней: около 30-

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке грантов РФФИ №11-04-92226-Монг_а и № 11-04-98008-р_сибирь_а

40 дней в году скорость ветра в приземном слое достигает 15-32 м/с, что повышает испаряемость влаги с почв и транспирацию растений. Среднегодовая температура воздуха по среднемноголетним данным $-0,4^{\circ}\text{C}$; амплитуда средних месячных температур воздуха летом $40-41^{\circ}\text{C}$, средняя сумма осадков за год – 320 мм с колебаниями в разные годы от 192 до 462 мм (Агроклиматические ресурсы ..., 1974). Условия Усманского бора можно считать оптимальными для сосны обыкновенной. Климат умеренно континентальный. Среднегодовая температура воздуха составляет $6,5^{\circ}\text{C}$; средняя сумма осадков за год – 578 мм с колебаниями в разные годы от 435 до 867 мм (Лавров и др., 1989).

В Ширинском бору деревья в возрасте 80-130 лет имеют высоту 12-17 м, классы бонитета IV-Va и ниже. В Нижнечикойском бору возраст деревьев составляет 44-115 лет, высота 11-15 м, классы бонитета IV-V. В Усманском бору, при среднем возрасте насаждений 80 лет, деревья достигают высоты 20-30 м, классы бонитета I - II (Вересин, 1971). По данным цитогенетического анализа, участок Усманского бора (с. Ступино), расположенный в границах Воронежского государственного биосферного заповедника (ВБГЗ), рассматривается как эталон экологически безопасной территории (Буторина и др., 2007) и может быть использован в качестве контроля.

Материалом для исследования послужило семенное потомство сосны обыкновенной от свободного опыления различающихся по росту групп деревьев: карликовых (4 дерева, Ширинский бор), полукарликовых (11 деревьев, Нижнечикойский бор) и высокорослых (3 дерева из Ширинского бора, 8 – из Нижнечикойского бора и 10 – из Усманского бора). Материал для исследования собирали в течение 1978-1986, 2006-2010 гг.

Возраст карликовых деревьев из Ширинского бора составил для k_1 -37 лет, k_2 -90 лет, k_3 -202 года и k_4 -168 лет, возраст полукарликовых сосен из Нижнечикойского бора – 115-135 лет. Рядом с карликами и полукарликами соседствуют отдельные нормально рослые сосны. Возраст взятых для сравнения высокорослых деревьев колеблется от 44 до 115 лет. Все карлики значительно уступают в росте одновозрастным типичным соснам (менее $\frac{1}{2}$ от популяционного среднего одного класса возраста), характеризуются меньшими приростами побегов, более короткой хвоей, большей изменчивостью по протяженности и форме кроны. Полукарликовые деревья отстают в росте от типичных деревьев на 20-40 %. Деревья относили к той или иной группе согласно классификации А.В. Сунцова (1984).

Для цитогенетического анализа использовали меристематические ткани кончиков корешков проросших семян, достигших длины 0,5 – 1,5 см, которые фиксировали в утренние часы (с 8.00 до 9.00) в спиртово-уксусной смеси (3 части 96 %-ного этилового спирта и одна часть ледяной уксусной кислоты). Для накопления митозов и сокращения (для подсчета числа) хромосом перед фиксацией проводили предварительную обработку кончиков кореш-

ков 1 % водным раствором колхицина в течение 5-6 ч. (начиная с 8.00 утра). Давленные препараты, окрашенные ацетогематоксилином, изготавливали по методике Топильской и др. (1975) в нашей модификации. Просмотр микропрепаратов осуществлялся на микроскопах МБИ-6 и Микмед-2 при увеличении $40 \times 1,5 \times 10$. Для каждого образца (дерева) просматривали корешки от 10-ти проростков. По возможности, анализировали все делящиеся клетки (не менее 100 – 200) корневой меристемы с каждого препарата. Для подсчета числа хромосом анализировали не менее 30 метафазных пластинок. Микрофотосъемку проводили с использованием цифрового видеоокуляра DCM500 (USB 2.0; WEBBERS MYScore 500 M).

Частоту и спектр (типы) патологий митоза (ПМ) учитывали в метафазе, анафазе и телофазе митоза клеток корневой меристемы. Частота патологий митоза вычислялась как отношение числа клеток с патологиями в мета-, ана-, телофазе митоза к общему числу просмотренных делящихся клеток (на тех же стадиях), в %. Спектр патологических митозов представлен как процентное отношение каждого вида патологий к общему числу патологических митозов. Учитывали наличие и частоту встречаемости клеток с микроядрами (в 600 – 800 интерфазных клетках) поскольку этот показатель может отражать уровень нерепарированных повреждений хромосом (Буторина, 2001; Захаров, 1995).

Статистическая обработка полученных экспериментальных данных осуществлялась с использованием статистического пакета программ Stadia. Процедура группировки данных и их обработка изложены в работе А.П. Кулаичева (2006). Сравнение выборок по частоте нарушений митоза и частоте микроядер проводилось с использованием непараметрических критериев: X-критерия рангов Ван-дер-Вардена, так как данные признаки не подчиняются нормальному распределению. Проверку нормальности распределения осуществляли с использованием критерия χ^2 .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Лабораторная всхожесть семян из южно-сибирских популяций сосны, определенная на 14-й день проращивания, существенно не различалась между группами карликовых и типичных по росту деревьев. Однако в целом она была значительно ниже (в 1,8 – 2 раза) по сравнению с деревьями из Усманского бора (табл. 1), что может быть связано с неблагоприятными условиями произрастания деревьев в Ширинском бору. При этом, наиболее высокая вариабельность показателя наблюдалась у группы карликовых деревьев (пределы варьирования признака – 15,8 - 91,0 %, коэффициент вариации – 54,3 %).

В Нижнечикойской популяции отмечена та же особенность. Более низкое качество семян, и даже полную стерильность карликовых деревьев из Балгазынского бора (в Туве) отмечал также А.В. Сунцов (1984).

Таблица 1 - Лабораторная всхожесть семян деревьев (%), контрастных по росту, из различных мест произрастания (годы сбора семян 2006, 2009 и 2010)

Показатели	Ширинский бор		Усманский бор (высокорослые деревья)
	карлики	высокорослые деревья	
Лабораторная всхожесть, %	39,4 ± 4,20	47,9 ± 4,30	88,3 ± 2,90*
Пределы варьирования признака, min – max	15,8 - 91,0	20,0 – 82,9	50,8 – 95,9
Коэффициент вариации	54,3	44,6	12,3

*Примечание: различия между выборками деревьев из Ширинского и Усманского боров достоверны при $P < 0,001$

Наиболее высокая цитогенетическая изменчивость отмечена в потомстве карликовых деревьев. В среднем, частота ПМ у них была в 2 раза выше (5,5 %) по сравнению с высокорослыми деревьями из Ширинского бора (2,8 %) и в 7 раз - по сравнению с деревьями из Усманского бора (0,8 %). Отмечено значительное варьирование частоты ПМ у деревьев из Ширинского бора: от 0 (нормальный митоз) до 18,7 % у семенного потомства карликовых деревьев и от 0 до 11,2 % - у высокорослых. В потомстве высокорослых деревьев из Усманского бора пределы варьирования были наименьшими и составили от 0 до 2,8 %.

В потомстве полукарликовых деревьев нижне-чичкойской популяции частота патологий митоза также была достаточно высокой и в среднем за разные годы составила $4,4 \pm 0,5$ % (с варьированием от 0 до 10,7 %), а у высокорослых – $2,9 \pm 0,9$ % (с варьированием от 0 до 10,3 %). В целом, частота ПМ в этой популяции также была достоверно выше, чем у деревьев Усманского бора (при $P < 0,001$). Различия между потомством карликовых и полукарликовых деревьев южно-сибирских популяций по этому показателю оказались несущественными.

Частота патологий митоза в семенном потомстве деревьев южно-сибирской популяции варьирует в зависимости от материнского дерева и погодных условий во время опыления и развития семян (табл. 2). Т. е. в пределах выборок деревьев наблюдается значительная межсемейная дифференциация между потомством разных деревьев, по-видимому, обусловленная генотипическими различиями материнских деревьев.

Так, в группе карликовых сосен наиболее высокий уровень ПМ отмечен у карлика *к4* (с максимальным значением 14,7 % в 2006 г. при внутрисемейном варьировании от 9,4 до 18,7 %), что в 3 раза выше пределов нормальных значений уровня спонтанного мутирования в средней полосе России – до 5% (Буторина, 2000, 2007; Дорошев, 2004). У карлика *к1* частота ПМ в том же 2006 году была также достаточно высокой и составила 6,6 % при внутрисемейном варьировании от 0,5 до 15,4 %. Интересно, что у этих двух карликов нарушения в митозе отмечены для всех без исключения проанализированных проростков за все годы исследований. У карлика *к3*, например, при средней за три года исследования (2006, 2009 и 2010) частоте ПМ, равной 3,9 %, нормальный митоз (здесь и далее – «частота ПМ не отличается от спонтанного уровня») наблюдался у 5-ти из 13 проростков (38,5 %), а у высокорослого дерева *х12* при сходной средней (за эти же

три года) частоте ПМ (3,4 %), нормальный митоз отмечен у 8-ми из 16 проростков (50 %). При этом, сохранение отмеченных различий между потомством карликов по частоте ПМ не только в разные годы, но и в пределах одного года, по-видимому, свидетельствует о генотипических различиях материнских деревьев и их различной чувствительности к неблагоприятным условиям произрастания.

В Нижнечичкойской популяции наряду с повышенной частотой встречаемости хромосомных перестроек в группе полукарликов встречаются отдельные деревья, семенное потомство которых отличается невысокой частотой хромосомных нарушений (два дерева) – 1,5 % (дер. №2) и 0,01 % (дер. №11), а также нормально рослые деревья с достаточно высоким числом ПМ (три дерева) – от 9,5 (у дер. №7) до 10,3 % (у дер. №8).

Кроме того, частота ПМ в потомстве карликовых, полукарликовых и высокорослых деревьев существенно варьирует по годам, в зависимости от погодных условий во время опыления и развития семян. Так, наблюдения за тремя полукарликовыми деревьями Нижнечичкойского бора в течение 5 лет показали, что наиболее высокая частота проростков с геномными и хромосомными мутациями (до 70 % семян с 1 дерева) наблюдается в годы, наиболее неблагоприятные по условиям увлажнения (длительная засуха) в период эмбриогенеза (1978, 1979 гг. с суммарным годовым количеством осадков, соответственно, 210 и 168 мм) по сравнению с более благоприятными годами (1983 и 1985 гг., когда за год выпало 298 и 303 мм осадков). То же отмечено и для сосны в Ширинском бору. В то же время нельзя исключать, что повышенная частота ПМ в образцах из Ширинского бора более раннего срока сбора (2006 гг.) может быть связана с накоплением в них хромосомных нарушений в процессе хранения семян (до их проращивания в 2009 г.) в связи с накоплением мутагенных метаболитов.

Всего было выявлено 12 типов патологий митоза (рис. 1):

- 1 тип - фрагментация хромосом в метафазе и анафазе митоза;
- 2 тип - отставание хромосом в метакинезе;
- 3 тип – отставание или забегание хромосом в анафазе;
- 4 тип – обособление группы хромосом в метафазе;
- 5 тип - обособление группы хромосом в анафазе, многополюсный митоз;
- 6 тип – неравномерное распределение хромосом в анафазе, асимметричный митоз;

7 тип – мосты в анафазе и телофазе;
 8 тип – агглютинация (склеивание) хромосом в метафазе и анафазе;
 9 тип – сложные (множественные) нарушения в анафазе и ана-телофазе: мосты + забегание хромосом, фрагментация + забегание хромосом, мосты + отстаивание хромосом, мосты + микроядра и др.
 10 тип – микроядра в телофазе, ана-телофазе;
 11 тип – остаточные ядрышки в метафазе;
 12 тип – кольцевые хромосомы.

Таблица 2 - Частота встречаемости патологических митозов и микроядер в семенном потомстве деревьев сосны обыкновенной

№ дерева	Год сбора семян	Патологии митоза, % $\bar{X} \pm S\bar{X}$	Пределы варьирования min-max, %	Микроядра, % $\bar{X} \pm S\bar{X}$	Пределы варьирования min – max, %
карлики (Ширинский бор, Хакасия)					
к1	2006	6,6 ± 1,1 ¹	1,8 – 15,4	1,3 ± 0,3	0,4 – 4,0
	2010	3,4 ± 0,8 ²	0,5 – 12,7	1,8 ± 0,6	0,1 – 8,2
Среднее за 2 года		4,6 ± 0,8	0,5 – 15,4	1,6 ± 0,4	0,1 – 8,2
к2	2006	2,4 ± 0,2	1,7 – 3,3	0,8 ± 0,1	0,5 – 1,0
	2006	11,5 ± 0,6 ³	8,7 – 13,7	0,5 ± 0,05 ³	0,3 – 0,7
к3	2009	2,4 ± 0,4 ⁴	0,0 – 4,0	0,04 ± 0,02 ⁴	0,0 – 0,2
	2010	0,7 ± 0,3 ⁵	0,0 – 2,4	0,6 ± 0,1	0,2 – 1,8
Среднее за 3 года		3,9 ± 0,7	0,0 – 13,7	0,4 ± 0,1	0,0 – 1,8
К4	2006	14,7 ± 0,8	9,4 – 18,7	2,1 ± 0,3	0,5 – 4,0
	2010	5,4 ± 0,6 ⁴	1,4 – 11,4	0,5 ± 0,1	0,1 – 1,6
Среднее за 2 года		8,3 ± 0,9	1,4 – 18,7	1,0 ± 0,2	0,1 – 4,0
Среднее за весь период наблюдений		5,5 ± 0,7	0,0 – 18,7	1,0 ± 0,2	0,0 – 8,2
высокорослые (Ширинский бор, Хакасия)					
2	2010	1,8 ± 0,2	0,9 – 3,4	0,4 ± 0,05	0,1 – 0,8
	2006	7,3 ± 0,6 ³	1,4 – 11,2	1,5 ± 0,2 ³	0,6 – 2,4
х12	2009	0,3 ± 0,1 ⁴	0,0 – 2,0	0,1 ± 0,02 ⁴	0,0 – 0,2
	2010	3,7 ± 0,2 ⁵	1,9 – 6,3	0,8 ± 0,1 ⁵	0,1 – 1,6
Среднее за 3 года		3,5 ± 0,4	0,0 – 11,2	0,7 ± 0,1	0,0 – 2,4
25	2006	4,3 ± 1,1 ³	0,0 – 10,8	1,3 ± 0,2 ³	0,5 – 2,0
	2010	1,4 ± 0,2 ⁴	0,3 – 3,0	0,3 ± 0,05 ⁴	0,1 – 0,8
Среднее за 2 года		2,3 ± 0,4	0,0 – 10,8	0,6 ± 0,1	0,1 – 2,0
Среднее за весь период наблюдений		2,8 ± 0,4***	0,0 – 11,2	0,6 ± 0,10*	0,0 – 2,4
высокорослые (Усманский бор)					
Среднее для 10 деревьев	2006	1,1 ± 0,3	0,0 – 2,5	0,01 ± 0,01	0,0 – 0,09
	2007	1,3 ± 0,2	0,0 – 2,8	0,001 ± 0,001	0,0 – 0,01
	2008	1,4 ± 0,2	0,4 – 2,7	0,001 ± 0,001	0,0 – 0,01
	2009	0,1 ± 0,1	0,0 – 0,9	0,0	0,0
	2010	0,2 ± 0,04	0,1 – 1,5	0,004 ± 0,004	0,0 – 0,03
Среднее за весь Период наблюдений		0,8 ± 0,1***	0,0 – 2,8	0,003 ± 0,002	0,0 – 0,09

Примечание: различия между 1 и 2 достоверны при P < 0,05; различия между 3,4 и 5 достоверны при P < 0,001; различия с группой карликовых деревьев достоверны при: ** P < 0,01, *** P < 0,001

Различия между изученными образцами выявлены не только по частоте, но и по спектру нарушений митоза (рис. 2). Наиболее широкий спектр ПМ, включающий 11 типов, выявлен в потомстве карликовых деревьев, тогда как у типичных рослых деревьев из Ширинского бора встречалось всего 7 типов, а у рослых их Усманского бора – 3 типа (т.е. набор ПМ был в 3,5 раза меньше, чем у карликов). Спектр ПМ у проростков семян сосны из Ширинского бора был представлен как патологиями, связанными с повреждением хромосом (фрагменты

хромосом в метафазе и анафазе; мосты в анафазе и телофазе; отстаивание хромосом в метакинезе и анафазе-телофазе; забегание хромосом в анафазе, большая часть из которых способна дать начало микроядрам), так и нарушениями веретена деления (обособление группы хромосом, многополюсный митоз). Еще один тип патологий - кольцевые хромосомы, был обнаружен у проростков семян большинства деревьев Нижнечикойского бора (нормы и полукарликов): центрические, дицентрические, ацентрические, двойные и надетые кольца.

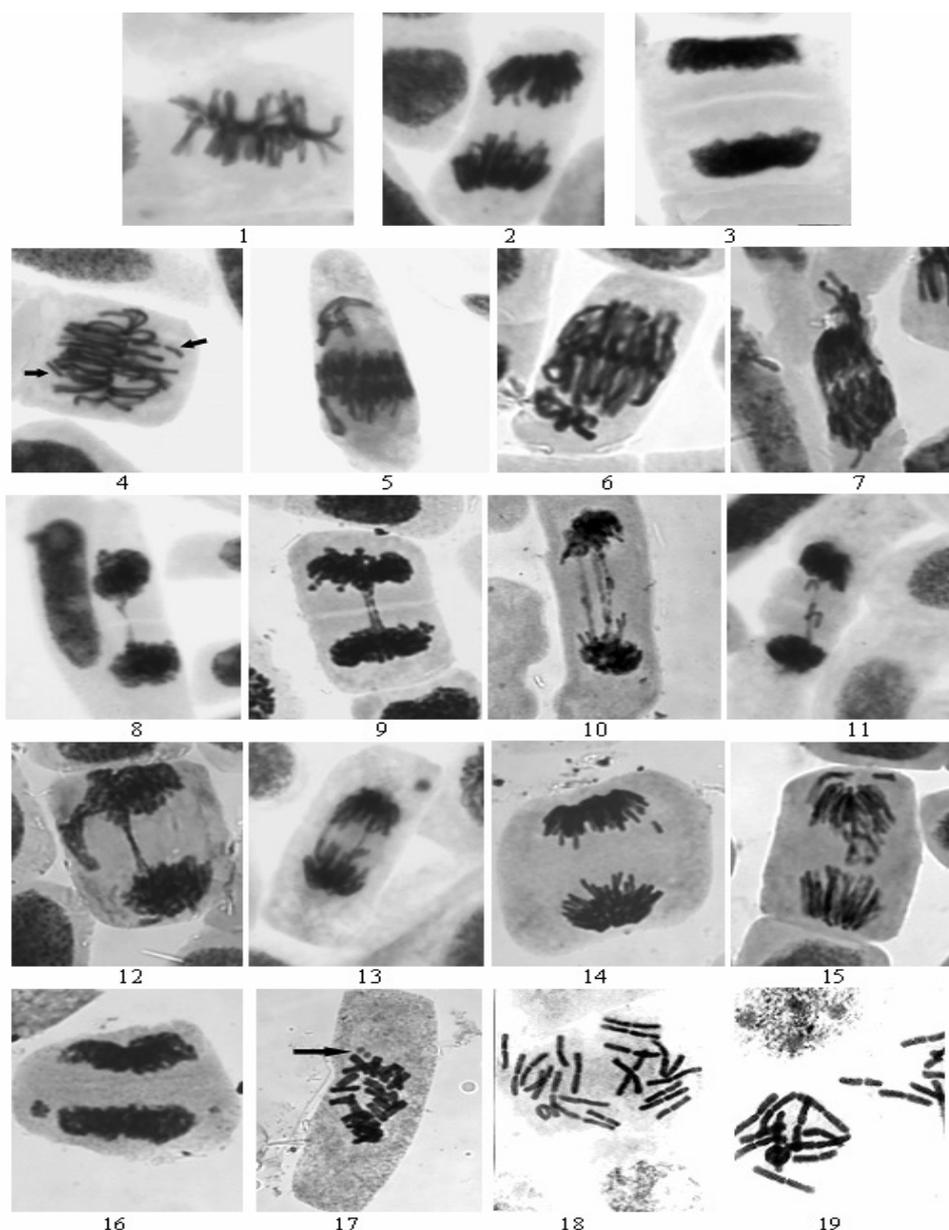


Рисунок 1 - Типы патологий митоза в корневой меристеме различных деревьев сосны обыкновенной из Ширинского бора: 1 - 3 – нормальное прохождение митоза в клетках корневой меристемы сосны обыкновенной (1- метафаза, 2 – анафаза, 3 – телофаза); 4 - фрагментация хромосом в метафазе; 5 и 6 – отставание хромосом в метакинезе и обособление хромосом; 7 – обособление группы хромосом + частичная агглютинация хромосом в анафазе; 8-13 – мосты в анафазе и ана-телофазе (одинарный - 8, двойной - 9, множественные - 10, мост + отставание хромосом - 11, двойной мост+обособление группы хромосом – 12, мосты+микроядро - 13); 14 - фрагментация хромосом в анафазе; 15 - отставание+забегание+фрагментация хромосом в анафазе; 16 - микроядро в телофазе; 17 – остаточные ядрышки в метафазе; 18-19 – кольцевые хромосомы. Увел. $10^{\times} \times 40^{\times} \times 1,5^{\times}$

Подобные структурные мутации описаны у хвойных в природных популяциях (в частности, на границах ареала вида), в условиях антропогенного стресса (техногенное и радиоактивное загрязнение) (Муратова, Седельникова, 2004). Основными причинами, вызвавшими данные нарушения в клетках проростков семян из Нижнечикойского бора, могут быть как неблагоприятные погодные условия в период эмбриогенеза, так и повышенный радиоактивный фон, отмеченный для Южного Забайкалья (Никифорова, 1969). Большой частью это короткоживущие хромосомные aberrации, исчезающие в процессе дальнейшего деления и дифференцировки клеток. Надетые кольца наблюдаются при сомати-

ческом кроссинговере. Образование дицентрика свидетельствует о наличии асимметричной транслокации в клетке. Перераспределение генетического материала между хромосомами может привести к дополнительному резерву изменчивости, увеличению диапазона нормы реакции организма.

Обнаруженные нарушения также могут привести к неравномерному распределению хромосом между дочерними клетками, потере генетического материала, возникновению анеуплоидии и нарастающую гетерогенности клеточных популяций. Так, в потомстве карлика *k4* наряду с типичными клетками, содержащими диплоидный набор хромосом

($2n=2x=24$), встречались клетки с гипоанеуплоидным ($2n-(1...8)=(23-16)$) набором хромосом, т.е. наблюдалась миксоплоидия соматической ткани (рис. 3). По мнению ряда исследователей, миксоплоидия наблюдается при изменении, и особенно,

при резком ухудшении условий произрастания: повышенной или пониженной температуре, засолении почвы, ранении растения, старении тканей и др. (Андрощук, 1978; Сапунов, 1980; Седельникова и др., 2010; Кунах, 2011).

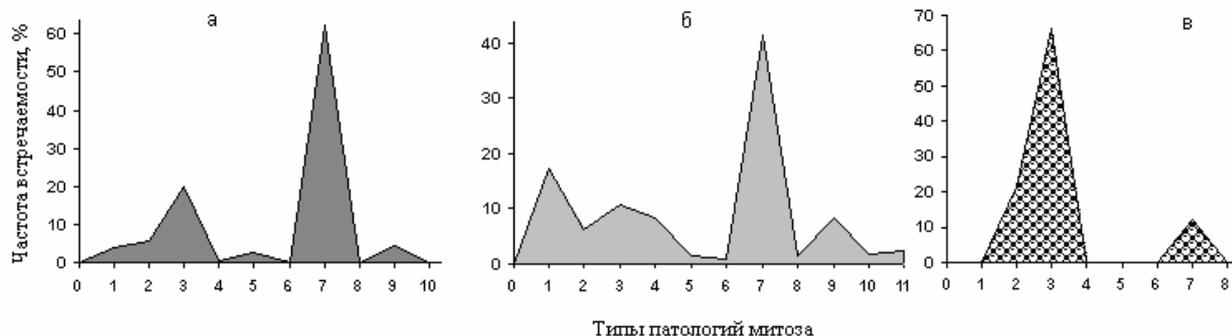


Рисунок 2 - Спектр патологий митоза в потомстве деревьев сосны обыкновенной контрастных по росту: высокорослых (а) и карликов (б) из Ширинского бора и нормально рослых (в) из Усманского бора. Типы патологий митоза: 1 - фрагментация хромосом в метафазе и анафазе митоза; 2 - отставание хромосом в метакинезе; 3 – отставание или забегание хромосом в анафазе; 4 – обособление группы хромосом в метафазе; 5 - обособление группы хромосом в анафазе, многополюсный митоз; 6 – неравномерное распределение хромосом в анафазе, асимметричный митоз; 7 – простые и сложные мосты в анафазе и телофазе; 8 – агглютинация (склеивание) хромосом в метафазе и анафазе; 9 – сложные (множественные) нарушения в анафазе и ана-телофазе; 10 – микроядра в телофазе, ана-телофазе; 11 – остаточные ядрышки в метафазе

Анеуплоидные клетки появляются при нарушении гомеостаза, наследственных дефектах системы репарации и гормонального баланса (Вахтин, 1980; Сапунов, 1980). В то же время, в нижнечикойской популяции было отмечено, что если в хромосомном наборе имелась дицентрическая хромосома, то число хромосом уменьшалось до 23, если одновременно в наборе имелось 2 дицентрика – оставалось 22 хромосомы, а при одновременном присутствии ди- и трицентрической хромосом в наборе оставалась только 21 хромосома.

Преобладающим типом аномалий в клетках проростков семя карликов и рослых деревьев, собранных в Ширинском бору, являются простые и сложные мосты (7 тип), которые составили 41,5 – 62,4 %. Их преобладание в общем спектре свидетельствует о повышении уровня мутационного процесса (хромосомных перестроек) на анализируемой территории. С другой стороны, присутствие мостов, по мнению некоторых авторов (Акопян, 1967; Симаков, 1983), отражает возрастание репарационных способностей объектов и возможную их адаптацию к стрессовому воздействию. В группе карликов существенную долю в общем спектре занимает фрагментация хромосом в метафазе и анафазе митоза (1 тип, 17,2 % против 4,1 % в группе высокорослых деревьев), что также свидетельствует о произошедших структурных хромосомных aberrациях. Значительное количество приходится и на долю сложных (множественных) нарушений: мосты + забегание хромосом, фрагментация + забегание хромосом, мосты + отставание хромосом, мосты + микроядра и др. (9 тип, 8,4 % против 4,5 % у нормально рослых). Присутствие в анафазе одиночных фрагментов свидетельствует о делециях хроматидного типа, парных – хромосомного. Мос-

ты с фрагментами образуются при асимметричных транслокациях (Муратова, Седельникова, 2004; Калашник, 2008).

Среди ПМ в группе карликов отмечены и несовместимые с жизнью нарушения митоза, отсутствующие в потомстве высокорослых деревьев, - агглютинация (склеивание) хромосом в метафазе и анафазе митоза (8 тип, 1,3 %).

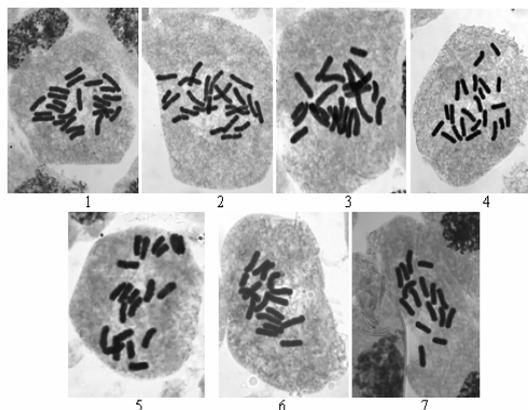


Рисунок 3 - Метафазные пластинки клеток меристемы проростков в потомстве карлика №4 с: 1-3 - диплоидным набором хромосом: $2n=2x=24$ (модальное число хромосом) и 4-7 - гипоанеуплоидным набором хромосом: $2n-1=23$ (4), $2n-3=21$ (5), $2n-7=17$ (6), $2n-8=16$ (7). Увеличение $10^x \times 40^x \times 1.5^x$

В потомстве карлика №1 были выявлены проростки с остаточными ядрышками в метафазе (рис. 1). Присутствие остаточных ядрышек в метафазе митоза рассматривают как проявление эпигенетической изменчивости (Буторина, 2008), поскольку изменение генетического материала при этом не происходит, но наблюдаемый пуффинг конденси-

рованных хромосом является проявлением активности генов рибосомальных цистронов, обычно ингибированных на этой стадии. Это приводит к синтезу дополнительных белков, обеспечивающих существование клетки в стрессовых условиях (Муратова и др., 2009). Остаточные ядрышки описаны в клетках животных и растений при лучевом воздействии, вирусной инфекции, под влиянием химических препаратов (Буторина, 2002; Муратова и др., 2009; Седелникова, Пименов, 2007). Их появление рассматривают как механизм адаптации клеток к воздействию экстремальных факторов (Калаев и др., 2006; Муратова и др., 2009; Butorina et al., 1997). Таким образом, в потомстве карликовых деревьев отмечены специфические нарушения митоза (как совместимые, так и не совместимые с жизнью), отсутствующие в группе высокорослых деревьев.

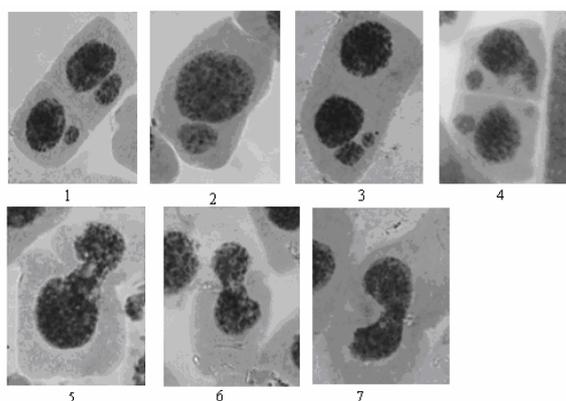


Рисунок 4 - Микроядра в клетках корневой меристемы проростков семян сосны обыкновенной, произрастающей в Ширинской лесостепи (1- 4) и амитозоподобное деление (5 -7) в семенном потомстве карликовых деревьев №3 и 4 Ширинского бора. Увеличение $10^x \times 40^x \times 1.5^x$

Спектр ПМ у проростков семян сосны из Усманского бора представлен отставаниями хромосом в метакинезе (21,3 %) и анафазе (17,8 %) митоза, мостами в ана-телофазе (12,3 %). Преобладающим типом нарушений (48,6 %) является забегание хромосом в анафазе, связанное с повреждением хромосом в области кинетохора, либо с частичным нарушением нитей веретена деления. Такие патологии могли быть следствием спонтанного мутационного процесса в результате флуктуации погодных факторов или действия вторичных метаболитов, образующихся в ходе нормальных метаболических процессов в организме, которые в большинстве случаев исправляются репарационными системами клетки.

Результаты микроядерного теста представлены в табл. 2 и на рис. 4. Микроядра отмечены в потомстве обеих групп деревьев из Ширинского бора, что свидетельствует о наличии нерепарированных повреждений хромосомного материала и может привести к цитогенетической нестабильности клеточных популяций (Ильинских и др., 1992). Однако частота их появления была различной. Наиболее высокая частота микроядер была выявлена у карликов к4 (2,1 % при внутрисемейном варьировании от

0,5 до 4 %) и №1 (1,6 % при внутрисемейном варьировании 0,1-8,2 %). У этих же карликов отмечена и наиболее высокая частота ПМ за все исследуемые годы. Причем, микроядра присутствуют у всех без исключения проанализированных проростков. Более того, у отдельных проростков этих же карликов количество микроядер доходило до 3-4 и выше на клетку, и было сходно с цитологическими картинами апоптоза – как проявления генетической программы самоликвидации отдельных патологически измененных нежизнеспособных клеток. В среднем группы карликовых и высокорослых деревьев статистически не различались по частоте встречаемости интерфазных клеток с микроядрами, но существенно различались с группой высокорослых деревьев из Усманского бора (соответственно – 1 %; 0,6 % и 0,003 %, т.е. в 200 – 300 раз выше).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований было установлено, что в семенном потомстве сосны обыкновенной, произрастающей в остепненных борах Сибири на южной границе ареала вида, происходит существенное изменение цитогенетических показателей: наблюдается увеличение частоты и спектра патологий митоза, расширение пределов варьирования частоты ПМ и присутствие микроядер по сравнению с потомством сосны обыкновенной из средней полосы России в Воронежской лесостепи. Это может быть связано с действием комплекса неблагоприятных факторов среды на южной границе ареала вида, в том числе экстремально высокими температурами, засухой и бедностью каменистых почв.

Полученные данные свидетельствуют о том, что все группы изученных деревьев, контрастные по росту (карлики, полукарлики и высокорослые), произрастающие в экстремальных условиях обитания, нередко находятся в состоянии экологического стресса. В потомстве всех изученных деревьев южно-сибирских популяций выявлено относительно высокое количество микроядер в клетках корневой меристемы, свидетельствующих о наличии нерепарированных повреждений хромосом. Наиболее высокая цитогенетическая изменчивость была отмечена в потомстве карликовых деревьев. В то же время, группа карликовых деревьев неоднородна по изучаемым признакам. Наиболее высокий уровень и широкий спектр ПМ и, соответственно, интенсивность мутационного процесса в клеточных популяциях организма и степень повреждения генетического материала отмечены в семенном потомстве двух карликов. У этих карликов нарушения в митозе обнаружены во всех без исключения проанализированных проростках за все годы исследования. Два других карлика мало отличаются от высокорослых деревьев по частоте и спектру нарушений митоза, их потомство расщепляется по степени нарушения протекания митозов (от нормального до аномального).

Однако и среди высокорослых встречаются деревья, семенное потомство которых характеризуется достаточно высокой частотой ПМ. Это свидетельствует о том, что частота и спектр ПМ в значительной степени зависят как от разнообразия условий произрастания деревьев в популяциях, так, по видимому, и от генотипических особенностей материнских деревьев, не всегда проявляющихся на морфологическом уровне разной ростовой активностью. Возникновение различных хромосомных перестроек (простых и сложных мостов, кольцевых хромосом различного типа и др.), геномных нарушений (миксоплоидии, приводящей к изменению дозы генов в клетках с различным уровнем плоидности), функциональных сбоев (появление остаточных ядрышек) свидетельствуют о повышении уровня генетической и эпигенетической изменчивости семенного потомства сосны в неблагоприятных условиях произрастания, что может иметь адаптивное значение.

Установлено, что частота патологий митоза (ПМ) варьирует в зависимости от погодных условий года во время опыления и развития семян. Наиболее высокая частота проростков с геномными и хромосомными мутациями наблюдается в наиболее неблагоприятные по условиям увлажнения годы, характеризующиеся длительной засухой в период эмбриогенеза.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Агроклиматические ресурсы Красноярского края и Тувинской АССР.- Л.: Гидрометеиздат, 1974. - 210 с.
- Акопян, Э.М. Влияние различных типов ионизирующих излучений на возникновение хромосомных aberrаций у гороха. Пострадиационное восстановление/ Э.М. Акопян // Генетика.- 1967.-Т. 3.- № 5.- С. 45-51.
- Алов, И.А. Патология митоза (формы патологии, классификация, количественная характеристика)/И.А. Алов // Вестник АМН СССР.- 1965.-№ 11.- С. 58-66.
- Андрощук, А.Ф. Частота спонтанных хромосомных aberrаций у видов тысячелистника / А.Ф. Андрощук // Цитология и генетика.- 1978.- Т. 12.- № 1.- С. 15-20.
- Буторина, А. К. Факторы эволюции кариотипов древесных / А.К. Буторина // Успехи современной биологии.- 1989.- Т. 108.- Вып. 3 (6).- С. 342-357.
- Буторина, А.К. Цитогенетическая характеристика семенного потомства некоторых видов древесных растений в условиях антропогенного загрязнения г.Воронежа / А.К. Буторина В.Н. и др. // Цитология.- 2000.- Т.42.- №2.- С.196-200.
- Буторина, А.К. Цитогенетическая изменчивость в популяциях сосны обыкновенной / А.К. Буторина В.Н. и др. // Экология.- 2001.- № 3.- С. 216-220.
- Буторина, А.К. Цитогенетический мониторинг аутохтонных лесов Усманского и Хреновского боров / А.К. Буторина О.Н. и др. // Известия РАН: Серия биологическая.- 2007.- № 4.- С. 508-512.
- Буторина, А.К. Ритмы суточной митотической активности у золотистой фасоли *Vigna radiate* (L.) R. Wilczek / А.К. Буторина, До Ныи Тиен. // Цитология.- 2008.- Т. 50.- №8.- С. 729-733.
- Вахтин, Ю.Б. Генетическая теория клеточных популяций/Ю.Б. Вахтин.- Л.: Наука, 1980.-168с.
- Вересин, М.М. Леса воронежские. Происхождение, облик и будущее наших лесных ландшафтов / М.М. Вересин. - Воронеж: Центрально-Черноземн. кн. изд-во, 1971.- 223 с.
- Дорошев, С.А. Влияние антропогенных стрессоров на изменчивость цитогенетических показателей у сосны обыкновенной / С.А. Дорошев. Автореф. дисс...к. б. н. - Воронеж, 2004.- 23 с.
- Захаров, И.К. Мутации и мутационный процесс в природных популяциях *Drosophila melanogaster* / И.К. Захаров. Автореф. дисс...д. б. н.- Новосибирск, 1995.- 48 с.
- Ильинских, Н.Н. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность /Н.Н. Ильинских и др.- Томск: Изд-во ТГУ, 1992.- 272 с.
- Ирошников, А.И. О генотипическом составе популяций сосны обыкновенной в юго-восточной части ареала / А.И. Ирошников //Селекция хвойных пород Сибири.- Красноярск: ИЛИД СОАН СССР, 1978.-С. 76-95.
- Калаев, В.Н. Оценка антропогенного загрязнения районов г. Старый Оскол по цитогенетическим показателям семенного потомства березы повислой / В.Н. Калаев А.К., Буторина, О.Ю. Шелухина // Экологическая генетика.- 2006.- Т. IV.- №2.- С. 9 - 21.
- Калашник, Н.А. Хромосомные нарушения как индикатор оценки степени техногенного воздействия на хвойные насаждения / Н.А. Калашник // Экология.- 2008.- №4.- С. 276-286.
- Кулаичев, А.П. Методы и средства комплексного анализа данных / А.П. Кулаичев //Учебное пособие.- М.: ФОРУМ-ИНФРА-М, 2006.- 512 с.
- Кунах, В.А. Пластичность генома соматических клеток и адаптивность растений / В.А. Кунах // Молекулярная и прикладная генетика.- 2011.- Т. 12.- С. 8 - 14.
- Лавров, Л.С. Воронежский заповедник / Л.С. Лавров, В.А. Семенов, В.В. Трегубов // Заповедники СССР. Заповедники Европейской части РСФСР. II.- М.: Мысль, 1989.- С. 164-188.
- Машкина, О. С. Цитогенетические реакции семенного потомства сосны обыкновенной на комбинированное антропогенное загрязнение в районе Новоліпецкого металлургического комбината / О.С. Машкина и др. // Экологическая генетика.- 2009.- Т. 7.- № 3.- С. 17-29.
- Муратова, Е.Н. Хромосомные мутации у сосны обыкновенной в Южном Забайкалье / Е.Н. Муратова // Изв. АН СССР. Сер. биологическая.- 1991.- № 5.- С. 689-699.
- Муратова, Е.Н. Геномные и хромосомные мутации у сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в экстремальных условиях произрастания / Е.Н. Муратова, Т.С. Седельникова //Хвойные бореальной зоны.- 2004.- С. 128-140.
- Муратова, Е.Н. Цитологическое изучение листовенницы сибирской в антропогенно нарушенных районах г. Красноярска и его окрестностей / Е.Н. Муратова, Т.В. Карпюк, О.С. Владимірова и др. // Вестник экологии, лесоведения и ландшафтоведения.- 2009.- № 9.- С. 99-108.
- Никифорова, Е.М. Некоторые закономерности миграции урана в природных водах Южного Забайкалья / Е.М. Никифорова // Микроэлементы в ландшафтах Советского Союза. - М.: Изд-во МГУ, 1969.- С. 184-194.
- Правдин, Л.Ф. Сосна обыкновенная / Л.Ф. Правдин - М.: Наука, 1964.- 189 с.
- Пятыгин, С.С. Стресс у растений: физиологический подход / С.С. Пятыгин // Журнал общей биологии.- 2008.- Т.69.- №4.- С. 294-298.

- Санников, С. Н. Генофеногеографический анализ популяций *Pinus sylvestris* L. на трансекте от северной до южной границы ареала / С. Н. Санников, И.В. Петрова, В.Л. Семериков // Экология.- 2002.- № 2.- С. 97-102.
- Сапунов, В.Б. О роли эндокринной системы в процессе возникновения мутаций / В.Б. Сапунов // Журнал общей биологии.- 1980.- Т. 16.- № 2.- С. 192-197.
- Седельникова, Т.С. Хромосомные мутации у лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) на Таймыре / Т.С. Седельникова, А.В. Пименов // Известия РАН. Сер. биологическая.- 2007.- № 2.- С. 244-247.
- Седельникова, Т.С. Изменчивость хромосомных чисел голосеменных растений / Т.С. Седельникова, Е.Н. Муратова, А.В. Пименов // Успехи современной биологии.- 2010.- Т. 130.- №6. – С. 557 – 568.
- Симаков, Е.А. О пострadiационном восстановлении цитогенетических повреждений в проростках семян разных форм картофеля / Е.А. Симаков // Радиобиология.- 1983.- Т. 23.- Вып. 5.- С. 703-706.
- Сунцов, А.В. Цитогенетика и эмбриология сосны обыкновенной в изолированных популяциях Центральной Тувы / А.В. Сунцов. Автореф. дис...к.б. н. Красноярск, 1984.- 16 с.
- Тихонова, И.В. Островная популяция *Pinus sylvestris* L. в Ширинской степи / И.В. Тихонова // Бот. журнал.- 2003.- Т. 8.- № 10.- С. 60-67.
- Топильская, Л.А. Изучение соматических и мейотических хромосом смородины / Л.А. Топильская и др. // Бюлл. научн. информации ЦГЛ им. Мичурина.- 1975.- Вып. 22.- С. 58-61.
- Butorina, A.K. The First detected case of Amitosis in Pine / A.K. Butorina, N. Evstratov // Forest Genetics.- 1996.- V. 3.- № 3.- P. 137-139.
- Butorina, A.K. The effects of irradiation from the Chernobyl nuclear power plant accident on the cytogenetic behaviour and anatomy of Trees / A.K. Butorina, N. E. Kosichenko, Y.N. Isakov, I.M. Pozhidaeva // Cytogenetic studies of forest trees and shrub species. Zagreb: Croatian forests. INC, 1997.- P. 211—239.

Поступила в редакцию 12 января 2012 г.
Принята к печати 01 марта 2012 г.