

doi 10.18699/vjgb-26-74

Молекулярно-цитогенетический анализ некоторых видов *Picea* из Евразии и Восточной Азии

О.В. Горячкина ¹, Е.Д. Бадаева ^{2, 3}, А.Б. Щербань ⁴, Е.Н. Муратова ¹¹ Институт леса им. В.Н. Сукачева Сибирского отделения Российской академии наук – обособленное подразделение

Федерального исследовательского центра «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», Красноярск, Россия

² Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия³ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия⁴ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия kvitko@ksc.krasn.ru

Аннотация. Представлены результаты молекулярно-цитогенетического исследования семи видов *Picea*, распространенных на территории Евразии и Восточной Азии, методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) и флуоресцентного окрашивания DAPI. Кластеры рибосомных генов 45S и 5S рРНК на хромосомах *P. meyeri* и *P. purpurea* картированы впервые, *P. abies*, *P. obovata*, *P. schrenkiana*, *P. crassifolia*, *P. omorika* изучались из новых местопроизрастаний. Все виды показали сходное распределение локусов 5S рДНК на обоих плечах крупной метацентрической хромосомы III: более интенсивный сигнал наблюдался на длинном плече, частично перекрываясь с сигналом 45S рДНК, минорный сайт 5S рДНК был локализован терминально на коротком плече. Сигналы 45S рДНК разной интенсивности были выявлены на 7–9 парах хромосом в кариотипах исследуемых видов. Яркие (мажорные) сигналы локализованы интеркалярно и совпадали с постоянными вторичными перетяжками. Их количество на гаплоидный геном составило: у *P. omorika* – 8, у *P. abies* и *P. obovata* – 6, у *P. schrenkiana*, *P. crassifolia*, *P. purpurea* и *P. meyeri* – 5. Выявлено также несколько минорных сайтов 45S рДНК на хромосомах *Picea*, не описанных ранее в литературе. Добавочные (В) хромосомы, обнаруженные у некоторых проростков *P. obovata*, *P. meyeri* и *P. purpurea*, не несли локусов рибосомных генов 45S и 5S рРНК. На хромосомах ели наблюдались интенсивно флуоресцирующие DAPI-позитивные полосы в интеркалярных районах, а у некоторых хромосом окрашивалась также область центромеры. На хромосомах I, III и X пар удалось выявить несколько постоянных позитивных DAPI-блоков, имеющих сходную локализацию у всех изученных видов. FISH с зондами 45S и 5S рДНК в сочетании с окрашиванием DAPI позволяет идентифицировать практически все гомологичные пары хромосом и провести сравнение кариотипов разных видов ели. Обсуждается внутри- и межвидовое кариотипическое разнообразие в роде *Picea* на основе распределения локусов 5S и 45S рДНК и рисунка DAPI.

Ключевые слова: хромосома; кариотип; FISH; 45S рДНК; 5S рДНК; окрашивание DAPI; *Picea*

Для цитирования: Горячкина О.В., Бадаева Е.Д., Щербань А.Б., Муратова Е.Н. Молекулярно-цитогенетический анализ некоторых видов *Picea* из Евразии и Восточной Азии. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026;30(5): 735-746. doi 10.18699/vjgb-26-74

Финансирование. Работа выполнена в рамках базового проекта ИЛ СО РАН № FWES-2024-0028 «Биоразнообразие лесов Сибири: эколого-динамический, генетико-селекционный, физико-химический и ресурсно-технологический аспекты».

Благодарности. Авторы благодарят чл.-кор. РАН проф. Е.А. Салину, к.б.н. Е.М. Тимонову и н.с. Т.Н. Капко (ИЦиГ СО РАН) за помощь в работе; к.б.н. Н.В. Орешкову (ИЛ СО РАН) за помощь в выделении ДНК *L. sibirica*; к.б.н. А.Б. Безделева (Океанариум ДВО РАН), к.б.н. И.Н. Тихонову (ИЛ СО РАН), к.б.н. Ю.В. Ткачеву (Донецкий ботанический сад) и к.б.н. О.А. Мочалову (ИБПС ДВО РАН) за предоставление образцов семян. Изоляция и клонирование пробы 5S рДНК проводились в лаборатории молекулярной генетики и цитогенетики растений Института цитологии и генетики СО РАН.

Molecular cytogenetic analysis of some *Picea* species from Eurasia and East Asia

O.V. Goryachkina ¹, E.D. Badaeva ^{2, 3}, A.B. Shcherban ⁴, E.N. Muratova ¹¹ V.N. Sukachev Institute of Forest of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences", Krasnoyarsk, Russia² N.I. Vavilov Institute of General Genetics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia³ Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia⁴ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia kvitko@ksc.krasn.ru

Abstract. Karyotypes of seven *Picea* species distributed across Eurasia and East Asia were analyzed using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and DAPI fluorescent staining. For *P. meyeri* and *P. purpurea*, the 5S and 45S rDNA sites were mapped here for the first time, while karyotypes of *P. abies*, *P. obovata*, *P. schrenkiana*, *P. crassifolia*, and *P. omorika* were examined from new locations. All the species studied had a similar distribution of 5S rDNA loci on both arms of the large metacentric chromosome III: a more intense signal was observed in the middle of the long arm, partially overlapping with the 45S rDNA signal, and a minor 5S rDNA site was localized terminally on the short arm. The distribution of 5S rDNA loci varied in the karyotypes of the studied species: from 7 to 9 pairs of chromosomes carried 45S rDNA signals of varying intensity. Strong (major) signals were localized intercalarily and coincided with persistent secondary constrictions. Their number per haploid genome was as follows: 8 in *P. omorika*, 6 in *P. abies* and *P. obovata*, and 5 in *P. schrenkiana*, *P. crassifolia*, *P. purpurea*, and *P. meyeri*. We also detected several minor 45S rDNA sites on the *Picea* chromosomes that had not been previously described in the literature. Supernumerary (B) chromosomes found in some seedlings of *P. obovata*, *P. meyeri*, and *P. purpurea* did not carry 45S and 5S rDNA loci. Intensely fluorescent DAPI-positive bands were observed in the intercalary regions of the spruce chromosomes, and the centromere regions of certain chromosomes were also stained. Several constant DAPI-positive blocks were identified on chromosomes I, III, and X, with similar locations across all studied species. Fluorescence *in situ* hybridization with 45S and 5S rDNA probes in combination with DAPI staining allowed us to identify virtually all homologous chromosomes and compare karyotypes of different species. The intra- and interspecific karyotypic diversity in the genus *Picea* is discussed considering the distribution of 5S and 45S rDNA loci and DAPI signals.

Key words: chromosome; karyotype; FISH; 45S rDNA; 5S rDNA; DAPI staining; *Picea*

For citation: Goryachkina O.V., Badaeva E.D., Shcherban A.B., Muratova E.N. Molecular cytogenetic analysis of some *Picea* species from Eurasia and East Asia. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(5):735-746. doi 10.18699/vjgb-26-74

Введение

Род *Picea* A. Dietr. (Ель) включает 35–50 видов, согласно классификациям разных авторов (Сукачев, 1928; Dalimore, Jackson, 1966; Бобров, 1971; Liu T.S., 1982; Farjon, 1990, 2001; Lockwood et al., 2013). Более половины видов *Picea* произрастает в Сибири, российском и зарубежном Дальнем Востоке, тихоокеанском бассейне. Это главные лесообразующие виды Северного полушария, имеющие большое практическое значение. Виды ели обладают большим морфологическим разнообразием, что связано с их географическим распространением от умеренных до субарктических районов.

Все представители рода *Picea* являются диплоидами с основным числом хромосом $n = 12$ ($2n = 24$) и имеют сходные кариотипы: восемь пар (I–VIII) длинных метacentриков, две пары (X, XI) коротких метacentриков и две пары (IX, XII) коротких субметacentриков (Liu Y.H., Li, 1985; Hizume, 1988; Li et al., 2001; Nkongolo, Mehes-Smith, 2012). В пределах группы I–VIII пар хромосомы сходны по длине и соотношению плеч, что не позволяет идентифицировать гомологи, используя традиционное окрашивание. Многие виды ели содержат в кариотипе сверхкомплектные В-хромосомы (на сегодняшний день они обнаружены у 21 вида), чаще метacentрического типа (Muratova и др., 2023).

Большие перспективы для анализа кариотипов растений имеет метод флуоресцентной гибридизации *in situ*, позволяющий картировать на хромосомах уникальные и повторяющиеся последовательности ДНК. В качестве цитогенетических маркеров для идентификации хромосом часто используют последовательности рибосомной ДНК (рДНК). Они относятся к классу консервативных умеренных повторов и организованы в виде кластеров из сотен или тысяч копий генов, разделенных межгенными спейсерами (Roa, Guerra, 2012). Их изучают для выявления закономерностей хромосомной эволюции, видовой и популя-

ционной дифференциации, эволюционных связей (Rosello et al., 2022).

К настоящему времени менее половины видов *Picea* проанализировано методом FISH (Ohri, 2021). Локусы 5S и 45S рДНК картированы на хромосомах 16 видов ели (Brown et al., 1993; Hizume, Kuzakawa, 1995; Lubaretz et al., 1996; Brown, Carlson, 1997; Hizume et al., 1999; Friesen et al., 2001; Šiljak-Yakovlev et al., 2002; Vischi et al., 2003; Sarri et al., 2008; Shibata, Hizume, 2008). У 11 видов картированы также Sau3A-повторы – специфичное для представителей *Picea* семейство сателлитной ДНК (Shibata, Hizume, 2008). Большинство работ выполнено для отдельных видов из одного-двух местопроизрастаний, что недостаточно для растений с такими обширными ареалами. Кроме того, отсутствует единая система классификации хромосом в кариотипах *Picea*, поэтому сравнение данных, полученных разными коллективами, нередко проблематично. Необходимо отметить, что корректная идентификация всех гомологичных хромосом очень важна для сравнения кариотипов и оценки филогенетических взаимоотношений между таксонами.

Целью настоящей работы являлся анализ кариотипов семи видов *Picea*, распространенных на территории Евразии и Восточной Азии, методом флуоресцентной гибридизации *in situ* с пробами рибосомных генов 45S и 5S рРНК. Обсуждается межвидовое кариотипическое разнообразие в роде *Picea* на основе распределения локусов 5S и 45S рДНК и рисунка DAPI.

Восточноазиатские виды *P. purpurea* Masters [син. *P. likiangensis* var. *purpurea* (Masters) Dallim. et A.B. Jacs.] и *P. meyeri* Rehder et E.H. Wilson, произрастающие в Китае, исследованы впервые. Еще один вид из Китая – *P. crassifolia* Komarov [син. *P. schrenkiana* var. *crassifolia* (Komarov) Komarov и *P. complanata* var. *crassifolia* (Komarov) Gaussen] – изучался из нового местопроизрастания. По классификации Е.Г. Боброва (1971), *P. crassifolia* и

P. meyeri относятся к секции *Picea*, серии *Asperatae*, а *P. purpurea* – к секции *Casicta*, серии *Likiangenses*.

В анализ были включены два евроазиатских вида с перекрывающимися обширными ареалами: ель европейская *P. abies* (L.) Н. Karst. (секция *Picea*, серия *Excelsae*) и ель сибирская *P. obovata* Ledeb. (секция *Picea*, серия *Obovatae*). В непрерывном ареале популяции ели европейской и сибирской претерпевают постепенные изменения от одного вида к другому. В зоне контакта ареалов эти два вида вступают в гибридизацию и образуют межвидовой гибрид *P. × fennica* (Regel.) Kom. (Попов, 1999). В нашей работе семенной материал был взят на территории распространения «чистых» видов.

Также в исследование были включены ель Шренка (*P. schrenkiana* Fisch. et C.A. Mey., секция *Picea*, серия *Obovatae*), имеющая довольно обширный ареал в горах Центральной Азии, и ель сербская (*P. omorika* (Pančić) Purkine, секция *Omorika*) – эндемичный вид с крайне ограниченным ареалом из Восточной Европы.

Материал и методы

Растительный материал и первичный цитогенетический анализ. Семена ели, собранные в естественных древостоях и на искусственных плантациях (табл. 1), проращивали в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге при комнатной температуре. Проростки длиной 0.5–1.0 см обрабатывали 0.2 % колхицином 15–18 ч при температуре 20 °С, после чего выдерживали в ледяной воде в течение 1 ч и фиксировали смесью 96 % спирта и ледяной уксусной кислоты (3 : 1).

Для подсчета числа хромосом, выявления хромосомных и геномных аномалий, а также анализа морфологии хро-

мосом использовали стандартные для хвойных методики с собственными модификациями (Правдин и др., 1972). Перед приготовлением препаратов для FISH корешки обрабатывали ферментами с целью размягчения тканей. Применяли два варианта обработки: 0.6 % водным раствором целлюлозы (Calbiochem, Швейцария), pH ~ 3–4, при 24 °С в течение ночи или смесью 2 % целлюлазы Onozuka R-10 (Sigma-Aldrich, США) и 2 % пектолиазы Y-23 (Fisher Scientific, США) в цитратном буфере (pH 4.0) при 37 °С в течение 30 мин.

Флуоресцентная гибридизация *in situ*. Для картирования рибосомных генов 45S рДНК на хромосомах *P. purpurea* использовали ДНК-зонд пшеницы рTa71 (Gerlach, Bedbrook, 1979), меченный дигоксигенином методом нуклеотидной транскрипции. Детекцию проводили с помощью антител против дигоксигенина, конъюгированных с родамином (Anti-digoxigenin-rhodamine, Fab фрагменты, Sigma-Aldrich, США). Проба 5S рДНК, картированная на хромосомах *P. purpurea*, была амплифицирована из геномной ДНК лиственницы сибирской *Larix sibirica* Ledeb. Геномную ДНК выделяли модифицированным методом с применением цетилтриметиламмонийбромида (СТАВ) из образцов тканей хвои (Devey et al., 1996). Два праймера, P3 (5'-GAGTTCTGATGGGATCCGGTG-3') и P4 (5'-CGC TTGGGCTAGAGCAGTAC-3'), использовали для амплификации спейсерного региона и частичной амплификации гена 5S рРНК (Brown, Carlson, 1997; Trontin et al., 1999).

ПЦР проводили со следующими условиями реакции амплификации: 3 мин при 96 °С, 30 циклов (40 с при 94 °С, отжиг при 53 °С в течение 1 мин, 30 с при 72 °С), 10 мин при 72 °С. ПЦР-продукты разделяли электрофорезом на 1 % агарозном геле, содержащем бромид этидия,

Таблица 1. Географическое происхождение и цитогенетическая характеристика исследованных образцов

Вид	Происхождение семян	Изучено проростков, шт.	Число хромосом, 2n (%)*	Число ядрышек в интерфазных ядрах, max (среднее)	Количество локусов 45S рДНК	
					мажорных	минорных
<i>P. abies</i>	Украина, Волынская область, с. Ростань	23	24	9 (5.63 ± 0.06)	12	4
<i>P. crassifolia</i>	США, штат Вашингтон (интродукция)	23	24	10 (5.42 ± 0.09)	10	4
<i>P. meyeri</i>	Китай, провинция Шаньси	29	24; 24 + 2B (4.8)	10 (5.48 ± 0.06)	12	4
<i>P. obovata</i>	(а) Россия, Красноярский край, окрестности г. Красноярска	64	24; 24 + 1B (18.7); 24 + 2B (3.1); 24 + 3B (1.6)	12 (6.48 ± 0.08)	12	2
	(б) Россия, Магаданская область	71	24	Н/д	12	2
	(в) Россия, Республика Тыва, Пий-Хемский район	23	24	10 (6.20 ± 0.06)	12	2
<i>P. omorika</i>	(а) Юго-западная Сербия	54	24	Н/д	16	2
	(б) США, штат Вашингтон (интродукция)	23	24	14 (8.20 ± 0.07)	16	2
<i>P. purpurea</i>	Китай, провинция Сычуань	31	24; 24 + 1B (6.5)	10 (4.50 ± 0.06)	10	4
<i>P. schrenkiana</i>	Киргизия, оз. Иссык-Куль	31	24	10 (6.29 ± 0.08)	10	4

* В скобках указана доля проростков (в %), содержащих в кариотипе В-хромосомы, от общего числа исследованных.

и визуализировали в УФ-свете. Размеры ПЦР-продуктов фрагментов 5S рДНК составляли примерно 250 п. н. Соответствующую полосу вырезали после электрофореза и очищали ДНК с использованием набора для очистки QIAquick PCR (QIAGEN, Германия). Клонирование фрагмента 5S рДНК осуществляли с помощью набора для клонирования PCR QIAGEN (США). Для трансформации брали компетентные клетки *Escherichia coli* XL-blue.

Рекомбинантные колонии отбирали на агаризованной LB-среде с ампициллином и Xgal/IPTG. Присутствие вставок проверяли методом ПЦР с вышеуказанными праймерами. Рекомбинантный клон, содержащий вставку ожидаемой длины, был выбран в качестве зонда для FISH и помечен биотином 16-dUTP методом ник-трансляции согласно протоколу производителя (Roche, Германия). Биотинилированный зонд выявляли с помощью авидина, конъюгированного с флуоресцеином (Fluorescein Avidin D, Vector Laboratories, США). Сигнал гибридизации усиливали, применяя флуоресцеин анти-авидин (Fluorescein Anti-Avidin D, Vector Laboratories, США).

Для исследования остальных шести видов *Picea* использовали ДНК-зонды пшеницы: рTa794 и рTa71 (Gerlach, Bedbrook, 1979; Gerlach, Dyer, 1980). FISH проводили в соответствии с ранее опубликованной методикой (Goryachkina et al., 2013).

Хромосомы окрашивали флуорохромом DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид, Sigma, США). Препараты анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Axio Imager D1 (Carl Zeiss, Германия) и CCD-камеры AxioCam (Carl Zeiss, Германия) с использованием пакета программ AxioVision, version 4.6. Изображения обрабатывали в пакете программ Adobe Photoshop, версия CS4 (Adobe Systems, Эдинбург, Великобритания).

Анализ кариотипа. Для анализа кариотипа и измерения хромосом использовали от 7 до 27 метафазных пластинок (у разных образцов) с хорошим разбросом. Для каждой хромосомы определяли следующие параметры: общую длину, соотношение плеч, положение вторичной перетяжки (отношение расстояния от центромеры до вторичной перетяжки к длине плеча хромосомы, в процентах), наличие или отсутствие локусов рДНК, позитивных и негативных полос DAPI, а также их локализацию на плече хромосомы как отношение расстояния от центромеры до середины сигнала к длине плеча хромосомы (в процентах). Пары гомологичных хромосом подбирали на основе морфологии, размеров, положения локусов 5S и 45S и рисунка DAPI. Нумерацию хромосом проводили в порядке уменьшения их абсолютной длины. В группе сходных по размерам метацентриков II–VII пар хромосомные пары располагались в той же последовательности, что в работе (Shibata, Hizume, 2008) для сравнения кариотипов.

Результаты

Кариотипы семи изученных видов *Picea* содержат 24 соматические хромосомы ($2n = 24$). Добавочные (В) хромосомы были найдены у нескольких проростков *P. meyeri*, *P. purpurea* и *P. obovata* из Красноярского края (см. табл. 1).

Все В-хромосомы относились к метацентрическому типу (соотношение плеч 1.1–1.3), их длина варьировала от 4.05 до 4.65 мкм. Кластеры рибосомных генов 5S и 45S рРНК на В-хромосомах отсутствовали. Морфометрические параметры хромосом *P. abies*, *P. obovata*, *P. omorika*, *P. meyeri* и *P. schrenkiana* представлены в табл. 2. Морфометрические параметры хромосом *P. crassifolia* и *P. purpurea* не рассчитывались, для этих видов в настоящей работе приводится только положение FISH сигналов.

Кариотипы изученных видов *Picea* показали сходное распределение кластеров генов 5S рРНК: два сигнала разной интенсивности выявлены на обоих плечах крупной метацентрической хромосомы III (рис. 1). Более интенсивный сигнал 5S рДНК наблюдался на длинном плече; он частично перекрывался с сигналом 45S рДНК, но был локализован ближе к центромере. Менее яркий минорный сайт 5S рДНК локализован терминально на противоположном плече. Зонд рTa794 показал более интенсивные сигналы гибридизации, чем зонд, амплифицированный из генома *L. sibirica*. Вероятно, поэтому нам не удалось выявить минорный сайт 5S рДНК на коротком плече хромосомы III у *P. purpurea*.

Сигналы 45S рДНК разной интенсивности были выявлены на 7–9 парах хромосом в кариотипах исследуемых видов. Яркие (мажорные) сигналы локализованы интеркалярно и совпадали с постоянными вторичными перетяжками. Их количество на гаплоидный геном составило: у *P. omorika* – 8, *P. abies* и *P. obovata* – 6, у *P. schrenkiana*, *P. crassifolia*, *P. purpurea* и *P. meyeri* – 5 (табл. 3, см. рис. 1).

Межвидовые различия по локализации и интенсивности сигналов 45S рДНК выявлены у хромосом II, VI, VIII, IX и X пар. Остальные пары хромосом у изученных видов не различались по этому признаку: хромосомы I, VII, XI и XII пар не содержали кластеров рибосомных генов 5S и 45S рРНК, а длинные метацентрики III, IV и V пар показали сходный рисунок гибридизации у всех изученных видов.

Сайт 45S рДНК на коротком плече хромосомы II присутствовал у всех видов, но были выявлены межвидовые различия по локализации и интенсивности сигнала (см. рис. 1). Проведенные измерения показали, что у *P. schrenkiana* и *P. omorika* локус 45S рДНК расположен более проксимально, чем у остальных видов (см. табл. 3), кроме того, он давал более слабый сигнал гибридизации. На хромосоме VI сайт 45S рДНК наблюдался у четырех из семи изученных видов, но его локализация различалась: у *P. meyeri* и *P. purpurea* сигнал выявлялся в медиальном положении, а у *P. abies* и *P. omorika* – ближе к центромере; интенсивность сигнала тоже различалась (см. рис. 1). Хромосомы VIII и X пар у исследуемых видов несли локусы 45S рДНК сходной локализации (см. табл. 3); различия были обнаружены по интенсивности гибридизационного сигнала.

В перичентромерных районах субметацентрической хромосомы IX наблюдались минорные сайты 45S рДНК у шести видов *Picea* (у всех, кроме *P. purpurea*). У *P. obovata*

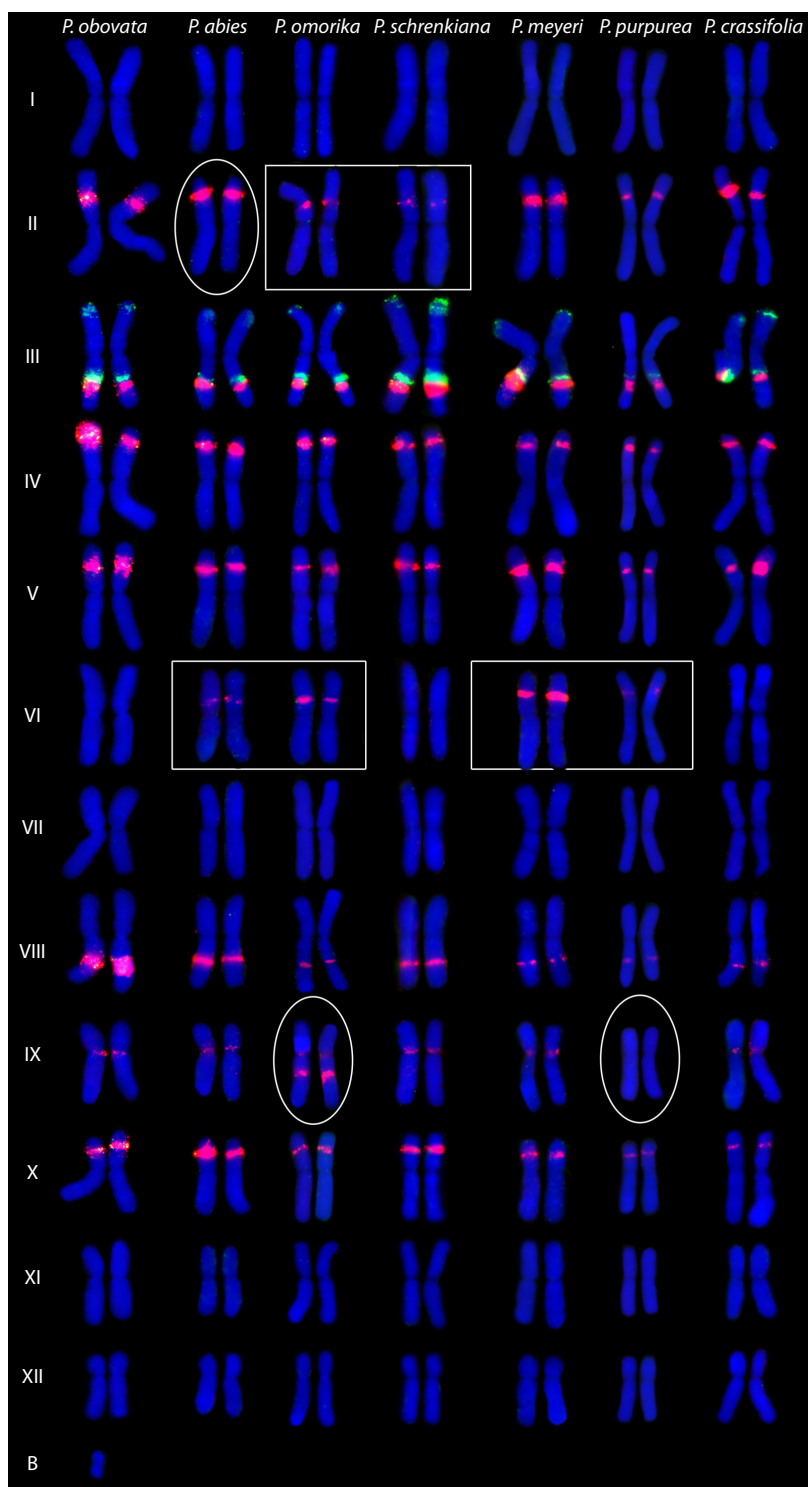


Рис. 1. Картирование сайтов 45S рДНК (красный цвет) и 5S рДНК (зеленый) на метафазных хромосомах семи видов *Picea*.

Прямоугольной рамкой очерчены хромосомы разных видов, несущие сигналы 45S рДНК сходной локализации, овалами – хромосомы с уникальным положением FISH сигнала или его отсутствием.

и *P. omorika* этот сайт отмечался на длинном плече, а у *P. abies*, *P. schrenkiana*, *P. crassifolia*, *P. meyeri* – на коротком. В кариотипе *P. omorika* хромосома IX несла еще и уникальный мажорный сигнал 45S рДНК в медиальном районе длинного плеча, совпадающий со вторичной перетяжкой.

После FISH на хромосомах были видны интенсивно флуоресцирующие DAPI-позитивные полосы в интеркалярных районах, а у некоторых хромосом окрашивается также область центромеры (рис. 2). DAPI-негативные полосы чаще соответствуют районам локализации рибосомных генов 5S и 45S рРНК и центромерам большинства хромосом.

Таблица 2. Морфометрические параметры хромосомных пар разных видов *Picea*: абсолютная длина / соотношение плеч

Пара хромосом	<i>P. abies</i> (28#)	<i>P. meyeri</i> (30)	<i>P. obovata</i>			<i>P. omorika</i>		<i>P. schrenkiana</i> (50)
			а (15)	б (7)	в (27)	а (13)	б (18)	
I	13.60 ± 0.24 / 1.06 ± 0.01	15.76 ± 0.32 / 1.06 ± 0.01	19.30 ± 0.49 / 1.06 ± 0.02	19.09 ± 0.53 / 1.05 ± 0.02	14.37 ± 0.19 / 1.07 ± 0.01	18.00 ± 0.24 / 1.06 ± 0.01	14.82 ± 0.35 / 1.08 ± 0.01	16.33 ± 0.44 / 1.07 ± 0.01
II	12.64 ± 0.32 / 1.07 ± 0.01	14.78 ± 0.31 / 1.08 ± 0.01	17.27 ± 0.40 / 1.09 ± 0.02	17.06 ± 0.28 / 1.13 ± 0.03	13.27 ± 0.20 / 1.08 ± 0.01	16.18 ± 0.23 / 1.06 ± 0.02	12.95 ± 0.34 / 1.05 ± 0.01	14.83 ± 0.38 / 1.07 ± 0.01
III	12.51 ± 0.18 / 1.14 ± 0.02	14.62 ± 0.35 / 1.15 ± 0.02	16.78 ± 0.43 / 1.08 ± 0.01	17.52 ± 0.34 / 1.08 ± 0.02	12.44 ± 0.15 / 1.06 ± 0.01	15.50 ± 0.20 / 1.06 ± 0.01	13.12 ± 0.27 / 1.04 ± 0.01	14.42 ± 0.34 / 1.03 ± 0.01
IV	12.06 ± 0.17 / 1.11 ± 0.01	13.13 ± 0.33 / 1.12 ± 0.01	16.02 ± 0.45 / 1.11 ± 0.02	16.42 ± 0.20 / 1.08 ± 0.02	11.82 ± 0.12 / 1.10 ± 0.01	14.95 ± 0.17 / 1.09 ± 0.01	12.69 ± 0.34 / 1.11 ± 0.01	14.27 ± 0.39 / 1.03 ± 0.01
V	11.95 ± 0.26 / 1.11 ± 0.02	13.85 ± 0.36 / 1.09 ± 0.02	16.66 ± 0.41 / 1.12 ± 0.02	17.03 ± 0.41 / 1.08 ± 0.03	12.76 ± 0.19 / 1.09 ± 0.01	15.41 ± 0.21 / 1.15 ± 0.02	12.58 ± 0.29 / 1.17 ± 0.02	14.53 ± 0.39 / 1.15 ± 0.01
VI	11.74 ± 0.22 / 1.13 ± 0.01	13.55 ± 0.34 / 1.08 ± 0.01	16.13 ± 0.28 / 1.06 ± 0.02	16.37 ± 0.33 / 1.08 ± 0.02	12.26 ± 0.17 / 1.06 ± 0.01	14.82 ± 0.29 / 1.08 ± 0.04	12.16 ± 0.23 / 1.06 ± 0.02	14.13 ± 0.39 / 1.07 ± 0.01
VII	11.28 ± 0.17 / 1.09 ± 0.01	13.23 ± 0.31 / 1.10 ± 0.01	16.06 ± 0.51 / 1.06 ± 0.01	16.16 ± 0.34 / 1.08 ± 0.02	12.01 ± 0.13 / 1.05 ± 0.01	15.10 ± 0.20 / 1.03 ± 0.01	13.05 ± 0.36 / 1.03 ± 0.01	13.49 ± 0.41 / 1.06 ± 0.01
VIII	11.00 ± 0.18 / 1.33 ± 0.02	12.35 ± 0.32 / 1.20 ± 0.01	15.83 ± 0.35 / 1.34 ± 0.02	16.08 ± 0.47 / 1.34 ± 0.05	11.66 ± 0.19 / 1.27 ± 0.02	14.76 ± 0.29 / 1.28 ± 0.02	12.33 ± 0.29 / 1.29 ± 0.02	13.74 ± 0.34 / 1.28 ± 0.01
IX	9.83 ± 0.14 / 1.79 ± 0.03	11.23 ± 0.24 / 1.80 ± 0.02	13.93 ± 0.27 / 1.75 ± 0.03	14.46 ± 0.21 / 1.70 ± 0.06	10.56 ± 0.14 / 1.72 ± 0.03	13.25 ± 0.16 / 1.69 ± 0.01	11.37 ± 0.35 / 1.71 ± 0.03	12.27 ± 0.31 / 1.72 ± 0.02
X	9.75 ± 0.15 / 1.36 ± 0.03	10.59 ± 0.20 / 1.56 ± 0.02	13.46 ± 0.27 / 1.32 ± 0.02	13.72 ± 0.23 / 1.44 ± 0.03	10.34 ± 0.11 / 1.29 ± 0.01	13.07 ± 0.21 / 1.27 ± 0.02	10.21 ± 0.24 / 1.22 ± 0.01	11.21 ± 0.25 / 1.36 ± 0.01
XI	8.84 ± 0.16 / 1.26 ± 0.02	9.89 ± 0.24 / 1.23 ± 0.02	12.41 ± 0.21 / 1.23 ± 0.02	12.57 ± 0.24 / 1.26 ± 0.02	9.07 ± 0.09 / 1.16 ± 0.01	11.75 ± 0.14 / 1.22 ± 0.02	9.52 ± 0.18 / 1.20 ± 0.02	10.84 ± 0.31 / 1.27 ± 0.01
XII	8.34 ± 0.14 / 1.96 ± 0.03	8.91 ± 0.20 / 1.91 ± 0.03	10.87 ± 0.20 / 1.97 ± 0.04	11.04 ± 0.20 / 1.90 ± 0.05	8.14 ± 0.09 / 1.79 ± 0.02	10.49 ± 0.11 / 1.86 ± 0.04	8.42 ± 0.14 / 2.00 ± 0.03	9.70 ± 0.22 / 2.01 ± 0.02
B	–	4.15 ± 0.11 / 1.32 ± 0.03	4.65 ± 0.22 / 1.13 ± 0.02	–	–	–	–	–

Примечание. Абсолютная длина приведена как $\bar{x} \pm SE$ (мкм); соотношение плеч – как $\bar{x} \pm SE$ (%); $\bar{x}$ – среднее; SE – стандартная ошибка; # число изученных метафаз.

Таблица 3. Относительное положение локусов 45S рДНК ($\bar{x} \pm SE$), %, на хромосомах видов *Picea*

Виды и популяции	II (s)	III (l)	IV (s)	V (l)	VI (s)	VIII (l)	IX (l)	X (s)
<i>P. abies</i>	66.5 ± 0.9	54.9 ± 1.0	73.0 ± 0.5	53.6 ± 0.6	<u>42.0 ± 2.2</u>	48.4 ± 0.4	–	54.9 ± 0.2
<i>P. crassifolia</i>	53.3 ± 0.9	55.1 ± 2.2	72.4 ± 1.2	52.0 ± 1.3	–	<u>49.1 ± 0.5</u>	–	54.8 ± 1.2
<i>P. meyeri</i>	55.9 ± 0.6	54.1 ± 0.6	73.0 ± 0.5	50.0 ± 0.7	54.7 ± 0.6	<u>47.3 ± 0.4</u>	–	54.9 ± 0.2
<i>P. obovata</i> :								
а	55.0 ± 0.6	54.4 ± 0.4	74.1 ± 0.4	49.6 ± 0.6	–	46.2 ± 0.5	–	54.6 ± 0.5
б	54.9 ± 0.7	54.2 ± 0.8	72.9 ± 0.9	50.0 ± 0.5	–	47.5 ± 1.9	–	54.8 ± 0.6
в	52.8 ± 0.4	55.1 ± 0.6	73.0 ± 0.4	48.9 ± 0.5	–	48.4 ± 0.7	–	54.5 ± 0.3
<i>P. omorika</i> :								
а	38.9 ± 0.9	54.1 ± 0.5	73.9 ± 0.6	54.7 ± 0.7	44.3 ± 1.0	46.6 ± 0.5	36.5 ± 0.7	55.0 ± 0.2
б	41.0 ± 0.7	55.0 ± 0.6	74.3 ± 0.7	54.9 ± 0.8	43.4 ± 1.2	48.4 ± 0.9	38.7 ± 0.5	55.0 ± 0.4
<i>P. purpurea</i>	55.4 ± 0.4	54.2 ± 1.4	72.6 ± 0.4	51.0 ± 0.6	<u>54.1 ± 1.3</u>	<u>48.5 ± 0.5</u>	–	54.9 ± 0.4
<i>P. schrenkiana</i>	<u>40.0 ± 0.9</u>	55.2 ± 0.4	73.1 ± 0.2	51.1 ± 0.4	–	49.6 ± 0.2	–	54.8 ± 0.4
<i>P. glauca</i>	57.4 ± 2.4	52.5 ± 2.8	72.8 ± 3.6	51.6 ± 2.7	35.8 ± 1.3	49.8 ± 1.1	–	54.6 ± 3.1
<i>P. sitchensis</i>	56.3 ± 2.2	54.8 ± 4.2	73.6 ± 2.0	52.7 ± 4.6	35.8 ± 2.3	–	–	–

Примечание. Минорные сайты 45S рДНК выделены курсивом и подчеркнуты. Для *P. glauca* и *P. sitchensis* приведены литературные данные (Brown, Carlson, 1997).

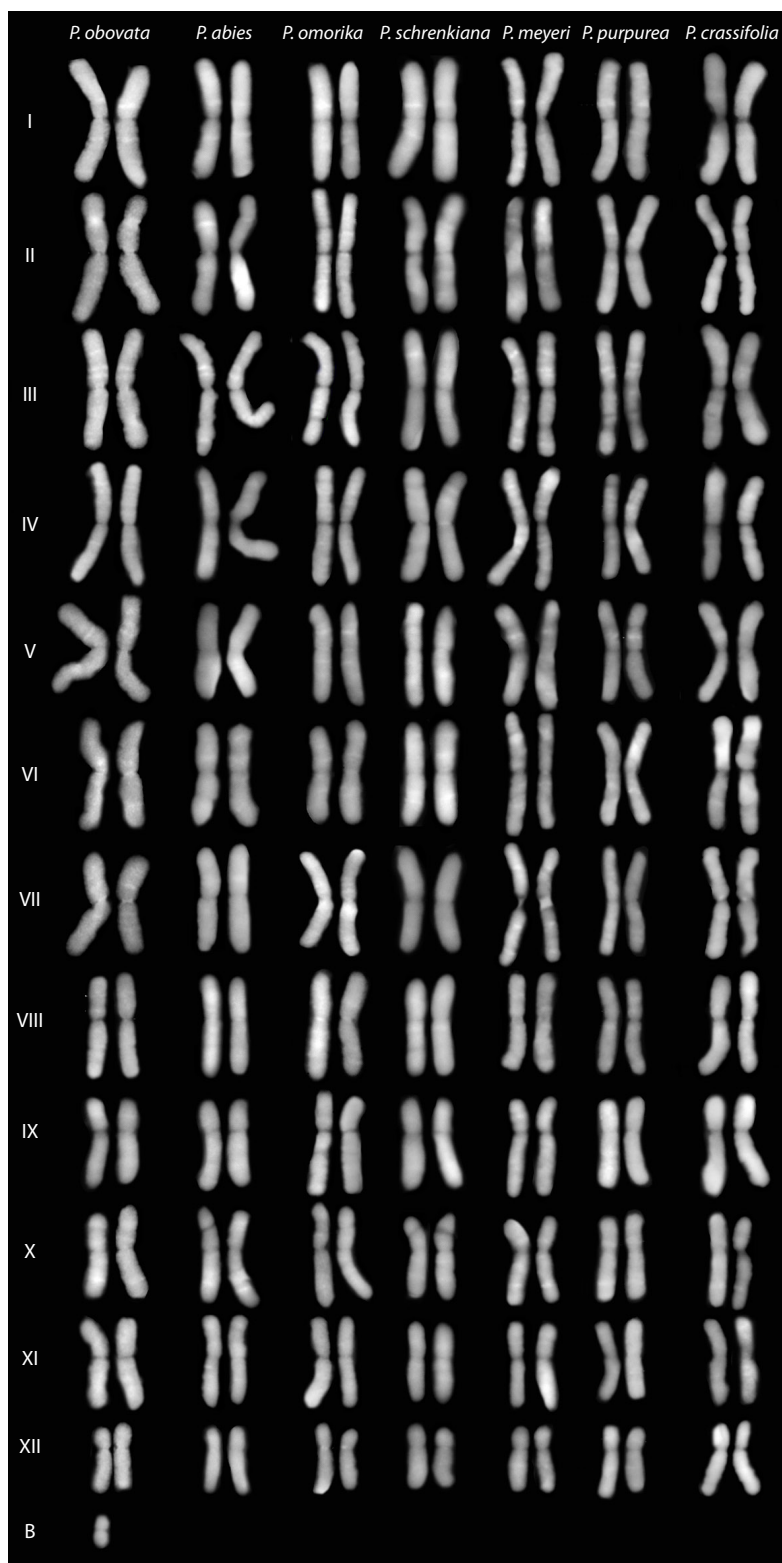


Рис. 2. Метафазные хромосомы изученных видов *Picea*, окрашенные DAPI.

Позитивные DAPI-блоки с яркой флуоресценцией в интеркалярных районах чаще всего выявлялись на хромосомах I, III и X пар (см. рис. 2). Их распределение совпадало у всех изученных видов, облегчая идентификацию этих хромосом и подбор пар гомологов. На обоих плечах хромосомы I наблюдались проксимальные позитивные

полосы DAPI; на коротком плече хромосомы III – двойная проксимальная и дистальная; на длинном плече хромосомы X – DAPI-бэнд в дистальном положении.

Другие DAPI-позитивные полосы отмечались на хромосомах нерегулярно, иногда только у одного гомолога в паре. Среди самых ярких можно отметить интеркаляр-

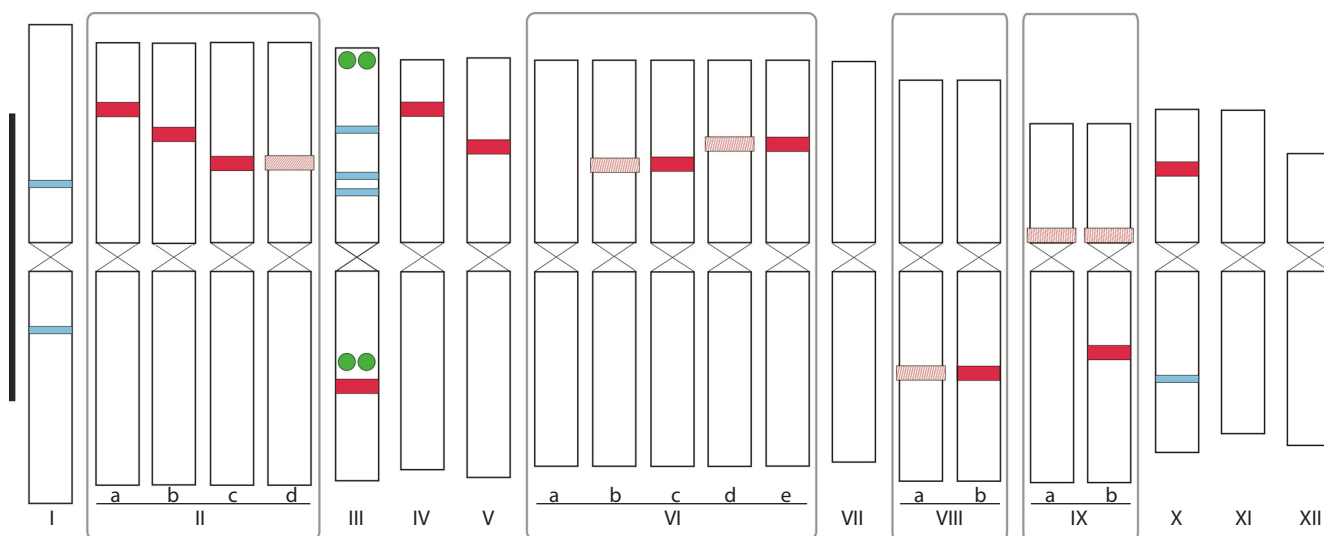


Рис. 3. Сравнительная идиограмма видов *Picea*, показывающая вариацию локализации сайтов 45S рДНК.

Красным показаны мажорные локусы, минорные локусы заштрихованы. Сайты 5S рДНК показаны зеленым цветом, DAPI-бэнды – голубым. Масштаб 10 мкм. I–XII – номера хромосом. Варианты локализации сайтов 45S рДНК соответствуют видам: на хромосоме II (a) – *P. abies*; (b) – *P. crassifolia*, *P. meyeri*, *P. obovata*, *P. purpurea*; (c) – *P. omorika*; (d) – *P. schrenkiana*; на хромосоме VI (a) – *P. schrenkiana*, *P. crassifolia*, *P. obovata*; (b) – *P. abies*; (c) – *P. omorika*; (d) – *P. purpurea*; (e) – *P. meyeri*; на хромосоме VIII (a) – *P. crassifolia*, *P. purpurea*, *P. meyeri*; (b) – *P. omorika*, *P. schrenkiana*, *P. obovata*, *P. abies*; на хромосоме IX (a) – *P. abies*, *P. crassifolia*, *P. meyeri*, *P. schrenkiana*, *P. obovata*; (b) – *P. omorika*.

ные полосы DAPI на коротком плече хромосомы II, соответствующие сайтам 45S рДНК у *P. obovata*, *P. abies*, *P. meyeri*. У остальных исследованных видов на коротком плече хромосомы II также обнаруживался интеркалярный DAPI-бэнд, но более слабый. Он был расположен ближе к центромере и не совпадал с сайтами 45S рДНК. На хромосоме IV у большинства видов наблюдалось много тонких интеркалярных DAPI-бэндов на обоих плечах. У *P. obovata*, *P. omorika*, *P. meyeri* и *P. purpurea* выявлены яркие DAPI-позитивные блоки в проксимальном районе короткого плеча хромосомы V, у *P. omorika*, *P. meyeri* и *P. purpurea* – позитивные DAPI-бэнды в середине длинного плеча хромосомы XII.

Таким образом, сочетание молекулярно-цитогенетического метода с традиционными методами кариологического анализа, основанного на изучении морфологии хромосом, позволяет идентифицировать пары гомологичных хромосом в кариотипах видов *Picea*. Восемь пар хромосом – I, III, IV, VIII, IX, X, XI, XII – легко идентифицируются у всех рассмотренных видов. У некоторых видов сложно различить хромосомы II и V пар, а также VI и VII пар. Например, хромосомы II и V пар в кариотипах *P. obovata*, *P. meyeri*, *P. purpurea* и *P. crassifolia* содержат мажорные сайты 45S рДНК сходной локализации на коротких плечах (см. табл. 3), и гомологичные пары могут быть различимы только по морфологии и рисунку DAPI-бэндинга. Хромосомы VI и VII у *P. obovata*, *P. schrenkiana*, *P. crassifolia* тоже трудно различимы, поскольку они не несут локусов рибосомных генов и имеют сходный рисунок DAPI.

Разнообразие изученных видов ели по распределению локусов рибосомных генов 5S и 45S рРНК представлено на идиограмме (рис. 3). Согласно рисунку, различия между видами по наличию, интенсивности и локализации сигналов 45S рДНК имеются у хромосомных пар II, VI, VIII

и IX. Эти данные вместе с другими признаками могут быть использованы для решения спорных вопросов и установления филогенетических взаимоотношений между видами рода *Picea*.

Обсуждение

Гены, кодирующие 5S и 45S рибосомную РНК, часто используются как молекулярно-цитогенетические маркеры в эволюционных и геномных исследованиях лесных древесных растений благодаря их высококонсервативной структуре и тандемной организации (Ribeiro et al., 2008). В пределах вида число локусов рДНК, как правило, стабильно, что делает их удобным инструментом для идентификации хромосом. Однако между таксонами число и локализация сайтов различаются, что связано с преобразованиями кариотипа в процессе эволюции.

Число кластеров рибосомных генов 5S рРНК у голосеменных варьирует от одного до четырех на гаплоидный геном, они могут иметь как терминальную, так и интерстициальную локализацию на хромосомах (Ribeiro et al., 2008; Garcia et al., 2017; Ohri, 2021). Гораздо большее разнообразие наблюдается по числу локусов 45S рДНК: от 2 (у большинства видов *Podocarpus* и *Juniperus*) до 38 у *Pinus taeda* (Ohri, 2021). Положение сайтов 45S рДНК на хромосомах большинства голосеменных растений, в том числе видов *Picea*, обычно интерстициальное, тогда как у покрытосеменных эти сайты чаще расположены терминально (Roa, Guerra, 2012; Garcia et al., 2017).

Гены 5S и 45S рРНК у представителей сем. Pinaceae чаще находятся на одной и той же хромосоме, во многих случаях на одном и том же плече, и гибридизационные сигналы частично могут перекрываться. Такие хромосомы наблюдаются в кариотипах *Picea*, *Pinus* и *Abies*, однако метод Саузерн-блот гибридизации не выявил существен-

ной совместной гибридизации проб 26S (18S) и 5S рДНК, что свидетельствует о смежном положении независимых сайтов 5S и 45S рДНК (Garcia, Kovařík, 2013). При этом кластер генов 5S рДНК у видов *Picea* находится ближе к центромере, а у видов *Abies* – ближе к теломере (Shibata et al., 2004; Puizina et al., 2008). В кариотипах разных видов *Pinus* обнаружены оба варианта смежной локализации сайтов 45S и 5S рДНК (Liu Z. et al., 2003; Cai et al., 2006).

В кариотипах всех видов *Larix* и *Pseudotsuga menziesii* локусы 5S и 45S рДНК также расположены на одной хромосоме, но на разных плечах (Hizume et al., 1996; Liu B. et al., 2006, 2007; Zhang et al., 2010; Goryachkina et al., 2013). Межвидовая изменчивость по числу и локализации сайтов 5S рДНК описана у видов *Pinus* и *Abies* (Liu Z. et al., 2003; Shibata et al., 2004; Cai et al., 2006; Puizina et al., 2008; Nkongolo, Mehes-Smith, 2012; Ohri, 2021). У изученных к настоящему времени видов *Picea* и *Larix* число локусов 5S рДНК постоянное.

Хромосома, несущая два кластера рибосомных генов 5S рДНК и мажорный локус генов 45S рДНК, выявлена в кариотипах всех видов *Picea* (Brown et al., 1993; Hizume, Kuzakawa, 1995; Brown, Carlson, 1997; Hizume et al., 1999; Šiljak-Yakovlev et al., 2002; Shibata, Hizume, 2008) и, вероятно, может считаться маркером кариотипа данного рода. Сходная модель расположения кластеров локусов 5S и 45S рДНК на одном из длинных метацентриков наблюдается в кариотипах большинства видов *Larix*: единственный локус 5S рДНК локализован терминально на коротком плече хромосомы III, которая также несет мажорный сайт 45S рДНК на другом плече (Liu B. et al., 2006, 2007; Zhang et al., 2010; Goryachkina et al., 2013).

Среди видов *Picea* число локусов 45S рДНК варьирует от 8 до 26, при этом у американских и евразийских видов их наблюдается больше, чем у восточноазиатских (Ohri, 2021). Две хромосомы – I и XI – не несут кластеров рибосомных генов 45S рДНК ни у одного из исследованных к настоящему времени видов ели. Межвидовые различия зафиксированы по числу сайтов 45S рДНК и их локализации на остальных хромосомах в кариотипе. Мажорные сигналы 45S рДНК совпадают с местами локализации постоянных вторичных перетяжек, свидетельствующих о функциональной активности соответствующих локусов, как было показано ранее (Šiljak-Yakovlev et al., 2002).

Два локуса генов 45S рДНК характеризуются высоким постоянством и выявляются в кариотипах всех видов *Picea*: медиальный сайт на длинном плече хромосомы III и субтерминальный на коротком плече хромосомы IV. Эти локусы облегчают идентификацию хромосомных пар и подбор гомологов в группе длинных метацентриков II–VII пар. Дистальный сайт 45S рДНК на коротком плече хромосомы V тоже достаточно стабилен и не выявлен только у североамериканского вида *P. breweriana* (Shibata, Hizume, 2008). В кариотипе *P. breweriana* обнаружено несколько уникальных мажорных сайтов 45S рДНК, которые не наблюдались на хромосомах других видов ели: на коротком плече хромосомы III и в перичентромерном районе хромосомы X (Shibata, Hizume, 2008). Считается, что ель Бревера занимает изолированное положение в секции

Omorika рода *Picea*, ее близость к некоторым азиатским видам ели подтверждается на основе изучения последовательностей нуклеотидов в ядерных, митохондриальных и хлоропластных геномах (Ran et al., 2006, 2015; Lockwood et al., 2013).

Интересные данные были получены при сравнении локализации полиморфных сайтов 45S рДНК на хромосомах II, VI и VIII пар. Эти результаты можно считать предварительными, поскольку к настоящему времени гены 5S и 45S рДНК картированы на хромосомах только половины видов *Picea* (Brown et al., 1993; Lubaretz et al., 1996; Brown, Carlson, 1997; Hizume et al., 1999; Šiljak-Yakovlev et al., 2002; Vischi et al., 2003; Sarri et al., 2008; Shibata, Hizume, 2008). Тем не менее можно отметить некоторые закономерности, которые могут указывать на родство или общее происхождение видов.

Ранее F. Shibata и M. Hizume (2008) описали две позиции мажорного сигнала 45S рДНК на коротком плече хромосомы II: субтерминальную (*P. abies*, *P. sitchensis*, *P. glauca*) и медиальную (*P. asperata*, *P. crassifolia*, *P. jezoensis* var. *hondoensis*, *P. koraiensis*, *P. obovata*, *P. pungens* var. *glauca*). Оба варианта локализации показаны на идиограмме (см. рис. 3). Однако G.R. Brown с коллегами (1993) в оригинальной работе говорили о медиальной локализации данного сигнала у *P. sitchensis* и *P. glauca* (см. табл. 3), что позволяет отнести эти виды ко второй группе. Таким образом, у *P. abies* сайт 45S рДНК на хромосоме II имеет уникальное положение в субтерминальной части короткого плеча (см. рис. 3, табл. 3). Проведенные нами измерения показали, что у *P. schrenkiana* и *P. omorika* кластер 45S рДНК на хромосоме II располагается более проксимально по сравнению с другими видами, соответственно, эти виды можно отнести к третьей группе (см. рис. 3). Таким образом, локус 45S рДНК на коротком плече хромосомы II может иметь три варианта расположения у разных видов *Picea* и представляется наиболее полиморфным по локализации на хромосомном плече.

Сайт 45S рДНК на хромосоме VI тоже характеризуется полиморфной локализацией, но присутствует только у половины изученных видов *Picea*. Среди исследованных нами видов этот сайт имел проксимальную локализацию у *P. omorika* (мажорный локус) и *P. abies* (минорный локус). У североамериканских видов *P. glauca* и *P. sitchensis* отмечены мажорные локусы 45S рДНК на хромосоме VI также с проксимальной локализацией 35.8 % (Brown, Carlson, 1997). F. Shibata и M. Hizume (2008) показали, что в кариотипе *P. engelmannii* хромосома VI имеет сигнал 45S рДНК в проксимальной части короткого плеча, а у *P. koraiensis* – в медиальной части длинного плеча. Согласно нашим данным по морфометрии, у *P. purpurea* и *P. meyeri* сигнал 45S рДНК на хромосоме VI расположен медиально на коротком плече, хотя у метацентриков иногда бывает трудно идентифицировать короткое и длинное плечи (см. табл. 3). У всех остальных изученных видов ели (евразийские *P. schrenkiana* и *P. obovata*, восточноазиатские *P. crassifolia*, *P. asperata*, *P. jezoensis* var. *hondoensis* и *P. koyamai*, североамериканские *P. breweriana*, *P. mariana* и *P. rubens*) хромосома VI не имеет сигналов 45S рДНК.

Сайт 45S рДНК на хромосоме VIII имеет сходную локализацию в середине длинного плеча у всех видов, однако интенсивность сигнала различается. Для большинства восточноазиатских видов (*P. meyeri*, *P. crassifolia*, *P. purpurea*) зафиксированы слабые сигналы гибридизации, в то время как у европейских и евразийских видов (*P. abies*, *P. omorika*, *P. schrenkiana*, *P. obovata*) наблюдаются яркие мажорные локусы 45S рДНК. Среди исследованных другими авторами видов из Восточной Азии сайт 45S рДНК сходной локализации на хромосоме VIII отмечался только у *P. jezoensis* var. *hondoensis* и отсутствовал у *P. asperata*, *P. koraiensis*, *P. koyamai* (Hizume et al., 1999; Shibata, Hizume, 2008). Тем не менее у трех последних видов флуоресцентное окрашивание выявило интеркалярные СМА⁺-бэнды на длинном плече хромосомы VIII; среди восточноазиатских видов они отсутствуют только у *P. maximowiczii* var. *senanensis* и *P. wilsonii* (Hizume, 2017). Как известно, интеркалярные СМА⁺-бэнды могут соответствовать районам локализации генов 45S рДНК.

У большинства изученных видов, за исключением *P. purpurea*, был выявлен минорный сайт 45S рДНК в перичентромерном районе хромосомы IX. Ранее этот локус был обнаружен у *P. abies* при гибридизации с пробой PAF1, содержащей межгенный спейсер 45S рДНК (Vischi et al., 2003). Флуоресцентное окрашивание дает сходные результаты: виды ели из Северной Америки и Евразии содержали СМА⁺-бэнды на хромосоме IX, а у ряда восточноазиатских видов (*P. wilsonii*, *P. koyamae*, *P. maximowiczii* var. *senanensis*, *P. likiangensis*) эти полосы отсутствовали (Hizume, 2017). Ранее было установлено филогенетическое родство *P. wilsonii*, *P. likiangensis* и *P. purpurea* по результатам молекулярно-генетического анализа ядерных, хлоропластных и митохондриальных генов (Sun et al., 2014). *P. purpurea* и *P. likiangensis* также имеют сходные морфологические признаки: по форме и структуре семенных чешуй, почкам и хвое, цвету и опушению побегов (Liu T.S., 1982).

Некоторые минорные сигналы представляют собой сайты с низким числом копий 45S рДНК, которые могли быть активными у предковых форм голосеменных, а затем переместились в дистальные районы хромосом в результате структурных перестроек или активности мобильных элементов (Garcia, Kovarik, 2013; Garcia et al., 2017). Этот феномен известен как амфиплазия и часто встречается у аллополиплоидных растений (Pikaard, 2000). Функция латентных локусов может быть восстановлена, если какие-то ядрышкообразующие районы хромосом были утеряны. Так, минорные сайты 45S рДНК на хромосоме 1R тетраплоидных *Triticale* становятся функционально активными в генотипах пшеницы, имеющих хромосомы 1В и 6В (Badaev et al., 1992). Большинство минорных ядрышковых организаторов обладают не истинными генами рДНК, а псевдогенами (Pedersen, Linde-Laursen, 1994) и могут возникать за счет действия мобильных элементов (Dubkovsky, Dvorak, 1995; Raskina et al., 2004).

Минорные перичентрические сигналы 45S рДНК характерны для сосен. Их количество варьирует у разных

видов от 2 до 18 на диплоидный набор (Liu Z. et al., 2003; Islam-Faridi et al., 2007; Bogunić et al., 2011; Shibata et al., 2016). М. Hizume с коллегами (2001) изолировали последовательности 18S и 26S рДНК, используя микродиссекцию перичентромерных районов хромосом *Pinus densiflora*, и предположили, что эти последовательности являются нефункциональными, поскольку число ядрышек в интерфазных ядрах было меньше, чем число мажорных NOR. Минорные перичентрические сигналы 45S рДНК наблюдались также у некоторых видов *Larix* (Goryachkina et al., 2013).

Рисунок FISH может быть использован для изучения взаимоотношений между видами. С этой точки зрения сигналы, локализованные на хромосомах II, VI, VII, VIII и X, представляются более информативными. Близкая локализация сайтов 45S рДНК во многих случаях обнаруживается у видов, относящихся к одним и тем же секциям (или под родам), выделенным разными авторами на основе сходства по морфологическим и анатомическим признакам (Сукачев, 1928; Dallimore, Jackson, 1966; Бобров, 1971; Liu T.S., 1982; Schmidt, 1989; Ledig et al., 2004; Farjon, 1990).

Необходимо отметить, что классификация рода внутри секций до сих пор остается противоречивой. Кроме того, многие виды *Picea* легко скрещиваются друг с другом в зоне контакта ареалов. Эксперименты по скрещиванию показали, что гибридизация происходит между видами ели, даже если они имеют географически изолированные ареалы, вплоть до расположения на разных континентах (Wright, 1955; Mikkola, 1969). Наши результаты по FISH в большой степени согласуются с данными других авторов по молекулярно-филогенетическим исследованиям рода (Sigurgeirsson, Szmidt, 1993; Nkongolo, 1999; Ran et al., 2006, 2015; Lockwood et al., 2013).

С другой стороны, сходная локализация сайтов 45S рДНК отмечена у видов из различных групп рода *Picea*: *P. omorika* и *P. schrenkiana* (проксимальный сигнал на коротком плече хромосомы II); *P. omorika* и *P. abies* (медиальный сигнал на коротком плече хромосомы VI); *P. meyeri* и *P. purpurea* (проксимальный сигнал на коротком плече хромосомы VI); *P. omorika* и *P. pungens* var. *glauca* (сигнал на длинном плече хромосомы IX). Таким образом, многие аспекты таксономических и филогенетических взаимоотношений видов рода *Picea* еще ожидают своего решения с использованием молекулярно-цитогенетических и генетических подходов.

Заключение

Сочетание молекулярно-цитогенетических методов с традиционными методами кариологического анализа, основанного на изучении морфологии хромосом, позволяет идентифицировать пары гомологичных хромосом в кариотипах *Picea*. Установлено, что кариотипы видов ели различаются по числу, локализации и интенсивности 45S рДНК сигналов. Сходная локализация сигналов, как правило, наблюдается у видов, входящих в состав одних и тех же секций. В некоторых случаях сходная локализация

сайтов 45S рДНК отмечена у видов из разных серий, что требует дальнейших сравнительных цитогенетических и молекулярно-генетических исследований. Таким образом, метод флуоресцентной гибридизации *in situ* дает ценную информацию для анализа взаимоотношений между видами и открывает новые возможности при изучении генетического разнообразия, эволюции, внутривидовой и межвидовой изменчивости рода *Picea*.

Список литературы / References

- Бобров Е.Г. История и систематика рода *Picea* A. Dietr. *Новости систематики высших растений*. 1971;7:5-40
- [Bobrov E.G. The history and systematics of the genus *Picea* A. Dietr. *Novitates Systematicae Plantarum Vascularium*. 1971;7: 5-40 (in Russian)]
- Муратова Е.Н., Седельникова Т.С., Горячкина О.В., Пименов А.В., Карпюк Т.В. Добавочные хромосомы хвойных растений (на примере видов ели *Picea* A. Dietr.). *Журнал СВУ. Биология*. 2023; 16(4):403-419
- [Muratova E.N., Sedel'nikova T.S., Goryachkina O.V., Pimenov A.V., Karpjuk T.V. Supernumerary chromosomes in coniferous plants: a case study of the *Picea* A. Dietr. genus. *Journal of Siberian Federal University. Biology*. 2023;16(4):403-419 (in Russian)]
- Попов П.П. Ель на востоке Европы и в Западной Сибири: популяционно-географическая изменчивость и ее лесоводственное значение. Новосибирск: Наука, 1999
- [Popov P.P. Spruce in the East Europe and Western Siberia: Population-geographic variation and its silviculture value. Novosibirsk: Nauka Publ., 1999 (in Russian)]
- Правдин Л.Ф., Бударагин В.А., Круклис М.В., Шершуква О.П. Методика кариологического изучения хвойных пород. *Лесоведение*. 1972;2:67-75
- [Pravdin L.F., Budaragin V.A., Kruklis M.V., Shershukova O.P. Methods of karyological investigation of conifers. *Lesovedenie*. 1972;2:67-75 (in Russian)]
- Сукачев В.Н. Лесные породы, систематика, география и фитосоциология их. Т. 1. Хвойные. М.: Новая деревня, 1928
- [Sukachev V.N. Forest Woody Species, Systematics, Geography and their Phytosociology. Vol. 1. Conifers. Moscow: Novaya Derevnja Publ., 1928 (in Russian)]
- Badaev N.S., Badaeva E.D., Dubovets N.I., Bolsheva N.L., Bormotov V.E., Zelenin A.V. Formation of a synthetic karyotype of tetraploid triticales. *Genome*. 1992;35(2):311-317. doi 10.1139/g92-047
- Bogunić F., Šiljak-Yakovlev S., Muratović E., Ballian D. Different karyotype patterns among allopatric *Pinus nigra* (Pinaceae) populations revealed by molecular cytogenetics. *Plant Biol*. 2011;13(1): 194-200. doi 10.1111/j.1438-8677.2010.00326.x
- Brown G.R., Carlson J.E. Molecular cytogenetics of the genes encoding 18s-5.8s-26s rDNA and 5s rRNA in two species of spruce (*Picea*). *Theor Appl Genet*. 1997;95(1-2):1-9. doi 10.1007/s001220050526
- Brown G.R., Amarasinghe V., Kiss G., Carlson J.B. Preliminary karyotype and chromosomal localization of ribosomal DNA sites in White spruce using fluorescence *in situ* hybridization. *Genome*. 1993; 36(2):261-267. doi 10.1139/g93-043
- Cai Q., Zhang D.M., Liu Z.L., Wang X.R. Chromosomal localization of 5S and 18S rDNA in five species of subgenus *Strobilus* and their implications for genome evolution of *Pinus*. *Ann Bot*. 2006;97(5): 715-722. doi 10.1093/aob/mcl030
- Dallimore W., Jackson A.B. A Handbook of Coniferae and Ginkgoaceae. London: Arnold, 1966
- Devey M.E., Bell J.C., Smith D.N., Neale D.B., Moran G.F. A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD, and microsatellite markers. *Theor Appl Genet*. 1996;92(6):673-679. doi 10.1007/BF00226088
- Dubcovsky J., Dvorak J. Ribosomal RNA multigene loci: nomads of the Triticeae genomes. *Genetics*. 1995;140(4):1367-1377. doi 10.1093/genetics/140.4.1367
- Farjon A. Pinaceae: Drawings and Descriptions of the Genera *Abies*, *Cedrus*, *Pseudolarix*, *Keteleeria*, *Nothotsuga*, *Tsuga*, *Cathaya*, *Pseudotsuga*, *Larix* and *Picea*. Königstein: Koeltz Scientific Books, 1990
- Farjon A. World Checklist and Bibliography of Conifers. Kew: Royal Botanic Gardens, 2001
- Friesen N., Brandes A., Heslop-Harrison J.S. Diversity, origin, and distribution of retrotransposons (*gypsy* and *copia*) in conifers. *Mol Biol Evol*. 2001;189(7):1176-1188. doi 10.1093/oxfordjournals.molbev.a003905
- Garcia S., Kovařík A. Dancing together and separate again: gymnosperms exhibit frequent changes of fundamental 5S and 35S rRNA gene (rDNA) organization. *Heredity*. 2013;111(1):23-33. doi 10.1038/hdy.2013.11
- Garcia S., Kovařík A., Leitch A.R., Garnatje T. Cytogenetic features of rRNA genes across land plants: analysis of the Plant rDNA database. *Plant J*. 2017;89(5):1020-1030. doi 10.1111/tpj.13442
- Gerlach W.L., Bedbrook J.R. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Res*. 1979; 7(7):1869-1885. doi 10.1093/nar/7.7.1869
- Gerlach W.L., Dyer T.A. Sequence organization of the repeated units in the nucleus of wheat which contains 5S-rRNA genes. *Nucleic Acids Res*. 1980;8(21):4851-4865. doi 10.1093/nar/8.21.4851
- 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 Syst Evol*. 2013;299(2):471-479. doi 10.1007/s00606-012-0737-y
- Hizume M. Karyomorphological studies in the family Pinaceae. *Mem Fac Educ Ehime Univ Nat Sci*. 1988;8(2):1-108
- Hizume M. Chromosome banding in *Picea* IV. Comparative karyotype analysis of fluorescent band patterns in 25 taxa. *Chromosome Bot*. 2017;12(2):17-32. doi 10.3199/iscb.12.17
- Hizume M., Kuzakawa Y. Fluorescent chromosome banding in *Picea*. II. Relationships between rDNA loci and chromomycin A₃-bands of *P. jezoensis* var. *hondoensis*. *La Kromosomo*. 1995;79-80:2754-2759
- Hizume M., Kuzakawa Y., Kondo T. Physical mapping of 5S rDNA locus on chromosomes in *Pseudotsuga menziesii*, Pinaceae. *La Kromosomo*. 1996;83-84:2901-2908
- Hizume M., Shibata F., Kondo T., Hoshi H., Kondo T., Ge S., Yang Q., Hong D. Identification of chromosomes in two Chinese spruce by multicolor fluorescence in hybridization. *Chromosome Sci*. 1999; 3(1):37-41
- Hizume M., Shibata F., Maruyama Y., Kondo T. Cloning of DNA sequences localized on proximal fluorescent chromosome bands by microdissection in *Pinus densiflora* Sieb. & Zucc. *Chromosoma*. 2001;110(5):345-351. doi 10.1007/s004120100149
- Islam-Faridi M.N., Nelson C.D., Kubisiak T.L. Reference karyotype and cytomechanical map for loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *Genome*. 2007;50(2):241-251. doi 10.1139/g06-153
- Ledig F.T., Hodgskiss P.D., Krutovskii K.V., Neale D.B., Eguiluz-Piedra T. Relationships among the spruces (*Picea*, Pinaceae) of Southwestern North America. *Systematic Botany*. 2004;299(2):275-295. doi 10.1600/036364404774195485
- Li L.C., Wang G., Su S. Karyotype analysis of four species of *Picea* in Chengdu (Pinaceae). *Guihaia*. 2001;21(1):43-46 (in Chinese)
- Liu B., Zhang S.-G., Zhang Y., Lan T.-Y., Qi L.-W., Song W.Q. Molecular cytogenetics analysis of four *Larix* species by bicolor fluorescence *in situ* hybridization and DAPI banding. *Int J Plant Sci*. 2006;167(2):367-372. doi 10.1086/499317
- Liu B., Qi L.-W., Chen R., Song W.Q. Multicolor fluorescence *in situ* hybridization with combinatorial labeling probes enables a detailed karyotype analysis of *Larix principis-rupprechtii*. *Biol Res*. 2007; 40(1):23-28. doi 10.4067/s0716-97602007000100003
- Liu T.S. A new proposal for the classification of the genus *Picea*. *Acta Phytotax Geobot*. 1982;33(4-6):227-245. doi 10.18942/bunruichiri.KJ00001079164
- Liu Y.H., Li M.X. Karyotype analysis of five species of genus *Picea*. *J Wuhan Bot Res*. 1985;3(3):203-207 (in Chinese)

- Liu Z., Zhang D., Hong D., Wang X. Chromosomal localization of 5S and 18S-5.8S-25S ribosomal DNA sites in five Asian pines using fluorescence *in situ* hybridization. *Theor Appl Genet.* 2003;106(2): 198-204. doi 10.1007/s00122-002-1024-z
- Lockwood J.D., Aleksić J.M., Zou J., Wang J., Liu J., Renner S.S. A new phylogeny for the genus *Picea* from plastid, mitochondrial, and nuclear sequences. *Mol Phylogenet Evol.* 2013;69(3):717-727. doi 10.1016/j.ympev.2013.07.004
- Lubaretz O., Fuchs J., Ahne R., Meister A., Schubert I. Karyotyping of three Pinaceae species via fluorescent *in situ* hybridization and computer-aided chromosome analysis. *Theor Appl Genet.* 1996; 92(3-4):411-416. doi 10.1007/BF00223687
- Mikkola L. Observations on interspecific sterility in *Picea*. *Ann Bot Fenn.* 1969;6(4):285-339
- Nkongolo K.K. RAPD and cytological analysis of *Picea* spp. from different provenances: genomic relationship among taxa. *Hereditas.* 1999;130(2):137-144. doi 10.1111/j.1601-5223.1999.00137.x
- Nkongolo K.K., Mehesh-Smith M. Karyotype evolution in the Pinaceae: implication with molecular phylogeny. *Genome.* 2012;55(11): 735-753. doi 10.1139/g2012-061
- Ohri D. Karyotype evolution in conifers. *Feddes Repertorium.* 2021; 132(3):232-262. doi 10.1002/fedr.202100014
- Pedersen C., Lindle-Laursen I. Chromosomal locations of four minor rDNA loci and a marker microsatellite sequence in barley. *Chromosome Res.* 1994;2(1):65-71. doi 10.1007/BF01539456
- Pikaard C.S. Nucleolar dominance: uniparental gene silencing on a multi-megabase scale in genetic hybrids. *Plant Mol Biol.* 2000; 43(2-3):163-177. doi 10.1023/a:1006471009225
- Puizina J., Sviben T., Krajačić-Sokol I., Zoldoš-Pećnik V., Šiljak-Yakovlev S., Papeš D., Besendorfer V. Cytogenetic and molecular characterization of the *Abies alba* genome and its relationship with other members of the Pinaceae. *Plant Biol.* 2008;10(2):256-267. doi 10.1111/j.1438-8677.2007.00018.x
- Ran J.-H., Wei X.-X., Wang X.-Q. Molecular phylogeny and biogeography of *Picea* (Pinaceae): implications for phylogeographical studies using cytoplasmic haplotypes. *Mol Phylogenet Evol.* 2006; 41(2):405-419. doi 10.1016/j.ympev.2006.05.039
- Ran J.-H., Shen T.-T., Liu W.-J., Wang P.-P., Wang X.-Q. Mitochondrial introgression and complex biogeographic history of the genus *Picea*. *Mol Phylogenet Evol.* 2015;93(1):63-76. doi 10.1016/j.ympev.2015.07.020
- Raskina O., Belyayev A., Nevo E. Activity of *En/Spm*-like transposons in meiosis as a base for chromosome repatterning in a small. Isolated, peripheral populations of *Aegilops speltoides* Tausch. *Chromosome Res.* 2004;12(2):153-161. doi 10.1023/B:CHRO.0000013168.61359.43
- Ribeiro T., Barão A., Viegas W., Morais-Cecili L. Molecular cytogenetics of forest trees. *Cytogenet Genome Res.* 2008;120(3-4): 220-227. doi 10.1159/000121070
- Roa F., Guerra M. Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: structural and evolutionary implications. *BMC Evolutionary Biology.* 2012;12:225. doi 10.1186/1471-2148-12-225
- Rossello J.A., Maravilla A.J., Rosato M. The nuclear 35S rDNA world in plant systematics and evolution: a primer of cautions and common misconceptions in cytogenetic studies. *Front Plant Sci.* 2022; 13:788911. doi 10.3389/fpls.2022.788911
- Sarri V.V., Minelli S., Panara F.F., Morgante M., Jurman I., Zuccolo A.A., Cionini P.G. Characterization and chromosomal organization of satellite DNA sequences in *Picea abies*. *Genome.* 2008; 51(9):705-713. doi 10.1139/G08-048
- Schmidt P.A. Contributions to the taxonomy and evolution of the genus *Picea* A. Dietr. *Flora.* 1989;182(5-6):435-461. doi 10.1016/S0367-2530(17)30431-0
- Shibata F., Hizume M. Comparative FISH karyotype analysis of 11 *Picea* species. *Cytologia.* 2008;73(2):203-211. doi 10.1508/cytologia.73.203
- Shibata F., Hizume M., Garajova Z. Conserved FISH karyotype in four species of *Abies* (Pinaceae). *Chromosome Sci.* 2004;8(3):95-98
- Shibata F., Matsusaki Y., Hizume M. A comparative analysis of multi-probe fluorescence *in situ* hybridization (FISH) karyotypes in 26 *Pinus* species (Pinaceae). *Cytologia.* 2016;81(4):409-421. doi 10.1508/cytologia.81.409
- Sigurgeirsson A., Szmidi A.E. Phylogenetic and biogeographic implications of chloroplast DNA variation in *Picea*. *Nordic J Bot.* 1993; 13(3):233-246. doi 10.1111/j.1756-1051.1993.tb00043.x
- Šiljak-Yakovlev S., Cerbah M., Coulaud J., Stojan V., Brown S.C., Zoldoš V., Jelenić S., Papeš D. Nuclear DNA content, base composition, heterochromatin and rDNA in *Picea omorika* and *Picea abies*. *Theor Appl Genet.* 2002;104(2-3):505-512. doi 10.1007/s001220100755
- Sun Y.-Sh., Abbott R.J., Li L.L., Li L., Zou J., Liu J.Q. Evolutionary history of Purple cone spruce (*Picea purpurea*) in the Qinghai-Tibet Plateau: homoploid hybrid origin and Pleistocene expansion. *Mol Ecol.* 2014;23(2):343-359. doi 10.1111/mec.12599
- Trontin J.-F., Grandemange C., Favre J.-M. Two highly divergent 5S rDNA unit size classes occur in composite tandem array in European larch (*Larix decidua* Mill.) and Japanese larch (*Larix kaempferi* (Lamb.) Carr.). *Genome.* 1999;42(5):837-848. doi 10.1139/g99-015
- Vischi M., Jurman J., Bianchi G., Morgante M. Karyotype of Norway spruce by multicolor FISH. *Theor Appl Genet.* 2003;107(4):591-597. doi 10.1007/s00122-003-1306-0
- Wright J.W. Species crossability in spruce in relation to distribution and taxonomy. *For Sci.* 1955;1(4):319-340. doi 10.1093/forestscience/1.4.31
- Zhang S.G., Yang W.H., Han S.Y., Han B.T., Li M.S., Qi L.W. Cytogenetic analysis of reciprocal hybrids and their parents between *Larix leptolepis* and *Larix gmelinii*: implications for identifying hybrids. *Tree Genet Genomes.* 2010;6(3):405-412. doi 10.1007/s11295-009-0258-1

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 28.11.2025. После доработки 16.04.2026. Принята к публикации 17.04.2026