

Ю.О. ТКАЧОВА, І.І. КОРШИКОВ
Донецький ботанічний сад НАН України
пр. Ілліча, 110, м. Донецьк, 83059, Україна
dbsgenetics@gmail.com

**ПОЛІМОРФІЗМ ЯДЕРНО-ЯДЕРЦЕВИХ
ПАРАМЕТРІВ НАСІННЕВОГО ПОТОМСТВА
PICEA ABIES (L.) KARST. (*PINACEAE*)
У ПРИРОДНИХ ПОПУЛЯЦІЯХ
ТА ІНТРОДУКЦІЙНОМУ НАСАДЖЕННІ**

Ключові слова: *Picea abies*, природні популяції, інтродукційне насадження, проростки насіння, ядерцева активність, ядерно-ядерцеве співвідношення

Вступ

Найбільший структурний домен клітинного ядра — ядерце (1—5 мкм) відзначається еволюційною консервативністю (Olson et al., 2002; Andersen et al., 2005). Основною функцією ядерця є швидке збирання малих та великих субодиниць рибосом (Lempiäinen, Shore, 2009), а також транскрипція рДНК та дозрівання транскриптів пре-рРНК (Жарская, Зацепина, 2007). Ядерце іноді називають «фабрикою рибосом» (Andersen et al., 2005). Ядерця вважають одним із найпластичніших компонентів клітинного ядра, організація та функціональна активність яких змінюються у відповідь на більшість зовнішніх впливів (Cheutin et al., 2004).

Формування ядерець і їхньої кількості в ядрі пов'язано з функціональною активністю ядерцевих організаторів хромосом, яка зумовлена фізіологічним станом клітини та молекулярно-генетичними процесами, що відбуваються в ній (Беляева, 1966; Кикнадзе, Беляева, 1967; Schwazzacher et al., 1993; Соболев, 2001). Активність ядерцевих організаторів тканин кореня і листка різних дикорослих видів однієї родини залежить від еколого-кліматичних умов зростання рослин (Дуброва, 1986). У природних умовах найбільш значущі структурні та функціональні перебудови ядерець відбуваються під час мітотичного поділу клітин (Жарская, Зацепина, 2007). Параметри ядерець — кількість і їхні розміри — є найбільш лабільними ознаками, що відображають рівень метаболічної активності клітин. Саме тому комплекс названих параметрів, а також площі ядерець та відношення площі ядра до загальної площі ядерець пропонують використовувати як високочутливий тест щодо впливу на клітину чинників зовнішнього середовища (Архипчук, 1995; Соболев, 2001; Калаев и др., 2005; Severine et al., 2010). Ядерцеві характеристики застосовують для визначення цитогенетичних змін у насінневого потомства деревних рослин, що зазнають впливу техногенно забрудненого довкілля (Хесин, 1967; Буторина и др., 2002).

У промислових регіонах степової зони України деревні види-інтродуценти перебувають під впливом як несприятливих природно-кліматичних чинників,

так і політантів техногенного походження. Як змінюється функціонально-кількісний поліморфізм ядерцевих організаторів у насіння інтродуцентів в умовах, спричинених дією цих двох несприятливих факторів? Свідчення про це практично відсутні. В подібних дослідженнях доцільно порівняти кількісно-якісні ядерно-ядерцеві характеристики рослин інтродукованих насаджень і природних популяцій.

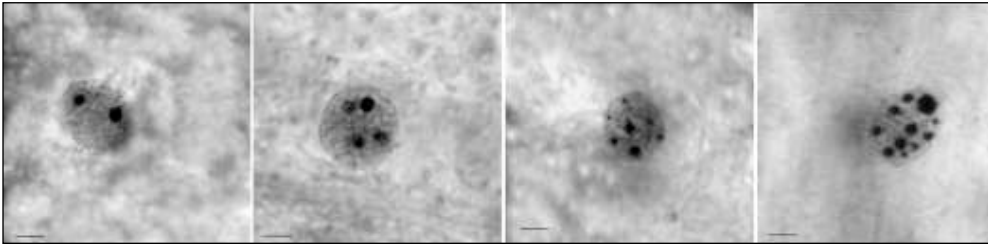
Мета роботи — порівняльний аналіз ядерно-ядерцевих характеристик насінневого потомства *Picea abies* (L.) Karst. двох природних популяцій, одна з яких забруднена радіонуклідами, та інтродукційного насадження для виявлення особливостей поліморфізму залежно від еколого-кліматичних умов.

Об'єкти та методика досліджень

Об'єкт нашого вивчення — проростки насіння двох природних популяцій *P. abies* Українського Полісся і 35-річного інтродукційного насадження в дендрарії Донецького ботанічного саду НАН України. Популяція «Малевиці» з Маневицького лісництва (Волинська обл.) розташована в зоні з підвищеним радіаційним фоном унаслідок аварії на Чорнобильській АЕС, який не фіксується у популяції «Ростань» Ростанського лісництва тієї самої області. Насіння було зібрано з 38 дерев у популяції «Ростань», 35 — у популяції «Малевиці» і з 38 — у дендрарії ботанічного саду. Вік дерев у популяціях становив 65—75 років. Насіння з кожного деревостану змішували, а потім випадкову вибірку пророщували в чашках Петрі на вологому фільтрувальному папері в термостаті за температури 23—25 °С. У дослідженні використовували корінці завдовжки 1,0—1,5 см, які фіксували оцтовим алкоголем (1:3). Для забарвлення ядерцеві застосовували загальноприйнятну методику (Муратова, 1995). Слід зазначити, що селективне забарвлення азотнокислим сріблом — зручний та адекватний метод для оцінювання активності ядерцевтворювальних регіонів хромосом в інтерфазі (Ward, 1977; Hozak et al., 1992; Tere, 1994). Корінці залишали у 50 % розчині азотнокислого срібла на 3 години за температури 60 °С. Після забарвлення корінці промивали та готували давлені препарати за стандартною методикою (Паушева, 1980). Мікропрепарати переглядали під мікроскопом *Carl Zeiss Primo star* зі збільшенням 40 × 10, фотографували цифровою фотокамерою *Canon PowerShot A620*. Розміри ядер та ядерцеві встановлювали за допомогою програмного забезпечення *Axio Vision Rel. 4.7*. Визначали умовну площу ядра та ядерця за їхніми проекціями. На 1000 клітин із кожної вибірки підраховували кількість ядерцеві. Функціональний стан ядерцевого організатора оцінювали за величиною ядерно-ядерцевого співвідношення в клітинах меристеми корінців проростків. Величину ядерно-ядерцевого співвідношення встановлювали як частку від ділення значень сумарної площі ядер на сумарну площу ядерцеві.

Результати досліджень та їх обговорення

У клітинах корінців проростків насіння *P. abies* трапляється від двох до одинадцяти ядерцеві (рисунок). Поліморфізм насінневого потомства за кількістю яде-



Різна кількість ядерць в інтерфазних ядрах клітин коренів проростків *Picea abies* (5 μm)
 Variable number of nucleoli in the interphase nuclei of roots of *Picea abies* seedlings (—5 μm)

рець в інтерфазному ядрі клітин має певні особливості залежно від умов зростання материнських дерев. Так, у потомстві дерев популяції «Ростань», що зростають у найменш забрудненому районі, переважають клітини з 4–7 ядерцями, а в потомстві дерев популяції «Малевиці» на забрудненій радіонуклідами території домінують клітини з 4–8 ядерцями (табл. 1).

Серед клітин потомства дерев інтродукційного насадження найчастіше трапляються ті, що мають 3–7 ядерць. У середньому найбільшу кількість ядерць встановлено в клітинах насінневого потомства рослин природних популяцій і суттєво меншу — в клітинах потомства дерев інтродукційного насадження. Значну мінливість кількості ядерць у ядрі виявлено в клітинах корінців проростків плюсових дерев *Pinus sylvestris* L. (Войтюк, Андреева, 2009). Тобто кількість ядерць у клітинах проростків певною мірою залежить від генетичних особливостей материнських дерев. Зі збільшенням кількості ядерцеутворювальних хромосом у клітині зростає й кількість ядерць. Проте часто ядерць у клітині виявляється менше, ніж хромосом із ядерцевим організатором, бо вони не завжди можуть бути активні в інтерфазі, а самі ядерця мають виражену тенденцію до злиття (Mosgoeller, 2004).

Таблиця 1. Частота ядер із різною кількістю ядерць в інтерфазних клітинах проростків *Picea abies* із насіння рослин природних популяцій Полісся та інтродукційного насадження

Деревостани	Частота ядер із різною кількістю ядерць, %										Середня кількість ядерць в ядрі, шт.
	кількість ядерць в ядрі, шт.										
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
Популяція «Ростань»	0,1	4,8	18,4	35,9	23,3	13,4	3,4	0,3	0,4	—	5,35 \pm 0,04
Популяція «Малевиці»	0,1	2,3	15,3	24,6	25,6	19,8	9,5	2,2	0,5	0,1	5,85 \pm 0,04
Насадження в дендрарії Донецького ботанічного саду	2,8	12,3	21,9	31,8	18,1	9,0	2,9	1,1	0,1	—	4,95 \pm 0,04

Оскільки ядерця є морфологічним вираженням активності ядерцевого організатора (Дуброва, Малахова, 1980), то можна стверджувати, що вона найменша в насіння рослин, які зростають далеко від природного ареалу, а саме в промисловому регіоні степової зони (Донецький ботанічний сад). Більшою є кількість ядерць у клітинах проростків насіння з популяції «Малевиці» порівняно з популяцією «Ростань», що, можливо, пов'язано з радіонуклідним забрудненням середовища. Зокрема, з'ясовано, що незначні дози радіації підвищували ядерцеву активність у зародкових клітинах риб (Архипчук, 1995). Разом з тим дефіцит вологи та висока температура спричинюють депресію ядерцевого організатора в клітинах рослин природних популяцій (Дуброва, 1986). Саме в таких природно-кліматичних умовах степової зони відбувається інтродукційне випробування *P. abies*. Загалом стрес призводить до реорганізації ядерної архітектури (Severin, 2010).

Найбільші ядра виявлено в клітинах проростків насіння з популяції «Ростань» (табл. 2). Суттєво меншими були ядра клітин проростків насіння з інтродукційного насадження щодо проростків насіння з обох популяцій. Морфологія та розмір ядерць пов'язані з їх функціональною діяльністю, яка, в свою чергу, залежить від росту клітин та обміну речовин (Severin, 2010). Ефекти, індуковані різними типами клітинного стресу, часто супроводжуються змінами в організації та складі ядерць. Наприклад, у разі пошкодження ДНК ультрафіолетовим опроміненням і хімічним забрудненням спостерігається явище сегрегації ядерць (Al-Baker et al., 2005). Ядерце та його білки беруть участь у регулюванні клітинного циклу, процесах апоптозу та старіння (Olson et al., 2002; Жарская, Зацепина, 2007; Severin, 2010; Lempiäinen, Shore, 2009).

Середня площа ядерць у клітинах проростків насіння з популяцій також була більшою порівняно з їхньою площею в клітинах проростків із насадження. Це стосується і ядерно-ядерцевого співвідношення — найбільше зафіксовано у проростків із популяції «Ростань».

Зменшення ядерно-ядерцевого співвідношення може обумовлюватися підвищенням об'єму ядерць, що пов'язують зі стимулюванням біосинтетичних процесів у клітинах (Машкин, Назарова, 1976; Дуброва, Малахова, 1980). Оскільки ядерце — дуже лабільна клітинна органела, зміна ядерцевої активності корелює з рівнем транскрипції рДНК, швидкістю процесингу рРНК і ви-

Таблиця 2. Ядерно-ядерцеві співвідношення в клітинах меристематичних тканин коренів проростків *Picea abies* із природних популяцій Полісся та інтродукційного насадження

Деревостани	Середня площа 1 ядра, мкм ²	Середня площа ядерць в 1 ядрі, мкм ²	Ядерно-ядерцеве співвідношення
Популяція «Ростань»	199,52 ± 13,61	22,08 ± 5,28	12,72 ± 0,73
Популяція «Малевиці»	170,45 ± 6,70	22,84 ± 1,83	10,0 ± 0,90
Насадження в дендрарії Донецького ботанічного саду	147,36 ± 5,77	18,51 ± 1,09	9,00 ± 0,50

ходу рибосомальних субодиниць з ядерця в ядро (Соболь, 2001). У деревних рослин ядерно-ядерцеве співвідношення в клітинах змінюється впродовж періоду вегетації (Машкин, Назарова, 1976). Зменшення цього співвідношення відзначається у хвойних в екстремальних умовах зростання, включаючи техногенно забруднене середовище. Такі зміни розглядають як адаптивну реакцію рослин на несприятливі умови місцезростань (Муратова, Седельникова, 1999; Хайдарова, Калашник, 1999). У насінневого потомства рослин, як показано на прикладі *Picea obovata* Ledeb., відтворюється каріотип материнських дерев у різних екотопах, а кількість ядерець збігається з кількістю ядерцеутворювальних хромосом (Владимирова, 2002). У наших дослідженнях найменше ядерно-ядерцеве співвідношення встановлено у клітин проростків насіння *P. abies* з інтродукційного насадження. Це пов'язано з істотним зменшенням площі їхніх ядер і ядерець порівняно з площею ядра і ядерець клітин проростків насіння з природних популяцій. Слід зазначити, що в клітин проростків насіння з популяції, яка зростала на території з підвищеним радіаційним фоном, також зменшується ядерно-ядерцеве співвідношення, насамперед за рахунок зменшення розмірів ядер у клітинах. Проте безпідставно припускати, що зниження цього показника в клітинах проростків насіння з популяції «Малевиці» й інтродукційного насадження зумовлене підвищенням синтетичних процесів у клітинах. Скоріше насіння рослин цих деревостанів має дещо знижений життєвий потенціал, оскільки в їхніх клітинах утворюються менші ядра, а стосовно інтродукційного насадження — і ядерця.

Висновки

Таким чином, у клітинах корінців проростків насіння *P. abies* із популяції «Ростань», яка найменше техногенно забруднена, відзначено найбільші інтерфазні ядра, а в клітинах проростків насіння з інтродукційного насадження — істотно менші. Така відмінність між насінневим потомством деревостанів стосується також площі ядерець, їхньої кількості та ядерно-ядерцевого співвідношення. Встановлено, що в клітинах проростків насіння з популяції «Малевиці», яка перебуває в зоні підвищеного радіаційного фону, середня площа інтерфазного ядра менша, що зумовлює менше значення ядерно-ядерцевого співвідношення порівняно з потомством популяції «Ростань». Усе це свідчить, що еколого-кліматичні умови та радіоактивне забруднення середовища впливають на формування насінневого потомства *P. abies*, а отже, позначаються на його цитогенетичних характеристиках.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Архипчук В.В. Использование ядрышковых характеристик в биотестировании // Цитология и генетика. — 1995. — № 3. — С. 6—12.
2. Беляева Е.С. К вопросу о роли ядрышкового организатора // Цитология. — 1966. — 8, № 3. — С. 379—383.
3. Буторина А.К., Калаев В.Н., Карпова С.С. Особенности протекания митоза и ядрышковые характеристики семенного потомства березы повислой в условиях антропогенного загрязнения // Цитология. — 2002. — 44, № 4. — С. 392—399.

4. Владимирова О.С. Кариологические особенности ели сибирской *Picea obovata* Ledeb. из разных мест произрастания // Цитология. — 2002. — **44**, № 7. — С. 712—718.
5. Войтюк В.П., Андреева В.В. Ядерцева активність у меристемі проростків плюсових дерев сосни звичайної // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. — 2009. — 7, № 2. — С. 177—183.
6. Дуброва Н.А. Изучение дифференциальной активности ядрышкового организатора хромосом у дикорастущих растений сем. *Ranunculaceae* // Цитология и генетика. — 1986. — № 4. — С. 302—303.
7. Дуброва Н.А., Малахова Л.А. Изучение полиморфизма ядрышкообразующих хромосом у видов рода *Actaea* L. (*Ranunculaceae* Juss.) // Цитология и генетика. — 1980. — № 5. — С. 3—8.
8. Жарская О.О., Зацепина О.В. Динамика и механизмы реорганизации ядрышка в митозе // Цитология. — 2007. — **49**, № 5. — С. 355—369.
9. Калаев В.Н., Буторина А.К., Марухленко В.Н., Вахтель В.М., Бабенко А.Г. Влияние низких активностей радона на ядерные структуры клеток апикальной меристемы корней *Zebrina pendula* Schnizl (ядрышковый тест) // Вестн. Самарск. гос. ун-та. — 2005. — № 1. — С. 80—85.
10. Кикнадзе И.И., Беляева Е.С. Ядрышко, закономерности его формирования и генетическая роль // Генетика. — 1967. — № 8. — С. 149—159.
11. Машкин С.И., Назарова М.Н. Сезонная динамика числа и размеров ядрышек, ядер и ядерно-ядрышковых отношений у представителей подсем. Сливовых при их интродукции // Цитология. — 1976. — **18**, № 12. — С. 1438—1443.
12. Муратова Е.Н., Седельникова Т.С. Кариологическое исследование болотных и суходольных популяций сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) // Экология. — 1999. — № 6. — С. 41—50.
13. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. — М.: Колос, 1980. — 304 с.
14. Соболев М.А. Роль ядрышка в реакциях растительных клеток на действие физических факторов окружающей среды // Цитология и генетика. — 2001. — № 3. — С. 72—84.
15. Хайдарова Т.Г., Калашник Н.А. Ядрышковые организаторы хромосом как адаптивные элементы хвойных видов // Цитология. — 1999. — **41**, № 12. — С. 1086—1089.
16. Хесин Я.Е. Размеры ядер и функциональное состояние клеток. — М.: Медицина, 1967. — 423 с.
17. Al-Baker E.A., Oshin M., Hutchison C.J., Kill I.R. Analysis of UV-induced damage and repair in young and senescent human dermal fibroblasts using the comet assay // Mech. Ageing Dev. — 2005. — **126**. — P. 664—672.
18. Andersen J.S., Lam Y.W., Leung A.K. et al. Nucleolar proteome dynamics // Nature. — 2005. — **433**. — P. 77—83.
19. Cheutin T., Misteli T., Dundr M. Dynamics of nucleolar components // The nucleolus. — New York: Kluwer Acad., 2004. — P. 29—40.
20. Hozak P., Roussel P., Hernandez-Verdun D. Procedures for specific detection of silver-stained nucleolar proteins on western blots // J. Histochem Cytochem. — 1992. — **40**(8). — P. 1089—1096.
21. Lempiainen H., Shore D. Growth control and ribosome biogenesis // Curr. Opin. Cell Biol. — 2009. — **21**. — P. 855—863.
22. Mosgoeller W. Nucleolar ultrastructure in vertebrate // The nucleolus. — New York: Kluwer Acad., 2004. — P. 10—20.
23. Olson M. O., Hingorani K., Szebeni A. Conventional and nonconventional roles of the nucleolus // Int. Rev. Cytol. — 2002. — **219**. — P. 199—266.
24. Schwazzacher H.G., Wachtler F. The nucleolus // Anat. Embryol. — 1993. — **188**. — P. 515—536.
25. Severine B., Westman B.J., Saskia H., Boisvert F.M., Lamond A.I. The nucleolus under stress // Molecular Cell. — 2010. — **40**. — P. 216—227.
26. Trere D. Technical and methodological aspects of silver staining and measurement of nucleolar organizer region (NOR) // Zentralbl. Pathol. — 1994. — **140**. — P. 11—14.
27. Ward O.G. Dimorphic nucleolar organizer regions in the frog *Rana blairi* // Can. J. Genet. Cytol. — 1977. — **19**(1). — P. 51—57.

Рекомендує до друку
Є.Л. Кордюм

Надійшла 07.02.2012 р.

Ю.А. Ткачева, И.И. Коршиков

Донецкий ботанический сад НАН Украины

ПОЛИМОРФИЗМ ЯДЕРНО-ЯДРЫШКОВЫХ ПАРАМЕТРОВ
СЕМЕННОГО ПОТОМСТВА *PICEA ABIES* (L.) KARST. (*PINACEAE*)
В ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ И ИНТРОДУКЦИОННОМ НАСАЖДЕНИИ

Исучен цитогенетический количественный полиморфизм у проростков *Picea abies* (L.) Karst., выращенных в лабораторных условиях из семян, собранных с деревьев двух природных популяций Украинского Полесья и интродукционного насаждения в Донбассе. Установлено, что интерфазные ядра у потомства деревьев из насаждения и популяции, которая произрастала на территории с повышенным радиационным фоном, меньше, чем в популяции с низким техногенным влиянием. Количество ядрышек, их площадь и ядерно-ядрышковое соотношение были наименьшими у потомства деревьев из интродукционного насаждения. Эколого-климатические условия среды (в т. ч. радиоактивное загрязнение) влияют на семенное потомство *P. abies*, что отражается на его цитогенетических характеристиках.

К л ю ч е в ы е с л о в а: *Picea abies*, природные популяции, интродукционное насаждение, проростки семян, ядрышковая активность, ядерно-ядрышковое соотношение.

Yu.A. Tkachova, I.I. Korshikov

Donetsk Botanical Garden, National Academy of Sciences of Ukraine

POLYMORPHISM OF NUCLEUS-NUCLEOLUS PARAMETERS
OF *PICEA ABIES* (L.) KARST. (*PINACEAE*) SEED PROGENY
IN THE NATURAL POPULATIONS AND IN THE INTRODUCTION PLANTING

Cytogenetic quantitative polymorphism was studied in the *Picea abies* (L.) Karst. seedlings. Seeds were collected from trees in two natural populations of Ukrainian Polesie and introduction plantation in Donbass and grown in the laboratory. It was established that interphase nuclei in offsprings of trees from the plantation and the population in areas with high radioactivity level are smaller than in population with low anthropogenic influence. The number of nucleoli and their area, and nucleus-nucleolus ratio was the lowest in the tree progeny from the introduction plantation. Environmental conditions (including radioactive pollution) affect the seed progeny of *P. abies* which is reflected in its cytogenetic characteristics.

К е у w o r d s: *Picea abies*, populations, introduction planting, seedlings seeds, nucleolus activity, nucleus-nucleolus ratio.