

И.И. Коршиков, Ю.А. Ткачева

ЯДЕРНО-ЯДРЫШКОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СЕМЕННОГО ПОТОМСТВА СОСНЫ КРЫМСКОЙ (*PINUS PALLASIANA* D. DON) ПРИРОДНОЙ ПОПУЛЯЦИИ И НАСАЖДЕНИЙ ТЕХНОГЕННО ЗАГРЯЗНЕННЫХ ТЕРРИТОРИЙ

ядро, ядрышко, ядерно-ядрышковое отношение, *Pinus pallasiana* D. Don

Введение

Ядрышко является органеллой и специфической областью ядра клетки, где происходит сборка рибосом. Функциональная активность ядрышек тесно связана с синтезом рибосомальной РНК и объективно отражает уровень метаболизма клетки в целом [2, 13, 15]. Количество ядрышек в ядре непосредственно связано с важнейшими молекулярно-генетическими процессами в клетке и определяется активностью и числом определенных участков хромосом – ядрышковых организаторов, которые чаще всего лежат в районах вторичных перетяжек. Изменение числа ядрышек может быть связано с эндогенными и экзогенными причинами. При ведущей роли эндогенных факторов в регуляции числа ядрышек их количество в ядре меристематических тканей растений может изменяться под влиянием природно-климатических факторов среды [4, 9, 13, 18]. Условия техногенно загрязненной среды влияют на цитологические показатели в клетках меристематических тканей материнских растений и их семенного потомства, включая число ядрышек в ядре и значение ядерно-ядрышкового отношения [1, 10].

Качественно-количественные характеристики ядрышек – высокочувствительного теста на влияние стрессовых факторов на клетку, вероятно, важны и для оценки состояния интродуцентов на новых территориях и особенно тех видов, которые произрастают в условиях техногенно загрязненной среды. В этом плане интересна сосна крымская (*Pinus pallasiana* D. Don), широко распространенная в искусственных насаждениях промышленных городов степной зоны Украины. Так как природный ареал этого вида включает Горный Крым, то возможно проведение сравнительных цитогенетических исследований по изучению изменения структурно-функциональной организации ядрышек под влиянием факторов природной и техногенно загрязненной среды.

Цель нашей работы – сравнительный анализ количественных и качественных характеристик ядрышек у семенного потомства *P. pallasiana* из природной популяции и интродукционных насаждений, испытывающих воздействие выбросов разных промышленных производств.

Объект и методика исследований

Объектом исследований было семенное потомство *P. pallasiana* из двух насаждений, произрастающих в окрестностях промышленных предприятий в Донбассе. Влияние промышленных выбросов на ядерно-ядрышковые характеристики изучали у семенного потомства сорокалетнего насаждения *P. pallasiana*, находящегося в пределах города Мариуполь на расстоянии трех километров от крупного металлургического комбината. Второе насаждение такого же возраста находилось в километровой зоне от крупного Новоамвросиевского цементного завода. Растения этого насаждения испытывают воздействие цементной пыли, оседающей на ветвях и хвое, а также попадающей в почву. В насаждениях семена собирали с 30 деревьев. В качестве контроля использовали семена из природной популяции Горного Крыма (район пгт Никита). Сборы семян были проведены с 25 деревьев возрастом от 80 до 100 лет.

Материалом для исследования послужили корешки прорастающих семян *P. pallasiana* от свободного опыления.

Для цитогенетических исследований было выбрано два показателя: ядрышковая активность и ядерно-ядрышковое отношение. Анализ проводили на временных препаратах из меристематических тканей корешков проростков семян. Семена проращивали в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге в термостате при температуре 23 – 25 °С. Корешки длиной 1,0 – 1,5 см

фиксируют в уксусном этаноле (1:3). Для окрашивания ядрышек применяли общепринятую методику [8]. Корешки помещали в 50 % раствор азотнокислого серебра на 3 часа в термостат при температуре 60 °С. Надо отметить, что селективное окрашивание азотнокислым серебром – удобный и адекватный метод для оценки активности ядрышкообразующих районов хромосом в интерфазе [16, 19]. После окраски корешки промывали и готовили давленные препараты по стандартной методике [12]. Просмотр микропрепаратов осуществляли с помощью микроскопа *Carl Zeiss Primo star* при увеличении 40x10. Подсчет числа ядрышек проводили в 1000 клеток каждой из трех выборок. Функциональное состояние ядрышкового организатора оценивали по величине ядерно-ядрышкового отношения в меристеме корешков проростков. Для этого на давленных препаратах определяли условную площадь ядра и ядрышка по их проекциям. Ядерно-ядрышковое отношение устанавливали как частное от деления площади ядер на суммарную площадь ядрышек.

Результаты исследований и их обсуждение

В наших исследованиях ядрышковая активность в клетках корешков *P. pallasiana* изменялась в широких пределах (рис.). Так, например, в проростках семян из природной популяции с разной частотой встречаются интерфазные клетки, имеющие от 1 до 11 ядрышек в ядре (табл. 1). Почти такой же диапазон изменчивости количества ядрышек отмечен в клетках проростков семян из насаждений. У проростков, полученных из семян, собранных вблизи крупного промышленного объекта – Новоамвросиевского цементного завода встречались клетки с 3 – 11 ядрышками, а в проростках из семян, собранных в г. Мариуполе – это клетки с 2 – 12 ядрышками в интерфазном ядре.

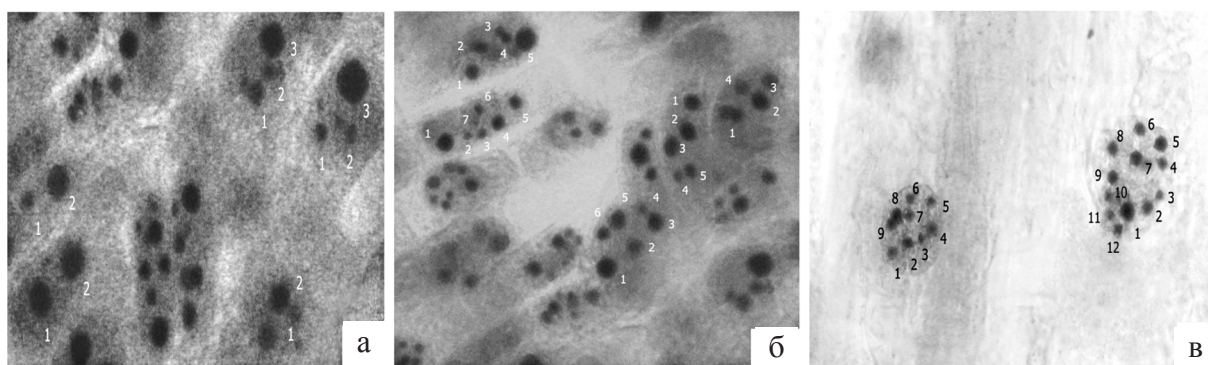


Рис. Интерфазные ядра с разным количеством ядрышек в клетках корешков проростков *Pinus pallasiana* D. Don:

а – низкое; б – среднее; в – высокое количество ядрышек. Увеличение 40x10.

Таблица 1. Частота встречаемости интерфазных ядер с различным числом ядрышек в клетках корешков проростков *Pinus pallasiana* D. Don из природной популяции Горного Крыма и интродукционных насаждений Донецкой области

Выборка	Частота встречаемости ядер с разным количеством ядрышек, %												Среднее число ядрышек на ядро, $M \pm m$
	количество ядрышек в 1 ядре												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Горный Крым													
Популяция в районе пгт Никита	0,3	2,3	10,7	18,9	23,6	28,1	10,8	3,3	1,6	0,3	0,1	0	5,20±0,05
Донецкая область													
Насаждение вблизи (1км) Новоамвросиевского цементного завода	0	0	5,6	19,8	23,8	27,5	14,3	6,3	2,0	0,5	0,2	0	5,56±0,05
Насаждение в г. Мариуполе	0	1,8	6,1	11,2	24,1	29,6	15,2	6,7	4,4	0,5	0,3	0,1	5,74±0,05

Примечание: $M \pm m$ – среднее арифметическое значение ± ошибка.

У семенного потомства популяции преобладали клетки, имеющие 3–7 ядрышек (встречаемость >10%). Доля таких клеток составила 91,2 %. Для потомства двух насаждений характерны клетки с 4–7 ядрышками, доля которых составила 85,4 % (цементный завод) и 80,1 % (г. Мариуполь). Эти районы хромосом вовлечены в транскрипцию рибосомных генов и процессинг рРНК, а по этой причине служат показателем метаболической активности клеток [17].

Среднее число ядрышек на интерфазное ядро наименьшим оказалось в клетках проростков *P. pallasiana* из популяции – 5,20, а наибольшим у проростков, полученных из семян из г. Мариуполя – 5,74. Эти различия достоверны по критерию Стьюдента. По всей видимости, под влиянием неблагоприятных условий интродукционного ареала, которые усиливаются загрязнением среды выбросами крупных промышленных предприятий, увеличивается число ядрышек в интерфазных ядрах семян *P. pallasiana*.

Следует отметить, что вариации количества ядрышек в интерфазном ядре генетически обусловлены и отражают их характерное свойство – высокую реактивность на изменения функционального состояния клетки [6]. Ряд авторов отмечает увеличение числа ядрышкообразующих районов и ядрышек в интерфазных клетках у хвойных в стрессовых условиях произрастания, рассматривая это как своеобразный механизм адаптации [3, 11, 14]. Установлено, что ядрышковая активность повышалась в зародышевых клетках рыб при внешнем облучении очень низкими дозами радиации [2].

В клетках проростков *P. pallasiana* природной популяции отмечены наиболее объемные ядра и ядрышки (табл. 2). У проростков семян березы повислой (*Betula pendula* Roth), произрастающих в различных районах г. Воронежа и на экологически «чистой» территории, сумма площадей двух гомоморфных ядрышек в клетках апикальной меристемы варьировала от 56,6 до 143,8 мкм². Увеличение размеров ядрышек объясняют возможной амплификацией рибосомальных генов [3]. У черемухи пенсильванской (*Padus pensylvanica* Sok.) и черемухи магалевки (*P. magaleb* (L.) Vozkh.) объем ядра и ядрышка в среднем составлял 105,2 и 4,7; 96,3 и 2,8, соответственно [7].

Таблица 2. Ядерно-ядрышковые отношения у проростков *Pinus pallasiana* D. Don из природной популяции Горного Крыма и интродукционных насаждений Донецкой области

Выборка	Средняя площадь 1 ядра (мкм ²)	Средняя площадь ядрышек в 1 ядре(мкм ²)	Ядерно-ядрышковые отношения
	M±m		
Популяция в р-не пгт Никита	192,64±10,22	6,47±0,28	7,24±0,44
Насаждение вблизи (1км) Новоамвросиевского цементного завода	167,18±5,76	5,12±0,43	8,21±0,76
Насаждение в г. Мариуполе	188,62±8,80	6,38 ±0,35	8,59±0,51

Примечание: M±m – среднее арифметическое значение ± ошибка.

Ядерно-ядрышковое отношение считается хорошим показателем активности белоксинтезирующих систем клетки. Любые изменения этого показателя свидетельствуют и об изменении уровня биосинтеза белка. Уменьшение ядерно-ядрышкового отношения указывает на возрастание объема ядрышек в ядре, что, в свою очередь, означает усиление биосинтетических процессов в клетке [5, 10, 15]. В наших исследованиях в клетках проростков *P. pallasiana* наименьшее значение ядерно-ядрышкового отношения свойственно проросткам семян природной популяции – 7,24, и большее проросткам насаждений – 8,21 – 8,54. В более широких пределах варьировал этот показатель у проростков семян лиственницы Сукачева (*Larix sukaczewii* N. Dul.) из разных географических районов России: 7,1 – 30,5 [9]. Тенденция к снижению ядерно-ядрышкового отношения в корешках проростков *P. pallasiana* из интродукционных насаждений свидетельствует о более ослабленном биосинтетическом потенциале семян этих древостоев, произрастающих в загрязненных условиях.

Заклучение

Таким образом, проростки семян *P. pallasiana* из природной популяции Горного Крыма отличаются большей средней площадью интерфазных ядер, более низким числом ядрышек в них и меньшими значениями ядерно-ядрышкового отношения, чем проростки семян насаждений, испытывающих влияние выбросов крупного цементного завода и промышленных предприятий г. Мариуполя. Изменение совокупности этих цитогенетических показателей у потомства *P. pallasiana* в насаждениях загрязненных территорий можно рассматривать как адаптивно-компенсаторные изменения на влияние неблагоприятных природных и техногенных факторов среды.

1. Артюхов В.Г. Цитогенетический полиморфизм семенного потомства деревьев березы повислой (*Betula pendula* Roth), произрастающих в различных экологических условиях / В.Г. Артюхов, В.Н. Калаев, С.С. Карпова // Экологическая генетика. – 2009. – Т. 7, № 1. – С. 30 – 40.
2. Архипчук В.В. Использование ядрышковых характеристик в биотестировании / В.В. Архипчук // Цитология и генетика. – 1995. – № 3. – С. 6 – 12.
3. Буторина А.К. Особенности протекания митоза и ядрышковые характеристики семенного потомства березы повислой в условиях антропогенного загрязнения / А.К. Буторина, В.Н. Калаев, С.С. Карпова // Цитология. – 2002. – Т. 44, № 4. – С. 392 – 399.
4. Дуброва Н.А. Изучение дифференциальной активности ядрышковых организаторов хромосом у дикорастущих растений сем. Ranunculaceae / Н.А. Дуброва // Цитология и генетика. – 1986. – № 4. – С. 302 – 303.
5. Дуброва Н.А. Изучение полиморфизма ядрышкообразующих хромосом у видов рода *Actaea* L. (Ranunculaceae Juss.) / Н.А. Дуброва, Л.А. Малахова // Цитология и генетика. – 1980. – № 5. – С. 3 – 8.
6. Кикнадзе И.И. Функциональная организация хромосом / Ия Ивановна Кикнадзе. – Л.: Наука. Ленингр. отд, 1972. – 211 с.
7. Машкин С.И. Сезонная динамика числа и размеров ядрышек, ядер и ядерно-ядрышковых отношений у представителей подсем. Сливовых при их интродукции / С.И. Машкин, М.Н. Назарова // Цитология. – 1976. – Т. XVIII, № 12. – С. 1438 – 1443.
8. Муратова Е.Н. Методики окрашивания ядрышек для кариологического анализа хвойных / Е.Н. Муратова // Ботан. журн. – 1995. – Т. 80, № 2. – С. 82 – 86.
9. Муратова Е.Н. Кариологическое исследование лиственницы Сукачева (*Larix sukaczewii* N. Dyl.): нуклеолярные районы и структурные перестройки / Е.Н. Муратова, Н.Е. Чубукина // Цитология и генетика. – 1985. – № 6. – С. 419 – 425.
10. Муратова Е.Н. Цитогенетические эффекты влияния горно-химического комбината на клетки элодеи канадской (*Elodea canadensis* Michx) / Е.Н. Муратова, М.Г. Корнилова, А.В. Пименов и др. // Вестник КрасГАУ. – 2006. – Вып. 14. – С. 159 – 163.
11. Муратова Е.Н. Кариологическое исследование болотных и суходольных популяций сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) / Е.Н. Муратова, Т.С. Седельникова // Экология. – 1999. – № 6. – С. 41 – 50.
12. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений / Зоя Петровна Паушева – М.: Колос, 1980. – 304 с.
13. Соболев М.А. Роль ядрышка в реакциях растительных клеток на действие физических факторов окружающей среды / М.А. Соболев // Цитология и генетика. – 2001. – № 3. – С. 72 – 84.
14. Хайдарова Т.Г. Ядрышковые организаторы хромосом как адаптивные элементы хвойных видов / Т.Г. Хайдарова, Н.А. Калашник // Цитология. – 1999. – Т. 41, № 12. – С. 1086 – 1089.
15. Хесин Я.Е. Размеры ядер и функциональное состояние клеток / Яков Ефимович Хесин – М.: Медицина, 1967. – 423 с.
16. Hozak P. Procedures for specific detection of silver-stained nucleolar proteins on western blots / P. Hozak, P. Roussel, D. Hernandez-Verdun // J. Histochem Cytochem. – 1992. – Vol. 40, № 8. – P. 1089 – 1096.
17. Schwazzacher H.G. The nucleolus / H.G. Schwazzacher, F. Wachtler // Anat. Embryol. – 1993. – Vol. 188. – P. 515 – 536.
18. Severine B. The Nucleolus under stress / B. Severine, B.J. Westman, H. Saskia [et al.] // Molecular Cell. – 2010. – Vol. 40. – P. 216 – 227.
19. Trere D. Technical and methodological aspects of silver staining and measurement of nucleolar organizer region (NOR) / D. Trere // Zentralbl. Pathol. – 1994. – Vol. 140. – P. 11 – 14.

УДК 576.3: 581.52: 634.942

ЯДЕРНО-ЯДРЫШКОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СЕМЕННОГО ПОТОМСТВА СОСНЫ КРЫМСКОЙ (*PINUS PALLASIANA* D. DON) ПРИРОДНОЙ ПОПУЛЯЦИИ И НАСАЖДЕНИЙ ТЕХНОГЕННО ЗАГРЯЗНЕННЫХ ТЕРРИТОРИЙ

И.И. Коршиков, Ю.А. Ткачева

Донецкий ботанический сад НАН Украины

Проведены исследования ядерно-ядрышковых характеристик интерфазных клеток в корешках проростков семян сосны крымской (*Pinus pallasiana* D. Don) из природной популяции Горного Крыма и интродукционных насаждений, испытывающих влияние выбросов крупного цементного завода и промышленных производств г. Мариуполя. Установлено, что клетки корешков проростков природной популяции отличаются большей средней площадью интерфазных ядер, более низким числом ядрышек в них и меньшим ядерно-ядрышковым отношением, чем клетки проростков семян интродукционных насаждений. Изменение совокупности этих цитогенетических показателей у потомства *P. pallasiana* в насаждениях загрязненных территорий можно рассматривать как адаптивно-компенсаторные реакции на влияние неблагоприятных природных и техногенных факторов среды.

UDC 576.3: 581.52: 634.942

NUCLEUS-NUCLEOLUS CHARACTERISTICS OF SEED PROGENY OF THE CRIMEAN PINE (*PINUS PALLASIANA* D. DON) OF A NATURAL POPULATION AND PLANTATIONS ON TECHNOGENICALLY POLLUTED AREAS

I.I.Korshikov, Yu.O.Tkachova

Donetsk Botanical Garden, National Academy of Sciences of Ukraine

The investigation of nucleus-nucleolus characteristics of interphase cells in seedling rootlets of the Crimean pine (*Pinus pallasiana* D. Don) from the natural population of the Crimean Mountains and the introduced plantations influenced by emissions of the large cement factory and industrial plants of Mariupol has been carried out. It has been determined that cells of seedling rootlets of the natural population are singled out by a big average area of interphase nucleuses, lower amount of nucleus-nucleolus ratio than cells of seedlings of the introduced plantation. Changing set of these cytogenetic indexes of the *P. pallasiana* progeny in the plantation of polluted areas can be considered as adaptive-compensatory reactions to the adverse impact of natural and technogenic environmental factors.