

УДК 576.315:575.222.73:633.1

Т. Г. Трочинська, фахів. I кат.Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
кафедра генетики і молекулярної біології,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна**ПОЛІМОРФІЗМ КЛІТИН ЧОЛОВІЧИХ ГЕНЕРАТИВНИХ СТРУКТУР
ПШЕНИЦІ, ЖИТА ТА ЇХ ГІБРИДІВ F₁ ЗА КІЛЬКІСТЮ ЯДЕРЕЦЬ
НА РІЗНИХ СТАДІЯХ МІКРОСПОРОГЕНЕЗУ**

У клітинах чоловічих генеративних структур п'яти сортів м'якої озимої пшениці, озимого жита та їх гібридів F₁ досліджували кількість ядерць в ядрах на п'яти етапах мікроспорогенезу. Виявлені суттєві видоспецифічні та сортоспецифічні відмінності за досліджуваним каріометричним показником.

Ключові слова: ядерце, пшениця, жито, пшенично-житні гібриди, мікроспорогенез, стадії.

Можливість аналізу функціональної активності генів по конкретних продуктах їх експресії у рослин дуже обмежена. Важливе для дослідників виключення являють собою ядерцеві організатори — локуси хромосом, що відповідають за синтез рРНК. Фенотиповий прояв їх активності — ядерце та ядерцеподібні структури — доступні для кількісного та якісного аналізу [1–4]. Вивчення морфологічних параметрів ядерць, у тому числі їх кількісного складу, на різних стадіях диференціювання клітин, у тому числі й клітин генеративного ряду може надати важливу інформацію про функціональний стан полігенних локусів рРНК в онтогенезі батьківських генотипів та їх гібридів [5].

Питання про зміни кількісного складу ядерць у рослинних та тваринних клітинах у нормі та в залежності від впливу найрізноманітніших чинників, інтенсивно досліджується [1, 6–9]. Так, наприклад, на меристемі *Allium fistulosum* показано, що кількість ядерць у клітинах є досить консервативним показником, у той час як площа ядерця (проекція на площину), змінювалася в результаті впливу численних факторів [1]. Продемонстровано, що в онтогенезі морфометричні показники ядерць змінюються по певній генетично контрольованій програмі [8]. Щодо клітин чоловічих генеративних структур вищих рослин подібні дані відсутні. Залишаються не дослідженими такі важливі генетичні аспекти мікроспорогенезу, як мінливість клітин генеративних структур за ознаками кількості ядерць у ядрах клітин та загальної кількості утвореного матеріалу на різних стадіях мікроспорогенезу. Сказане свідчить про актуальність та важливість подібних досліджень з метою поглиблення існуючих сьогодні уявлень про генетичні механізми регуляції мікроспорогенезу у рослин. З урахуванням сказаного метою даних досліджень стало з'ясування кількісних змін ядерць і загальною ядерцевого матеріалу в чоловічих генеративних клітинах за мікроспорогенезу у хлібних злаків (пшениця, жито) та їх гібридів.

Матеріали та методи

Досліджували різновікові пиляки першого покоління п'яти комбінацій створених нами пшенично-житніх амфігаплоїдів та батьківських форм. Мате-

ринськими формами для схрещування були як давно відомі, так і недавно створені (одеської селекції) сорти озимої м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.): Безоста 1 і Миронівська 808, Альбатрос одеський, Фантазія одеська, Одеська 276. У якості батьківської форми використовували Харківське 60 — сорт озимого жита (*Secale cereale* L.). Сорти та гібриди висівали рендомізованими блоками в п'ятикратній повторності. Різновікові пиляки фіксували за Карнуа та Навашиным [10]. Мікротомні зрізи завтовшки 10 мкм забарвлювали на білки бромфеноловим синім за Мезіа [11], на нуклеїнові кислоти — метиловим зеленим — піроніном по Тревану і Шарроку з контролем по Браше [10, 12]. Тимчасові препарати пиляків забарвлювали ацетокарміном [13]. Кількість ядерць у ядрах клітин чоловічих генеративних структур вираховували на п'яти стадіях мікроспорогенезу. На кожному етапі кількість ядерць підраховували у 1000–1100 клітинах, визначали кількість клітин з певним числом ядерць у ядрі, а також показник загальної кількості ядерць на сто клітин по стадіям та утворених протягом всього мікроспорогенезу. Результати досліджень обробляли за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу [14].

Результати та їх обговорення

Загалом у пшениці за кількістю ядерць клітини розподіляли на чотири класи (від одного до чотирьох ядерць); дуже зрідка у клітинах спорогенної тканини м'якої пшениці зустрічались ядра з п'ятьма та шістьма ядерцями. Впротилежність цьому, у клітинах жита, як правило, виявляли лише одне ядерце, зрідка два; відсутність ядер з трьома і чотирма ядерцями пояснюється тим, що у жита є лише два ядерцевих організатори. Враховуючи такі принципи розбіжності у молекулярно-генетичних передумовах кількісного варіювання ядерць у клітинах пшениці і жита, було поставлено завдання дослідити динаміку кількісного складу ядерць у різних клітинах сортів пшениці, жита та їх гібридів F_1 в процесі мікроспорогенезу.

У табл. 1 наведено дані відносно кількості ядерць в ядрах клітин чоловічих генеративних структур старих сортів, а також нових сортів одеської селекції, зокрема Альбатрос одеський, Фантазія одеська, Одеська 267 та F_1 гібридів від схрещування цих сортів з житом Харківське 60.

Порівняння розподілу клітин на вище зазначені класи у досліджуваних сортів пшениці показало, що пшениці одеської селекції досить сильно відрізняються від сортів Безоста 1 і Миронівська 808. У класі клітин з однадерцевим ядром сорт Альбатрос одеський мав найнижчий показник ($P < 0,01$) на всіх досліджуваних етапах мікроспорогенезу, окрім тетрад мікроспор. Два інших нових сорти Фантазія одеська і Альбатрос одеський за кількістю однадерцевих клітин, навпаки, переважали старі сорти (Безоста 1, Миронівська 808).

Сорт Альбатрос виявляв також чітку специфічність за кількістю клітин з двома, трьома та чотирма ядерцями. Так, у класі клітин з двоядерцевими ядрами, клітин, що належали цьому сортові, було найменше (29,82%), а на всіх інших етапах мікроспорогенезу — найбільше. При цьому на стадіях профазі I і вакуолізованих мікроспор зазначена перевага сорту Альбатрос була найбільш суттєвою ($P < 0,01$).

У класах трьох- і чотирьохядерцевих ядер суттєві розбіжності між сортами спостерігалися лише на стадії спорогенної тканини. Саме на цій стадії особливо чітко виявилися значні переваги ($P < 0,01$) сорту Альбатрос над іншими сортами, особливо над давно відомими, за кількістю багатоядерцевих ядер. За кількістю

чотириядерцевих клітин рослини сорту Альбатрос на стадії спорогенної тканини переважав інші сорти майже у 3–4 рази. Схожі показники мінливості 2–4-ядерцевих клітин виявив тільки сорт Одеська 267, але ця мінливість була значно меншою. Таким чином, можна констатувати, що генетичною особливістю сорту пшениці Альбатрос одеський є здатність до утворення значно більшої кількості багатоядерцевих ядер порівняно з іншими сортами.

Таблиця 1

Динаміка кількості ядерць в ядрах клітин чоловічих генеративних структур в процесі мікроспорогенезу у різних сортів пшениці, жита та F₁ пшенично-житніх гібридів (2004 р.), %

Сорт, гібрид	Спорогенна тканина	Профаза I мейозу	Тетради	Вільні мікроспори	
				невакуолізовані	вакуолізовані
Середня кількість ядер з одним ядерцем					
Безоста 1	45,22	97,73	99,80	96,72	88,86
Миронівська 808	46,56	99,21	100	97,71	90,83
Альбатрос ОД	36,55	75,42	99,22	94,90	76,51
Фантазія ОД	48,83	94,49	99,70	96,10	81,00
Одеська 267	47,82	92,82	99,62	94,38	79,10
F ₁ Безоста 1×Харківське 60	76,62	99,11	100	99,51	99,32
Харківське 60	88,24	99,62	100,00	98,36	100
F ₁ Миронівська 808×Харківське 60	79,68	99,41	100	99,12	99,62
F ₁ Альбатрос ОД×Харківське 60	56,40	95,39	99,03	98,68	98,85
F ₁ Фантазія ОД×Харківське 60	59,70	98,56	99,62	99,51	99,90
F ₁ Одеська 267×Харківське 60	59,14	96,61	99,32	99,23	99,81
НСР ₀₅	4,64	3,39	0,57	2,24	3,71
Середня кількість ядер з двома ядерцями					
Безоста 1	37,33	1,48	0,20	3,09	8,36
Миронівська 808	38,22	0,60	0	2,29	6,88
Альбатрос ОД	29,82	23,63	0,68	4,80	22,20
Фантазія ОД	34,84	4,32	0,30	3,80	17,90
Одеська 267	30,72	6,79	0,38	4,60	19,40
Харківське 60	11,76	0,38	0,00	1,64	0
F ₁ Безоста 1×Харківське 60	18,38	0,89	0	0,50	0,68
F ₁ Миронівська 808×Харківське 60	15,42	0,60	0	0,87	0,39
F ₁ Альбатрос ОД×Харківське 60	28,09	4,32	0,97	1,32	1,15
F ₁ Фантазія ОД×Харківське 60	29,55	1,15	0,38	0,49	0,10
F ₁ Одеська 267×Харківське 60	29,20	2,90	0,68	0,77	0,19
НСР ₀₅	3,65	2,41	0,52	1,81	3,90

Закінчення таблиці 1

Сорт, гібрид	Спорогенна тканина	Профаза I мейозу	Тетради	Вільні мікроспори	
				невакуолізовані	вакуолізовані
Середня кількість ядер з трьома ядерцями					
Безоста 1	13,18	0,79	0	0,19	2,78
Миронівська 808	11,78	0,20	0	0	2,29
Альбатрос ОД	19,73	0,95	0,10	0,30	1,29
Фантазія ОД	12,99	1,19	0	0,10	1,10
Одеська 267	13,79	0,39	0	1,02	1,50
F ₁ Безоста 1 × Харківське 60	3,90	0	0	0	0
F ₁ Миронівська 808 × Харківське 60	3,90	0	0	0	0
F ₁ Альбатрос ОД × Харківське 60	10,52	0,29	0	0	0
F ₁ Фантазія ОД × Харківське 60	9,04	0,29	0	0	0
F ₁ Одеська 267 × Харківське 60	9,35	0,49	0	0	0
НСР ₀₅	2,83	0,89	—	0,85	1,11
Середня кількість ядер з чотирма ядерцями					
Безоста 1	4,27	0	0	0	0
Миронівська 808	3,44	0	0	0	0
Альбатрос ОД	13,90	0	0	0	0
Фантазія ОД	3,35	0	0	0	0
Одеська 267	7,67	0	0	0	0
F ₁ Безоста 1 × Харківське 60	1,10	0	0	0	0
F ₁ Миронівська 808 × Харківське 60	1,00	0	0	0	0
F ₁ Альбатрос ОД × Харківське 60	4,99	0	0	0	0
F ₁ Фантазія ОД × Харківське 60	1,71	0	0	0	0
F ₁ Одеська 267 × Харківське 60	2,31	0	0	0	0
НСР ₀₅	2,08	—	—	—	—

За порівняння усіх п'яти гібридів першого покоління кількість ядерців найбільш варіабельна у спорогенній тканині. Відсоток стрівальності ядер з певним числом ядерців не залежав від віку спорогенної тканини, але залежав від конкретного генотипу, що свідчить про генетичну обумовленість процесу злиття різних ядерцеутворюючих локусів [15]. На цій стадії гібриди F₁ з участю сортів одеської селекції мають вірогідно ($P \leq 0,001$) меншу кількість клітин з одним ядерцем і більшу кількість клітин з двома і трьома ядерцями в ядрі, ніж гібридів F₁ за участю старих сортів пшениці – (Безоста 1 × Харківське 60) і (Миронівська 808 × Харківське 60). В цілому слід зазначити, що характер мінливості гібридів F₁ цілком відтворює динаміку мінливості материнських сортів пшениці.

Так, кількість клітин з одним ядерцем найнижча у рослин гібриду F_1 (Альбатрос \times Харківське 60). У цього ж гібриду найвища кількість багатоядерцевих ядер і двоядерцевих клітин у профазі I, так само як і у сорту Альбатрос. Є підстави вважати, що цьому сорту властива генетична обумовлена здатність активувати більшу кількість ядерцеутворюючих локусів на ДНК (генів р-РНК).

На стадіях невакуолізованих і вакуолізованих мікроспор у сортів пшениці одеської селекції значно підвищується кількість клітин, що належать до класів з двома і трьома ядерцями. В протилежність пшениці, клітини чоловічих генеративних структур жита і пшенично-житніх гібридів на зазначених стадіях розвитку починають дегенерувати, тому виявлені нами відмінності в поведінці різних генотипів є цілком природними.

Таким чином, можна констатувати, що за кількістю ядерць виявлено суттєві відмінності клітин генеративного ряду досліджених сортів пшениці і жита, а також їх гібридів F_1 . Встановлено генетично обумовлені особливості сорту пшениці Альбатрос одеський та пшенично-житнього гібриду F_1 за кількістю багатоядерцевих (три та чотири ядерця) та двоядерцевих клітин, що може бути пов'язане з більш високим рівнем метаболізму та життєздатності цих генотипів.

Аналіз кількості ядерць в окремих групах клітин не дає повної уяви про загальну кількість ядерцевого матеріалу в клітинах генеративних структур сорту або гібриду, а, отже, про дійсний рівень метаболізму клітин, їх функціональної здатності та про характер мінливості досліджуваної ознаки в процесі мікроспорогенезу. Для того, щоб виявити дійсний стан цієї важливої ознаки, ми визначали середню кількість ядерць в ядрах 100 клітин на основних стадіях та в цілому за мікроспорогенезу у досліджуваної вибірки сортів пшениці, жита та їх гібридів (табл. 2).

Проведений аналіз показує, що спостерігається суттєва мінливість окремих сортів і пшенично-житніх гібридів за ознакою «кількість ядерць/100 клітин» як в кінці мікроспорогенезу, так і на окремих його стадіях. Найбільша кількість ядерць у досліджуваних сортів і гібридів виявлена на етапі спорогенної тканини. Далі вона поступово зменшується і знову зростає лише на стадії вільних мікроспор. Оскільки така динаміка характерна для всіх досліджених сортів пшениці і зберігається в умовах різних років вирощування рослин [15], то можна говорити про закономірну генетично обумовлену мінливість ядерцевого матеріалу в процесі мікроспорогенезу. Відмінності цього показника між окремими сортами пшениці дуже значні, що теж слугує на користь його генетичної детермінації. Особливо за досліджуваною ознакою виділяється сорт Альбатрос одеський. За кількістю ядерць у спорогенній тканині цей сорт перевищує інші сорти пшениці на 17–23%, а за середньою кількістю утворених ядерць в процесі мікроспорогенезу – на 8–14%. Ця перевага Альбатросу над іншими сортами зберігається і на інших стадіях мікроспорогенезу.

Як свідчать дані табл. 2, у жита утворюється значно менша кількість ядерць на основних етапах мікроспорогенезу і сумарно по усіх стадіях мікроспорогенезу. Особливо значні відмінності між рослинами жита і пшениці виявляються на стадії спорогенної тканини (показник «кількість ядерць/100 клітин» у жита у 1,5–1,9 разів менше відповідних показників у пшениці) і за середньою кількістю утворених ядерць протягом всього мікроспорогенезу (жито поступається пшениці у 1,2–1,3 рази).

Виявлені особливості у розподілі кількості ядерць зберігаються і у пшенично-житніх гібридів (табл. 2). У всіх гібридів у профазі I кількість ядерць в ядрах

різко зменшується і на відміну від сортів пшениць, залишається низькою до стадії вакуолізованих мікроспор. За загальною кількістю ядерць як на стадії спорогенної тканини, так і сумарно протягом всіх стадій мікроспорогенезу безперечним лідером є гібрид, отриманий за участю Альбатроса одеського. Таким чином, його генетично обумовлена здатність утворювати значно більшу кількість ядерць в ядрах чоловічих генеративних структур чітко успадковується пшенично-житнім гібридом F_1 .

Таблиця 2
Кількість ядерць у генеративних клітинах пшениці, жита та їх гібридів F_1 на основних стадіях мікроспорогенезу (шт/100 клітин, 2004 р.)

Сорт, гібрид	Спорогенна тканина	Профаза I мейозу	Тетради	Вільні мікроспори		Середня кількість ядерць на шт/100 клітин
				невакуолізовані	вакуолізовані	
Безоста 1	177	103	100	103	114	119
Миронівська 808	172	101	100	102	111	117
Альбатрос ОД	211	125	101	105	125	133
Фантазія ОД	171	107	100	104	120	120
Одеська 267	181	108	100	107	122	124
Харківське 60	112	101	100	102	100	103
(Безоста 1×Харківське 60) F_1	129	101	100	100	101	106
(Миронівська 808×Харківське 60) F_1	126	101	100	101	100	106
(Альбатрос ОД×Харківське 60) F_1	164	105	101	101	101	114
(Фантазія ОД×Харківське 60) F_1	153	102	100	100	100	111
(Одеська 267×Харківське 60) F_1	155	104	101	101	100	112
НСР ₀₅	8,37	3,99	0,58	2,85	3,76	2,05

Висновки

1. Виявлені суттєві відмінності за ознакою “кількість ядерць в ядрі” між сортами озимої пшениці в процесі мікроспорогенезу. Ця каріометрична різноманітність зумовлена відмінностями систем генетичного контролю досліджуваної ознаки і тому успадковується.

2. За кількістю ядерць клітини генеративних структур сортів пшениці суттєво (1,4–4,5 рази) переважають такі ж клітини жита на диплоїдній і гаплоїдній стадіях мікроспорогенезу. Це відображає значні відмінності між цими злаками стосовно генетичного контролю досліджуваної каріометричної ознаки.

3. Кількість ядерць у клітинах пшениці, жита та їх гібридів F_1 є максимальною у клітинах на стадії спорогенної тканини, і різко зменшується на наступних стадіях мікроспорогенезу.

4. Виявлено генотипові особливості утворення ядерць в клітинах сорту Альбатрос одеський: ядерця в ядрах клітин цього сорту зливаються значно рідше, ніж ядерця клітин інших сортів, особливо таких як Безоста 1 та Миронівська 808.

Література

1. Архипчук В. В. Использование ядрышковых характеристик в биотестировании // Цитология и генетика. — 1995. — Т. 29, № 3. — С. 6–12.
2. Marshall W. F. Gene expression and nuclear architecture during development and differentiation // Mechanisms of Development. — 2003. — Vol. 120. — P. 1217–1230.
3. Дуброва Н. А. Динамика функциональной активности ядрышковых организаторов хромосом в различных тканях растений // Мат. VIII Всесоюз. симп. — Пушкино : Науч. центр биол. исслед. АН СССР, 1984. — С. 244–245
4. Бондарь Л. М., Частокоренко Л. В., Баранова В. А. Популяционный анализ активности ядрышкового организатора у растений // Генетика. — 1987. — Т. 23, № 2. — С. 317–324.
5. Гилятзединов Ш. Я., Ахметов Р. Р., Конарев В. Г. Активность эндополиплоидии и повторяемость рДНК у родительских форм гетерозисных гибридов растений // Гетерозис. Часть III. — Минск: Наука и техника, 1982. — С. 178–199.
6. Калаев В. Н., Федорова А. И., Супрычева И. С. Биоиндикация загрязнения радоном жилых помещений вблизи источника минеральных вод «Белая горка» с использованием цитогенетического метода // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. — 2005. — № 1. — С. 116–121.
7. Федорова А. И., Калаев В. Н., Плахотина А. Ю. Биоиндикация мутагенного эффекта радона с использованием ядрышкового теста в клетках корней традесканции // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. — 2004. — №2. — С. 151–156.
8. Архипчук В. В., Романенко В. Д., Архипчук М. В. и др. Цитогенетический анализ определения влияния пороговых величин антропогенных факторов на геном растений и животных // Докл. РАН. — 1992. — Т. 326, № 5. — С. 908–910.
9. Архипчук В. В., Стойка Ю. А. Ядрышковая активность клеток карпа в средах с разным содержанием ионов калия // Гидробиол. журн. — 2003. — Т. 39, № 1. — С. 31–38.
10. Роскин Г. Н., Левинсон Л. Б. Микроскопическая техника. — М.: Сов. наука, 1957. — 468 с.
11. Паламарчук И. А., Веселова Т. Д. Учебное пособие по ботанической гистохимии. — М.: Изд-во МГУ, 1965. — 108 с.
12. Пирс Э. Гистохимия теоретическая и прикладная. — М.: ИЛ, 1962. — 962 с.
13. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. — М.: Агропромиздат, 1988. — 271 с.
14. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта. — 4-е изд. — М.: Колос, 1985. — 240 с.
15. Бланковская Т. Ф., Трочинская Т. Г. Цитологические маркеры экспрессивности генов рРНК в микророспорогенезе у ржи, пшеницы и пшенично-ржаных гибридов // Цитология и генетика. — 2005. — Т. 39, № 2. — С. 22–26.

Т. Г. Трочинская

Одесский национальный университет,
кафедра генетики и молекулярной биологии,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина

ПОЛИМОРФИЗМ КЛЕТОК МУЖСКИХ ГЕНЕРАТИВНЫХ СТРУКТУР ПШЕНИЦЫ, РЖИ И ГИБРИДОВ F1 ПО КОЛИЧЕСТВУ ЯДРЫШЕК НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ МИКРОСПОРОГЕНЕЗА

Резюме

В клетках мужских генеративных структур пяти сортов мягкой озимой пшеницы, озимой ржи и их гибридов F1 изучали количество ядрышек в ядрах на пяти этапах микро-

спорогенеза. Для исследуемого кариометрического признака выявлены существенные видо- и сортоспецифические различия.

Ключевые слова: ядрышко, пшеница, рожь, пшенично-ржаные гибриды, микроспорогенез, стадии.

T. G. Trochinskaya

Odessa National University,
Department of Genetics and Molecular Biology,
Dvoryanskaya Str. 2, Odessa, 65082, Ukraine

**THE MALE GENERATIVE STRUCTURES CELLS POLYMORPHISM BY THE
NUMBER OF NUCLEOLEI PER NUCLEUS IN THE WHEAT, RYE AND WHEAT-RYE
HYBRIDS DURING MICROSPOROGENESIS**

Summary

The number of nucleolei per nucleus has been scrutinized for male generative structures cells of five sorts of winter wheat, winter rye and their wheat-rye hybrids. The essential distinctions of investigated quantitative character have been shown for sorts and species of investigated cereals.

Key words: nucleolus, wheat, rye, wheat-rye hybrids, microsporogenesis, stage.