

БІЛОНОЖКО Ю.О.^{1✉}, КОРШИКОВ І.І.^{2,3}¹ ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»,
Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а, ORCID: 0000-0002-7099-0455² Донецький ботанічний сад Національної академії наук України,
Україна, 50089, м. Кривий Ріг, вул. Маршака, 50³ Криворізький ботанічний сад НАН України,
Україна, 50089, м. Кривий Ріг, вул. Маршака, 50

✉ tkacheva_ua@ukr.net, (067) 951-18-45

ЯДЕРНО-ЯДЕРЦЕВІ ОСОБЛИВОСТІ ОКРЕМИХ ВИДІВ РОДИНИ PINACEAE

Мета. Метою роботи було встановлення міжвидових особливостей функціонування ядерцеутворюючого організатора на прикладі 6 видів родини Pinaceae. **Методи.** В дослідженні залучено вибірки різних видів хвойних, що зростають у межах природного ареалу та умовах інтродукції. Для візуалізації ядерця використовували метод забарвлення азотнокислим сріблом. Вивчали кількісні та розмірні особливості ядра та ядерця в інтерфазних клітинах проростків, а також обчислювали значення ядерно-ядерцевого співвідношення. **Результати.** Виявлено міжвидовий поліморфізм у кількості та розмірах ядерця, ядер та ядерно-ядерцевого співвідношення у шести видів та форм родини Pinaceae L. Більше, порівняно з іншими видами, відрізняються розмірні показники, отримані для насінневого потомства *Picea abies*. **Висновки.** У досліджених видах хвойних, вочевидь, є міжвидова диференціація за ядерно-ядерцевими показниками. На досліджувані характеристики впливають не тільки вид, вік та стан рослини, а також природно-кліматичні умови, в яких існує популяція.

Ключові слова: ядерно-ядерцеві показники, міжвидове різноманіття, хвойні, Pinaceae.

Актуальною проблемою сучасної біології залишається дослідження генетичного різноманіття хвойних. За дії дестабілізуючих природних та антропогенних факторів відбувається поступове виснаження генетичних ресурсів лісоутворюючих порід. Наразі для оцінювання міжпопуляційного та міжвидового різноманіття застосовують широкий спектр показників (від морфологічних до найсучасніших молекулярних маркерів).

У якості одного з цитологічних маркерів використовують характеристики ядерцеутворюючого регіону хромосом, оскільки ядерця в еукаріотичних клітинах відіграють значну кількість фундаментальних функцій, включаючи метаболізм РНК, регуляцію транскрипції та організацію геному, а також реакції клітинного стресу і старіння [1]. Дослідження варіацій ядерцеутворюючих регіонів у різноманітних видів рослин, безхребетних та хребетних тварин показали мінливість у кількості та хромосомному розташуванні навіть у споріднених видів [2; 3]. Було висунуто припущення, що кластери рДНК є високомобільними компонентами геному та їм притаманна природна варіабельність ядерно-ядерцевих характеристик у клітинах одного органу [4]. Виявлено і внутрішньовидову мінливість цього показника [5].

Число та особливості локалізації нуклеоллярних районів хромосом у видів родини Pinaceae Lindl можуть варіювати у широких межах [6]. Нуклеоллярний поліморфізм є одним зі шляхів виникнення каріологічного різноманіття в популяціях і може бути використаний як додатковий параметр для ідентифікації окремих гомологічних пар хромосом у межах груп із тотожною морфологією. В чисельних дослідженнях хвойних представлено значне різноманіття цитогенетичних показників, які змінюються залежно від дії чинників як природного, так і антропогенного походження [7, 8].

У результаті багаторічних досліджень цитогенетичних особливостей різних видів хвойних рослин нами було виявлено певні тенденції у функціонуванні ядерця у клітинах насінного потомства [9]. Слід зазначити, що найвагоміший вплив на структуру та рівень активності ядерцеутворюючого регіону хромосом чинять умови

зростання материнських рослин. Однак порівняльного аналізу цих показників у різних видів хвойних проведено не було.

Отже, метою роботи було визначити міжвидові особливості функціонування ядерцеутворюючого організатора на прикладі 6 видів родини Pinaceae.

Матеріали і методи

У дослідженні було використано насінневе потомство природних популяцій та насаджень 6 видів родини Pinaceae. Для *Picea abies* (L.) Karst. досліджено насіння природної популяції з Українського Полісся (сmt Ростань, Ростаньське лісництво, Волинська область) і насадження з Національного дендрологічного парку «Софіївка» НАН України (м. Умань, Черкаська обл.). Для *P. pallasiana* D. Don у якості контролю використовували насіння природної популяції Гірського Криму (сmt Нікіта) порівняно з насінням насаджень у дендропарку Біосферного заповідника «Асканія-Нова» ім. Ф.Е. Фальц-Фейна НААН України (Херсонська обл.) та Національного дендрологічного парку «Софіївка». Насіння *Pinus sylvestris* L. зібрано в передмісті м. Кременець (Тернопільська обл.). Насіння в популяції *Pinus fominii* subsp. *cretacea* (Kalen.) L.V. Orlova, що зростає у відділенні Українського степового природного заповідника НАН України «Крейдова флора» (Донецька обл.), збирали два роки поспіль. Із різних ділянок на узбережжі Чорного моря було зібрано насіння *Pinus brutia* var. *pityusa* (Steven) Silba (Піцунда, Абхазія) та *Pinus brutia* var. *stankewiczii* Sukacz. (м. Судак, Крим). Насіння збирали з 30–40 дерев у кожному деревостой, що досліджувався. Кількість досліджуваних рослин та їх вік наведено в таблиці.

Аналіз проводили на тимчасових препаратах меристематичних тканин корінців проростків насіння. Випадкову вибірку насіння 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 ядерць використовували 50% розчин азотнокислого срібла. Корінці інкубували 3 год за температури 60° С. Пророщування насіння *P. brutia* var. *pityusa* та *P. brutia* var. *stankewiczii* потребувало попередньої скарифікації та підбору температурного режиму під час фарбування. Після забарвлення матеріал промивали та готували препарати. Мі-

кропрепарати переглядали під мікроскопом Carl Zeiss *Primo star* за збільшення 40×10, фотографували цифровою фотокамерою *Canon Power Shot A620*. Розміри ядер та ядерць визначали за допомогою програмного забезпечення *Axio Vision Rel. 4.7.* (Zeiss). Вимірювали умовну площу ядра та ядерця за їхніми проекціями в 50 клітинах з кожної вибірки. Кількість ядерць підраховували на 1000 клітин. Функціональний стан ядерцеутворюючого регіону оцінювали за величиною ядерно-ядерцевого співвідношення в клітинах меристеми корінців проростків. Показник ядерно-ядерцевого співвідношення встановлювали як частку від ділення значень сумарної площі ядер на сумарну площу ядерць.

Результати та обговорення

У результаті дослідження було проаналізовано ядерцеві характеристики 286 дерев різних видів та форм родини Pinaceae. Для більшості з них притаманна наявність вторинної перетяжки, яка є місцем локалізації рибосомальних генів, у 6–8 парах хромосом.

В інтерфазних клітинах досліджених видів мінімальна кількість ядерць становила 1–2, а максимальна 13–14 (табл.). При цьому варіювала і середня кількість ядерць у ядрі (від 4,5±0,05 у *Pinus fominii* subsp. *cretacea* до 7,3±0,04 у *Pinus brutia* var. *pityusa*).

Загалом наявність ядерць у ядрі вважається морфологічним вираженням активності нуклеоларних локусів хромосом. Їх кількість дозволяє оцінити інтенсивність функціонування рибосомальних генів та опосередковано рівень активності синтезу білків [10]. Оскільки кількість ядерць є генетично детермінованою, збільшення цього показника може відбуватися за рахунок розділення ядерцеутворюючого регіону або ж за наявності в ньому делецій та дуплікацій. Збільшення кількості ядерць у ядрі можливе і за поліплоїдії або анеуплоїдії, однак збільшення хромосомного набору не призводить до автоматичного зростання об'єму ядерць у клітині.

Для всіх досліджених видів хвойних спостерігався поліморфізм у розмірних характеристиках як ядер, так і ядерць. Також для усіх досліджуваних видах було виявлено гетероморфність розмірів ядерць у ядрі однієї клітини (одночасно спостерігалися і досить дрібні ядерця розміром 1,1 мкм і ядерця, розміри яких становили 66,2 мкм).

Таблиця. Кількісні та розмірні характеристики ядерць в інтерфазних клітинах шести видів та форм родини Pinaceae L.

Вид	Місце зростання популяції/насадження	К-кість/вік дерев	Кількість ядерць			Розмір ядерць	Розмір ядер	Ядерно-ядерцеве співвідношення
			min	середня	max			
<i>Pinus sylvestris</i>	Кременець (попул.)	30/45	2	4,92±0,02	9	43,8±0,5	170,4±3,3	4,0±0,1
<i>Pinus fominii</i> subsp. <i>cretacea</i>	«Крейдяна флора» (попул.)	50/40	2	5,5±0,05	10	37,1±0,3	180,2±1,9	5±0,1
			1*	4,5±0,05*	12*	19,7±0,3*	120,7±1,9*	6,7±0,1*
<i>Pinus pallasiana</i>	Крим (попул.)	25/80-100	1	5,20±0,05	11	28,62±1,3	192,64±10,2	7,24±0,4
	«Асканія Нова» (насадж.)	20/30	1	6,40±0,04	14	28,8±1,7	125,3±4,7	7,93±0,7
	Умань (насадж.)	30/30-150	2	6,10±0,05	10	30,3±0,7	141,5±5,2	4,27±0,6
<i>Pinus brutia</i> var. <i>pityusa</i>	Піцунда (попул.)	12/70	1	7,3±0,04	13	47,2±2,3	184,3±7,7	4,5±0,2
<i>Pinus brutia</i> var. <i>stankewiczii</i>	Крим (попул.)	51/70	1	6,24±0,04	12	49,65±0,4	176,8±1,4	3,71±0,1
<i>Picea abies</i>	Ростань (попул.)	38/65-75	1	5,35±0,04	10	22,08±5,3	199,52±13,6	12,72±0,7
	Умань (насадж.)	30/180-200	2	5,07±0,04	9	19,07±1,4	101,61±4,3	6,77±0,3

Примітки. Для *Pinus fominii* subsp. *cretacea*: без позначки насіння зібране в 2012 році; * – в 2013 році, з тих самих материнських рослин.

Кількість ядерць та їх розміри в ядрі клітин залежать від інтенсивності метаболічних процесів у тканинах, які можуть стимулювати діяльність ядерцевих організаторів [11; 12]. Структура та розміри ядерць за звичайного функціонального навантаження клітини (та організму) лишаються постійними.

Більше, порівняно з іншими видами, відрізняються показники, отримані для *Picea abies*. Проаналізувавши насінневе потомство з двох деревостанів, ми отримали як максимальне значення розміру ядер, так і мінімальне: імовірно, така різниця була зумовлена віковими особливостями материнських рослин. Цей же вид вирізнявся досить дрібними ядерцями.

Серед рослин роду *Pinus* розмірні характеристики значно коливалися. Отже, для дослі-

джених видів були отримані дані, які свідчать про міжвидовий поліморфізм нуклеоларних структур. Однак слід зауважити, що коливання у кількості та розмірі ядерць залежать і від віку материнських рослин. На прикладі *Pinus fominii* subsp. *cretacea* також продемонстровано залежність рівня функціонування ядерцевого організатора від погодних умов у рік формування насіння. Таку мінливість можна вважати адаптивною відповіддю материнських рослин на сукупність кліматичних факторів у період мікроспогогенезу й ембріонального розвитку насіння.

Висновки

Таким чином, досліджені види хвойних відрізнялися за ядерно-ядерцевими показниками. Виявлене різноманіття вказує на межі їх

міжвидової диференціації. Загалом до головних чинників, які впливають на досліджувані параметри, слід віднести вид та вік хвойної рослини,

а також природно-кліматичні умови, в яких існує популяція.

References

1. Qi Y., Zhang B. Chromatin network retards nucleoli coalescence. *Nat Commun.* 2021. Vol. 12. P. 6824. doi: 10.1038/s41467-021-27123-9.
2. Britton-Davidian J., Cazaux B., Catalan J. Chromosomal dynamics of nucleolar organizer regions (NORs) in the house mouse: micro-evolutionary insights. *Heredity.* 2012. Vol. 108. P. 68–74. doi: 10.1038/hdy.2011.105.
3. Montiel E.E., Manrique-Poyato M.I., Rocha-Sánchez S.M. et al. Nucleolus size varies with sex, ploidy and gene dosage in insects. *Physiological Entomology.* 2012. Vol. 37. P. 145–152. doi: 10.1111/j.1365-3032.2011.00822.x.
4. Zharskaia O.O., Zatsepina O.V. Dynamics and mechanisms of the nucleolus reorganization during mitosis. *Tsitologiya* 2007. Vol. 49 (5). P. 355–369. doi: 10.1134/S1990519X07040013. [in Russian]
5. Hirai H. Chromosome dynamics regulating genomic dispersion and alteration of nucleolus organizer regions (NORs). *Cells.* 2020. Vol. 9. P. 971. doi: 10.3390/cells9040971.
6. Ohri D. Karyotype evolution in conifers. *Feddes Repertorium.* 2021. P. 1–31. doi: 10.1002/fedr.202100014.
7. Korshikov I., Belonozhko Yu., Lapteva H. Cytogenetic abnormalities in seed progenies of pinus pallasiana d. don stands from technogenic polluted lands in the steppe of Ukraine. *Ekologiya (Bratislava).* 2019. Vol. 38 (2). P. 117–125. doi: 10.2478/eko-2019-0009.
8. Ignatenko R.V., Efimova L. A., Nikerova K. M. The cytogenetic parameters of *Pinus sylvestris* L. under conditions of the Far North of Russia (Karelia). *Folia Oecologica.* 2022. Vol. 49 (1). doi: 10.2478/foecol-2022-0007.
9. Tkachova Yu.O., Korshikov I.I. Nuclear-nuclear polymorphism of the seed progeny *Picea abies* (L.) Karst. (Pinaceae) in natural populations and introductory stands. *Ukrainian Botanical Journal.* 2012. Vol. 69 (6). P. 919–925. [in Ukrainian]
10. Lafontaine D.L.J., Riback J.A., Bascetin R. et al. The nucleolus as a multiphase liquid condensate. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2021. Vol. 22. P. 165–182. doi: 1038/s41580-020-0272-6.
11. Khrolenko Yu.A., Burundukova O.L., Lauve L.S. et al. Characterization of the variability of nucleoli in the cells of *Panax ginseng* Meyer *in vivo* and *in vitro*. *Ginseng Res.* 2012. Vol. 36 (3). P. 322–326. doi: 10.5142/jgr.2012.36.3.322.
12. Ma T-H., Chen P-H., Chin-MingTan B. et al. Size scaling of nucleolus in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Biomed J.* 2018. Vol. 41 (5). P. 333–336. doi: 10.1016/j.bj.2018.07.003.

BILONozhko Yu.O.¹, KORSHIKOV I.I.^{2,3}

¹ Institute of Food Biotechnology and Genomics, Nat. Acad. of Sci. of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Osypovskoho str., 2A

² Donetsk Botanical Garden of NAS of Ukraine, Ukraine, 50089, Kryvyi Rih, Marshak str., 50

³ Kryvyi Rih Botanical Garden of NAS of Ukraine, Ukraine, 50089, Kryvyi Rih, Marshak str., 50

NUCLEUS-NUCLEOLUS FEATURES OF CERTAIN SPECIES OF THE PINACEAE FAMILY

Aim: The aim of the study was to establish the interspecific features of the functioning of the nucleolus-forming organizer on the example of 6 species of the family Pinaceae. **Methods.** The study involved samples of different species of conifers that grow within the natural range and conditions of introduction. Silver nitric acid staining was used to visualize the nucleoli. Quantitative and dimensional features of the nucleus and nucleoli in the interphase cells of seedlings were studied, and the values of the nucleus-nucleolus ratio were calculated. **Results.** Interspecific polymorphism in the number and size of nucleoli, nuclei and nucleus-nucleolus ratio in six species and forms of the Pinaceae L. family was revealed. **Conclusions.** The studied species of conifers obviously have interspecific differentiation by nucleus-nucleolus parameters. The studied characteristics are influenced not only by the species, age and condition of the plant, but also by the natural and climatic conditions in which the population exists.

Keywords: nuclear-nuclear indicators, interspecific diversity, conifers, Pinaceae.