

## ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ЭКСПРЕССИВНОСТИ ГЕНОВ рРНК В МИКРОСПОРОГЕНЕЗЕ У РЖИ, ПШЕНИЦЫ И ПШЕНИЧНО-РЖАНЫХ ГИБРИДОВ



*Исследовано количество ядрышек в процессе микроспорогенеза у пшеницы, ржи и пшенично-ржаных гибридов первого поколения; показана зависимость количества ядрышек в клетках от стадии микроспорогенеза и числа ядрышкообразующих районов хромосом. Вычислены объемы ядер и ядрышек, определена величина ядерно-ядрышковых отношений и выявлено закономерное изменение их в процессе микроспорогенеза. Обосновано использование кариометрических показателей как цитологических маркеров экспрессивности генов рРНК в процессе микроспорогенеза у злаков.*

© Т.Ф. БЛАНКОВСКАЯ, Т.Г. ТРОЧИНСКАЯ, 2005

**Введение.** В теоретических и экспериментальных исследованиях, касающихся репродуктивной биологии, все более проявляется тенденция к синтезу эмбриологического и генетического направлений. Это обусловлено тем, что большинство проблем, связанных с морфогенезом, в той или иной степени касается обеих наук. В процессах, связанных с развитием и дифференцировкой, функционированием и активностью клетки, наряду со структурными генами значительная роль принадлежит генам рРНК, обеспечивающим функционирование белок-синтезирующей системы клетки [1, 2]. Морфологическим проявлением активности рибосомальных генов является ядрышко, структура и функционирование которого связаны с важнейшими молекулярно-генетическими процессами в клетке — уровнем синтеза рРНК, скоростью ее процессинга и выхода зрелых субъединиц рибосом из ядрышка [1, 3]. Количественные и качественные характеристики ядрышек изменяются под влиянием внешних факторов и используются для оценки функциональной активности генетического аппарата [3—6].

Большинство исследований функционирования генов рРНК относятся к объектам с неизменным геномом. У гибридных растений в соматических клетках обнаружено явление амфипластии — ядрышкового доминирования. Установленный еще в 80-х годах прошлого века [7, 8] факт инактивации ржаного ядрышкообразующего района (далее ЯОР) в присутствии пшеничных ЯОР и последовательность супрессии ЯОР хромосом близкородственных видов злаков получают свое развитие в современных исследованиях, уделяющих внимание функционированию ржаных хромосом вообще и ядрышкообразующих в частности в окружении пшеничных хромосом [9—13].

Цель настоящего исследования — изучить количество и объем ядрышек как цитологических маркеров экспрессивности генов рРНК на последовательных этапах микроспорогенеза у F<sub>1</sub> пшенично-ржаных гибридов и их родительских форм.

**Материалы и методы.** Материалом для исследования послужили гибриды F<sub>1</sub> от скрещивания мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) с рожью (*Secale cereale* L.). В качестве материнских форм использовались озимые сорта пшеницы Безостая 1 и Мироновская 808, отцовской формой служила озимая рожь Харьковская 60. Для исследования изготавливали постоянные и времен-

ные препараты разновозрастных пыльников растений, выращенных в полевых условиях в 2002—2003 гг. Для приготовления временных микропрепаратов пыльники фиксировали в уксусном спирте, а постоянных — по Навашину или Карнуа; в последнем случае материал доводили до парафина по общепринятой методике [14]. Срезы толщиной 10 мкм готовили на салазочном микротоме. Препараты окрашивали с применением цитохимических реакций: бромфеноловым синим — на суммарные белки, реактивом Шиффа для выявления ДНК, метиловым зеленым — пиронином по Браше с обработкой контрольных препаратов рибонуклеазой для одновременного определения ДНК и РНК [15]. Для последующего изучения отбирали препараты на шести этапах развития пыльников: спорогенная ткань, лептонома-зигонема и пахинема-диплонема профазы I, микроспоры в тетрадах, невакуолизованные и вакуолизованные микроспоры. Распределение и количество исследуемых веществ в клетках оценивали визуально по наличию и интенсивности окрашивания. На каждом этапе развития пыльников гибридов и родительских форм число ядрышек подсчитывали в 1000—1100 клетках, диаметры ядер и ядрышек измеряли при помощи винтового окуляра-микрометра МОВ-1×15 при объективе 40× светового микроскопа «БЮЛАМ» в 35—50 клетках. Объемы вычисляли по формуле для эллипсоида. Вычисленные объемы и величины ядерно-ядрышковых отношений (далее ЯЯО) обрабатывали статистически [16].

**Результаты исследований и их обсуждение.** Исследования показали, что количество ядрышек в ядрах значительно варьировало только в клетках спорогенной ткани (таблица). Клетки на этой стадии четко отличались от клеток стенки пыльника очень высоким содержанием РНК и белка в цитоплазме, крупными ядрами и ядрышками.

Количество ядрышек в клетках на этом этапе микроспорогенеза варьировало в пределах, обусловленных числом активных ЯОР и слиянием соседних мелких ядрышек в одно крупное. Процент встречаемости ядер с определенным числом ядрышек не зависел от возраста клеток спорогенной ткани, являющейся довольно длительным этапом микроспорогенеза злаков, что свидетельствует о неслучайном процессе слияния ядрышек в интерфазных клетках.

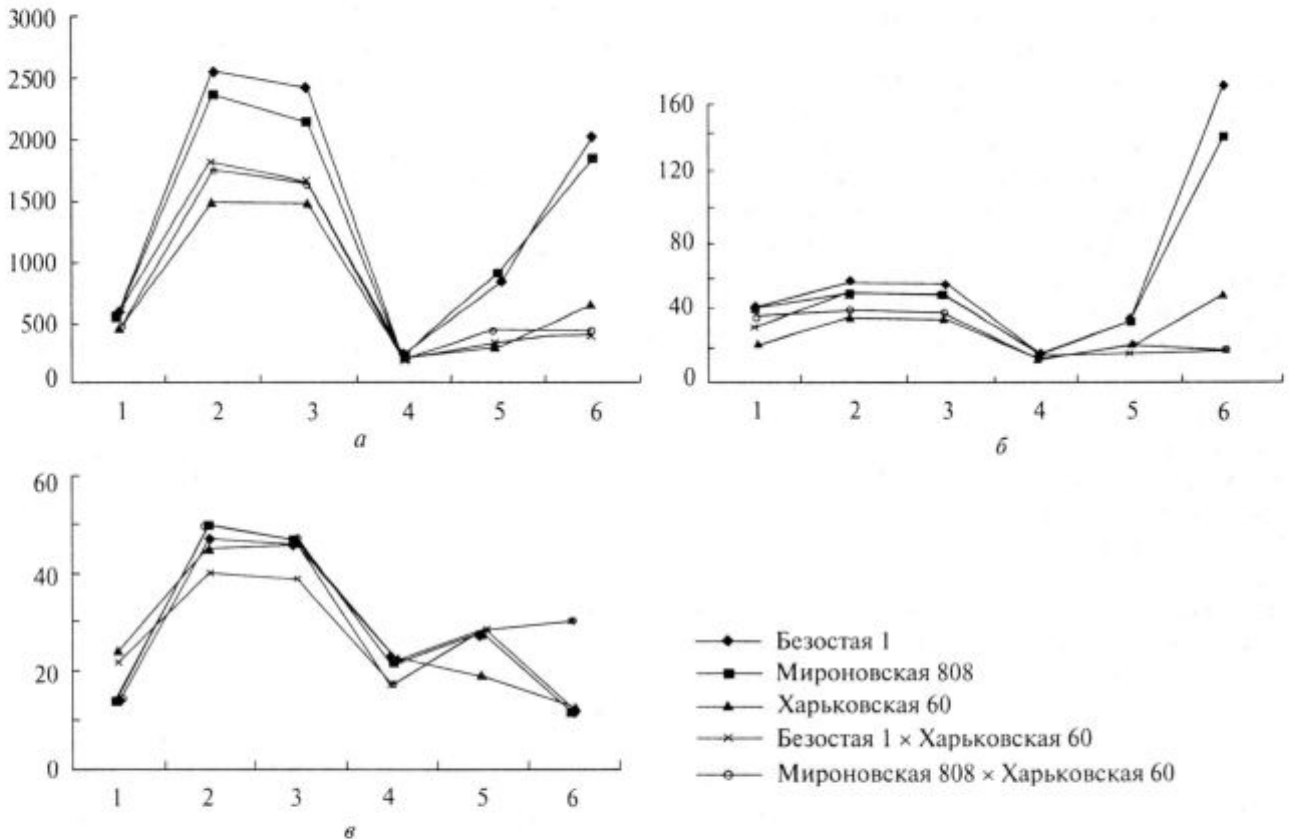
Большинство клеток спорогенной ткани (73—78 %) F<sub>1</sub> пшенично-ржаных гибридов характеризовались наличием одного ядрышка, около 20 % клеток содержали два ядрышка, 2—4 % — три, менее 1 % — четыре и более ядрышек. Разница по сравнению с материнскими формами может быть обусловлена внесением ржаных хромосом, изменяющих закономерное расположение пшеничных ЯОР и приводящих к повышению частоты слияния ядрышек.

На последующих этапах вплоть до образования вакуолизованных микроспор подавляющее большинство клеток как родительских форм, так и гибридов имели по одному ядрышку в ядре. Среди вакуолизованных микроспор 6—8 % у пшеницы, 1—3 % у ржи и менее 1 % у F<sub>1</sub> пшенично-ржаных гибридов имели более одного ядрышка в ядре.

Принято считать, что гены рРНК ржи в присутствии пшеничных хромосом не экспрессируются, рДНК остается конденсированной и неактивной [1, 8, 17 и др.]. Это явление было установлено при анализе функционирования рРНК меристематических клеток кончиков корней прорастающих зерновок тритикале. Однако в делящихся гаплоидных ядрах пыльцы локус рДНК в хромосоме 1R в окружении пшеничных хромосом является деконденсированным, активным [18]. Таким образом, внутриядерная организация и активность локусов рРНК зависят от типа и состояния клеток [19].

Количество ядрышек в ядрах клеток спорогенной ткани у F<sub>1</sub> пшенично-ржаных гибридов и родительских форм

Количество ядрышек	Сорт или вариант скрещивания, проц. клеток				
	Безостая 1 (пшеница)	Мироновская 808 (пшеница)	Харьковская 60 (рожь)	Безостая 1 × Харьковская 60	Мироновская 808 × Харьковская 60
2002 г.					
1	45,6	50,0	86,3	73,6	75,3
2	33,6	31,0	13,7	20,3	20,0
3	15,1	13,9	—	4,6	4,3
4 и больше	5,7	5,1	—	0,7	0,4
2003 г.					
1	40,4	46,3	91,9	78,2	74,4
2	36,6	30,1	8,1	19,3	20,6
3	16,4	15,6	—	2,3	4,4
4 и больше	6,7	8,0	—	0,1	0,6



Объем ядра (а) и ядрышка (б), величина ЯЯО (в) в процессе микроспорогенеза у сортов мягкой пшеницы, ржи и F<sub>1</sub> пшенично-ржаных гибридов: по вертикали — мкм<sup>3</sup> (а, б) и относительные единицы (в); по горизонтали — этапы микроспорогенеза — 1 — спорогенная ткань, 2 — лептотена-зиготена, 3 — пахитена-диplotена, 4 — тетрады микроспор, 5 — невакуолизованные микроспоры, 6 — вакуолизованные микроспоры

В процессе микроспорогенеза объем ядра клеток изученных сортов изменялся сходным образом (рисунок, а), что дает основание утверждать наличие генетического контроля объема ядер в онтогенезе. У пшенично-ржаных гибридов объем ядер занимал промежуточное положение между родительскими формами вплоть до стадии невакуолизированной микроспоры, когда у гибридов этот показатель увеличивался в меньшей мере, чем у родителей.

Объем ядрышек в клетках спорогенной ткани пыльников мягкой пшеницы составлял около 40 мкм<sup>3</sup>, у ржи вдвое меньше, а у F<sub>1</sub> приближался к материнской форме (рисунок, б). Архипчук считает [4], что размеры одиночных ядрышек более точно отражают изменения в ядрышковой активности, чем суммарные размеры нескольких ядрышек. У изученных сортов и гиб-

ридов средний объем ядрышек у одно- и двуядрышковых клеток достоверно не различался.

Во время профазы I мейоза объем ядрышек у сортов мягкой пшеницы либо не изменялся, либо увеличивался незначительно, а у ржи увеличивался вдвое. На *Lilium*, *Trillium*, *Cosmos* различными исследователями [20–22] было показано, что РНК, синтезируемая в премейотической интерфазе, а также в поздней профазе мейоза и в период мейотических делений относится к рибосомальному типу, а РНК, выявляемая в лептотене и зиготене — большей частью информационной, обеспечивает накопление белков веретена. Также показано, что элиминация рибосом начинается в зиготене и усиливается в пахитене-диplotене. Можно предположить, что наблюдаемое у ржи в лептотене значительное увеличение объема ядрышка свидетельствует о продолжении

и даже интенсификации синтеза рибосомальных РНК, возможно, для обеспечения достаточной популяции рибосом, необходимых при трансляции иРНК. У мягкой пшеницы подобного увеличения не наблюдается, вероятно, из-за того, что будучи полиплоидным видом, она продуцирует достаточное количество рибосом в течение премейотической интерфазы.

В варианте Мироновская 808 × рожь Харьковская 60 объем ядрышек в клетках спорогенной ткани и в микроспороцитах во время профазы I не различался, а в варианте Безостая 1 × рожь Харьковская 60 этот показатель в микроспороцитах почти вдвое выше, чем в клетках спорогенной ткани. Можно предположить влияние генетического фона, создаваемого наличием ржаных хромосом, на функционирование ЯОР материнских сортов пшеницы.

Объем ядрышек микроспор в тетрадах у всех изученных форм злаков почти одинаков, он составляет 10–12 мкм<sup>3</sup>, т.е. является наименьшим на протяжении микроспорогенеза. В свободных невакуолизованных микроспорах пшеницы и ржи объем ядрышек увеличивается в 2–3 раза по сравнению с микроспорами в тетраде, а у F<sub>1</sub> этого увеличения не происходит или оно незначительно. Характерной особенностью вакуолизованных микроспор пшеницы и ржи является резкое увеличение объема ядрышка — в 2–4 раза по сравнению с предыдущим этапом развития. У F<sub>1</sub> пшенично-ржаных гибридов ядрышки в вакуолизованных микроспорах не увеличиваются и даже уменьшаются, в цитоплазме этих клеток содержится значительно меньше РНК по сравнению с родительскими формами. Вакуолизованные микроспоры у гибридов F<sub>1</sub> прекращают развитие, не превращаясь в мужской гаметофит. Таким образом, судя по объему ядрышек, можно заключить, что в процессе микроспорогенеза и развития микроспор экспрессивность генов рРНК наименьшая в тетрадах микроспор и наивысшая в вакуолизованных микроспорах, что характеризует интенсивность формирования рибосом. Поскольку цитоплазма всех исследованных нами клеток, кроме дегенерирующих, интенсивно окрашивалась при реакциях на РНК и белки, а, следовательно, ядрышки функционировали нормально, объем ядрышек может служить критерием экспрессии генов рРНК в процессе микроспорогенеза у злаков. Гибель вакуолизи-

рованных микроспор у гибридов — одно из проявлений принципа аббревиации генетически неполноценных структур.

Невысокое ядерно-ядрышковое отношение у всех изученных сортов и гибридов наблюдалось в клетках спорогенной ткани (рисунок, в), что свидетельствует об интенсивной транскрипции генов рРНК в процессе подготовки клеток к мейотическому делению. Повышение величины ЯЯО было характерным для всех сортов и гибридов в течение профазы I вследствие значительного увеличения объема ядер. В микроспорах, находящихся в тетрадах, этот показатель значительно уменьшается. В свободных невакуолизованных микроспорах у гибридов и материнских сортов величина ЯЯО опять повышается, а у ржи — уменьшается. В вакуолизованных микроспорах величина ЯЯО у родительских сортов значительно снижалась, в то время как у пшенично-ржаных гибридов она продолжала повышаться.

Показано, что у исследуемых сортов пшеницы объемы ядра, ядрышка и величина ядерно-ядрышкового отношения в процессе микроспорогенеза и развития микроспор достоверно не различались в разные годы выращивания растений (2002–2003 гг.). В отличие от самоопылителя — пшеницы, у перекрестноопылителя ржи наблюдались достоверные различия объемов ядер и ядрышек в невакуолизованных и вакуолизованных микроспорах ( $P < 0,001$ ), показатели же ЯЯО достоверно не различались. У F<sub>1</sub> Мироновская 808 × Харьковская 60 достоверных различий не выявлено, в то время как у F<sub>1</sub> Безостая 1 × Харьковская 60 объемы ядрышка и величина ЯЯО различались достоверно, что говорит о генетической обусловленности их изменений.

**Выводы.** Количество ядрышек в клетках пшеницы и ржи изменяется в зависимости от этапа микроспорогенеза и является видоспецифическим; у F<sub>1</sub> межродовых гибридов количество ядрышек в клетках приближается к отцовской форме. У F<sub>1</sub> пшенично-ржаных гибридов и их родительских форм в процессе микроспорогенеза и развития микроспор объемы ядер, ядрышек и величина ЯЯО закономерно изменяются, что свидетельствует о генетической обусловленности этих изменений. Кариометрические показатели могут служить критерием экспрессивности генов рРНК в процессе микроспорогенеза как у объектов с неизменным геномом, так и у гибридов.

**SUMMARY.** The quantity of nucleolei during microsporogenesis of wheat, rye and F<sub>1</sub> of wheat-rye hybrids has been investigated. Dependence of nucleoli quantity from microsporogenesis stage and number of nucleolar organizer regions in chromosomes have been shown. The volumes of nuclei and nucleoli as well as nucleus-nucleolus ratio have been calculated. The changes of these indices during microsporogenesis were regular. The possibility of using cariometrical indices as cytological markers of rRNA gene expression in the process of microsporogenesis has been substantiated.

**РЕЗЮМЕ.** Досліджено кількість ядерць в процесі мікроспорогенезу у пшениці, жита та F<sub>1</sub> пшенично-житних гібридів; показано залежність кількості ядерць у клітинах від стадії мікроспорогенезу та кількості ЯОР хромосом. Вираховано об'єми ядер та ядерць, визначено величину ядерно-ядерцевого відношення та виявлено закономірну зміну їх у процесі мікроспорогенезу. Обґрунтовано використання каріометричних показників як цитологічних маркерів експресивності генів рРНК за мікроспорогенезу.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Челидзе П.В. Ультраструктура и функции ядрышка интерфазной клетки. — Тбилиси : Мецниереба, 1985. — 119 с.
2. Шапова А.И., Кравцова Л.А. Цитогенетика пшенично-ржаных гибридов. — Новосибирск : Наука, 1990. — 164 с.
3. Соболев М.А. Роль ядрышка в реакциях растительных клеток на действие физических факторов окружающей среды // Цитология и генетика. — 2001. — 34, № 3. — С. 72–84.
4. Архипчук В.В. Использование ядрышковых характеристик в биотестировании // Цитология и генетика. — 1995. — 29, № 3. — С. 6–12.
5. Хволес А.Г., Черняев Т.А. Механизм стимуляции мутагенами // Докл.АН СССР. — 1988. — 301, № 5. — С. 985–988.
6. Архипчук В.В., Романенко В.Д., Архипчук М.В., Кипнис Л.С. Цитогенетический анализ определения влияния пороговых величин антропогенных факторов на геном растений и животных // Докл. РАН. — 1992. — 326, № 5. — С. 908–910.
7. Lacadena J.R., Cermeno M.C., Orellana J., Santos J.L. Evidence for wheat-rye nucleolar competition (amphiplasty) in triticale by silver-staining procedure // Theor. Appl. Genet. — 1984. — 67. — P. 207–213.
8. Cermeno M.C., Friebe B., Zeller F.J., Krolov K.D. Nucleolar competition in different (A/B), (A/B)RR, DRR tetraploid triticales // Heredity. — 1987. — 58. — P. 1–4.
9. Pikaard C.S. Nucleolar dominance : Uniparental gene silencing on a multi-megabase scale in genetic hybrids // Plant Mol. Biol. — 2000. — 43, № 2/3. — P. 163–177.
10. Leitch A.R., Mosgoller W., Shi M., Heslop-Harrison J.S. Different patterns of rDNA organisation in nuclei of wheat and rye // J. Cell Sci. — 1992. — 101. — P. 751–757.
11. Neves N., Silva M., Heslop-Harrison J.S., Viegas W. Nucleolar dominance in triticales: control by unlinked genes // Chromosome Res. — 1997. — 5. — P. 125–131.
12. Neves N., Heslop-Harrison J.S., Viegas W. rRNA gene activity and control of expression mediated by methylation and imprinting during embryo development in wheat × rye hybrids // Theor. Appl. Genet. — 1995. — 91. — P. 529–533.
13. Viegas W., Neves N., Silva M., Caperta A., Morais-Cecilio L. Nucleolar Dominance: A 'David and Goliath' Chromatin Imprinting Process // Curr. Gen. — 2002. — 3, № 6. — P. 563–576.
14. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. — М.: Колос, 1974. — 288 с.
15. Паламарчук И.А., Веселова Т.Д. Учебное пособие по ботанической гистохимии. — М.: Изд-во МГУ, 1965. — 108 с.
16. Рокшский П.Ф. Биологическая статистика. — Минск : Выш. школа, 1973. — 319 с.
17. Gustafson P., Dera A. R., Petrovic S. Expression of modified rye ribosomal RNA genes in wheat // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1988. — 85, № 11. — P. 3943–3945.
18. Silva M., Queiroz A., Neves N., Barao A., Castilho A., Morais-Cecilio L., Viegas W. Reprogramming of rye rDNA in triticale during microsporogenesis // Chromosome Res. — 1995. — 3. — P. 492–496.
19. Leitch A. Higher levels of organization in the interphase nucleus of cycling and differentiated cells // Microbiol. and Mol. Biol. Rev. — 2000. — 64, № 1. — P. 138–152.
20. Mackenzie A., Heslop-Harrison J., Dickinson H.G. Elimination of ribosomes during meiotic prophase // Nature. — 1967. — 215. — P. 997–999.
21. Dickinson H.G., Heslop-Harrison J. The ribosome cycle, nucleoli and cytoplasmic nucleoloids in meiocytes of Lilium // Protoplasma. — 1970. — 69. — P. 187–200.
22. Резникова С.А. Цитология и физиология развивающегося пыльника. — М.: Наука, 1984. — 272 с.

Поступила 22.11.04