

Е. К. ПРЕССМАН, И. М. ЛЕВИН, Л. С. САНДАХЧИЕВ

СБОРКА КЛЕТКИ ACETABULARIA MEDITERRANEA ИЗ ЯДРА, ЦИТОПЛАЗМЫ И КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ

(Представлено академиком Б. Л. Астауровым 26 VI 1972)

Одним из наиболее перспективных направлений в исследованиях ядерно-цитоплазматических взаимоотношений является изучение клеток, в которых микрохирургическим путем совмещены компоненты нескольких исходных клеток. Наибольшее развитие это направление получило в работах, проводимых на простейших, в частности свободноживущих пресноводных амебах и инфузориях-стендорах, и ооцитах земноводных. Сочетая технику ядерных и цитоплазматических трансплантаций, Джеону с сотрудниками⁽¹⁾ удалось собрать клетку *Amoeba proteus*, обладающую способностью давать клон, из главных клеточных компонент, а именно: ядра, цитоплазмы и клеточной стенки, причем все они были взяты от различных исходных клеток. Существенным недостатком этой работы, с нашей точки зрения, является то, что при сборке клетки амобы клеточная стенка берется со значительным количеством собственной цитоплазмы (около 25 процентов). В излагаемой ниже работе была сделана попытка собрать из основных клеточных компонент клетку *Acetabularia*, обладающую способностью к морфогенезу, т. е. к образованию на апикальном конце мутовок, репродуктивного органа — зонтика и, наконец, цист.

Необходимо отметить, что трансплантация как ядер, так и цитоплазмы ацетабулярии из одного стебля в другой является известной процедурой^(2, 3).

В работе использовали штамм *Acetabularia mediterranea*. Растения выращивали на морской воде с добавками солей⁽⁶⁾. Для экспериментов брали растения длиной 30–40 мм, из которых ампутацией апикального конца получали ядерные фрагменты длиной 25 мм.

«Темновые» растения получали выдерживанием ядерных фрагментов в течение 10 суток в темноте. В тех случаях, когда речь будет идти о «световых» растениях, имеется в виду, что перед опытом ядерные фрагменты 2–3 суток выдерживали в условиях непрерывного освещения. После такого выдерживания на свету отбирали растения, не имевшие мутовок.

Получение пустых стеблей и цитоплазмы проводили по описанной методике⁽³⁾. Все операции по трансплантации цитоплазмы и ядер выполняли с помощью микроманипулятора ММ-1 микрошпательками длиной 15–20 мм и диаметром 50–70 м. Сразу после окончания трансплантации цитоплазмы в пустой стебель на открытый участок фрагмента накладывали лигатуру и собранный фрагмент выдерживали в чистой морской воде. За это время цитоплазма растекается вдоль клеточной стенки, образуется вакуоль и собранное растение принимает вид обычного безъядерного фрагмента. В такие выжившие фрагменты имплантировали ядра. Выделение ядер и имплантацию их в собранный фрагмент проводили в 10% сахарозе⁽²⁾. Собранные растения культивировали в обычных условиях.

На рис. 1 приведена схема микрохирургических операций, используемых в данной работе. Из этой схемы видно, что при сборке пустого стебля и цитоплазмы проводили как ауотрансплантацию, т. е. трансплантацию своей же цитоплазмы, так и гомотрансплантацию, т. е. трансплантацию

цитоплазмы из другого растения. Ядро же во всех случаях трансплантировалось в собранные безъядерные фрагменты из «чужих» растений.

Подбирая условия для трансплантации цитоплазмы, мы проверили несколько вариантов сред, из которых наиболее удачными оказались морская вода, морская вода с добавками сахарозы (0,1%) и 3% агар, приготовленный на морской воде, кроме того поверхность агара смачивали морской водой, содержащей 0,1% сахарозы. На морской воде было собрано 87 фрагментов, из которых жизнеспособными оказалось 20, т. е. около 23%. На морской воде, содержащей 0,1% сахарозы, из 37 собранных фрагментов выжило 14 (37%). И, наконец, при использовании 3% агара в качестве среды для сборки из 58 собранных растений выжило 33, или 56%.

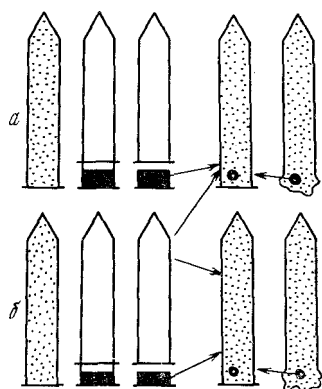


Рис. 1. Схема сборки клетки *Acetabularia*. а — гомотрансплантация, б — аутогосплантация цитоплазмы

Проверка возможности хранения пустых стеблей и отцентрифугированной цитоплазмы в условиях, обычных для нормальных растений, показала, что их хранение уже в течение суток снижает выживаемость собранных фрагментов до 4%.

Существуют многочисленные данные, свидетельствующие о различии в физиологическом состоянии между растениями ацетабулярий, находящимися в условиях освещения, и растениями, выдержанными в темноте (^{4, 5, 7-14}). Принимая это во внимание, мы проверили выживаемость собранных безъядерных фрагментов в зависимости от условий (темнота или свет) культивирования растений, предназначенных для эксперимента. Была проведена сборка клеток из стеблей и цитоплазмы, взятых от растений, находившихся в условиях непрерывного освещения и в темноте.

Результаты сборки клеток *Acetabularia mediterranea* из компонент «световых» и «темновых» растений

Таблица 1

Результаты сборки клеток *Acetabularia mediterranea* из компонент «световых» и «темновых» растений

Вид сборки	$N_{пц}$	$N_{в}$	$N_{вж}$	$N_{пз}$	$N_{вз}$	$N_{тз}$
«Световой» стебель + «световая» цитоплазма (А)	53	39	35	10	7	7
«Световой» стебель + «световая» цитоплазма (Г)	53	39	35	9	6	5
«Темновой» стебель + «темновая» цитоплазма (А)	36	20	19	4	3	2
«Темновой» стебель + «темновая» цитоплазма (Г)	39	25	22	0	0	0
«Световой» стебель + «темновая» цитоплазма	46	2	0	0	0	0
«Темновой» стебель + «световая» цитоплазма	48	24	5	5	3	0

Примечание. Сборку проводили на 3% агаре. А — аутогосплантация, Г — гомотрансплантация. $N_{пц}$ — число растений с пересаженной цитоплазмой; $N_{в}$ — число растений, выживших после трансплантации цитоплазмы; $N_{вж}$ — число растений, выживших после имплантации ядра; $N_{пз}$ — число растений, сформировавших первый зонтик; $N_{вз}$ — число растений, сформировавших второй зонтик; $N_{тз}$ — число растений, сформировавших третий зонтик.

Результаты экспериментов представлены в табл. 1. Как видно из этой таблицы, наибольшей способностью к выживанию отличаются растения, пробывшие 2–3 суток в условиях непрерывного освещения, причем для выживания собранных фрагментов не имеет значения, «своя» или «чужая» цитоплазма пересаживалась в пустой апикальный стебель. В экспе-

риментах 5 и 6, т. е. там, где клеточные компоненты брали от растений, находившихся в различных условиях (темнота и свет) морфогенеза либо совершенно не наблюдалось (эксперимент 5), либо наблюдался в небольшом числе случаев (эксперимент 6). В последнем варианте выживаемость фрагментов с трансплантированной цитоплазмой была хорошей, но эти фрагменты оказались очень чувствительными к дальнейшим операциям.

Собранные растения, обладающие способностью к морфогенезу, через различные промежутки времени образуют несколько рядов мутовок и зонтики. Первые зонтики почти во всех растениях имели неправильную форму. Поскольку растения с инъектированной цитоплазмой способны к морфогенезу и в отсутствие ядра (³), то первые зонтики удаляли. Для большей достоверности удаляли и вторично образовавшиеся зонтики. Часть растений, сформировавших зонтики в третий раз, была доведена до образования цист. Созревшие зонтики собранных растений по внешнему виду ничем не отличаются от зрелых зонтиков обычных растений. Но в некоторых случаях образовывались зрелые зонтики аномального вида. В таких зонтиках цисты распределялись не по всем камерам, а лишь по некоторым, тогда как основная часть зонтика оставалась пустой. В ряде случаев растения образовывали зонтики с обоих концов, но после их удаления такие растения формировали зонтик только с одной стороны.

Разработанная методика сборки клетки ацетабулярии открывает возможность для «конструирования» клеток из растений, имеющих различные наследственные свойства, и для изучения роли различных клеточных структур в процессе морфогенеза.

Авторы приносят искреннюю благодарность Р. И. Салганику за внимание к работе и ценные советы, а также В. П. Разумовой и Г. А. Казначеевой за помощь, оказанную при выполнении этой работы.

Новосибирский институт органической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР

Поступило
20 VI 1972

Новосибирский институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Академии наук СССР

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ K. W. Jeon, I. J. Lorch, J. F. Danielli, Science, 167, 1626 (1970). ² C. Richter, Planta, 52, 554 (1959). ³ Л. И. Чиркова, А. В. Пикалов и др., Онтогенез, 1, 42 (1970). ⁴ J. Hämmerling, C. Hämmerling, Planta, 52, 516 (1959). ⁵ J. Hämmerling, C. Hämmerling, Planta, 53, 522 (1959). ⁶ K. Keck, Methods Cell Physiol., 1, 189 (1964). ⁷ K. Zetche, Naturwiss., 49, 404 (1962). ⁸ G. Werz, Planta, 57, 636 (1962). ⁹ G. Werz, K. Zetche, Planta, 59, 563 (1963). ¹⁰ H. G. Schweiger, H. J. Bremer, Biochim. et biophys. acta, 51, 50 (1961). ¹¹ J. Hämmerling, H. Clauss et al., Exp. Cell Res., Suppl., 6, 210 (1959). ¹² G. Werz, Plata, 53, 502 (1959). ¹³ G. Werz, Zs. Naturforsch., 15b, 85 (1960). ¹⁴ F. de Vitry, Bull. Soc. Biol. Paris, 47, 1325 (1965).