

УДК 576.312.35+576.35

ЦИТОЛОГИЯ

В. И. МАЛЮК, М. К. ПАВЛОВА, Л. В. МАРИНОВСКАЯ,  
Н. Т. ТИМОХИНА, Н. М. ПИВЕНЬ

# ЭФФЕКТ ИЗБРАТЕЛЬНОЙ СТИМУЛЯЦИИ РАЗМНОЖЕНИЯ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК ОПРЕДЕЛЕННОЙ ПЛОИДНОСТИ В ГЕТЕРОПЛОИДНОЙ КУЛЬТУРЕ

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 13 V 1975)

Известно, что в пассируемых культурах исходная ploидность эукариотических клеток растительного и животного происхождения, как правило, подвергается существенным изменениям. Вследствие трансформации исходного кариотипа, охватывающей ту или другую часть популяции с появлением в ней полиплоидных, анеуплоидных, а в некоторых случаях и гиподиплоидных элементов, культивируемые клеточные популяции приобретают гетероплоидный вид (<sup>1-3</sup>). Попытки сохранения исходной ploидности способами обычной селекции (<sup>4</sup>) не получили широкого распространения из-за своей трудоемкости. Поиск химических соединений, способных предотвратить гетероплоидизацию клеток в культуре (<sup>5</sup>), несмотря на всю его привлекательность, вряд ли можно признать перспективным из-за общеизвестной, присущей клеткам высших организмов, видовой, органной, тканевой и индивидуальной специфики.

Таблица 1

Общий план экспериментов по оценке влияния компонентов среды Шенка и Хильдебрандта на ploидность клеток штамма ЗСАС-1.

| Факторы                           | Уровни факторов, N |        |
|-----------------------------------|--------------------|--------|
|                                   | верхний            | нижний |
| X <sub>1</sub> (минеральные соли) | 2                  | 0,25   |
| X <sub>2</sub> (сахароза)         | 3,3                | 1      |
| X <sub>3</sub> (смесь витаминов)  | 1                  | 0,1    |
| X <sub>4</sub> (2,4-Д и кинетин)  | 1                  | 0      |

Примечание. N — концентрация фактора компонента среды по прописи Шенка и Хильдебрандта, кроме 2,4-Д, для которого N соответствует 2,5 мг/л; параклорфеноксиуксусная кислота из состава среды исключена.

Большого внимания заслуживает разработка другого подхода. Если принять, что регистрируемая в пассируемых культурах гетероплоидизация есть следствие неадекватности состава питательной среды потребностям клеток, то логично заключить, что подбором адекватного состава среды можно вычлени из популяции фракцию клеток определенной ploидности. Результаты экспериментальной проверки сформулированной идеи на примере пассируемой культуры *Beta vulgaris* L. изложены ниже.

Исследование выполнено на культуре ткани, полученной на дисках корнеплодов триплоидных растений сорта Верхняяская 038 (штамм

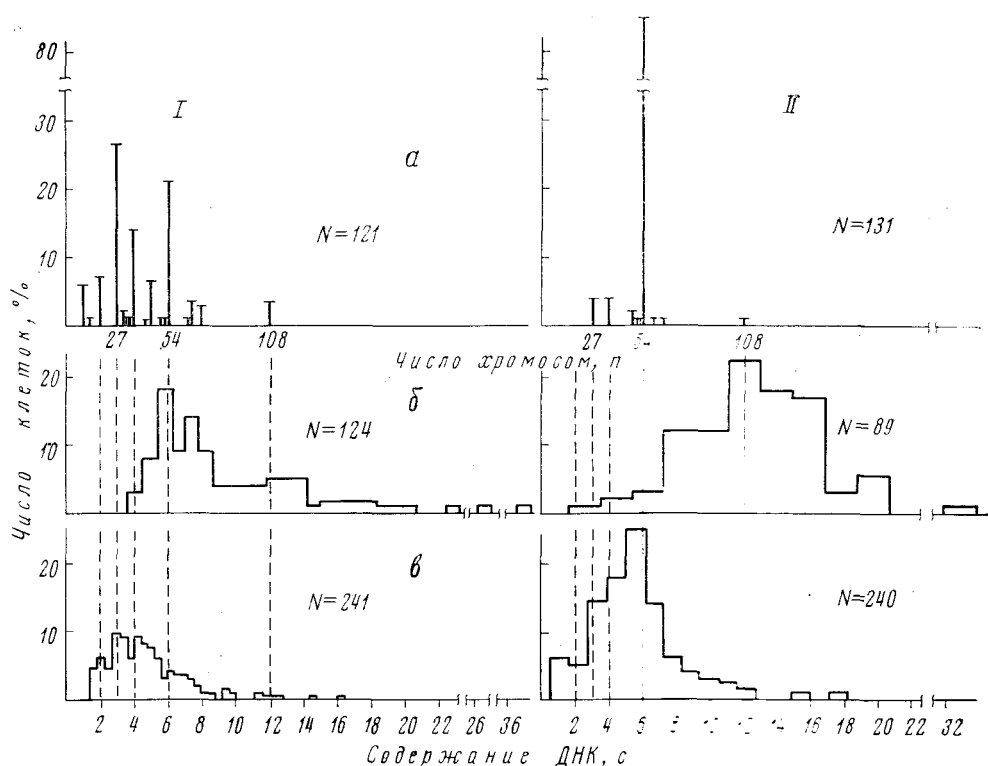


Рис. 1. Распределение клеток по числу хромосом (а), содержанию ядерной ДНК в мета- и анафазе (б) и в интерфазе (в). Штамм ЗСАС-1, выращенные в жидкой питательной среде исходного состава (I) и оптимизированной факторным экспериментом (II). N — количество исследованных клеток; с — условная единица ploidy

ЗСАС-1) и прошедшей 45 пассажей на плотной питательной среде Шенка и Хильдебрандта <sup>(6)</sup> с заменой смеси 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) и пара-хлорфеноксиуксусной кислоты на 2,4-Д в концентрации 2,5 мг/л и снижением содержания инозита до 100 мг/л. Для получения суспензионной культуры ткань переносилась в жидкую питательную среду того же или измененного состава и выращивалась в клеточных колбах объемом 50 мл на качающем устройстве при скорости колебаний 85 об/мин, в темноте, при температуре 26–28°. Подбор адекватного состава питательной среды осуществлен по схеме полного факторного эксперимента с выделением 4 факторов, каждого на двух уровнях (ПФЭ-2<sup>4</sup>) <sup>(7)</sup>. Ввиду громоздкого состава исходной питательной среды ее компоненты были сгруппированы, как показано в табл. 1. Пloidность клеток в суспензионных культурах контролировалась в первом пассаже после перенесения в жидкую питательную среду, в фазе линейного роста. Клетки фиксировались в утренние часы ацетатанолом (1:3) 1 сутки при 4° и окрашивались 3 суток при той же температуре пропионовым лакмодом <sup>(8)</sup>. Хромосомные числа определялись для каждой пробы на основании анализа приблизительно 100 метафаз с хорошим разбросом хромосом. Фиксация материала для цитофотометрии ДНК в ядрах клеток проводилась метанолом — формалином — уксусной кислотой (17:2:1) при 4° 2 часа, гидролитическая процедура — в 5 N HCl при 25° 45 мин. Препараты окрашивались свежеприготовленным по Де-Томази <sup>(9)</sup> реактивом Шиффа, pH 2, в течение 6 час. Цитофотометрические определения выполнены на однолучевой модели цитофотометра двухволновой методикой, расчет содержания ДНК в ядрах — по Шерудило <sup>(10)</sup>.

Клетки исследованного штамма, выращенные на среде исходного состава, принадлежат к отчетливо гетеропloidной популяции (рис. 1, *a—e, I*).

Опуская характеристику изменений ploидности клеток в условиях различных вариантов питательной среды по схеме ПФЭ-2<sup>4</sup>, рассмотрим лишь тот, который был получен во 2-м варианте и который имеет непосредственное отношение к цели работы. Состав среды был представлен фактором X<sub>1</sub> на верхнем и остальными факторами — на нижнем уровнях (табл. 1). Распределение клеток по ploидности показано на рис. 1, *II*. Прежде всего здесь отмечается сильное доминирование гексаploидных клеток (84,73%), формирующих единственную линию ploидности. Численное представительство клеток делящейся фракции в каждом из отдельных классов ploидности не достигает даже 4%. Митотически делящаяся фракция представлена, таким образом, почти целиком клетками, хромосомные числа которых эквивалентны удвоенному набору. Принципиально та же картина обнаруживается и на гистограмме содержания ДНК в митотически делящихся клетках. Формой она приближается к нормальному распределению с одной, четко обозначенной, вершиной, спроецированной на то значение количества ДНК, которое содержится в делящейся гексаploидной клетке. Представленная характеристика целиком относится и к той части клеточной популяции, которая в момент фиксации находилась в интерфазе (рис. 1, *e*). Распределение интерфазных клеток по содержанию ядерной ДНК обнаруживает большое сходство с гистограммой ploидности митотически делящейся фракции. Естественно, что в этом случае, при уменьшенном вдвое значении количества ДНК (в основных единицах ploидности), проекции соответствующих классов смещены по оси абсцисс влево.

В основе обнаруженной трансформации ploидности не может лежать спонтанная селекция. Процесс спонтанной селекции, как правило, растягивается на продолжительное время, измеряемое сменой десятков клеточных генераций. Свидетельство тому — вся совокупность обширной литературы по биологии тканевых культур. Единственным механизмом вычленения из гетеропloidной популяции еще в первом пассаже клеток одного и того же уровня ploидности может быть лишь сильная избирательная стимуляция из репродукции. Этот эффект достигнут изменением количественных отношений между компонентами питательной среды методом математического планирования эксперимента. Значение полученного результата определяется тем, что он открывает принципиальную возможность управления изменчивостью кариотипа соматических клеток в культуре — сложном и во многих отношениях еще не познанным явлением. Одновременно устанавливается и способ реализации этой возможности — экспериментальный подбор такого соотношения компонентов среды, которое оптимальным образом обеспечивает необходимые для размножения потребности клеток заданного уровня ploидности.

Полученное доказательство возможности избирательной стимуляции к размножению клеток заданного уровня ploидности в гетеропloidной культуре может иметь и практический выход, особенно существенный при работе с соматическими клетками растительного происхождения. Закрепление определенного уровня ploидности в ходе дальнейшей клеточной дифференциации и морфогенеза в культуре может в будущем позволить получать растения строго определенной ploидности из гетеропloidных тканевых культур.

- <sup>1</sup> Ю. Б. Вахтин, Генетика соматических клеток. Л., «Наука», 1974.
- <sup>2</sup> З. Б. Шамина, В сб.: Культура изолированных органов, тканей и клеток растений, М., «Наука», 1970, стр. 129.
- <sup>3</sup> N. Sunderland, In: Plant Tissue and Cell Culture, Blackwells, Oxford, 1973, p. 161.
- <sup>4</sup> T. Eriksson, Physiol. Plant., v. 20, № 3, 507 (1967).
- <sup>5</sup> N. Gupta, S. P. Carlson, Nature, New Biol., v. 239, 90, 86 (1972).
- <sup>6</sup> R. U. Schenk, A. C. Hildebrandt, Canad. J. Bot., v. 50, 199 (1972).
- <sup>7</sup> В. Н. Максимов, В. Д. Федоров, Применение методов математического планирования, М., Изд-во МГУ, 1969.
- <sup>8</sup> С. Г. Канта́рь, Цитология и генетика, т. 1, № 4, 87 (1967).
- <sup>9</sup> J. A. de Tomasi, Stain Techn., v. 11, 137 (1936).
- <sup>10</sup> А. И. Шерудило, Цитология, т. 8, № 1. 120 (1966).