

О. В. Захленюк, И. А. Костенюк

НЕКОТОРЫЕ ЦИТО- И МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ПАРА-ФТОРФЕНИЛАЛАНИНА В КУЛЬТУРЕ ТКАНЕЙ *NICOTIANA TABACUM* И *PAPAVER BRACTEATUM*

Проведен цитогенетический анализ культивируемых клеток *N. tabacum* и *P. bracteatum*, выращиваемых на среде, содержащей 100 мг/л пара-фторфенилаланина (*n*-ФФА). Показано, что *n*-ФФА снижает темпы полиплоидизации и способствует пролиферации клеток с низким уровнем плоидности, оказывает стимулирующее влияние на морфогенетические процессы. В устойчивой к *n*-ФФА ткани табака отмечен пониженный уровень митотических нарушений. Описаны миксоплоидия регенерантов табака, полученных из устойчивого к *n*-ФФА каллуса.

Введение. Одним из аспектов биологического действия *n*-ФФА является индукция изменений хромосомных чисел клеток или цитогенетической структуры культивируемых растительных тканей. Вслед за сообщением Гупта и Карлсона [1] об особой устойчивости гаплоидных клеток к воздействию *n*-ФФА в условиях *in vitro* появилось много работ по изучению возможности поддержания с помощью этого соединения линий таких клеток в культивируемых тканях растений, а также получения гаплоидных растений-регенерантов. Однако имеющиеся на сегодняшний день результаты неоднозначны. Преимущественная пролиферация гаплоидных клеток в культуре тканей при воздействии *n*-ФФА показана в одних работах [2—4], но не подтверждается в других [5—7]. Клетки устойчивых к *n*-ФФА тканей могут быть диплоидными [8, 9], тетраплоидными [10]. Показана значительная миксоплоидность таких тканей [7, 10, 11]. Попытки повышения выхода гаплоидных растений-регенерантов из устойчивых к *n*-ФФА тканей не принесли ожидаемых результатов. Тем не менее получение регенерантов таким путем представляет интерес в связи с тем, что они часто оказываются анеуплоидными [12, 13]. Изменения плоидности и анеуплоидия наблюдались также при обработке *n*-ФФА интактных растений [14, 15] и грибов [16]. По некоторым данным, *n*-ФФА вызывает не только изменения числа хромосом, но и изменения карнотипа [15]. Все это указывает на целесообразность дальнейшего изучения цитогенетических эффектов *n*-ФФА, так как он может представлять определенную ценность для хромосомной инженерии у растений.

Ранее нами была установлена повышенная частота эмбриогенеза в культуре устойчивых к *n*-ФФА тканей табака и мака [17]. В настоящей работе представлен цитогенетический анализ этих тканей, а также полученных регенерантов табака.

Материалы и методы. Культуру тканей из листьев гаплоидного растения *N. tabacum* сорта Самсун ($2n=24$) получали и культивировали в течение 1,5 лет на модифицированной среде Мурасиге — Скуга (МС-2) с уменьшенным вдвое содержанием макросолей (контрольный вариант). Одновременно с контрольной из участков листьев того же растения на среде МС-2, содержащей 100 мг/л *n*-ФФА, получали и культивировали опытный вариант (штамм *Nt-P*). В качестве контрольного варианта культуры тканей мака прицветникового использовали штамм P_{11} , полученный в ИФР СССР (Москва) С. А. Рабиновичем и И. Н. Кузовкиной из незрелой коробочки мака прицветникового *P. bracteatum* Lindl. ($2n=14$) и выращиваемый в течение 6 лет на модифицированной питательной среде Мурасиге — Скуга (среда РW). Устойчивую к *n*-ФФА ткань мака (штамм $P_{11}-P$) получали путем ступенчатой селекции штамма P_{11} на среде РW с постепенным увеличением в ней содержания *n*-ФФА с 10 до 100 мг/л в течение 17 месяцев.

Все культуры пассировали в темноте при 26 °С. Интервалы пересадок для табака — 30, для мака — 15—17 сут.

В работе использовали *n*-ФФА, синтезированный в Институте молекулярной биологии и генетики АН УССР, активность которого была ранее испытана на проростках ячменя [7]. Условия получения регенерантов табака описаны в работе [17].

Цитогенетический анализ каллусных тканей и корешков регенерантов проводили с использованием ацетоорсенновой методики приготовления давленных препаратов.

Результаты и обсуждение. Цитогенетический анализ двух штаммов табака проводили в течение девяти пассажей (рис. 1: распределение

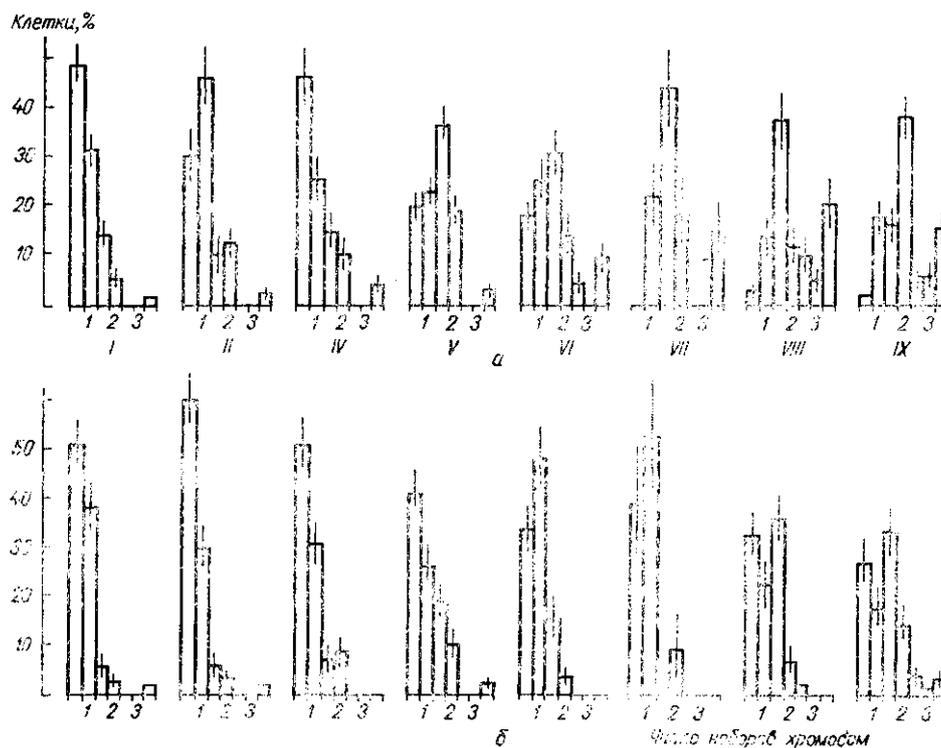


Рис. 1

клеток различных уровней пloidности в культуре тканей табака: *а* — контроль; *б* — штамм *Nt-P*; *I—IX* — номера пассажей). Гистограммы распределения частот клеток с различным числом хромосом отражают такие общие для обоих штаммов особенности, как миксопloidность тканей, обнаруживаемая с первого пассажа; прогрессирующая полипloidизация тканей и преимущественное деление в них анеупloidных клеток. В то же время хорошо заметно, что темпы увеличения частот полипloidных клеток в ткани, культивируемой в селективных условиях, значительно меньше, чем в контроле. Различен и спектр анеупloidных клеток. В частности, доля гипогипloidных клеток у штамма *Nt-P* больше, чем у контрольного в течение всего исследуемого периода. Преимущественное деление гапloidных клеток при воздействии *n*-ФФА отмечено лишь в 6-м и 7-м пассажах.

Изменения, обнаруженные у штамма мака прицветникового после культивирования его на среде с *n*-ФФА, неоднозначны. В отличие от контрольного штамма *P₁₁*, у которого наблюдали преимущественное деление клеток с трипloidными и околотрипloidными наборами хромосом, у штамма *P₁₁-P* наблюдали деления, в основном, диплоидных клеток, а также анеупloidных с близкими к диплоидному наборами хромосом. Однако при этом у него отмечено некоторое расширение пределов изменчивости клеток по числу хромосом за счет появления

высокополиплоидных клеток. Частота гаплоидных и близких к этому уровню клеток не повысилась. Эти различия отмечены спустя четыре пассажа после возврата штамма $P_{11}-P$ на контрольную питательную среду (рис. 2: распределение клеток культуры тканей мака по числу наборов хромосом: *a* — контроль; *b* — штамм $P_{11}-P$ (через четыре пассажа после возвращения на контрольную среду)).

Увеличение частоты клеток более низких уровней плоидности без существенных изменений со стороны гаплоидных клеток показано ранее при изучении влияния *n*-ФФА в низких дозах (1—3 мг/л) на исходно миксоплоидные каллусные ткани томата и гаплоаппуса [7].

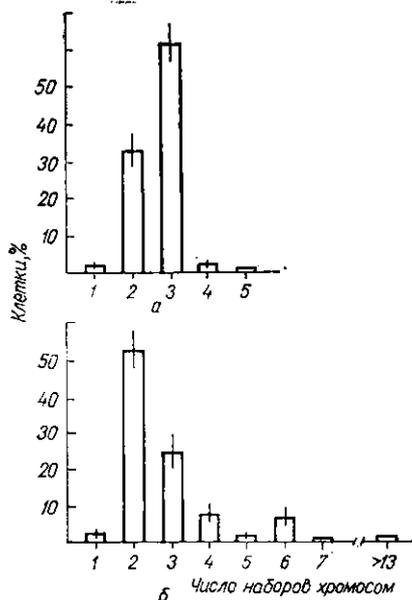


Рис. 2

Сходные результаты получены и другими авторами [11]. Таким образом, устойчивость к *n*-ФФА могут проявлять клетки с различным числом хромосом. Механизм возникновения устойчивости и ее возможной связи с плоидностью клетки остается невыясненным. Высказанное ранее предположение о том, что особая устойчивость к *n*-ФФА гаплоидных клеток связана с появлением у них рецессивной мутации [9], не объясняет всех наблюдаемых случаев.

В ряде работ приводятся данные, свидетельствующие о том, что изменения числа хромосом возникают в сравнительно короткие сроки после воздействия *n*-ФФА и могут быть результатом структурных либо функциональных нарушений веретена деления клеток. Проведенный в настоящей работе анализ анафазных нарушений обнаружил следующее. Культура тканей табака характеризовалась довольно высоким уровнем аберрантных

анафаз. Частота хромосомных аберраций в виде мостов без фрагментов во всех изученных пассажах оказалась выше в контроле, чем в ткани, выращиваемой на среде с *n*-ФФА (таблица). Пределы изменения частоты анафаз с отставаниями хромосом (нарушением веретена деления) были также шире в контроле (от 0,1 до 14,3 %), чем у штамма $Mt-P$ (от 0 до 6,4 %). Последний результат противоречит установленным ранее фактам значительных нарушений аппарата деления, вызываемых *n*-ФФА [7]. Однако в упомянутой работе подобные нарушения обнаружены в течение первых суток обработки и увеличение времени обработки свыше 30 ч не приводило к повышению их частоты. Возможно, в основе реакции клеток на первичное воздействие и длительную обработку *n*-ФФА лежат различные механизмы. В частности, известно,

Частота анафазных нарушений в культуре тканей табака при выращивании на среде с *n*-ФФА в течение десяти пассажей (суммарные данные)

Вариант опыта	Изучено анафаз	Анафазы с нарушениями, %			
		С абберрациями хромосом		С отставанием хромосом	Всего
		Мосты без фрагментов	Фрагменты		
Контроль	595	15,3±1,5	0,8±0,4	5,4±0,9	21,5±1,7
<i>n</i> -ФФА, 100 мг/л	613	11,3±1,3*	0,0	3,3±0,7	14,8±1,4**

* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$.

что поступление аналога в устойчивые к нему клетки ограничивается [9], чем, отчасти, можно объяснить пониженный уровень митотических нарушений при длительном контакте клеток с данным селективным фактором.

Штаммы табака и мака, выращиваемые на контрольных средах, не обнаруживали явных признаков морфогенеза. *n*-ФФА в ряде случаев индуцировал проявление таких признаков сразу после воздействия. Так, первичный каллус табака на среде с *n*-ФФА (20—60 мг/л) в отличие от контроля характеризовался интенсивным ризогенезом, которого не наблюдали при дальнейшем культивировании каллуса на этой среде. При первичном переводе тканей мака на среду с *n*-ФФА (10—60 мг/л) появлялись очаги эмбриогенеза, но в дальнейшем также исчезали. При сравнении эффективности эмбриогенеза, который обычно имеет место при переводе тканей мака на безгормональную среду, с тем же показателем на безгормональной среде, дополненной *n*-ФФА, оказалось, что *n*-ФФА при некоторых концентрациях (10 мг/л) более чем в 4 раза стимулировал этот процесс [17]. Более чем в 3 раза повышалась частота эмбриогенеза и регенерации растений при переводе штамма табака *Nt-P*, выращиваемого в течение 6—7 пассажей на среде с *n*-ФФА, на среды для регенерации [17]. Анализ корневой меристемы растений-регенерантов табака показал, что все они миксоплоидные с пределами варьирования клеток по числу хромосом от 14 до 50 при $n=24$. У большинства из проанализированных растений (9 из 12) все же преобладали гаплоидные клетки, но «чистых» гаплоидов не обнаружено, несмотря на имевшиеся к этому предпосылки, такие как гаплоидное происхождение каллусной ткани и поддержание в ней довольно высокого уровня гаплоидных клеток во время перевода этой ткани на регенерационные среды (см. рис. 1, 7-й пассаж). Из литературы также известно, что *n*-ФФА оказался неэффективным при получении гаплоидов из каллуса *N. sylvestris*, хотя способствовал поддержанию в нем определенного количества гаплоидных клеток [18], а из устойчивых к *n*-ФФА линий *N. tabacum* получены преимущественно диплоидные, триплоидные и тетраплоидные регенеранты [19].

Несмотря на пониженный уровень анафазных aberrаций хромосом у штамма *Nt-P*, в частности, анафаз с мостами, которые образуются дицентрическими хромосомами, в меристеме корней полученных из этого штамма регенерантов также наблюдали анафазы с мостами (в среднем около 7%). Причина их появления остается неясной, если исходить из сделанного в работе [20] заключения о том, что возможность переживания каллусных клеток с дицентрическими хромосомами, зачастую вовлекаемых в процесс эмбриогенеза на первых его этапах, до стадии взрослого растения исключается. Однако есть немало сообщений о наличии транслокаций и других хромосомных перестроек у регенерантов [21]. Появление митотических нарушений может происходить *de novo* в процессе укоренения регенерантов.

Таким образом, наши данные свидетельствуют в пользу того, что действие *n*-ФФА не является селективным только по отношению к гаплоидным клеткам и не приводит к регенерации гаплоидных растений. Тем не менее *n*-ФФА снижает темпы полиплоидизации культивируемых тканей и способствует пролиферации клеток более низких уровней плоидности в исходно миксоплоидной ткани, а также оказывает положительное влияние на процессы морфогенеза. Это наводит на мысль о том, что пролиферативное преимущество в условиях воздействия аналога оказывается у клеток, потенциально готовых к организованному росту. В свою очередь известно, что эмбриоидным структурам и органам в культивируемых тканях чаще всего дают начало диплоидные и другие относительно низкоплоидные клетки (см., например, [22]). Другими словами, связь возникновения устойчивости к *n*-ФФА у клеток с их плоидностью может быть опосредована генетическим и/или эпигенетическим статусом клеток, predisполагающим

к морфогенезу. Предположение, высказанное по результатам настоящей работы, разумеется, нуждается в дальнейших экспериментальных проверках.

Авторы выражают благодарность В. А. Кунаху за внимательное прочтение рукописи и высказанные замечания.

Резюме

Проведено цитогенетичний аналіз культивованих клітин *N. tabacum* і *P. bracteatum*, стійких до пара-фторфенілаланіну (п-ФФА). Показано, що п-ФФА знижує темпи поліплоїдизації та сприяє проліферації клітин з низьким рівнем плоїдності, спричиняє стимулюючий вплив на процеси морфогенезу в обох культурах. В стійкій до п-ФФА тканині тютюну відмічено знижений рівень мітотичних порушень. Описано міксоплоїдію рослин-регенерантів тютюну, одержаних із стійкого до п-ФФА калусу.

Summary

Cytogenetic analysis of cultured *Nicotiana tabacum* and *Papaver bacterium* cells resistant to *para*-fluorophenylalanine (pFPA) has been provided. pFPA retarded polyploidy process and enhanced proliferative activity of cells with low ploidy, and stimulated morphogenesis in both species calluses. Low frequency of chromosome aberrations in tobacco tissue culture resistant to pFPA has been demonstrated. Regenerated from resistant tobacco callus plants characterized with mixoploidy status.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gupta N., Carlson P. S. Preferential growth of haploid plant cells in vitro // Nature.— 1972.— 239, N 90.— P. 86.
2. Matthews P. S., Vasil I. K. A comparative study of cell proliferation and DNA synthesis in pith explants of haploid and diploid tobacco // Haploid Inform. Serv.— 1974.— 11.— P. 12—14.
3. Niizeki M. Studies on plant cell and tissue culture. IV. Effect of *para*-fluorophenylalanine on haploid and diploid cells of tobacco plant *in vitro* // J. Faculty Agric. Hokkaido Univ.— 1974.— 57, N 4.— P. 349—356.
4. Matthews P. S., Vasil I. K. The dynamics of cell proliferation in haploid and diploid tissues of *Nicotiana tabacum* // Z. Pflanzen.— 1976.— 77, N 3.— P. 222—236.
5. Dix P. I., Street H. E. Effects of *p*-fluorophenylalanine on growth of cell lines differing in ploidy and derived from *Nicotiana sylvestris* // Plant Sci. Lett.— 1974.— 3, N 4.— P. 238—288.
6. Chaleff R. S., Carlson P. S. Somatic cell genetics of higher plants // Ann. Rev. Genet.— 1974.— 8.— P. 267—278.
7. Левенко Б. А., Кифорак О. В. Влияние фторфенілаланіна на культуру тканин томата і гаплопалупса // Эксперим. генетика растений.— Киев: Наук. думка, 1977.— С. 138—142.
8. Rani A., Bhojwani S. S., Johri B. M. Effect of *p*-fluorophenylalanine on tissue cultures of *Grepis capillaris* // Beitr. Biol. Pflanz.— 1974.— 50, N 2.— P. 269—275.
9. Palmer J. E., Widholm J. Characterization of carrot and tobacco cell cultures resistant to *p*-fluorophenylalanine // Plant Physiol.— 1975.— 56, N 2.— P. 233—238.
10. The *fluorophenylalanine* sensitive and resistant tobacco cell lines, TX1 and TX4. I. DNA content, chromosome number, nuclear ultrastructures, and effects of spermidine / W. Nagl, R. Ribicki, H.-O. Mertler et al. // Protoplasma.— 1984.— 122.— P. 138—144.
11. Влияние парафторфенілаланіна на содержание ядерной ДНК и сегрегацию хромосом в гибридных клетках *Atropa+Nicotiana* / Д. М. Глеба, В. П. Момот, А. Н. Околот, Ю. Ю. Глеба // Цитология и генетика.— 1985.— 19, № 4.— С. 281—285.
12. Fukui K., Niizeki H. Artificial reduction of chromosome number in *Fragaria nanasa* following treatment with *p*-fluorophenylalanine // Plant tissue culture: Proc. 5th Int. Congr. plant tissue and cell culture (Tokyo, Lake Jamanaka, 1982).— Tokyo, 1982.— P. 427—428.
13. Fukui K., Niizeki H. Noguogijutsu kenkyusho nokoku // Bull. Nat. Inst. Agr. Sci.— 1983.— D, N 34.— P. 113—185.
14. Banks P., Britten E. J., Byth D. E. Heritable *para*-fluorophenylalanine-induced aneuploidy in maize // J. Hered.— 1982.— 73, N 6.— P. 465—466.
15. Banks P., Britten E. J., Gordon G. H. *Para*-fluorophenylalanine-induced chromosome number changes in higher plants. I. Maize // Genome.— 1989.— 32, N 6.— P. 962—966.

16. Bond D. J., McMillan Z. The effect of *p*-fluorophenylalanine on the frequency of aneuploid meiotic products in *Sordaria brevicollis*// *Mutat. Res.*—1979.— 60, N 2.— P. 221—224.
17. А. с. 1544798 СССР, МКИ С 12 № 5/00. Стимулятор эмбриогенеза в культуре растительной ткани/О. В. Захленюк, И. А. Костенюк, В. А. Кунах и др.// *Бюлл. № 7.*—1990.
18. Malepszy S. Kultury tkankowe w genetice roslin ze szczegolnym uwzlednieniem haploidow// *Zes. nauk SGGWAR Warsz. Rozpr. nauk.*—1979.— 110.— S. 113.
19. Gupta N., Bhaskaran S. *In vitro* isolation of biochemical mutants in haploid cell cultures of *Nicotiana tabacum*// *Plant cell cult. crop improv. Proc. Int. symp. (Calcutta, 1981).*— New York; London, 1983.— P. 387—396.
20. Role of permanent dicentric systems in carrot somatic embryogenesis/F. Toncelli, G. Martini, G. Giovinazzo et al.// *Theor. and Appl. Genet.*—1985.— 70.— P. 345—384.
21. Evans D. A. Somaclonal variation-genetic basis and breeding applications// *Trends Genet.*—1989.— 5, N 2.— P. 35—63.
22. Кунах В. А. О связи между плоидностью штаммов *Crepis capillaris* и *Haploparpus gracilis* и спонтанным органогенезом// *Цитология и генетика.*—1974.— 8, № 4.— С. 303—308.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев
Ин-т клеточ. биологии и генет. инженерии АН УССР, Киев

Получено 11.02.91

УДК 577.113

Н. И. Сьякте, А. В. Будылин

АССОЦИАЦИЯ ДОМЕНОВ ХРОМАТИНА С ЯДЕРНЫМ СКЕЛЕТОМ В КЛЕТКАХ АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА. АНАЛИЗ МЕТОДОМ НУКЛЕОПРОТЕИД-ЦЕЛИТ-ХРОМАТОГРАФИИ

Методом НПЦ-хроматографии исследовано распределение нуклеопротеидов различной прочности в изолированных ядрах и ядерном матриксе. В препаратах матрикса, полученных обработкой ядер ДНКазой I, обнаружены устойчивая к соли-мочевине (ДНК II) и неустойчивая (ДНК I) связи ДНК — матрикс. Все связи устойчивы к действию меркаптоэтанолола, ЭДТА и низкой ионной силы. ДНК II чувствительна к действию нуклеазы S₁ для ее разрушения необходимо плавление молекулы ДНК. Рестриктазы вызывают деградацию ДНК II с различной эффективностью: AluI, Sau3AI >> EcoRI, PstI, PvuII > HindIII, SalGI, BamHI. По совокупности свойств ДНК I и ДНК II не соответствуют связям ДНК — матрикс, обнаруживаемым другими методами.

Введение. Со скелетными структурами клеточного ядра (ядерный матрикс, каркас, нуклеоид) ассоциированы многие ферментативные активности, включая транскрипцию и репликацию [1—7]. Разнообразие функций ядерного скелета объясняют множественностью и гетерогенностью точек ассоциации ДНК с этой структурой. Различаются типы связи ДНК с ядерным матриксом по признакам устойчивости к хелатирующим агентам [1, 8, 9], постоянства и зависимости от транскрипции [4, 6]. Разработана модель функционирования ядерного матрикса, основанная на разделении функций разных точек связи ДНК с ядерным скелетом [3]. При помощи метода НПЦ-хроматографии были обнаружены различающиеся по прочности два типа связи ДНК с ядерным матриксом. «Слабая» связь (ДНК I) разрушается в концентрированных растворах соли-мочевины, «прочная» (ДНК II) — при высокой температуре. Предполагается, что прочная связь участвует в репликации и имеет топологическую природу. Предварительно охарактеризованы полипептиды и последовательности ДНК, образующие ксмплексы. Идентифицировать ДНК I и ДНК II со связями, обнаруженными другими методами, не удается [2, 10—14].

Значительная часть результатов получена при помощи двухградентного варианта НПЦ-хроматографии, в котором ДНК I и несвязан-

© Н. И. СЬЯКТЕ, А. В. БУДЫЛИН, 1991