



УДК 58.09:575.12

ПРОСТРАНСТВЕННОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ РОДИТЕЛЬСКИХ ГЕНОМОВ В ГИБРИДАХ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК РАСТЕНИЙ

А. С. Пароконный, В. П. Момот, В. Н. Котов, Ю. Ю. Глеба

Введение. Неслучайные размещение и ориентация родительских (материнских и отцовских) хромосом наблюдались в зиготе и в течение ранних стадий дробления (но не позже) у ряда видов животных [1]. Кроме того, в одном случае было показано, что у половых гибридов ячменя с рожью пространственное разделение родительских геномов сохраняется на протяжении большого количества регулярных митозов в соматических тканях [2]. Имеющаяся информация позволяет предположить, что разделение геномов в соматических тканях спорифита — это общее явление, оставшееся незамеченным потому, что материнский и отцовский геномы обычно не различаются морфологически. Гибридизация соматических клеток, позволяющая объединять клетки филогенетически отдаленных видов, в частности видов с морфологически различающимися хромосомами, является новым подходом при изучении пространственного расположения хромосом и родительских геномов в ядрах и выяснении возможных механизмов наследования такого расположения.

В первых работах, посвященных клеточным делениям гибридов соматических клеток различных видов, было обнаружено, что хромосомы двух родителей в первом митотическом цикле гибридной клетки размещаются в виде отдельных групп, образуя двухсегментную структуру в мета- и анафазе [3—6]. Однако раздельное размещение родительских геномов в первой метафазе еще не доказывает наследования этого явления в длительном ряду поколений. При анализе же клеточных клонов соматических гибридов не было уделено внимания пространственному расположению хромосом и исследовались к тому же лишь колхицинированные препараты [4, 7—10].

Поэтому нами было предпринято специальное изучение расположения хромосом двух родительских геномов в гибридах соматических клеток на разных этапах культуры. В качестве объекта исследования использовали гибридную комбинацию *Nicotiana chinensis*+*Atropa belladonna* [9, 11].

Материалы и методы. В качестве одного из родителей использовали клеточный штамм китайского табака *N. chinensis* ($2n=28$). Клетки выращивали на агаризованной среде В₅ [12]. В качестве другого родителя использовали мезофильные протопласты диплоидных ($2n=72$) асептически выращиваемых растений красавки *A. belladonna*. Протопласты каллусных и мезофильных клеток получали обработкой тканей ферментной смесью, как описано в [7].

Слияние индуцировали, согласно Као [4]. Отмытую и осажденную в 0,3 М нитрате натрия смесь родительских протопластов красавка:табак (1:3) обрабатывали раствором полиэтиленгликоля (молекулярная масса 3000) в течение 25 мин [13]. Смесь родительских клеток и гетероплазматических продуктов слияния культивировали в среде МО-1 при 25 °С на рассеянном свете в течение 2—3 дней. Для проведения цитологического анализа материал фиксировали в ацетоспирте (1:3) 12—24 ч при 4—8 °С

в после обезвоживания в спиртах нисходящей концентрации окрашивали 1 %-ным раствором ацетоорсеина в течение 24 ч при комнатной температуре.

При анализе метафазных пластинок использовали следующую статистическую методику. Радиус метафазы принимали равным единице. Каждая метафаза разделялась демаркационной окружностью переменного радиуса r ($0 < r < 1$) на две области, а именно: 1) внутреннюю область демаркационной окружности и 2) внешнее кольцо. Для оценки степени несовпадения распределений хромосом красавки и табака использовали статистику Пирсона [14]:

$$W = \frac{[v_1(n_2 - v_2) - v_2(n_1 - v_1)]^2 n}{n_1 n_2 (v_1 + v_2) (n - v_1 - v_2)}$$

(обозначения даны в таблице). Статистика W является функцией радиуса r демаркационной окружности. Для суждения о совпадении (или несовпадении) распределений хромосом красавки и табака на метафазных пластинках использовали критерий χ^2 с одной степенью свободы при уровне значимости 1 %.

Результаты и обсуждение. Расположение хромосом в метафазах первых клеточных делений слившихся протопластов. Исследование метафаз в гетероплазматических

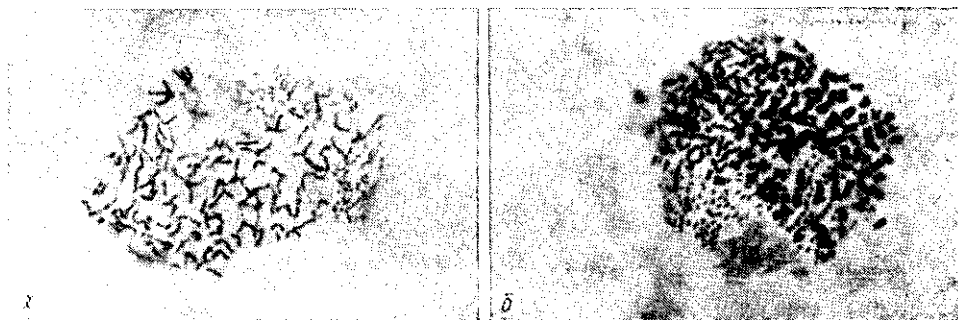


Рис. 1. Расположение хромосом двух родителей в метафазах первого клеточного деления гибридных клеток *N. chinensis*+*A. belladonna* (ум. 4/5)

Fig. 1. Disposition of chromosomes of two parents in metaphases of the first division of the hybrid cells of *Nicotiana chinensis* + *Atropa belladonna* (a, б) (4/5 reduction)

продуктах слияния проводили на третий день роста культуры, метафазы гибридных клеток идентифицировали по наличию в них видоспецифических хромосомных типов: мелких (красавка) и крупных (китайский табак). Анализ расположения хромосом родителей в метафазных пластинках обнаруживает во всех случаях одну и ту же закономерность: хромосомы двух видов размещены в общей метафазной пластинке группами, а не беспорядочно перемешаны. Каждая группа представляет собой сегмент метафазной пластинки, внутри которого расположены хромосомы одного вида. Под-

счет количества хромосом в сегменте позволяет утверждать, что отдельные сегменты содержат примерно геном родительской клетки. Поскольку для гибридизации использовали мезофильные диплоидные клетки красавки ($2n=72$) и генетически нерегулярные миксоплоидные каллусные протопласты китайского табака, можно заключить, что гибридная клетка (рис. 1, а) возникла в результате слияния как минимум одной клетки табака с двумя клетками красавки. Точно так же анализ метафазной пластинки (рис. 1, б) позволяет выделить в ней три сегмента

Обозначения в записи статистики Пирсона W
Notation used in the presentation of Pearson's statistic W

Область	Число хромосом		Всего
	красавки	табака	
1	v_1	v_2	$v_1 + v_2$
2	$n_1 - v_1$	$n_2 - v_2$	$n - v_1 - v_2$
Всего	n_1	n_2	n

с геномами красавки и два сегмента с геномами табака. Такое разделение возможно благодаря тому, что хромосомы различных групп, как свидетельствует изучение их морфологии, находятся в разной фазе конденсации.

Подобное четкое сегментное строение неизменно наблюдалось при анализе первых митозов в гибридных клетках самых различных видов

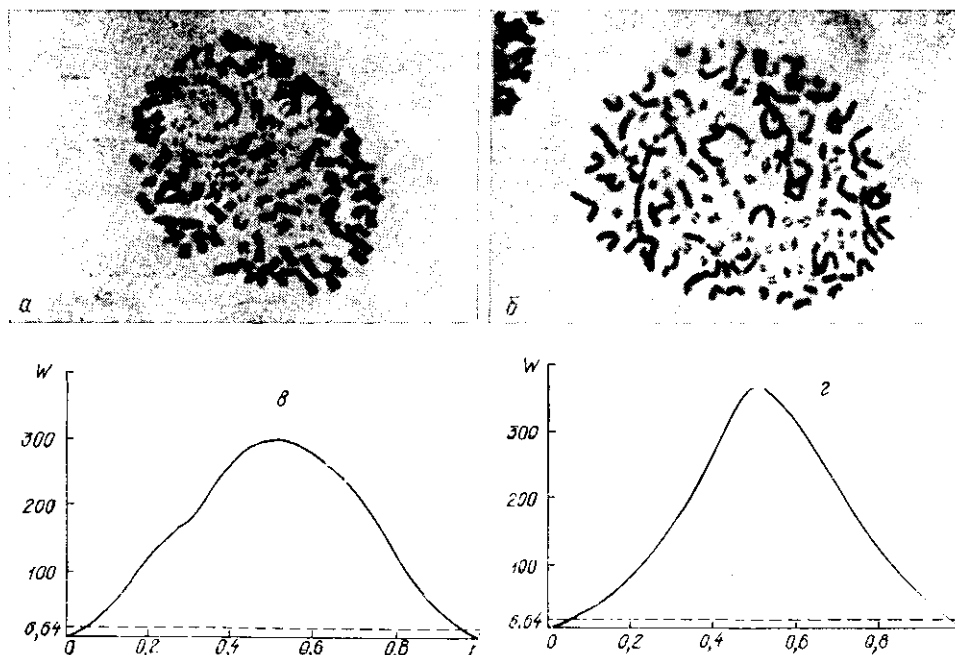


Рис. 2. Метафазные пластинки клеток клонов соматических гибридов *N. chinensis* + *A. belladonna* (а, б), культивированных в течение четырех лет, и кривые изменения статистики W в зависимости от радиуса r демаркационной окружности, рассчитанные по 10 метафазным пластинкам клеток соматических гибридов *N. chinensis* + *A. belladonna* двух клонов NA-5 (а) и NA-15 (б). Пунктирной линией отмечено критическое значение статистики W , соответствующее уровню значимости 1% критерия χ^2 при одной степени свободы (ум. 4/5)

Fig. 2. Metaphase plates of the cells from clones of somatic hybrids *N. chinensis* + *A. belladonna* cultivated for 4 years (а, б), the curves of statistics W versus the radius r of the demarcation circle calculated by 10 metaphase plates of the somatic hybrids *N. chinensis* + *A. belladonna* of two clones NA-5 (а) and NA-15 (б). A critical value of statistics W corresponding to 1% confidence level of the χ^2 -criterion with one degree of freedom is shown by a dashed line (4/5 reduction)

вых комбинаций, в том числе: *Nicotiana chinensis*+*Allium cepa*, *Nicotiana chinensis*+*Vicia faba*, *Nicotiana chinensis*+*Pisum sativum*, *Nicotiana plumbaginifolia*+*Nicotiana sylvestris*.

Расположение родительских геномов в метафазах длительно пассируемых линий соматических гибридов *N. chinensis*+*A. belladonna*. Метафазы изучали в клетках двух клеточных клонов *N. chinensis*+*A. belladonna*, полученных в работе [9] и пассировавшихся в течение четырех лет в культуре *in vitro*. Статистический анализ расположения хромосом двух родителей в метафазах дал по существу одни и те же результаты в отношении обеих изученных линий: NA-5 и NA-15. Во всех исследованных метафазных пластинках расположение хромосом было, во-первых, неслучайным, во-вторых, отличалось от расположения хромосом в метафазах первых делений гибридных клеток. Как можно видеть (рис. 2, а, б), хромосомы двух родителей расположены таким образом, что мелкие хромосомы красавки находятся в центральной части метафазы, а крупные хромосомы китайского табака расположены в периферической зоне. Для строгой количественной оценки наблюдаемой

закономерности мы проводили простой статистический анализ метафазных пластинок с использованием статистики Пирсона W . На рис. 2, в, г представлены кривые зависимости статистики W от радиуса r демаркационной окружности, рассчитанные для двух клеточных клонов. Хромосомы красавки с вероятностью 99 % преобладают внутри демаркационной окружности для большинства значений r . Наилучшее разделение происходит при $r=0,4\div 0,5$.

Таким образом, разделение родительских геномов в гибридах соматических клеток сохраняется в течение многих клеточных поколений, хотя топография разделения изменяется, эволюционирует от сегментной структуры к структуре с радиальной симметрией.

Следует отметить, что ситуация, когда в пределах одного генома мелкие хромосомы располагаются в центральной части метафазной пластинки, а крупные — на ее периферии, наблюдается и в клетках ряда видов животных [2].

Анализ расположения хромосом в метафазах клеток *N. chinensis*—*A. belladonna*, выращиваемых в присутствии колхицина. В работе использовали линию клеток НА-5. Клетки после переноса в свежую питательную среду культивировали три дня, затем добавляли колхицин (концентрации 100, 300 и 1000 мкг/мл) и выращивали в его присутствии в течение шести дней. Далее клетки отмывали и переносили в свежую питательную среду. Статистический анализ метафаз (аналогичный использованному в предыдущем исследовании) проводили: а) сразу после культивирования клеток с колхицином; б) через 25 и 35 дней после отмывки от него. Как и следовало ожидать, встречавшиеся сразу после действия колхицина метафазы характеризовались беспорядочным расположением хромосом двух родителей по всему объему клетки (рис. 3, а). Среди метафаз клеток, выращиваемых в течение нескольких недель после удаления колхицина, большинство составили метафазы с беспорядочным расположением хромосом (рис. 3, б, д). Вместе с тем значительная часть метафаз характеризовалась компактным расположением хромосом, причем присутствовали как типы с хаотичным расположением хромосом двух геномов (рис. 3, в), так и метафазы с тенденцией к их раздельному расположению, о чем свидетельствует поведение статистики W (рис. 3, г, е).

Сопоставление полученных результатов позволяет заключить, что обнаруженная нами закономерность в расположении хромосом двух родителей в метафазах гибридных клеток не является артефактом цитологических методик. Неслучайное расположение наблюдается лишь в препаратах, в которых клетки не подвергали обработке колхицином. На различных этапах эволюции гибридного ядра взаимное расположение хромосом изменяется, хотя техника приготовления препаратов была неизменной. Наконец, расположение хромосом становится беспорядочным в части клеток культур, выращиваемых в присутствии колхицина.

Полученные нами результаты свидетельствуют, что в метафазу первого деления геномы гибридов соматических клеток вступают относительно синхронно и обособленно, так что хромосомы каждой родительской клетки образуют свою пространственно отдельную группу в обобщенной метафазной пластинке. Эти данные находятся в хорошем соответствии с наблюдениями других авторов [3, 5, 15], изучавших первые деления в гибридах соматических клеток растений.

Наиболее интересным и важным наблюдением нашего исследования является обнаружение пространственного разделения двух родительских геномов в клетках длительно пассируемых клонов гибридных клеток.

Сравнение взаимного расположения хромосом в первых метафазах гибридных продуктов и длительно пассируемых клеточных линиях свидетельствует об изменении взаимного пространственного расположения родительских геномов в ядрах клеток в процессе эволюции популяций

гибридных клеток. Таким образом, в гибридах соматических клеток растений не только хромосомы сохраняют свою видовую индивидуальность, но и целые геномы остаются физически разделенными внутри обобщенного ядра, что скорее всего свидетельствует о структурной

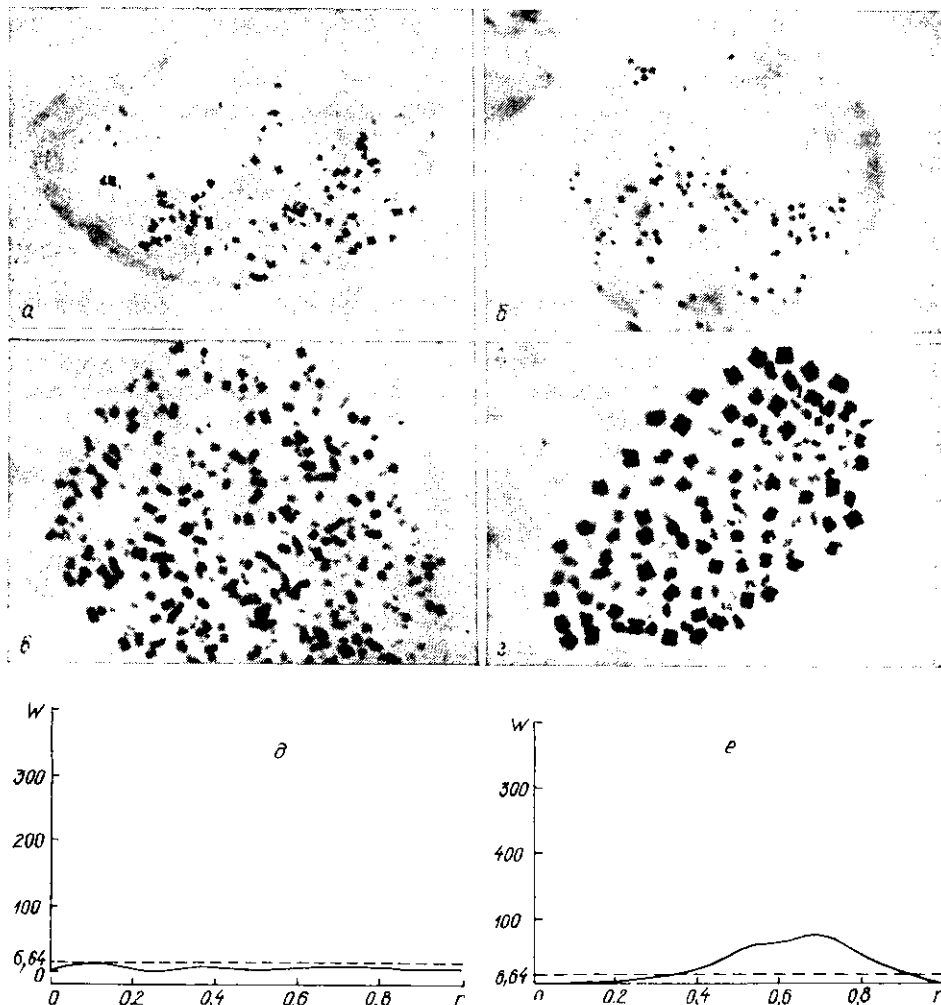


Рис. 3. Метафаза каллусной клетки культуры соматического гибрида *N. chinensis* + *A. belladonna*, выращенной в присутствии колхицина (концентрация 100 мкг/мл) в течение 6 дней (а), и метафазы клеток клона NA-5 и кривые изменения статистики W в зависимости от радиуса r демаркационной окружности, рассчитанные по 10 метафазам соматического гибрида *N. chinensis* + *A. belladonna* (б-г). Клетки культивировали в течение 35 дней на свежей питательной среде после отмывки от колхицина. Пунктирной линией отмечено критическое значение статистики W , соответствующее уровню значимости 1% критерия χ^2 при одной степени свободы (ум. 4/5)

Fig. 3. A metaphase of a cell from the callus of somatic hybrid *N. chinensis* + *A. belladonna* cultivated for 6 days in the presence of colchicine (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (a) and metaphases of the cells of clone NA-5 and the curves of statistics W versus the radius r of the demarcation circle calculated by 10 metaphases of somatic hybrid *N. chinensis* + *A. belladonna* (б-г). The cells were cultivated for 35 days on the fresh nutrient medium after removal of colchicine. A critical value of statistics W corresponding to the 1% confidence level of the χ^2 -criterion with one degree of freedom is shown by a dashed line (4/5 reduction)

химерности также и нехромосомных компонентов ядра. Факт отдельного расположения родительских геномов в гибридах на протяжении многочисленных клеточных поколений является доказательством наследственной природы наблюдаемого явления и подтверждает гипотезу наследуемого упорядоченного расположения хромосом в метафазной пластинке.

Наши исследования также показывают, что пространственное разделение родительских геномов в гибридах соматических клеток может быть эффективно разрушено. Эксперименты с использованием колхицина позволили установить длительный эффект этого митотического яда в клеточной культуре в отношении пространственного расположения хромосом в метафазе. Судя по результатам, клетки с нарушенным по сравнению с установившимся ранее расположением хромосом сохраняют жизнеспособность и способны по крайней мере к нескольким последовательным делениям. Таким образом, в клетках нет жесткого генетического контроля расположения хромосом в метафазе, что свидетельствует в пользу предположения об эпигенетическом контроле этого наследственного признака.

Нет никаких оснований считать, что механизмы, определяющие пространственное расположение хромосом и наследование этого расположения в гибридах соматических клеток, принципиально отличаются от механизмов, обеспечивающих геномное разделение в гибридах, полученных гаметическим слиянием, поэтому соматические гибриды представляют собой интересную и удобную модель для изучения пространственной и временной организации митоза в эукариотической клетке.

SPATIAL SEPARATION OF PARENT GENOMES IN HYBRIDS OF THE SOMATIC PLANT CELLS

A. S. Parokorny, V. P. Momot, V. N. Kotov, Yu. Yu. Gleba

N. G. Kholodny Institute of Botany,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

Spatial arrangement of chromosomes in metaphase nuclei of somatic cells hybrids *Nicotiana chinensis*+*Atropa belladonna* has been studied. It is found that during the first division, chromosomes of two parents are not randomly intermixed in metaphase plate, but they are grouped in segments, each containing predominantly chromosomes of one parent. Spatial separation of parental genomes is retained during the long-term (6-48 months) cultivation of hybrid cells, although topology of separation changes from «segment» to «radial» (chromosomes of one species being in the center and those of another occupying periphery of the metaphase plate). Analysis of cells grown for 6 days in the presence of colchicine (100, 300 and 1000 µg/ml) and then cultivated for 1-7 months in the colchicine-free medium has revealed that colchicine induces disorders in chromosome spatial positions, and that these alterations are heritable. Therefore, the phenomena studied are, probably, of epigenetic nature. Possibilities of using somatic cells hybrids as a model for analyzing the mechanisms of mitosis are discussed.

1. Costello D. P. Identical linear order of chromosomes in both gametes of the *Acoel tubellarian Polychoerus carmelensis*. A preliminary note // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1970.— 67, N 5.— P. 1951—1958.
2. Finch R. A., Smith J. B., Bennett M. D. Hordeum and secale mitotic genomes lie apart in a hybrid // J. Cell Sci.— 1981.— 52, N 1.— P. 391—403.
3. Plant protoplast fusion and growth of intergeneric hybrid cells / K. N. Kao, F. Constabel, M. R. Michayluk, O. L. Gamborg // Planta.— 1974.— 120, N 3.— P. 215—227.
4. Kao K. N. Chromosomal behaviour in somatic hybrids of soybean *Nicotiana glauca* // Mol. and Gen. Genet.— 1977.— 150, N 1.— P. 225—230.
5. Constabel F., Weber G., Kirkpatrick J. W. Sur la compatibilité des chromosomes dans les hybrides intergenériques de cellules de *Glycine max* × *Vicia hajastana* // C. r. Acad. sci.— 1977.— 285, N 3.— P. 319—322.
6. Chien Y.-C., Kao K. N., Wetter L. E. Chromosome isozyme studies of *Nicotiana tabacum* — *Glycine max* hybrid cell lines // Theor. and Appl. Genet.— 1982.— 62, N 4.— P. 301—304.
7. Gleba Y. Y., Hoffman F. Hybrid cell lines *Arabidopsis thaliana*+*Brassica campestris*: no evidence for specific chromosome elimination // Mol. and Gen. Genet.— 1978.— 165, N 1.— P. 257—264.
8. Gleba Y. Y., Hoffmann F. «Arabidobrassica»: plant-genome engineering by protoplast fusion // Naturwissenschaften.— 1979.— 66, N 3.— P. 547—554.

9. *Intertribal* hybrid cell lines of *Atropa belladonna*(\times)*Nicotiana chinensis* obtained by cloning individual protoplast fusion products / Y. Y. Gleba, V. P. Momot, N. N. Cherep, M. V. Scarzhynskaya // *Theor. and Appl. Genet.*—1982.—62, N 1.—P. 75—79.
10. *Krumbiegel G., Schieder O.* Selection of somatic hybrids after fusion of protoplasts from *Datura innoxia* Mill. and *Atropa belladonna* L. // *Planta.*—1979—145, N 3.—P. 371—375.
11. *Genetic* processes in intergeneric cell hybrids of *Atropa+Nicotiana*. 1. Genetic constitution of cell of different clonal origin grown *in vitro* / Y. Y. Gleba, V. P. Momot, A. N. Okolot et al. // *Theor. and Appl. Genet.*—1983.—65, N 3.—P. 269—276.
12. *Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K.* Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cell // *Exp. Cell Res.*—1968.—50, N 2.—P. 151—158.
13. *Streptomycin-resistant* and sensitive somatic hybrids of *Nicotiana tabacum+Nicotiana knightiana*: correlation and resistance to *Nicotiana tabacum* plastids / L. Menczel, F. Nagy, Z. Kiss, P. Maliga // *Theor. and Appl. Genet.*—1981.—59, N 3.—P. 191—198.
14. *Крамер Г.* Математические методы статистики.—М.: Мир, 1975.—648 с.
15. *Nuclear* fusion in intergeneric heterokaryons. A note / F. Constabel, D. Dudits, O. L. Gamborg, K. N. Kao // *Can. J. Bot.*—1975.—53, N 10.—P. 2092—2095.

Ин-т ботаники им. Н. Г. Холодного АН УССР,
Киев

Получено 4.03.86

НОВЫЕ КНИГИ ИЗДАТЕЛЬСТВА «НАУКОВА ДУМКА»

ЕФИМОВА А. С., БЕЗДРОБНЫЙ Ю. В. СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ ИНСУЛИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ.—14 л.—2 р. 40 к. План 1987 г. № 308 (II кв.)

В монографии изложены основные результаты и достижения бурно развивающихся в последние годы исследований инсулиновых рецепторов периферических тканей. Рассматриваются их структура, надмолекулярная организация, биосинтез и обмен, закономерности регуляции активности и изменения состояния этих веществ в физиологических условиях и при заболеваниях, сопряженных с нарушением регуляторной функции инсулина.

Для биохимиков, физиологов, молекулярных биологов, а также врачей, ветеринаров, зоотехников.

Заказать это издание можно в магазине издательства «Наукова думка» (252001 Киев 1, ул. Кирова, 4), который высылает книги иногородним заказчикам наложенным платежом.

Индивидуальные покупатели должны оформлять заказы на почтовых открытках, где указываются автор и название книги, номер по плану, необходимое количество экземпляров и адрес, по которому должна быть отправлена заказанная литература.

Организации и предприятия оформляют заказы гарантийными письмами.

Прием предварительных заказов в магазине издательства прекращается за три месяца до выхода издания в свет.
