

АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ РОСЛИН ТА ГЕНЕТИКИ

На правах рукопису

ГУБАР
Олена Костянтинівна

ВИВЧЕННЯ КАРІОТИПІЧНОЇ МІНЛИВОСТІ КУЛЬТИ-
ВОВАНИХ КЛІТИН РОСЛИН НА ПРИКЛАДІ
CREPIS CAPILLARIS L. WALLR TA ZEA MAYS L.

03.00.15 —
генетика

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття вченого ступеню
кандидата біологічних наук

Київ 1992



00819774 (-)

Робота виконана в Інституті молекул
АН України (м. Київ)

Науковий керівник:

доктор біологічних наук
В. А. Кунах

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук
С. С. Малюта

кандидат біологічних наук
М. К. Павлова

Ведуча організація:

Інститут клітинної біології та
генетичної інженерії АН України

Захист відбудеться "19" листопада 1992 р. в 10⁰⁰ годин на засіданні
Спеціалізованої ради Д 016.57.01 в Інституті фізіології рослин та
генетики АН України (252022, Київ-022, вул. Васильківська, 31/17).

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці інституту

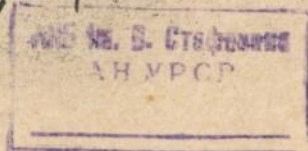
Автореферат розіславий "15" жовтня 1992 р.

Вчений секретар

Спеціалізованої ради

кандидат біологічних наук

В. А. Труханов



ЗАЧАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ПРАЦІ

Актуальність теми. Започаткування робіт по диференційному забарвленню хромосом рослин поширило можливості вивчення мінливості хромосом, яка відбувається в рослинних клітинах. Однак розроблені методики по диференційному забарвленню хромосом дозволяли проводити цитогенетичний аналіз лише в суспензійних культурах і були непридатні для вивчення процесів мінливості хромосом з калюсних культурах. В той же час, дослідження методами рутинного забарвлення не змогли дати відповідь на багато питань, пов'язаних з мінливістю в культурі *in vitro* (Bayliss, 1980). Розроблена нами модифікація методу диференційного забарвлення хромосом дозволила провести цитогенетичний аналіз хромосом в калюсних культурах. Була вивчена мінливість культивованих *in vitro* клітин на прикладі смородини (*Sorbus capillaris*) та кукурудзи (*Zea mays*).

Проведеними дослідженнями встановлено, що при культивуванні зміни зачіпляють не тільки число та морфологію хромосом, але й малюнок диференційного забарвлення. Встановлено, що навіть клітини, схожі з інтактними рослинами за числом та морфологією хромосом, зазнають змін, які виявляються в перерозподілі гетерохроматину. При цьому, в клітинах ризогенних штамів зберігається число та морфологія хромосом при змінненні малюнку С-бандів, тоді як в неорганізованому ростучому калюсі змінюється число, морфологія та малюнок диференційного забарвлення хромосом. Показано взаємозв'язок між ступенем генетичної гетерогенності культивованих клітин кукурудзи та характеристиками генотипу рослин, вихідних для одержання культури.

Подальший розвиток досліджень мінливості культивованих клітин за допомогою розробленої методики С-бандінгу та деяких морфометричних показників дозволить провести вивчення спрямованості мінливості в культурі *in vitro*, а також, можливо, вирішити питання про причини походження та еволюцію окремих хромосом, не характерних для вихідних інтактних рослин.

Метою цього дослідження було вивчення каріотипічної мінливості культивованих клітин смородини та кукурудзи в порівнянні з геномами інтактних рослин за допомогою сучасних методів хромосомного аналізу, а саме С-бандінгу.

Основними задачами були:

1. Розробити модифікацію методу диференційного забарвлення хромосом в культивованих клітинах рослин, яка б дозволяла виявля-

ти максимально можливу кількість блоків гетерохроматину та ідентифікувати хромосоми.

2. Прослідкувати мінливість каріотипу скредеи *Speris capillaris in vitro* в динаміці: від первинного калюсу до сформованого калюсного штаму.
3. Вивчити можливий зв'язок між вихідними характеристиками геному та ступенем генетичної гетерогенності культивованих клітин кукурудзи.

Наукова новизна та практична цінність праці.

В результаті проведеної роботи досліджена мінливість каріотипу культивованих клітин *Speris capillaris* у ризогенних та неорганізовано ростучих штамів. Виявлено взаємозв'язок між ступенем мінливості геному та типом росту культивованих клітин. Показано, що вихідні характеристики геному інтактних рослин, такі як кількість гетерохроматину та малюнок його розподілу, мають вплив на особливості поведінки клітин *in vitro*. Розроблені методи та отримані результати дозволяють глибше розібратись в особливостях соматоклональної мінливості. Приведені в роботі ідіограми диференційно забарвлених хромосом кукурудзи можуть бути використані для аналізу каріотипів різних форм кукурудзи.

Атробація праці. Матеріали цієї праці доповідались на IV Всесоюзній конференції "Культура клітин рослин та біотехнологія" (Київ, 1983 р.); на V з'їзді генетиків та селекціонерів України (Умань, 1986 р.); на 6-й та 7-й Всесоюзних нарадах "Структура та функції хромосом" (Пушино, 1988 р. та 1990 р.); на Міжнародному симпозіумі "Клітини та гени біотехнології для аеробних алаків" (Алма-Ата, 1989 р.); на Міжнародній конференції "Біологія культивованих клітин та біотехнологія" (Новосибірськ, 1988 р.); на VII Всесоюзному симпозіумі "Молекулярні механізми генетичних процесів" (Москва, 1990 р.).

Публікації. По матеріалах дисертації опубліковано 11 робіт.

Обсяг праці. Праця обсягом 118 сторінок машинописного тексту складається з вступу, чотирьох розділів, закінчення, висновків та списку використаної літератури (242 джерела). Експериментальні результати викладені в 4 таблицях та 25 малюнках.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

В роботі використовували інтактні рослини скредеи (*Speris capillaris* L. Wallr., $2n=6$) та кукурудзи (*Zea mays* L., $2n=20$), а

також культури тканин, отримані від цих рослин.

Досліджували два різогенних тривало культивованих штами скєреди (штам N7 - одержаний у 1978 році в нашому відділі з частин листочків двомісячної рослини на середовищі Еріксона (Eriksson, 1963); штам N403 - одержано нами в 1984 році з листочків двомісячних рослин на тому ж середовищі) та неорганізовано ростучий калюсний штам, одержаний нами з експлантатів листа на модифікованому середовищі Еріксона.

Для цитоаналізу використовували 4 форми кукурудзи, які належать до двох підвидів: цукрового (Акорд-72 та мітчик Мангельсдорфу) та зубовидного (ВІР-27 та ЧК-218). Для одержання калюсу кукурудзи використовували різні експлантати двотижневих проростків ліній ВІР-27 та ЧК-218. Одержували культуру тканин на модифікованих середовищах за Мурасіге та Скутом (Murashige, Skoog, 1962).

Мінливість геномів рослин та культивованих клітин вивчали на їх каріотипах, застосовуючи рутинне забарвлення, С-бендінг та вимірювання кількості ДНК.

Рутинне забарвлення та С-бендінг. Матеріал обробляли перед фіксацією 0.1% колхидином (кукурудза - 1.5 години, скєреда та культура тканин кукурудзи та скєреди - 2 години) при 26° С. Корінці рослин фіксували в суміші етанол-крижана оцтова кислота (3:1) протягом 4 годин; культивовані клітини - протягом доби. Для рутинного забарвлення матеріал фарбували оцтосерсеїном. Для диференційного забарвлення нами була розроблена модифікація методу, який застосовується для злаків (Большева та ін., 1985). Для кінчиків корінців та культур тканин скєреди проводили гідроліз 0.2 N HCl при 60°С протягом 3 хв., для кінчиків корінців кукурудзи - протягом 2 хв. Після гідролізу кінчики корінців скєреди та кукурудзи мацерували в суміші 0.2% целюліазу та 0.2% пектинази (1:1) протягом 2 год. при 26°С. Підібрати добрі умови мацерації для культур тканин скєреди не вдалось. Тому при виготовленні препаратів проводили тільки механічне подрібнення тканини та прогрівання в 45% оцтовій кислоті. Постійні давлені препарати з кінчиків корінців готували з суспензії клітин в 45% оцтовій кислоті. Препарати з культури тканин готували сильним роздавлюванням механічно подрібнених шматочків тканини в 45% оцтовій кислоті. Покривні скелєця знімали за допомогою рідкого азоту. Після зняття покривних скелєць препарати обезводнювали 12 год. в абсолютному спирті, потім не менш тижню висушували на повітрі. Сухі препарати

обробляли насиченим розчином гідроксиду барію при кімнатній температурі: корінці кукурудзи - 2 хв., корінці та культуру тканин скєреди - 5 хв. Після цього препарати ополіскували 1 н HCl і ретельно промивали водою. Чіткий С-бендінг як для препаратів кукурудзи, так і скєреди отримували при інкубуванні препаратів в розчині 2xSSC протягом години при 60°C. Зарбували препарати в 10% розчині барвінка Гімза (Merck, ФРН) в тріс-HCl буфері, рН 6.8. Скєльця з забарвленими препаратами промивали водою, висушували та поміщали в ентелан (Merck, ФРН).

Аналіз препаратів проводили на мікроскопі "Amplival" (НДР). Мікрофотографування виконували на плівці "Мікрат-300". Для аналізу метафазних пластинок використовували мікрофотографії з кінцевим збільшенням на позитивах 4000. Каріотипування проводили на основі малюнку диференційного забарвлення хромосом та відносних довжин плечей хромосом (Захаров, 1979; Навашин, 1985).

Кількість ДНК вимірювали в забарвлених за Сьольєном профазних ядрах клітин кінчиків корінців у лійні кукурудзи ВІР-27 та ЧІ-218. Інтегральну оптичну густину профазних ядер вимірювали на мікроденситометрі "Opton MSPO1" на 525 нм. Для перерахування умовних одиниць показань приладу в пікограми ДНК як еталон використовували ядра ярового жита Petkus spring (Bennett, Smith, 1976).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

1. Каріотипічна м'яливість - культивованих клітин *Sorghum capillaris*, яка виявляється методом С-бендінгу.

Каріотип скєреди складається з 3 пар хромосом - А, С, Д (Навашин, 1985). За допомогою С-методу диференційного забарвлення хромосом в метафазних пластинках кінчиків корінців виявлено 30 смуг конститутивного гетерохроматину (мал. 1а), тоді як в літературі є дані по каріотипу скєреди з 20-22 смугами гетерохроматину (Ashmore, Soula, 1981; Noguchi, Ohno, 1989). Всі три пари хромосом мають С-бенди, супутнича Д-хромосома має самий великий гетерохроматинний блок набору в проксимальній частині довгого плеча. Всі три пари хромосом мають центромерний гетерохроматин.

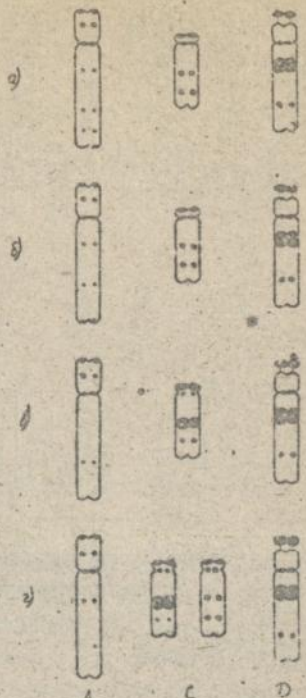
При аналізі первинного калюсу у всіх вивчених метафазах помітних відмін по числу та морфології хромосом та по розподілу С-смуг в порівнянні з інтактними рослинами не виявлено (мал. 1б). Напевно, це пояснюється тим, що на першому етапі культивування це

аберігається генетичний потенціал інтактноі рослини.

У тривало ростучоі ризогенноі культури при однаковій кількості та морфології хромосом малюнок диференційного забарвлення відрізнявся від інтактноі рослини (мал. 1в, г). Найбільш значні зміни в розподілі гетерохроматину спостерігали в С-хромосомах обох штамів. У штама N403 (мал. 1в) збільшився С-блок в дистальній частині довгого плеча та в термінальній частині короткого плеча хромосоми. У штама N7 (мал. 1г) виявлено поліморфізм по розміру обох смуг в довгому плечі С-хромосоми. Напевно, в обох С-хромосомах штаму N403 та одній хромосомі штаму N7 відбулась інверсія середньої ділянки довгого плеча, яка зачепила обидва С-блоки.

Таким чином, нами встановлено, що при культивуванні відбуваються перебудування хромосом навіть в диплоїдних клітинах, які беруть участь в процесах регенерації, де при рутинному забарвленні змін не спостерігається. Виходячи з морфології корінців, штама N7 більш подібний до корінців інтактноі рослини, що відповідає меншій мінливості каріотипу в порівнянні з штамом N403, який морфологічно більше відрізняється від корінців інтактноі рослини. Це дозволяє передбачити ще більшу мінливість у неорганізованс ростучих калосних штамів.

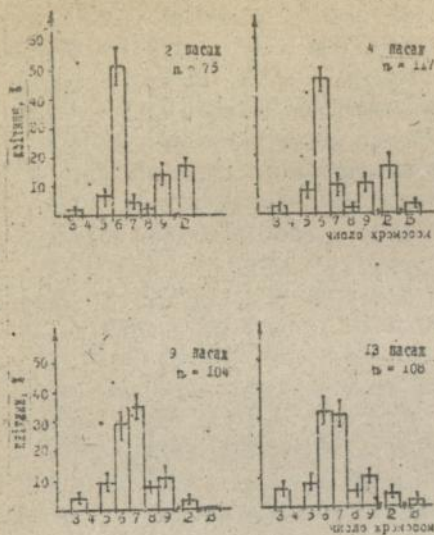
Одержати чіткий С-бендінг можна тільки зруйнувавши клітинну стінку. При цьому можлива втрата хромосом та поява метафаза з псевдоануплоїдним числом хромосом. Культивування само по собі



Мал. 1. Ідіограми каріотипів корінців та трьох штамів культури тканин скереди.

а - корінці, б - первинний калюс, в - штама N403, г - штама N7.

А, С, Д - пари хромосом



Мал. 2. Розподіл клітин за числом хромосом в культурі тканин *Speris capillarıs*. n - кількість проаналізованих метафаз.

феративного пулу (серед них 35.58% семихромосомних метафаз), вміст диплоїдів знизився до 32.61%. У 13 пасажі розподіл клітин за числом хромосом був подібний до розподілу в 9-ому пасажі.

Таким чином, через рік культивування до часу сформованого штаму культура тканин скереда являє собою популяцію міксоплоїдних клітин з переважною більшістю анеуплоїдних каріотипів. Найбільшу гетерогенність анеуплоїдних каріотипів спостерігали в перші 4-6 пасажів культивування, а наприкінці першого року розмах мінливості зменшувався.

При застосуванні С-бендінгу смуги гетерохроматину спостерігали у всіх хромосомах, як з незмінною морфологією, так і в тих, які зазнали морфологічних змін.

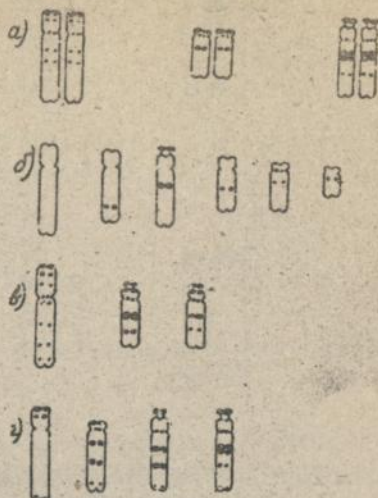
У 2-му пасажі ще зустрічали пластинки (10%), подібні за морфологією хромосом та малюнком їх забарвлення до метафаз інтактної

приводить до виникнення анеуплоїдів. Тому для визначення хромосомних чисел в неорганізовано ростучому калксі застосовували рутинне забарвлення. Аналіз проводили двома методами паралельно в 2-ому, 4-ому, 9-ому та 13-му пасажі.

Методами рутинного забарвлення встановлено, що вже у 2-му пасажі штаму скереда являє собою популяцію міксоплоїдних клітин з переважною кількістю (50.6%) диплоїдів (мал. 2). У 4-ому пасажі основний пул клітин, що діляться, також представляли диплоїди (46.15%), поліплоїди склали 26%, кількість анеуплоїдів зростає до 21%. Після 9 місяців культивування (9 пасаж) анеуплоїдні клітини склали більше 45% пролі-

Мал. 3. Ідіограми каріотипів, які зустрічаються при культивуванні неорганізовано ростучого калкосу скереда.

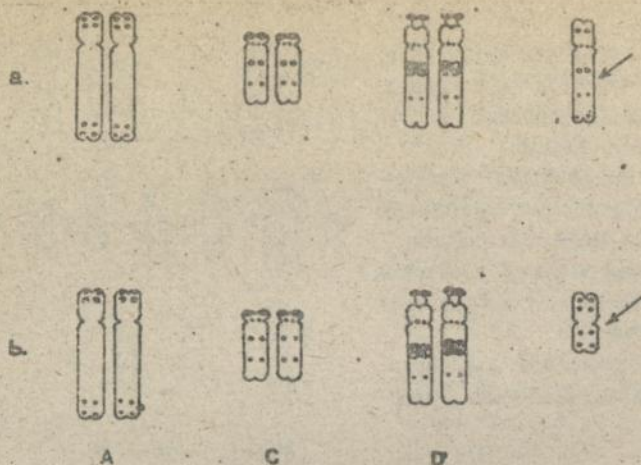
- а - шестихромосомна пластинка, морфологічно подібна до метафази інтактних рослин,
- б - шестихромосомна пластинка із зміненою морфологією хромосом,
- в - трьоххромосомна пластинка,
- г - чотирьоххромосомна пластинка.



рослини, в 4-ому пасажі таких метафаз не спостерігали. В цих двох пасажах серед проаналізованих шестихромосомних метафаз зустрічалися як пластинки зі зміненою морфологією хромосом, так і морфологічно подібні до метафаз інтактних рослин, але які відрізнялися за малюнком С-бандів (мал. 3а, б). Зустрічали анеуплоїдні пластинки в яких, виходячи з морфології хромосом та малюнку С-бандів, було важко визначити до якого типу відноситься та чи інша хромосома (мал. 3б, в, г). Спостерігали як крупні акроцентричні хромосоми, близькі за розмірами до А-хромосом, так і дрібні хромосоми, які по довжині дорівнювали половині С-хромосоми.

У 9-ому пасажі збільшилась кількість семихромосомних анеуплоїдних метафаз. Вони склали біля 60% від загальної кількості проаналізованих клітин, які поділялись. При цьому 6 хромосом такого семихромосомного набору були подібні за морфологією до хромосом інтактних рослин, а додаткова сьома хромосома зустрічалась двох типів (мал. 4): 1 - великий акроцентрик, близький за розміром до А-хромосоми набору; 2 - метацентрик, близький за розміром до С-хромосоми. Ці два типи семихромосомних метафаз зустрічались з однаковою частотою.

Шестихромосомні метафази мали такі ж відмінні в малюнку за-



Мал. 4. Ідіограми каріотипів домінуючої популяції клітин в культурі тканин *Scorpiis scarpillarıs* у 9-ому пасажі.

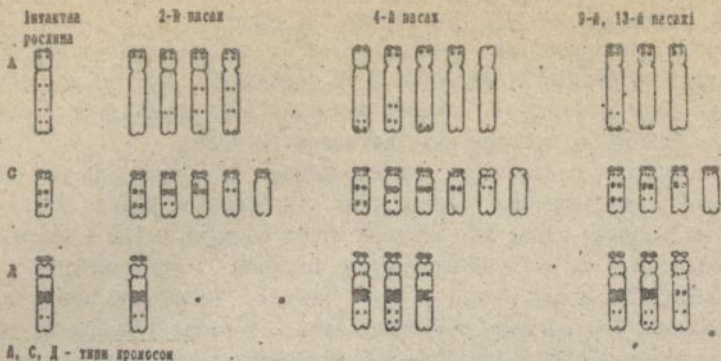
- а - з додатковою акроцентричною хромосомою,
 б - з додатковою метацентричною хромосомою.

барвлення, як описано вище для 2-го та 4-го пасажів.

Картина каріотипічної мінливості, яку спостерігали в 13 пасажі, подібна до такої в 9-ому пасажі.

Відомо, що через деякий час культивування спостерігається домінування одного-трьох каріотипів (Bayliss, 1973; Кунах, 1979), що дозволяє зробити припущення про існування адаптивних змін геному культивованих *in vitro* клітин. Як і в випадках, описаних для скереди в інших роботах (Ashmore, Gould, 1931; Ikeda-Komatsu, Tanaka, 1983; Каллак та ін., 1987), нами показано, що і в калусній культурі домінуючими виявились семихромосомні каріотипи.

Відомо, що порушення геному більш легко переносяться поліплоїдними клітинами, оскільки втрата хроматину у них приводить до меншого генного дисбалансу ніж така ж втрата в диплоїдних клітинах. Можна припустити, що анеуплоїдія в культурі тканин скереди виникла через лоплоїдію, а потім порушення поділу, такі як відставання хромосом в анафазі, хромосомні мости, мультиполлярні поділи. Поліплоїдія притаманна і для інтактних рослин скереди (Na-



А, С, Д - типи хромосом

Мал. 5. Основні типи С-бендінгу у морфологічно незмінених хромосомах культивованих клітин *Steris capillaris*.

vashin, 1926). Значний відсоток появи тетраплоїдних клітин на початку культивування (16.2%) підтверджує походження знеуплоїдів через поліплоїдію.

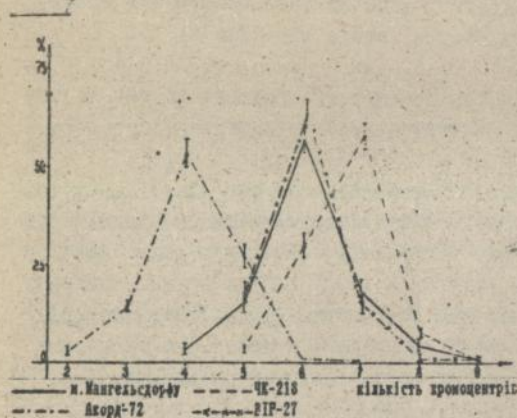
В процесі культивування при збереженні морфології хромосом спостерігалась велика різноманітність малюнків їх диференційного забарвлення (мал. 5). В першу чергу зміни зачіпляли довгі плечі у всіх трьох типах хромосом і тільки в 4-ому пасажі зміни в малюнку забарвлення зачіпляли і малі плечі хромосом. Треба також підкреслити, що найбільш нестабільною хромосомою набору в наших дослідженнях була С-хромосома, найбільш стабільною - супутнича Д-хромосома.

Таким чином, нами вперше досліджена мінливість каріотипу *Steris capillaris in vitro* в динаміці від первинного калусу до сформованого калусного штаму, застосовуючи метод С-бендінгу. Показано, що в процесі уведення в культуру відбувається швидка реорганізація геному, яка приводить до виникнення змінених каріотипів. При культивуванні відбувається зміни і в хромосомах диплоїдних клітин, в яких при рутинному забарвленні змін не спостерігали. Показано також, що штами з різним ступенем диференціації відзначаються за розмахом мінливості. В клітинах ризогенних штамі зберігається без змін число та морфологія хромосом при зміні малюнка С-бендів, тоді як у неорганізовано ростучому штамі змінюється число, морфологія та малюнок С-бендів.

2. С-бендінг та культура тканин *Zea mays*.

Метою наших досліджень на кукурудзі було вивчення за допомогою методу С-бендінгу каріотипів та складання ідіограм хромосом чотирьох форм кукурудзи, а також вивчення впливу вихідних характеристик геному на процеси культивування *in vitro*.

Різницю між генотипами, що вивчалися, було виявлено вже при дослідженні диференційно забарвлених інтерфазних ядер. У лінії ВІР-27 переважали ядра, які містили шість великих чітко виражених хромоцентрів, у лінії ЧК-218 ядра містили 7 хромоцентрів. У мітчика Мангелсдорфу, як і у лінії ВІР-27, переважно зустрічались клітини, які містили 6 хромоцентрів. У гібриду Акорд-72 переважали клітини, що містили по 4 блоки гетерохроматичу (мал. 6).



Мал. 6. Розподіл інтерфазних ядер за числом хромоцентрів у різних генотипах кукурудзи.

Всі хромосоми лінії ВІР-27 по малюнку їх диференційного забарвлення можна розподілити на 2 групи (мал. 76): Першу групу складають хромосоми 1, 6, 7, та 8-ої пар, які мають великі гетерохроматинові блоки. До другої групи (2, 3, 4, 5, 9 та 10 пари) належать хромосоми, що не мають великих гетерохроматинових сегментів.

У мутантної лінії ЧК-218, одержаної від лінії ВІР-27 при застосуванні мутагену, спостерігали зміни у вмісті гетерохроматину, що вже виявлялось при аналізі інтерфазних ядер (мал. 6). Якщо порівнювати метафазні пластинки, видно зростання кількості гетерохроматину за рахунок появи у всіх хромосомах центромерного гетерохроматину, збільшення великих теломерних блоків та появи но-

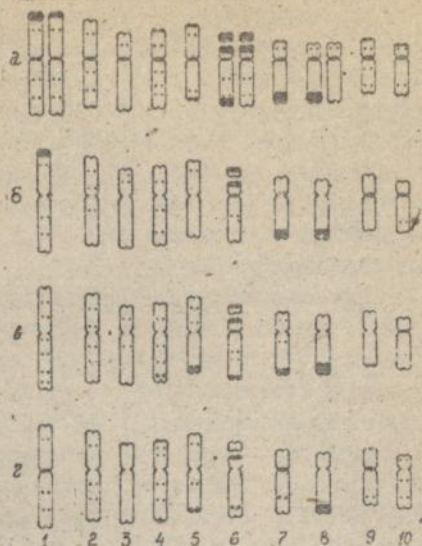
Мал. 7. Ідіограми каріотипів чотирьох форм кукурудзи.

а - ЧК-218,

б - ВІР-27,

в - мітчик Мангельсдорфу,

г - Акорд-72



вих інтеркалярних блоків (мал. 7а): у лінії ЧК-218 виявлено 22 інтеркалярних блоки, тоді як у лінії ВІР-27 - 14 в перерахунок на гаплоїдний геном. У лінії ЧК-218 в короткому плечі 1-ої пари хромосом та в довгих плечах 6-ої та 8-ої пар виявлено гетероморфізм за розміром та наявністю великого теломерного сегменту.

В інтерфазних ядрах лінії ВІР-27 та мітчику Мангельсдорфу зустрічали переважно по 6 блоків гетерохроматину (мал. б), але при вивченні хромосомних наборів виявлено різницю і між цими лініями по малюнку диференційного забарвлення (мал. 7в). Великі блоки гетерохроматину знайдені в 5-й, 6-й та 8-й парах хромосом. Супутничного гетерохроматину у цієї лінії було значно менше, ніж у лінії ВІР-27. Відрізнялись ці дві лінії по кількості та розподілу інтеркалярного гетерохроматину.

Акорд-72 мав малу кількість гетерохроматину, що вже було видно з невеликої кількості гетерохроматинових блоків в інтерфазних ядрах (мал. б). Великий блок теломерного гетерохроматину в довгому плечі мала тільки 8-а пара хромосом (мал. 7г). Акорд-72 єдина з досліджених форм, яка мала негетерохроматинизований супутник в 6-й парі хромосом та найменш виражений ядерцетворюючий район.

Для того, щоб зв'язувати з чим зв'язана мінливість в кількості та розподілі гетерохроматину, було проведене мікрофотометричне визначення кількості ДНК в забарвлених за Фольгенем профазних ядрах кінчиків корінців ліній ВІР-27 та ЧК-218. Ці лінії найбільш цікаві серед звичених через те, що одержані одна з іншою за допомогою мутагенної обробки при відсутності гібридизації. Дані морфометричного аналізу показали, що збільшення вмісту гетерохроматину у мутантної лінії ЧК-218 не приводило до зміни загального вмісту ДНК.

Для вивчення впливу характеристик геному західних рослин на процеси культивування *in vitro* були відібрані споріднені лінії кукурудзи ВІР-27 та ЧК-218, які суттєво відрізнялись по вмісту та розподілу гетерохроматину. У лінії ЧК-218 калус був одержаний на всіх типах експлантатів, частота калусоутворення була високою на всіх вивчених живильних середовищах і в середньому перевищувала 60%. Для лінії ВІР-27 необхідною умовою формування калусу була присутність в живильному середовищі як ауксину, так і кінетину. Середня частота калусоутворення у лінії ВІР-27 була менше 23%. Інтенсивність росту культивованих клітин лінії ВІР-27 була в два рази нижча, ніж у клітин лінії ЧК-218. Цитогенетичний аналіз на перших етапах культивування показав більшу стабільність культури тканин, одержаної від лінії ВІР-27 (мал. 8). В процесі культивування плідність калусних тканин лінії ВІР-27 суттєво не змінювалась, залишаючись диплоїдною. В калусних тканинах лінії ЧК-218, в той же час, частка поліплоїдних клітин значно зменшувалась і в 5-ому пасажі лінії істотно не відрізнялись по розподілу клітин за числом хромосом (мал. 8).

Таким чином, в нашій роботі кожна з проаналізованих форм кукурудзи мала свій малюнок розподілу гетерохроматину (мал. 7), який дозволив відрізнити каріотиби ліній один від одного. Цю різницю в кількості гетерохроматину можна помітити вже при аналізі гетерохроматинових блоків в інтерфазних ядрах - кожна з ліній мала властиву їй кількість блоків гетерохроматину (мал. 8).

Порівняння хромосом 4-х звичених генотипів по наявності у них різних смуг гетерохроматину показало, що вивчені форми мають широкий поліморфізм по розміру та наявності блоків гетерохроматину майже у всіх хромосомах кукурудзи. Найбільш стабільними серед вивченого матеріалу були теломерні блоки короткого плеча 6-ї хро-

Мал. 8. Розподіл клітин за числом геномів в культурі тканин кукурудзи.

а - ЧК-218, б - ВІР-27.

П - первинний калус,

I, V - номер пасажу.

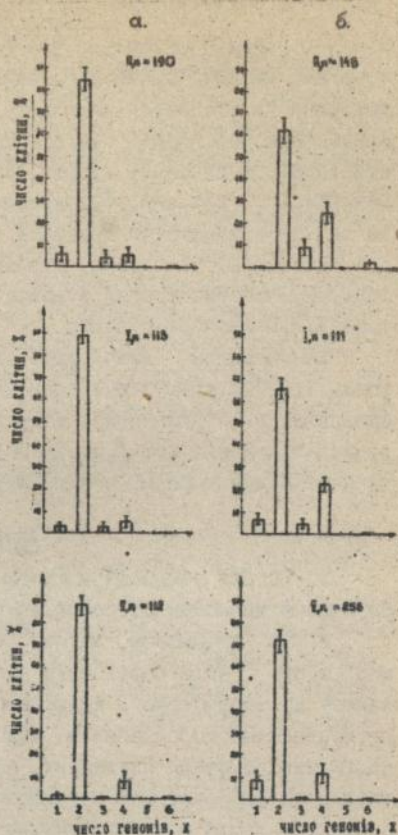
n - кількість вивчених метафаз.

мосоми (ядерцеутворюючий район) та теломерний блок довгого плеча 8-ї хромосоми.

Збільшення кількості гетерохроматину у мутантній лінії ЧК-218 не привело до збільшення загального вмісту ДНК у порівнянні з вихідною лінією ВІР-27. Можна припустити, що мутагенна дія викликала зменшення вмісту одних послідовностей з одночасним збільшенням інших. Підтвердженням цьому може бути виявлений гетероморфізм за малюнком диференційного забарвлення у 1-й, 6-й та 8-й парах хромосом, в яких пройшла редукція теломерного гетерохроматину при одночасному збільшенні інших

блоків, зокрема ядерцеутворюючого району. Явно збільшується центромерний гетерохроматин, який по складу ДНК відрізняється від іншого, як це було раніше показано для кукурудзи (Horn, Walden, 1971; Ward, 1980).

Цікаво проаналізувати, яким чином впливає різниця в малюнку розподілу С-бандів та в кількості гетерохроматину на калусоутворення та пасований ріст культури тканин. Експериментально одержана з гомозиготної лінії ВІР-27 мутантна лінія ЧК-218 значно перевищувала по інтенсивності калусоутворення вихідний матеріал (най-



менша різниця достовірна при $P < 0.01$). Для цієї лінії калус було одержано на всіх типах експлантатів, тоді як для лінії ВІР-27 листовий та стебловий калуси не вдалося одержати на жодному з використаних середовищ. Цитогенетичний аналіз показав більшу стабільність вихідної лінії ВІР-27 у порівнянні з мутантною формою ЧК-218, для якої був виявлений спалах хромосомної мінливості на перших етапах культивування.

Визначені між двома вивченими лініями відмінності в поведінці калусних тканин зумовлені, напевно, різними кількостями та розподілом гетерохроматину.

Таким чином, метод диференційного забарвлення хромосом дозволив ідентифікувати всі пари хромосом в наборі за малюнком їх забарвлення і таким чином відрізнити каріотиби різних ліній кукурудзи. Викладені тут підходи можуть бути використані для виявлення нестабільних форм, у яких йдуть процеси формування.

ВИСНОВКИ

1. Вперше розроблена модифікація С-методу диференційного забарвлення хромосом стосовно до культивованих клітин рослин.

2. За допомогою методу С-бендінгу досліджена мінливість каріотипу *Sorghum setigerum* in vitro в динаміці від первинного калусу до сформованого калусного штаму. Встановлено, що протягом четвертого-шостого пасажів відбувається спалах мінливості, який приводить до появи численних варіантів каріотипів із зміненим числом та морфологією хромосом, а також із змінами малюнка С-бендів. Після року культивування, до періоду сформованого штаму, модальний клас клітин, що діляться, складають два семихромосомних каріотиби. Показано, що в геномі *Sorghum setigerum* найбільш мінливою була С-хромосома набору, найменш — супутнича Д-хромосома.

3. Виявлено взаємозв'язок ступеню мінливості та типу росту культивованих клітин *Sorghum setigerum*. Показано, що клітини ризогенних штамів зберігають число та морфологію хромосом при зміні малюнка С-бендів, в той час як у неорганізованому ростучому калусі змінюється число, морфологія і малюнок диференційного забарвлення хромосом.

4. За допомогою розробленого варіанту С-методу диференційного забарвлення хромосом проведено хромосомний аналіз: вперше складені у відповідності до генетичної номенклатури хромосом іди-

ограми каріотипів чотирьох форм кукурудзи. Встановлено, що кожна форма має індивідуальний малюнок С-бандів.

Б. Порівняння двох споріднених ліній кукурудзи, одержаних одна від іншої методом експериментального мутагенезу, показало, що у каріотипі похідної лінії збільшилась кількість гетерохроматину у порівнянні з вихідною лінією при збереженні загального вмісту ДНК.

В. Показано взаємозв'язок ступеню генетичної гетерогенності культивованих клітин кукурудзи та характеристиками генотипу рослин, вихідних для одержання культури тканин. Встановлена між двома лініями (ВІР-27 та ЧК-218) різниця за інтенсивністю калусоутворення, приростом біомаси та розмахом хромосомної мінливості культивованих клітин обумовлена, ймовірно, різною кількістю та різним розподілом гетерохроматину в хромосомах вихідних рослин.

Список праць, опублікованих за матеріалами дисертації:

1. Савченко (Губарь) Е. К., Бадаєва Е. Д., Кунах В. А., Бадаєв Н. С. Каріотипический полиморфизм родственных линий кукурузы // Докл. АН УССР. Сер. В. - 1982. - №7. - С. 74-76.

2. Савченко (Губарь) Е. К. Сравнительная характеристика культуры тканей двух родственных линий кукурузы, различающихся по количеству гетерохроматина // Культура клеток растений и биотехнология. Тез. докл. IV Всесоюз. конф., Кишинев, 1983. - Кишинев: Штиинца, 1983. - С. 176-177.

3. Kunakh V. A., Savchenko (Gubar) E. K. Chromosomal behaviour peculiarities in two related stocks of maize in vitro // Intern. symp. on genetic manipulation in crops. III Intern. symp. on haploidy. I Intern. symp. on somatic cell genetics in crops. (Beijing, 22-26 October 1984). Abstracts. - China: 1984. - P. 62.

4. Савченко (Губарь) Е. К., Бадаєва Е. Д., Войко Е. В. и соавт. Каріотипический анализ различных генотипов кукурузы // Генетика. - 1986. - Т. 22, №1. - С. 85-101.

Б. Савченко (Губарь) Е. К., Кунах В. А. Сравнительная характеристика культуры тканей двух родственных линий кукурузы, различающихся по количеству гетерохроматина // Культура клеток растений и биотехнология. - М.: Наука, 1986. - С. 214-218.

В. Губарь Е. К., Алхимова Е. Г., Захляк О. В., Кунах В. А. Изучение культуры тканей *Crepis capillaris* при использовании

обычного и С-метода окрашивания хромосом //V Съезд УОГиС, Умань, 1986. Теа. докл. - Киев: Наук. думка, 1986. - Ч.1. - С.161-162.

7. Губарь Е. К., Кунах В. А. Изменения в распределении гетерохроматина в хромосомах диплоидных клеток *Crepis capillaris* L. Wallr в культуре *in vitro* //Докл. АН УССР, Сер. Б. - 1988. - №9. - С. 66-69.

8. Губарь Е. К. Изучение культуры тканей *Crepis capillaris* с использованием С-метода окрашивания хромосом //Биология культивируемых клеток и биотехнология. Теа. докл. Межд. конф., Новосибирск, 1988. - Новосибирск: 1988. Ч.1. - С. 22.

9. Кунах В. А., Губарь Е. К., Соловьян В. Т. Геномная изменчивость культивируемых клеток *Crepis capillaris* //Молекулярные механизмы генетических процессов. Теа. докл. VII Всесоюз. симп., Москва, 1990. - Москва: 1990. - С. 158-159.

10. Губарь Е. К. Кариотипическая изменчивость неорганизованно растущего каллуса *Crepis capillaris* //VI Съезд УОГиС, Полтава, 1992. Теа. докл. - Киев: 1992. - Т.3. - С. 144-145.

11. Губарь Е. К., Кунах В. А. Кариотипическая изменчивость культивируемых клеток скерды (*Crepis capillaris* L. Wallr) //Генетика. - 1992. - Т.28, №6. - С.51-61.

Огул

Підп. до друку 07.10.92. Формат 60x84/16. Пап. офс. № 2. Офс. друк.
Ум. друк. арк. 0,93. Ум. фарбо.-відб. 1,16. Обл.-вид. арк. 0,96. Тираж
100 экз. Зам. 620. Безкоштовно.

ІЕЗ Ім.Е.О.Патона. 252650 Київ 5, МСП, вул. Горького, 69.
ПОД ІЕЗ Ім.Е.О.Патона. 252650 Київ 5, МСП, вул. Горького, 69.

АНС №. 6. СТОРОНА
АНУРС

468533

AB 25.952