

*Биология*

УДК 581.6.633.11

Р.Р. ВАРДАПЕТЯН, А.Б. КИРАКОСЯН, С.Г. ТИРАЦУЯН, Г.А. ПАНОСЯН

**ПАРАМЕТРЫ РОСТА КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР  
НЕКОТОРЫХ СОРТОВ ПШЕНИЦЫ**

Исследован ряд кинетических параметров роста клеточных культур некоторых сортов пшеницы. Обнаружено сходство между клеточными культурами, полученными из сортов Безостая I и Ахтамар. На примере сахарозы показаны способы расчета кривых утилизации мажорных компонентов питательной среды. Предложены параметры, позволяющие наиболее эффективно отбирать сорта для культивирования в биореакторах. Сделан вывод о связи между исследованными кинетическими параметрами и генетическими особенностями донорских сортов.

Получение регенерантов культуры тканей и клеток, а также жизнеспособных соматических гибридов невозможно без оптимизаций условий выращивания клеточных культур в биореакторах различного действия.

Проблема усложняется также в связи с тем, что в определенные периоды роста культур клеток в реакторах периодического действия или после возмущений в проточных реакторах непрерывного действия популяции клеток находятся в переходном состоянии, кинетика которого может оказаться весьма сложной. При этом необходимо учитывать, что кинетические параметры клеточных культур могут быть обусловлены как условиями пассирования, так и генетическими особенностями каждого сорта [1, 2].

До настоящего времени имеются лишь единичные работы об успешном получении культуры тканей и клеток злаковых, в частности пшеницы [3, 4], что обусловлено в основном сложностью культивирования.

Целью настоящей работы было исследование некоторых кинетических параметров клеточных культур, полученных из различных сортов пшеницы.

Материалы и методика. Соматические эмбрионы получили из скutelлиарного каллуса 4-дневных проростков семян пшеницы сортов Безостая 1, Наир 40, Армянка 60 и Ахтамар; все репродукции 1990 г.

Семена стерилизовали в течение 30 мин. в 96% эталоне, 2 раза промывали в стерильной воде, добавляя 1% кальций-гипохлорид, инкубировали 30 мин. и повторно 3 раза промывали в стерильной воде. Полученные стерильные семена проращивали в стерильном термостате при 27°C 4 дня.

Обрезки из каждого экспланта 0,4 - 1 г индивидуально инкубировали в 1 мл среды MS [5], далее разрезали на 3-10 частей по 0,1 г и продолжали инку-

бировать в 100 мл колбах Эрленмейера в 5 мл среды MS на качалке при 24°C 125 кач/мин. под освещением 200 лк.

Для инициации клеточной суспензии использовали среду MS, содержащую 1 г/л гидролизата казеина (MERCK, кислотно-гидролизированный, свободный от витаминов), 2 мг/л 2,4 Д (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота, SIGMA), 250 мг/л мезо-инозитола (SIGMA), 1 мг/л тиамин (SIGMA) и 30 г/л сахарозы. Все растворы были отфильтрованы, стерилизованы и доведены до значения pH - 5,8 при добавлении 0,1 М КОН.

Образование клеточной суспензии протекает в три этапа.

I этап: 1-4 часа - начинается разрушение каллуса, пролиферация наружной клеточной стенки и разделение нитей каллуса.

II этап: 4-24 часа - отделение отдельных клеток и клеточных кластеров, формирование гетерогенной клеточной суспензии.

III этап: 12-48 часа - постепенный переход сначала в гомогенную фазу, а в последующем в гомогенную культуру.

Через 48 часов на клеточную суспензию добавляли 30 мл свежей среды MS. Через 7 дней проводили пересев клеточной культуры по 10 мл в новую питательную среду. При этом клеточная культура сохраняет способность к регенерации до 8 месяцев. Клеточную культуру отделяли от каллуса через 48 часов фильтрованием.

Морфогенетический контроль проводили проверкой способности культуры к повторной трансформации в проростки. Для этого на клеточную культуру в основной среде добавляли 2,5 мг/л 2,4 Д, 0,5 мг/л зеатина, 0,5 мг/л ГК 3 и 0,25 мг/л абсциссовой кислоты, далее переводили на среду, содержащую агар морских водорослей (0,8 г/л). Все среды стерилизовали. Культуру клеток инкубировали при 24°C 16 часов светового дня в течение 2-х недель до прорастания.

Концентрацию клеточной культуры в 1 мм<sup>3</sup> и дисперсию клеток считали на автоматическом счетчике клеток "Целлоскоп - 101" (Швеция). Для этого 1 мл суспензии разбавляли 45 раз в 1,42 н раствора KCl. Для калибровки "Целлоскопа - 101" полученные данные сопоставляли с результатами замеров, полученными на камере Горяева, помещаемой на универсальный исследовательский микроскоп "МБИ-6".

Для исключения возможных систематических ошибок при исследовании параметров клеточного роста пересев в новую питательную среду проводили таким образом, чтобы к 0 часу во всех культурах были примерно равные исходные концентрации клеток.

Результаты и обсуждения. Кинетические параметры роста определяли в первые 24 ч проращивания с замерами клеточных концентраций через каждый час. Для получения максимально приближенных кинетических кривых роста к реальным полученным данным замеров обрабатывали методом сплайн-интерполяции [6]:

$$x_t = ax_{t-2} + bx_{t-1} + cx_t + bx_{t+1} + ax_{t+2}, \quad (1)$$

где  $x_t$  - концентрация клеток в момент  $t$ ;  $a$ ,  $b$  и  $c$  - "весовые" коэффициенты, равные 0,1; 0,2 и 0,4 соответственно,  $t$  - время проращивания.

Полученные значения  $x_t$  анализировались исходя из следующих принципов. Как известно, увеличение числа клеток в экспоненциальной фазе может быть описано уравнением

$$\frac{dx}{dt} = \mu x, \quad \frac{1}{x} - \frac{dx}{dt} = \mu, \quad (2)$$

причем  $x = x_0$  при  $t = t_{lag}$ .

Таким образом скорость увеличения  $x$  пропорциональна  $x_0$ . Интегрируя уравнения (2), получаем

$$\ln \frac{x}{x_0} = \mu (t - t_{lag})$$

или

$$x = x_0 e^{\mu (t - t_{lag})} \quad (3)$$

при  $t > t_{lag}$ .

Отсюда следует, что время, необходимое для удвоения численности популяции клеток, составляет

$$\bar{t}_d = \frac{\ln 2}{\mu}. \quad (4)$$

При учете ингибирующего фактора кривую роста можно характеризовать уравнением логистической кривой [7]:

$$x_t = \frac{x_0 e^{\mu (t - t_{lag})}}{1 - \beta x_0 (1 - e^{\mu (t - t_{lag})})}, \quad (5)$$

где  $\beta = \frac{1}{x_s}$  ( $x_s$  – концентрация биомассы в стационарной фазе), а  $\mu$  – коэффициент клеточного роста.

Преобразуя уравнения (5), получаем

$$\ln \left( \frac{x_t / x_s}{1 - x_t / x_s} \right) = \mu (t - t_{lag}) - \ln(x_t / x_0 - 1) \quad [8]. \quad (6)$$

Нетрудно видеть, что, определив экспериментально  $x_s$ , можно затем по графику зависимости  $\ln \left( \frac{x_t / x_s}{1 - x_t / x_s} \right)$  от  $t$  найти  $\mu$ , а подставив значения  $\mu$  в уравнение (3), определить  $t_{lag}$ .

Вышеприведенные уравнения позволяют также определить  $t_{lag}$ . Исходя из условия

$$x_0 e^{\mu (t_{lag} / 2 - t_{lag})} = \frac{x_0 e^{\mu (t_{lag} / 2 - t_{lag})}}{1 - \beta x_0 (1 - e^{\mu (t_{lag} / 2 - t_{lag})})} = x_0 \quad (7)$$

путем несложных преобразований получаем

$$\beta x_0 (e^{\mu (t_{lag} / 2 - t_{lag})} - 1)^2 = 1 \quad (8)$$

Таблица 1

Динамика изменений параметров  $\theta$  и  $\mu$  в процессе прорастания культур клеток различных сортов пшеницы

Сорта пшеницы время прорастания /час/	Безостав 1			Наири 40			Армянка 60			Ахтмар		
	С клеток	$\theta$	$\mu$	С клеток	$\theta$	$\mu$	С клеток	$\theta$	$\mu$	С клеток	$\theta$	$\mu$
0	27	0.000	-	45	0.000	-	45	0.000	-	24	0.000	-
1	27	0.000	-	45	0.000	-	45	0.000	-	24	0.000	-
2	27	0.000	-	45	0.000	-	45	0.000	-	24	0.000	-
3	43	0.011	0.5026	45	0.000	-	46	0.001	0.4779	24	0.000	-
4	69	0.030	0.4945	45	0.000	-	67	0.018	0.4341	24	0.000	-
5	108	0.058	0.4910	57	0.008	0.2960	98	0.044	0.4171	24	0.000	-
6	168	0.101	0.4894	73	0.020	0.2800	136	0.075	0.3988	24	0.000	-
7	254	0.162	0.4887	94	0.034	0.2740	199	0.128	0.4087	24	0.000	-
8	372	0.246	0.4882	120	0.053	0.2720	275	0.191	0.4067	24	0.000	-
9	519	0.351	0.4876	153	0.076	0.2700	371	0.271	0.4061	24	0.000	-
10	688	0.472	0.4874	193	0.104	0.2690	482	0.363	0.4047	24	0.000	-
11	859	0.594	0.4870	242	0.138	0.2680	605	0.465	0.4044	24	0.000	-
12	1014	0.704	0.4867	300	0.179	0.2680	729	0.568	0.4039	24	0.000	-
13	1141	0.795	0.4864	368	0.227	0.2670	845	0.664	0.4035	35	0.008	0.5608
14	1237	0.864	0.4865	445	0.281	0.2670	946	0.748	0.4031	58	0.024	0.5483
15	1304	0.911	0.4862	531	0.341	0.2670	1028	0.816	0.4027	97	0.052	0.5451
16	1349	0.944	0.4859	623	0.406	0.2660	1092	0.870	0.4025	159	0.096	0.5427
17	1379	0.965	0.4851	719	0.473	0.2664	1140	0.909	0.4027	253	0.163	0.5424
18	1398	0.978	0.4872	816	0.541	0.2661	1174	0.938	0.4024	385	0.257	0.5418
19	1409	0.986	0.4852	910	0.607	0.2659	1198	0.958	0.4023	553	0.377	0.5412
20	1416	0.991	0.4832	998	0.669	0.2658	1215	0.972	0.4027	743	0.512	0.5410
21	1421	0.995	0.4846	1079	0.726	0.2658	1226	0.981	0.4018	928	0.645	0.5406
22	1424	0.997	0.4857	1150	0.775	0.2657	1234	0.987	0.4023	1087	0.757	0.5405
23	1425	0.998	0.4744	1211	0.818	0.2655	1239	0.992	0.4012	1207	0.842	0.5403
24	1426	0.999	0.4678	1263	0.855	0.2655	1242	0.994	0.3974	1290	0.901	0.5399
24 + t <sub>128</sub>	1428	1.000	0.4286	1392	0.945	0.2650	1247	0.998	0.3897	1428	1.000	0.4962
48 + t <sub>128</sub>	1428	1.000	0.2456	1470	1.000	0.2356	1249	1.000	0.2178	1428	1.000	0.2481

или

$$e^{\mu(t_{10g}/2 - t_{1ag})} - 1 = \sqrt{1/\beta x_0} = \sqrt{x_1/x_0}, \quad (9)$$

$$t_{10g}/2 - t_{1ag} = \ln(\sqrt{x_1/x_0} + 1) / \mu, \quad (10)$$

где  $t_{10g}$  показывает интервал логарифмического роста численности клеток.

Если в нулевой момент времени концентрация субстрата равна  $a_0$ , то полная утилизация субстрата будет при

$$a_0 = \frac{K_s}{\mu}(x_1 - x_0) \quad \text{или} \quad K_s = \frac{a_0 \mu}{x_1 - x_0}, \quad (11)$$

где  $K_s$  – коэффициент утилизации.

Отсюда следует, что утилизацию субстрата можно определить из уравнения

$$a_t = \frac{K_s(x_1 - x_0)}{\mu t}. \quad (12)$$

Сравнительный анализ параметров роста культур клеток зачастую бывает затруднен из-за разного исходного количества клеток в среде и неодинаковой концентрации в стационарной фазе. Поэтому для сравнительного анализа кривых роста нами был введен масштабирующий параметр  $\theta$ , определенный из уравнения

$$\theta_t = \frac{x_1 - x_0}{x_2 - x_0} \quad (13)$$

где  $\theta$  – параметр масштабирования.

В табл. 1 приведены концентрации, параметры  $\theta$  и  $\mu$  культур клеток сортов пшеницы Безостая 1, Наири 40, Армянка 60 и Ахтамар. Как видно из таблицы, в процессе развития клеточной культуры коэффициент клеточного роста  $\mu$  претерпевает значительные изменения и падает до минимального значения в стационарной фазе.

Сравнение масштабированных кривых роста культур клеток исследованных сортов пшеницы приведены на рис. 1. Как видно из рисунка, формы кинетических кривых у культур клеток сортов Безостая 1, Армянка 60 и Ахтамар практически не отличаются.

Иная картина наблюдается у клеточной культуры сорта Наири 40. Ее кинетическая кривая является достаточно полой, что указывает на общую низкую скорость роста численности популяции.

Дополнительный интерес вызывает сравнение точек  $t_{\theta, 0.5} - t_{1ag}$ , т.е. времени, при котором рост популяции достигает своего половинного значения. Результаты этих расчетов приведены в таблице 2, из которой следует, что наиболее близкими друг к другу по своим свойствам являются клеточные культуры сортов Безостая 1 и Армянка 60. Представляется также интересным сравнение параметров  $\theta_{t_{10g} + t_{1ag}}$  (табл. 2). Этот параметр показывает долю клеточной популяции, растущей в логарифмической фазе. Как видно из табл. 2, наиболь-

шая способность к логарифмическому росту проявляется у клеточной культуры сорта Безостая 1.

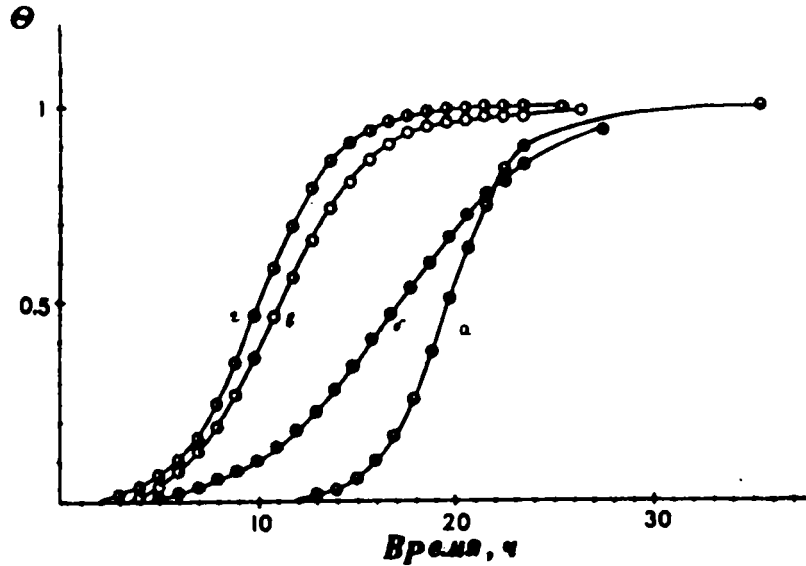


Рис. 1. Масштабированные кривые роста культур клеток сортов: Безостая 1 (а), Наирн 40 (б), Армянка 60 (в) и Ахтамар (г).

Однако для анализа роста культур клеток различных сортов пшеницы необходимо проведение сравнительного анализа всех вышеприведенных параметров. Все эти данные сведены воедино и представлены в табл. 2.

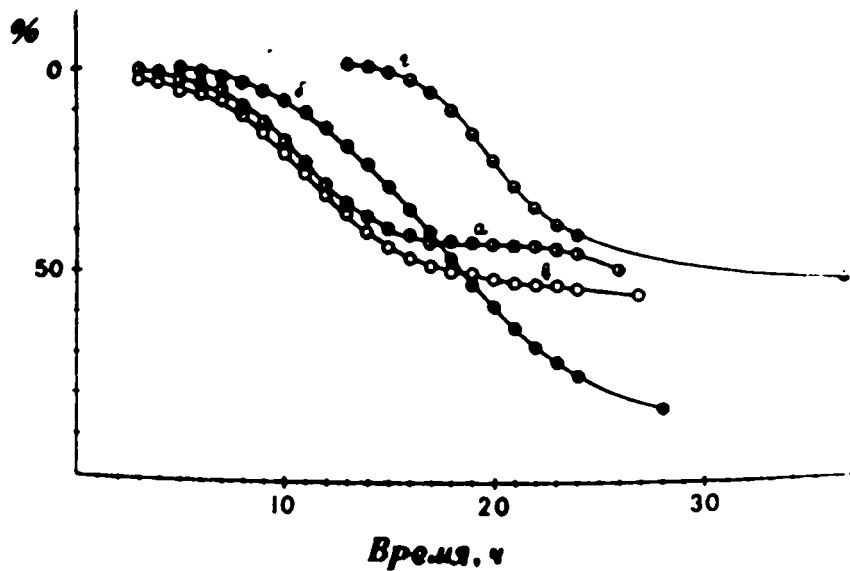


Рис. 2. Кривые утилизации сахаразы у клеточных культур сортов: Безостая 1 (а), Наирн 40 (б), Армянка 60 (в) и Ахтамар (г).

Как видно из этой таблицы, параметры роста клеточных культур отличаются друг от друга в значительной степени. Анализ табл. 2 показывает, что максимальным сходством по числу параметров ( $t_{log}$ ,  $\bar{T}_d$ ,  $\mu_{log}$ ,  $\beta$ ) выделяются клеточные культуры сортов Безостая 1 и Ахтамар. Клеточная культура сорта Армянка 60 в свою очередь параметрами  $K_s$  и  $t_{0,5} - t_{lag}$  похожа на клеточные культуры сортов Ахтамар и Безостая 1 соответственно.

Как видно из этой таблицы, параметры роста клеточных культур отличаются друг от друга в значительной степени. Анализ табл. 2 показывает, что максимальным сходством по числу параметров ( $t_{log}$ ,  $\bar{T}_d$ ,  $\mu_{log}$ ,  $\beta$ ) выделяются клеточные культуры сортов Безостая 1 и Ахтамар. Клеточная культура сорта Армянка 60 в свою очередь параметрами  $K_s$  и  $t_{0,5} - t_{lag}$  похожа на клеточные культуры сортов Ахтамар и Безостая 1 соответственно.

Сходные результаты получаются при сравнении кривых утилизации сахара (рис. 2). Как видно из рисунка, кривые утилизации у сортов Безостая 1 и Ахтамар похожи друг на друга и смещены на величину  $t_{lag}$  (Ахтамар) -  $t_{lag}$  (Безостая 1).

Таблица 2  
Параметры роста культуры клеток различных сортов пшеницы

	Безостая 1	Наири 40	Армянка 60	Ахтамар
$t_{log}$	8.71	14.43	9.18	8.03
$t_{lag}$	2.01	4.07	2.94	12.30
$\bar{T}_d$	1.43	2.62	1.73	1.28
$\log$	0.485 $\pm 0.008$	0.264 $\pm 0.012$	0.400 $\pm 0.030$	0.535 $\pm 0.016$
$K_s \cdot 10^{-4}$	4.566	4.900	5.376	5.280
$t_{0,5} - t_{lag}$	8.20	13.30	8.26	7.61
$\beta \cdot 10^{-4}$	7.0	6.8	8.0	7.0
$\theta_{t_{log} + t_{lag}}$	0.750	0.607	0.664	0.540

Полученные результаты можно объяснить тем, что сорт Ахтамар представляет собой гибрид, одним из предшественников которого является сорт Безостая 1. Сходство, хотя и не столь выраженное, наблюдается также между культурами клеток сортов Наири 40 и Армянка 60, также имеющих общих генетических предшественников.

Для максимальной эффективности биореакторов необходимо сведение к минимуму времени роста клеточных культур за счет уменьшения *lag* фазы и времени удвоения популяции ( $\bar{T}_d$ ). Важно также, чтобы максимальная часть роста популяции приходилось на логарифмическую фазу роста ( $\theta_{t_{log} + t_{lag}}$ ).

Кроме того, из наших результатов следует, что при использовании биореакторов для получения клеточных культур злаковых, необходимо также учитывать генетические особенности донорских сортов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. McHughen A. Rapid regeneration of wheat in vitro. - Ann. Bot., 1983, v. 51, N 6, p. 851.
2. Гапоненко А.К., Мунтян М.А., Маликова Н.И. и др. Регенерация растений различных генотипов пшеницы *Triticum aestivum* L. in vitro. - Докл. АН СССР, т. 278, N 5, с. 1231.
3. Прохоров М.Н., Чернова Л.К., Филин-Колдаков Б.В. Выращивание ткани пшеницы на культуре и восстановление целого растения. - Докл. АН СССР, 1974, т.214, № 1, 2, 3, с. 472.
4. Dudits D., Nemet G., Haydu Z. Study of callus growth and organ formation in wheat (*Triticum aestivum*) tissue cultures. - Canad. J. Bot., 1975, v. 53, № 10, p. 957.
5. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. - Physiol. plantarum., 1962, v. 15, f. 3, p. 473.
6. Rump R., Demangeat I.L., Demangeat C., Steibel I., Chanbron I. Enregistrement des Courbes de Fusion Derivées du DNA par Traitement Automatique des Données en Temps Reel. - J. Biophys. et Med. Nucl., 1980, v. 4, № 2, p.p. 75-82.
7. Бейли Дж., Оллис Д. Основы биохимической инженерии. М.: Мир, 1989, т. 1.
8. Ollis D.F. A Simple Batch Fermentation Model: Theme and Variations. - Ann. N.Y. Acad. Sci. USA, 1983, v. 143, p. 144.

Վ.Ռ. ՎԱՐՉԱՊԵՏՅԱՆ, Ա.Բ. ԿԻՐԱԿՈՍՅԱՆ, Ս.Գ. ՏԻՐԱՏՈՒՅԱՆ,  
Գ.Հ. ՓԱՆՈՍՅԱՆ

### ՅՈՐԵՆԻ ՈՐՈՇ ՍՈՐՏԵՐԻ ԲԶՋԱՅԻՆ ԿՈՒՆՏՈՒՐԱՆԵՐԻ ԱՃԻ ՊԱՐԱՄԵՏՐԵՐԸ

#### Ա մ փ ո փ ու մ

Ուսումնասիրվել են ցորենի որոշ սորտերի բջջային կուլտուրաների աճի մի շարք կինետիկական պարամետրերը: Հայտնաբերվել է նմանություն Բեզոստայա 1 և Ախթամար սորտերից ստացված բջջային կուլտուրաների միջև:

Սախարոզի օրինակի վրա ցույց են տրվել սննդային միջավայրի մածորային կոմպոնենտների ուսիլացման կորերի հաշվարկման եղանակները:

Առաջարկվել են պարամետրեր, որոնք թույլ են տալիս առավել էֆեկտիվորեն ընտրել սորտեր՝ կենսառեակտորներում կուլտիվացնելու համար:

Եզրակացություն է արվել, որ գոյություն ունի կապ ուսումնասիրված կինետիկական պարամետրերի և դոնորային սորտերի գենետիկական առանձնահատկությունների միջև:

R.R. VARDAPETIAN, A.B. KIRAKOSIAN, S.G. TIRATSUYAN, G.H. PANOSSIAN

### GROWTH PARAMETERS OF CELL CULTURES FOR SOME SORTS OF WHEAT

#### Summary

A number of kinetic parameters of cell cultures growth for several sorts of wheat has been investigated. Certain similarities between cell cultures from Besostaya 1 and Akhtamar sorts have been discovered. Calculation methods of major component utilization curves of nourishing environment are indicated, using saccharose as an example. Parameters, allowing the most effective selection of the sort for cultivation in bioreactors are suggested. A conclusion is made about the relation between investigated kinetic parameters and genetic peculiarities of donor sorts.