



УДК 575.127

СОМАТИЧЕСКАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ *LYCOPERSICON ESCULENTUM* MILL. И *LYCOPERSICON PERUVIANUM* V. *DENTATUM*

Н. М. Пивень, О. К. Махорина,
И. К. Комарницкий, Н. Н. Череп, Л. Р. Шлумуков

Введение. Соматическая гибридизация высших растений является экспериментальной альтернативой половому скрещиванию как способу гибридизации. К достоинствам этой новой технологии генетического конструирования относятся, прежде всего, отсутствие барьеров скрещиваемости при межвидовой гибридизации, а также иное по сравнению с таковым при половом процессе поведение родительских генов в гибридных продуктах. Большинство опытов с применением клеточной инженерии до сих пор проводили на табаке или других видах рода *Nicotiana*, и одной из важнейших задач сегодня является разработка технологии применительно к другим культурным растениям [1, 2]. Ранее нами были предприняты исследования для разработки эффективного комплекса методов, который бы позволил получать соматические гибриды у томатов (*Lycopersicon*) [2, 3]. Целью данного исследования явилось применение этих методов для получения межвидовых соматических гибридов между культурным и перуанским томатами. Получение фертильных гибридов между двумя указанными видами представляет значительный практический интерес, поскольку перуанский томат обладает целым рядом хозяйственных ценных признаков [4], при половой же гибридизации до сих пор не удавалось получить гибриды, которые несли бы гены цитоплазмы перуанского томата. Следует заметить, что до сегодняшнего времени в литературе нет сообщений о получении с помощью гибридизации соматических клеток фертильных гибридов в роде *Lycopersicon* [5—8].

Материалы и методы. В качестве одной родительской формы использовали асептически выращиваемые растения мутантной линии *L. esculentum* МО393 ($2x=24$), несущей два маркерных гена: *m* — пестролистность (2-я хромосома), *c* — картофельный лист (6-я хромосома). В качестве другого родителя использовали две линии *L. peruvianum* v. *dentatum* — 3767 (серия А) и 3772 (серия В); для выделения протопластов использовали культивируемые клетки, выращиваемые на среде 4х [2] в темноте при 28 °С с двухнедельным режимом пассирования. Каллусные клетки *L. peruvianum* v. *dentatum* получены из проростков и поддерживались в культуре на протяжении 1,5 лет. Эти линии характеризовались выраженной гетеропloidией. Модальное число хромосом для линии 3767 составляло 56, а для линии 3772 — 40 хромосом. Однако, несмотря на гетерогенность клеточных популяций этих линий, у них сохранялась способность регенерировать целые растения как из каллусных тканей, так и из изолированных протопластов [3]. Семена исходных родительских форм были любезно предоставлены акад. АН МССР А. А. Жученко и Н. Ф. Бочарниковой (Ин-т экологической генетики АН МССР). Протопласты из каллусных и мезофильных клеток получали с помощью ферментных смесей в растворе 0,5 М сахарозы и 5 мМ хлористого кальция, рН 5,5 [2, 3]. Очистку и слияние изолированных протопластов проводили, согласно методу Менцеля [9]. При обработке протопластов по вышеуказанной методике наблюдали возник-

новение большого количества гетероплазматических продуктов слияния, неслившиеся клетки мезофила листа *L. esculentum* при этом погибали. Далее клетки культивировали на рассеянном свете при 25—27 °С в питательной среде S-S-S [2]. Отбор делящихся гетероплазматических продуктов слияния осуществляли с помощью механической изоляции на 4—6-й день культивирования после обработки полиэтиленгликолем. Методика выделения и дальнейшего культивирования делящихся гетерокаррионов подробно описана ранее [2, 10]. Эксперименты по выделению и слиянию изолированных протопластов проводили в апреле—мае 1983 года. Для индукции органогенеза образовавшиеся микроколонию диаметром 3—5 мм высаживали на агаризованные среды ПРМ с 2,5 мг/л бензиламинопурина или ЕРМ с 1—3 мг/л эсатина в сочетании с 0,1—0,2 мг/л индолил-3-уксусной кислоты [2, 3]. Регенерировавшие растения укореняли на твердой безгормональной среде МС [11], содержание макроэлементов уменьшали в два раза и высаживали в теплицу. У растений-регенерантов подсчитывали количество хромосом в метафазных пластинках клеток корешков [3]. Анализ множественных молекулярных форм ферментов эстеразы и пероксидазы включал электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) гомогенатов из листьев растений-регенерантов [2]. Выделение рибулозодифосфаткарбоксилазы-оксигеназы (РДФК) проводили, как описано в [12]. Нативный фермент разделяли на субъединицы электрофорезом в 10 %-ном ПААГ с DS-Na [13]. Кусочки геля, содержащие малую субъединицу, прямо накладывали на гель для фокусировки, содержащий 3 % амфолитов, рН 5—8 и 3—10 («ЛКВ», Швеция) в соотношении 7 : 5. Фокусирование проводили при 15 °С, 15 Вт, 2000 В в течение 5 ч. Гели окрашивали кумасси R-250. Рестриктивный анализ хлоропластной ДНК (хлДНК) проводили с помощью рестриктазы *EcoRI*, согласно методикам, описанным ранее [14].

Результаты и обсуждение. Для каждой серии опытов было получено не менее 100 клонов, 60 из которых дали полностью сформировавшиеся растения-регенеранты. В таблице представлены результаты анализа некоторых растений-регенерантов, полученных из продуктов слияния протопластов. Количество хромосом у изученных растений колебалось от диплоидного ($2x=24$) до гексаплоидного ($6x=72$) уровней. Большинство растений имело тетраплоидный набор хромосом, хотя встречались также и миксо-, и анеуплоидные формы. Родительские формы отличались морфологией листьев (рис. 1). Листья и черешки перуанского томата густо опушены мелкими волосками, в то время как у культурного томата опушение редкое, с отдельными длинными волосками. У мутанта *МО393* листья расчленены в меньшей степени, чем у перуанского томата с 2—4 неполностью сросшимися боковыми сегментами. Поверхность листа *МО393* деформирована, края листьев цельные в противоположность зубчатым у перуанского томата. Гибридные растения наряду с типичными для *L. peruvianum* густым опушением имели характерные для *L. esculentum* более длинные волоски.

Результаты анализа растений-регенерантов из продуктов слияния изолированных протопластов
Analyses of plants regenerated from protoplast fusion products

№	Количество хромосом	Множественные молекулярные формы		РДФК	хлДНК
		Эстеразы	Пероксидазы		
A4	48	—	СГ	—	—
A13	24	Е	—	—	Е
A79	48	—	СГ	—	—
A80	48	—	—	СГ	П
B3	48	СГ	—	—	П
B7	68	СГ	СГ	СГ	П
B17	48	СГ	—	—	П
B37	62	—	СГ	СГ	—
B81	48	—	СГ	СГ	П

Примечание. СГ — соматический гибрид; П — типа *peruvianum*; Е — типа *esculentum*; «—» — не анализировали.

У некоторых форм (А80, Б7) наблюдалась фенотипическая экспрессия рецессивной мутации «картофельный лист» (рис. 1), что могло быть следствием асимметрии генотипа, возникшего при слиянии протопластов.

На рис. 2 представлена морфология цветков перуанского, культурного томатов и их соматического гибрида. Лепестки цветков перу-

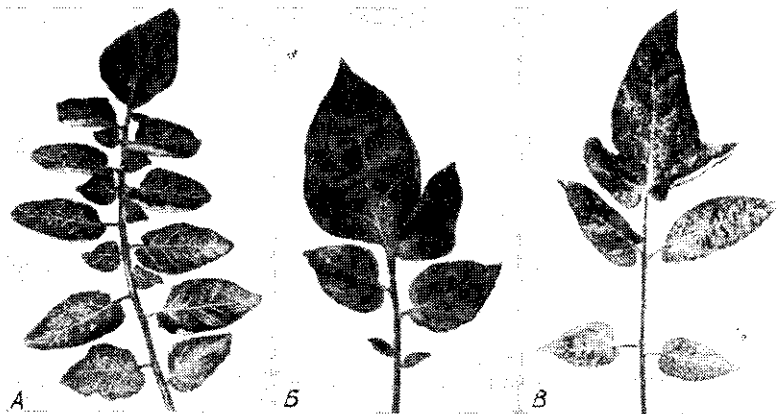


Рис. 1. Морфология листьев: А — *L. peruvianum* v. *dentatum* 3772; Б — растение А80; В — *L. esculentum* MO393.

Fig. 1. Morphology of leaves: А — *L. peruvianum* v. *dentatum* 3772; Б — plant А80; В — *L. esculentum* MO393.

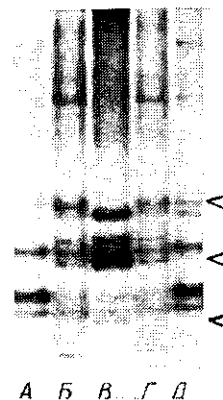
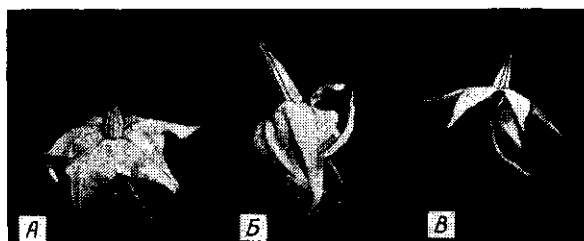


Рис. 2. Морфология цветков: А — *L. peruvianum* v. *dentatum* 3772; Б — растение А80; В — *L. esculentum* MO393.

Fig. 2. Morphology of flowers: А — *L. peruvianum* v. *dentatum* 3772; Б — plant А80; В — *L. esculentum* MO393.

Рис. 3. Электрофореграмма множественных молекулярных форм эстеразы: А, Д — *L. peruvianum* v. *dentatum* 3772; Б, Г — растение Б7; В — *L. esculentum* MO393.

Fig. 3. Esterase isozyme patterns obtained for: А, Д — *L. peruvianum* v. *dentatum* 3772; Б, Г — plant Б7; В — *L. esculentum* MO393.

анского томата имеют ярко-желтый цвет и обычно завернуты, в то время как цветки мутанта MO393 светло-желтые и имеют звездчатую форму. У большинства растений-регенерантов окраска и форма цветков были промежуточными.

Биохимический анализ включал изучение множественных молекулярных форм эстеразы и пероксидазы, исследование полипептидного состава РДФК, а также определение спектров фрагментов хлДНК, генерируемых эндонуклеазами рестрикции. Данные электрофоретического анализа множественных молекулярных форм эстеразы представлены на рис. 3. У родительской линии культурного томата эстеразы

представлены 7 молекулярными формами, 3 из которых являются наиболее активными. Аналогичным образом у перуанского томата обнаруживаются 9 полос активности, в том числе 3 интенсивных. Несколько полос двух родителей отличаются по своей подвижности и могут быть использованы как молекулярные видоспецифические маркеры при анализе продуктов гибридизации (на рисунке отмечено стрелками). Исследование эстераз у 19 растений-регенерантов, полученных из независимых гетерокарицитов, позволило обнаружить у трех из них (клоны

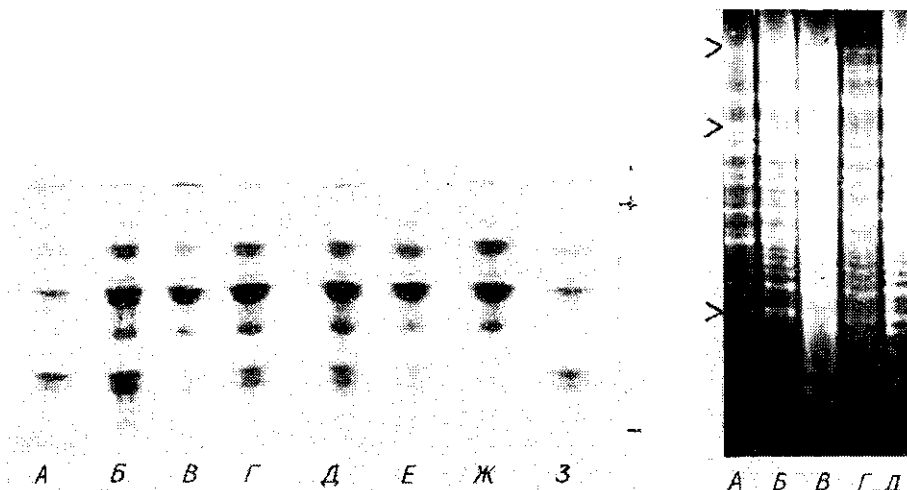


Рис. 4. Изоэлектрофокусирование малой субъединицы РДФК: А, З — *L. esculentum*; Б — *L. peruvianum* v. *dentatum*; соматические гибриды: В — А1; Г — Б7; Д — Б37; Е — Б53; Ж — Б81.

Fig. 4. Isoelectric focusing of RuBPCase small subunit from: А, З — *L. esculentum*; Б — *L. peruvianum* v. *dentatum*; somatic hybrids: В — А1; Г — Б7; Д — Б37; Е — Б53; Ж — Б81.

Рис. 5. Рестрикционные спектры хлДНК (рестриктаза *EcoRI*): А — *L. esculentum* М0393; Б — растение А13; В — растение А80; Г — *L. peruvianum* v. *dentatum* 3772; Д — *L. peruvianum* v. *dentatum* 3767.

Fig. 5. Restriction chlDNA patterns of plants (restrictase (*EcoRI*): А — *L. esculentum* М0393; Б — plant А13; В — plant А80; Г — *L. peruvianum* v. *dentatum* 3772; Д — *L. peruvianum* v. *dentatum* 3767.

Б3, Б7, Б17) видоспецифические молекулярные формы обоих родителей (таблица). Остальные 16 растений оказались сходными с тем или иным родителем. Анализ множественных молекулярных форм пероксидазы (данные не представлены) равным образом свидетельствует о гибридной природе регенерантов клонов А4, А79, Б7, Б81 (таблица).

Изоэлектрофокусирование полипептидов большой и малой субъединиц РДФК обнаружило, что оба родителя имеют наборы с идентичными изоэлектрическими точками (рис. 4). Различия были обнаружены лишь в стехиометрическом соотношении различных полипептидов малой (кодируемой ядром) субъединицы; у перуанского томата преобладают полипептиды с более кислым значением *pI*. Анализ пяти гибридов (рис. 4) показывает, что у растений из клонов Б7, Б37 и Б81 стехиометрия полипептидов малой субъединицы соответствует таковой предполагаемых ядерных гибридов.

Анализ наборов рестриктных фрагментов хлДНК позволил обнаружить различия между двумя родительскими видами (рис. 5), что и было положено в основу при изучении генов органелл предполагаемых соматических гибридов. Результаты исследования 14 растений-регенерантов из 14 клонов свидетельствуют, что у всех изученных форм, за исключением растений клона А13, ДНК хлоропластов идентична таковой перуанского томата.

Представленные данные позволяют нам сделать вывод, что по крайней мере часть из проанализированных растений-регенерантов является соматическими гибридами культурного и перуанского томатов. Результаты анализов свидетельствуют также, что гены цитоплазмы у этих гибридных растений происходят от перуанского томата. Синтезированные методами клеточной инженерии гибриды, таким образом, имеют наборы генов, которые до сих пор не удавалось получить с помощью полового скрещивания. В планы нашей дальнейшей работы входит изучение фертильности полученных форм растений с целью возможного их вовлечения в селекционный процесс.

SOMATIC HYBRIDIZATION
OF *LYCOPERSICON ESCULENTUM* MILL.
AND *LYCOPERSICON PERUVIANUM* V. *DENTATUM*

N. M. Piven, O. K. Makhorina, I. K. Komarnitsky, N. N. Cherep, L. R. Shlumukov

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

Summary

Somatic hybrids were obtained after protoplast fusion of sexually incompatible species of *L. esculentum* and *L. peruvianum* v. *dentatum*. Genetic novelty of the hybrids in question was shown by study of the chromosome number, isozymes (esterase, peroxidase), a small subunit of RuBPCase and chloroplast DNAs. Somatic interspecies hybrids possess new combinations of genes which have not been obtained before.

1. Глеба Ю. Ю., Сытник К. М. Клеточная инженерия растений.— Киев: Наук. думка, 1984.—160 с.
2. Соматическая гибридизация пасленовых / В. А. Сидоров, Н. М. Пивень, Ю. Ю. Глеба, К. М. Сытник.— Киев: Наук. думка, 1985.—130 с.
3. Пивень Н. М., Махорина О. К. Регенерация растений из каллусных протопластов *Lycopersicon peruvianum* v. *dentatum* // Цитология и генетика.— 1985.—19, № 4.— С. 271—277.
4. Жученко А. А. Генетика томатов.— Кишинев: Штиинца, 1973.—663 с.
5. Melchers G., Sacristan M. D., Holder A. A. Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from protoplasts // Carlsberg Res. Commun.— 1978.—43.— P. 203--218.
6. Melchers G. Tomatoes and potatoes somatic hybrids between tomatoes and potatoes // Tissue culture and research. / Eds P. Rohlich, A. Bacsy.— Budapest: Acad. Kiado, 1984.— P. 499—513.
7. Genetic transfer in plants through interspecific protoplast fusion / J. E. Shepard, T. Bidney, A. Kemble, T. Barby // Science.— 1983.—219, N 4585.— P. 683—688.
8. O'Connell M. A., Hanson M. R. Somatic hybridization between *Lycopersicon esculentum* and *Lycopersicon pennellii* // Theor. and Appl. Genet.— 1985.—70, N 1.— P. 1—12.
9. Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of *Nicotiana tabacum*+*Nicotiana knightiana* / L. Menczel, F. Nagy, Z. R. Kiss, P. Maliga // Ibid.— 1981.—59, N 2.— P. 191—195.
10. Gleba Yu. Yu. Microdroplet culture: tobacco plants from single mesophyll protoplasts // Naturwissenschaften.— 1978.—65, N 2.— S. 158.
11. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. Plant.— 1962.—15, N 2/3.— P. 473—497.
12. Cammaerts D., Jacobs M. A simple electrophoretic procedure for the determination of the polypeptide composition of the subunits of fraction I protein // Anal. Biochem.— 1980.—109, N 2.— P. 317.
13. Saemmler U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage // Nature.— 1980.—227, N 5259.— P. 680—685.
14. Kolodner R., Tewari K. K. Molecular size and conformation of chloroplast deoxyribonucleic acid from pea leaves // J. Biol. Chem.— 1972.—247, N 19.— P. 6355—6364.

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

Получено 1.11.85