

12. Mathews C. K. Giant pools of DNA precursors in sea urchin eggs.— *Exp. Cell Res.*, 1975, **92**, N 1, p. 47—56.
13. Eliasson R. E., Pontis E., Reichard P. Replication of polyoma DNA in nuclei isolated from azidoctyidine inhibited fibroblasts.— *J. Biol. Chem.*, 1981, **256**, N 17, p. 9044—9050.
14. Hiss E. A., Preston R. J. The effect of cytosine arabinoside on the frequency of single-strand breaks in DNA of mammalian cells following irradiation or chemical treatment.— *Biochim. et biophys. acta*, 1977, **478**, N 1, p. 1—8.

Ин-т молекулярной биологии АН СССР, Москва
Тихоокеанский ин-т биоорганич. химии
ДВНЦ АН СССР, Владивосток

Получено 16.07.84

УДК 575.127:633.71:576.851

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ Т-РАЙОНА В ГИБРИДАХ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК, ПОЛУЧЕННЫХ ПУТЕМ СЛИЯНИЯ НОРМАЛЬНОЙ И ОПУХОЛЕВОЙ КЛЕТОК

И. Ф. Каневский, Н. Н. Череп, М. В. Скаржинская, Ю. Ю. Глеба

Введение. Клетки корончатых галлов растений, трансформированные *Agrobacterium tumefaciens* и несущие в своем геноме Т-ДНК, способны к росту *in vitro* на питательных средах, лишенных фитогормонов [1]. Они синтезируют необычные аминокислоты, так называемые опи-пы [2—4], а некоторые опухолевые линии не способны зеленеть на свету и/или регенерировать стебли. Эти свойства клеток корончатых галлов впервые были использованы Вуллемсом с соавт. [5] для отбора внутривидовых соматических гибридов между нормальной и трансформированной клетками *Nicotiana tabacum*. Нам ранее были получены аналогичным образом межвидовые гибриды *Nicotiana tabacum* (трансформированный) + *Nicotiana plumbaginifolia* [6]. В обоих случаях отбор гибридов оказался возможным, потому что у них сохранялся признак гормоннезависимости и при этом восстанавливалась способность к позеленению/регенерации стеблей.

В данной работе изучали возможность селективного отбора гибридных линий в межвидовой комбинации видов *Nicotiana tabacum* (трансформированный) и *Atropa belladonna* L., а также экспрессию признаков, прямо или опосредованно контролируемых генами Т-ДНК, в гибридных клетках: активность лизопиндегидрогеназы; неспособность к образованию побегов; неспособность к ризогенезу; устойчивость к 2-аминоэтилцистеину, 5-бромдезоксисуридину и 5-метилтриптофану.

Материалы и методы. В качестве одного из родителей использовали клеточную линию *Nicotiana tabacum*, сорт *White Burley*, полученную в результате трансформации клосток табака октопиновым штаммом *Agrobacterium tumefaciens* B6S3, несущим плазмиду LBA2 (любезно предоставлена д-ром О. Шидером, Ин-т селекции растений Макса Планка, Кёльн, ФРГ). Опухолевые клетки выращивали на среде Линсмейера и Скуга [7], лишенной гормонов, в темноте, при 28 °С. Источником мезофильных протопластов служили асептически выращиваемые диплоидные растения красавки *Atropa belladonna* L. ($2n=72$).

Для получения каллусных и мезофильных протопластов использовали ферментные смеси и технику, описанные Глейбой и Гоффманом [8].

Активность лизопиндегидрогеназы определяли по методике, разработанной Оттеном и Шилпероортом [9]. Анализ множественных молекулярных форм амилазы проводили согласно методике электрофореза в полиакриламидных гелях по Дэвису [10].

Слияние протопластов индуцировали по методу Менцеля с соавт. [11], при помощи полиэтиленгликоля и буфера с высоким рН, высоким содержанием Ca^{2+} и 10 %-ного диметилсульфоксида (ДМСО). После слияния протопласты культивировали три недели

в среде МО-1 [12], а затем микроколонии переносили в лишенную гормонов среду ЛС [7] и культивировали при интенсивном освещении — 4 клк.

Устойчивость родительских и гибридных клеток к 5-бромдезоксипуридину, 2-аминоэтилцистеину и 5-метилтриптофану определяли в трех независимых опытах. При построении кривых устойчивости клеток к аналогам вычисляли прирост сырого веса тканей в опыте по отношению к контролю (рост на средах, лишенных аналогов) и выражали в процентах для каждой дозы соответствующего аналога.

Результаты и обсуждение. В настоящее время у нас имеются коллекции 57 клеточных гибридных линий, отобранных на селективной среде ЛС по способности к позеленению, 50 из которых регенерировали морфологически несовершенные побеги без корней на лишенных

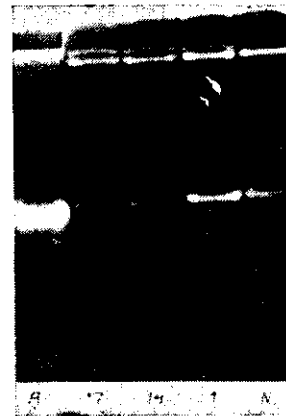


Рис. 1. Биохимический анализ множественных молекулярных форм амилазы клеточных гибридов табака и красавки: *N* — опухолевые клетки табака, *A* — красавки и трех гибридных линий 7, 14 и 1.

Fig. 1. Biochemical analysis of amylase molecular forms in cell hybrids of *Nicotiana* and *Atropa*. *N* — tobacco tumour cells, *A* — cells of *Atropa* and three hybrid lines 7, 14 and 1.

гормонов питательных средах. Эксперименты по индукции ризогенеза были безуспешны. Для нормализации морфологии побегов их прививали на декапитированные тепличные растения *N. glauca*, *N. tabacum* и *Lycopersicon esculentum*. Наиболее удачными оказались прививки на томаты. По фенотипу они имели признаки как типичные для красавки (синтез в листьях и стеблях антоцианов), так и характерные для табака (опушенность и форма листа). Комбинация родителей в данном эксперименте была выбрана по нескольким причинам. Использование в качестве одного из родителей опухолевых клеток табака дает возможность легко изолировать гибриды на простых селективных средах по позеленению и регенерации побегов на свету. Табак и красавка принадлежат к различным трибам, что позволяет простыми биохимическими и цитогенетическими методами идентифицировать истинные ядерные гибриды.

Анализ спектров множественных молекулярных форм амилазы однозначно подтвердил гибридность по ядерным генам по крайней мере 16 исследованных по этому признаку линий (рис. 1).

Цитогенетический анализ гибридных клеток 12 линий позволил выявить в них наличие хромосом обоих родительских видов (хромосомы красавки в 2—2,5 раза меньше по размерам хромосом табака) (рис. 2). Однако следует указать, что среди выделенных линий имеются каллусные ткани и стебли с различными хромосомными числами и различными соотношениями хромосом красавки и табака. Отсутствие стеблевого органогенеза у линий, содержащих лишь несколько хромосом красавки, можно объяснить недостаточным количеством генов красавки, отвечающих за морфогенетические потенции; аналогичную картину наблюдали и у гибридов опухолевых клеток табака с гаплоидными клетками листа *N. plumbaginifolia* [6].

Одним из белков, кодируемых Т-ДНК, является фермент лизопиндегидрогеназа, определяющий синтез в опухолевых клетках октопина. Исследования Вуллемса с соавт. [5] и наши собственные анализы [6] показали, что при гибридизации опухолевой и нормальной клеток в

роде *Nicotiana* признак активности лизопиндегидрогеназы наследуется как доминантный (семидоминантный). К такому же выводу позволяют прийти исследования межтрибных гибридов табак + красавка: во всех 23 исследованных гибридных линиях обнаружена активность лизопиндегидрогеназы (рис. 3).

Устойчивость к 2-аминоэтилцистеину (АЭЦ). Как показали Дагл и Темпе [13], опухолевые клетки с Т-ДНК от октопиновых штаммов агробактерий обнаруживают устойчивость к аналогу лизина 2-аминоэтилцистеину, что связано со способностью фермента ли-

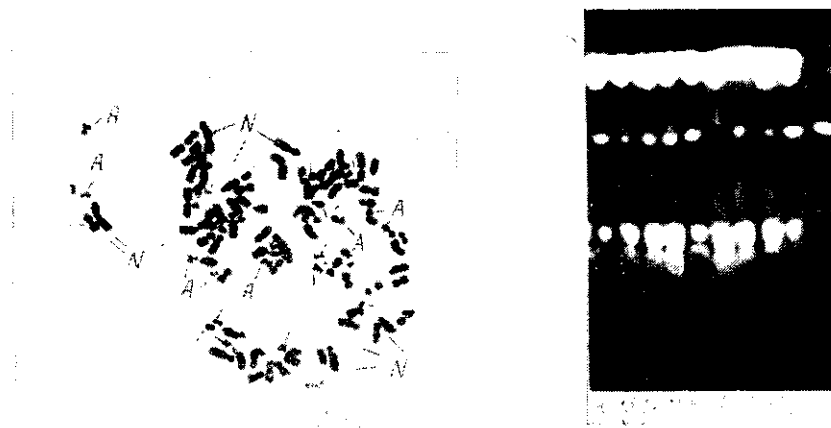


Рис. 2. Цитологический анализ межтрибных гибридов табака и красавки. Метафазные хромосомы в гибридной клетке линии 33 ($\times 1700$). Стрелками указаны хромосомы табака (N) и красавки (A).

Fig. 2. Cytological analysis of *Nicotiana* and *Atropa* intertribal hybrids. Metaphase chromosomes in a cell of hybrid line 33. ($\times 1700$). The arrows show tobacco (N) and *Atropa* (A) chromosomes.

Рис. 3. Электрофореграмма продуктов, образовавшихся в реакционной смеси под действием лизопиндегидрогеназы в экстрактах родительских и гибридных клеток табака и красавки: K — инкубационная смесь с октопином; O — октопин как маркер; B6 — опухолевый табак; A — красавка; 10, 11, 13, 14 — соответствующие гибридные линии. В экстрактах всех четырех гибридных линий под действием лизопиндегидрогеназы синтезируется октопин.

Fig. 3. Fluorography of an electrophoretic analysis of extracts from the parental and hybrid cells of *Nicotiana*+*Atropa*. K — incubation mixture with an octopine, O — octopine as a marker, B6 — tobacco tumour cells, A — *Atropa* cells; 10, 11, 13 and 14 — corresponding hybrid cell lines. Lysopine dehydrogenase synthesizes an octopine in extracts from cells of four hybrid lines.

зопиндегидрогеназы катализировать превращение аналога в нетоксические для клетки продукты. Мы исследовали устойчивость к АЭЦ у опухолевых клеток табака и культивируемых клеток красавки и нашли, что при выращивании на гормоносодержащих средах клетки обоих родителей ведут себя одинаково, а именно: они обладают ограниченной устойчивостью к аналогу в интервале концентраций 3—10 мг/л. Наоборот, при выращивании на лишенных гормонов средах рост клеток красавки полностью ингибируется уже при 3 мг/л аналога, в то время как опухолевые клетки табака растут хорошо (50% от контроля) при концентрации АЭЦ 30 мг/л, а медленный рост (10—15% от контроля) наблюдали даже при концентрации аналога 100 мг/л. Клетки трех гибридных линий также способны к росту в присутствии 3—100 мг/л АЭЦ на лишенных экзогенных гормонов средах, кривые устойчивости носят в этих случаях сложный характер, однако во всех случаях устойчивость гибридных клеток не ниже, а в ряде случаев явно выше таковой опухолевых клеток родительской линии табака. Таким образом, наблюдаемая у опухолевых клеток в отсутствие экзогенных гормонов повышенная устойчивость к аминоэтилцистеину наследуется при гибридизации как доминантный признак (рис. 4, A).

зеленению/регенерации стеблей при выращивании на свету независимо от наличия или отсутствия фитогормонов в питательной среде. Гибридные клетки обнаруживают способность к морфогенезу стеблей или к позеленению (в нескольких случаях у клонов с высоким количеством хромосом или в случаях с элиминацией большинства хромосом красавки). Однако, поскольку способность к позеленению была в данной работе селективным признаком, нельзя исключить возможность, что у ряда рекомбинантных форм признак супрессии стеблевого морфогенеза не является определяемым Т-районом, как это было в случае гибридов *Nicotiana tabacum* (трансформированный) + *Nicotiana plumbaginifolia* [6].

Супрессия ризогенеза. Для клеток опухолевой линии табака характерным является также отсутствие корневого морфогенеза. Стебли всех гибридных линий табак + красавка также не способны к ризогенезу. Однако, поскольку гибриды между каллусной/нетрансформированной клеткой табака и мезофильной клеткой красавки также не обнаруживают способность к корнеобразованию, однозначная интерпретация полученных данных невозможна.

Способность к гормоннезависимому росту. Как и клетки корончатых галлов табака, гибриды табака и красавки, полученные путем слияния протопластов, являются также гормоннезависимыми. Поскольку этот признак использовали в данных экспериментах как селективный для отбора продуктов слияния, нельзя исключить возможность возникновения гибридов с ростом, зависящим от экзогенных гормонов.

Таким образом, данные нашего исследования позволили показать, что целый ряд признаков опухолевых клеток табака, прямо или опосредованно определяемых Т-районом, наследуются при гибридизации соматических клеток и межтрибной комбинации видов табак + красавка как доминантные или доминантные с промежуточным типом доминирования. К таковым относятся синтез фермента лизопиндегидрогеназы, устойчивость к 2-аминоэтилцистеину, 5-бромдезоксиуридину, 5-метилтриптофану, а также способность к гормоннезависимому росту и супрессия ризогенеза. Признак подавления стеблевого морфогенеза в этих же экспериментах проявляется как рецессивный. Данные, касающиеся наследования большинства признаков (за исключением синтеза лизопиндегидрогеназы и морфогенетических реакций), при гибридизации клеток получены впервые. В результате анализа мы в состоянии предложить несколько новых приемов селекции гибридов опухолевых и нормальных клеток. Наиболее эффективными и простыми представляются методики, основанные на способности гибридных клеток к росту и позеленению на гормонсодержащих питательных средах в присутствии 5-бромдезоксиуридина или росту и позеленению на лишенных гормонов средах, снабженных 2-аминоэтилцистеином. Последняя схема селекции нами была успешно применена для выделения гибридов между диплоидными клетками *N. plumbaginifolia* и клетками корончатых галлов табака, облученных γ -лучами (суммарная доза 6 крад). Наши данные свидетельствуют о том, что контролируемые Т-ДНК признаки наследуются во всех случаях все вместе. Статистически строгих анализов мы не проводили, поэтому кажется вполне вероятным, что отбор, основанный на применении предлагаемых схем селекции, позволит уловить генетически различные спектры рекомбинантов гибридных клеток, несущих Т-ДНК в различных состояниях.

В заключение можно сказать, что система, включающая слияние нормальной и опухолевой клеток в межтрибной комбинации табак + красавка, позволяет легко и эффективно выделять большие количества истинных ядерных гибридов; допускает простые методы их анализа и является подходящей моделью для изучения экспрессии генов Т-ДНК в гибридах между опухолевой и нормальной соматической клетками.

Устойчивость к 5-бромдезоксисуридину (БрДУ). Мейнс [14], а также Вискот в соавт. [15] обнаружили, что привыкшие к цитокинину клетки, в том числе и принадлежащие к ним опухолевые клетки растений, обладают повышенной устойчивостью к аналогу тимидина 5-бромдезоксисуридину, причем добавление экзогенных цитокининов приводит к увеличению устойчивости. Эти данные не удивительны, поскольку в опухолевых клетках наблюдается повышенный синтез цитокининов и, естественно, их предшественников, что приводит к пониженному поглощению и включению в ДНК аналога тимидина. Наши

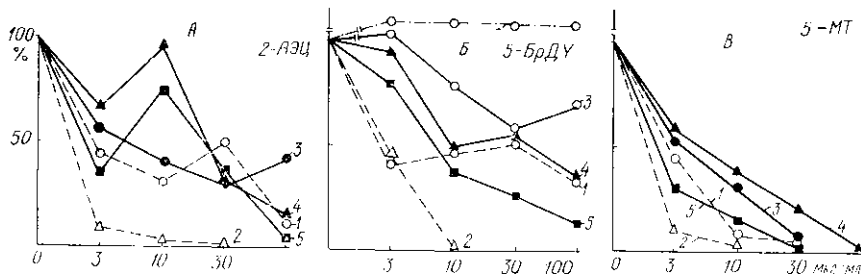


Рис. 4. Рост родительских и трех гибридных каллусных тканей табака и красавки на лишенной гормонов среде, содержащей 2-аминоэтилцистеин (А) и гормональных средах, содержащих 5-бромдезоксисуридин (Б) и 5-метилтриптофан (В). Кривые устойчивости для клеток опухолевого табака (1) и красавки (2) нарисованы пунктирными линиями, а для клеток 13-й (3), 14-й (4) и 21-й (5) гибридных линий — сплошными.

Fig. 4. Growth of the parental and three hybrid callus tissues of *Nicotiana* and *Atropa* on hormone-free medium containing 2-aminoethylcysteine (A), and on hormonal media containing 5-bromodeoxyuridine (B) and 5-methyltryptophan (B). Resistant curves for tobacco tumour (1) and *Atropa* (2) cells are shown by dotted line, and for cells of the 13th (3), 14th (4) and 21st (5) hybrid cell lines — by continuous ones.

исследования также показывают, что опухолевые клетки табака обладают повышенной устойчивостью к БрДУ в пределах концентраций 3—100 мг/л (обычно ингибирующим рост растительных клеток) аналога, причем эта устойчивость значительно более выражена при выращивании клеток в присутствии экзогенного цитокинина (1 мг/л 6-бензиламинопурина) и особенно ауксина 2,4-дихлорфеноксипропановой кислоты (0,2 мг/л). Анализ роста клеток соматических гибридов табак + красавка обнаруживает во всех случаях промежуточный уровень устойчивости к БрДУ, хотя разные линии ведут себя по-разному. Таким образом, наблюдаемая у опухолевых клеток зависимость от экзогенных гормонов дифференциальная устойчивость к аналогу тимидина наследуется при гибридизации клеток в данной комбинации видов как семидоминантный признак (рис. 4, Б).

Устойчивость к 5-метилтриптофану (МТ). Литературные данные свидетельствуют о том, что некоторые мутации устойчивости к 5-метилтриптофану — аналогу триптофана, ингибирующему активность фермента антранилатсинтетазы, ведут к повышенному накоплению в клетках свободного триптофана и образующегося из него ауксина индолин-3-уксусной кислоты. Исходя из этого мы исследовали возможность обратного явления в опухолевых клетках табака, синтезирующих большие количества ауксинов, т. е. не приведет ли сверхсинтез ауксинов к приобретению клетками устойчивости к аналогу триптофана. Данные (рис. 4, В), однако, позволяют сделать вывод лишь о слегка более высокой устойчивости опухолевых клеток к МТ при концентрациях аналога 3—10 мг/л; как и следовало ожидать, добавление экзогенных гормонов несколько повышает толерантность клеток к антиметаболиту. Клетки гибридной линии 14 табак + красавка во всех случаях проявляют более высокую устойчивость к МТ, чем родительские клетки.

Супрессия стеблевого органогенеза. Клетки родительского штамма опухолевой линии табака (B6S3) не способны к по-

EXPRESSION OF T-REGION GENES IN SOMATIC CELL
HYBRIDS OBTAINED BY FUSION OF NORMAL AND TUMOUR CELLS

I. F. Kanevsky, N. N. Cherep, M. V. Skarzhynskaya, Yu. Yu. Gleba

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

Summary

Protoplast fusion of *Nicotiana tabacum* (B6S3) tumour cells and *Atropa belladonna* L. mesophyll leaf cells was carried out. 57 hybrid cell lines in hormone-free medium are selected. Analysis of hybrid lines involved the determination of the multiple molecular forms of amylase and the LpDH activity, suppression of shoot and root organogenesis, resistance to 5-bromodeoxyuridine, 2-aminoethylcysteine, 5-methyltryptophan as well as cytogenetic study. The available data permit demonstrating that under somatic cell hybridization most of tumour characters, controlled by T-DNA, are inherited as dominant. In some cases the expression of these characters depends on exogenous phytohormone presence or absence in nutrient media.

1. White P. R., Braun A. C. A cancerous neoplasm of plants. Autonomous bacteria-free crown-gall tissue.— *Cancer Res.*, 1942, N 2, p. 597—617.
2. Lioret C. Les acides amines libres des tissus de crown-gall cultivés in vitro. Mise en évidence d'un acide amine particulier à ces tissus.— *C. R. Acad. Sci. Paris*, 1957, 244, p. 2171—2174.
3. Menuge A., Morel G. Sur la présence d'octopine dans les tissus de crown-gall.— *C. R. Acad. Sci. Paris*, 1964, 259, p. 4795—4796.
4. Kemp J. D. A new amino acid derivative present in crown-gall tumor tissue.— *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1977, 74, p. 862—863.
5. Willems G. J., Molendijk L., Schilperoort R. A. The expression of tumor markers in intraspecific somatic hybrids of normal and crown-gall cells from *Nicotiana tabacum*.— *Theor. Appl. Genet.*, 1980, 5, p. 203—208.
6. Каневский И. Ф., Глеба Ю. Ю., Череп Н. Н. Получение и анализ клеточных гибридов между *Nicotiana plumbaginifolia* и *Nicotiana tabacum* трансформированного *Agrobacterium tumefaciens*.— *Генетика*, 1983, 19, № 12, с. 2060—2066.
7. Linsmaier E. M., Skoog F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures.— *Physiol. Plantarum*, 1965, 18, p. 100—127.
8. Gleba Y. Y., Hoffmann F. Hybrid cell lines *Arabidopsis thaliana*+*Brassica campestris*: no evidence for specific chromosome elimination.— *Mol. Gen. Genet.*, 1978, 165, p. 257—264.
9. Otten L., Schilperoort R. A. A rapid micro scale method for the detection of lysopine and nopaline dehydrogenase activities.— *Biochim. et biophys. acta*, 1978, 527, p. 497—502.
10. Davies B. Y. Disk electrophoresis. 2. Method and application to human serum proteins.— *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1967, 121, p. 404—427.
11. Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of *Nicotiana tabacum*×*Nicotiana glauca*: correlation of resistance to N. *Tabacum* plastids / L. Mencez, F. Nagy, Z. R. Kiss, P. Maliga.— *Theor. Appl. Genet.*, 1981, 59, p. 191—195.
12. Intertribal hybrid cell lines of *Atropa belladonna*×*Nicotiana chinensis* obtained by cloning individual protoplast fusion products / Y. Y. Gleba, V. P. Momot, N. N. Cherep, M. V. Skarzhynskaya.— *Theor. Appl. Genet.*, 1982, 62, p. 75—80.
13. Dahl G. A., Tempé J. Studies on the use of toxic precursor analogs of opines to select transformed plant cells.— *Theor. Appl. Genet.*, 1983, 66, N 3/4, p. 233—239.
14. Meins F. 5-Bromodeoxyuridine: A specific inhibitor of cytokinin-habituation in tobacco cell culture.— *Planta*, 1976, 129, p. 239—244.
15. Vyskot B., Karpfel Z., Bezdék M. Hormonal control of 5-Bromodeoxyuridine (BUDR) tolerance in crown-gall tumors and habituated tissues.— *Planta*, 1977, 137, p. 247—252.

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

Получено 5.09.84