



УДК 575.133:575.153:575.155

© Е. Л. Бабичук, С. Г. Кушнир, Ю. Ю. Глеба, 1990

ФЕРТИЛЬНЫЕ МЕЖТРИБНЫЕ СИММЕТРИЧНЫЕ СОМАТИЧЕСКИЕ ГИБРИДЫ В СЕМЕЙСТВЕ ПАСЛЕНОВЫХ

В экспериментах по соматической гибридизации сливали протопласты, полученные из мезофила стрептомицинустойчивого мутанта табака SR-1 и красавки, устойчивой к канамицину; хлорофиллдефектного мутанта табака и физохлайны (дикий тип). В результате генетической селекции на двойную антибиотикоустойчивость в одном эксперименте и на способность к позеленению — в другом были отобраны соматические гибриды, которые, по данным цитогенетических и биохимических анализов, объединяли симметричные количества ядерного генетического материала исходных видов. Полученные гибриды были морфологически нормальными и после прививки на табак цвели. Гибриды табак+красавка дали половое потомство после опыления их пыльцой табака. Растения первого поколения наследовали 20—30 хромосом красавки ($2n=72$) и 48 хромосом табака ($2n=48$).

Введение. Наиболее очевидным потенциальным преимуществом технологии соматической гибридизации является преодоление барьеров нескрещиваемости, прежде всего при гибридизации филогенетически отдаленных видов. В принципе можно получить гетерокариоцит, объединяющий геномы сколь угодно далеких видов, принадлежащих к разным семействам, порядкам, классам и т. д. Однако в результате более чем двадцатилетних экспериментов в этой области не было получено морфологически нормальных фертильных соматических гибридов между видами, принадлежащими хотя бы к разным трибам одного семейства, не говоря уже о семействах [1, 2]. Наиболее часто (у очень далеких гибридов) в процессе размножения гибридных клеток хромосомы одного из видов элиминируются; когда же (у более близкородственных гибридов) хромосомные наборы более или менее стабильны, полученные гибриды оказывались неспособными к нормальному морфогенезу и стерильными. С постепенной утерей хромосом одного из родительских видов происходит нормализация и восстановление способности к морфогенезу [3]. Поэтому в последнее время было общепринято, что для получения нормальных фертильных растений необходима существенная асимметризация отдаленных соматических гибридов (т. е. элиминация большей или подавляющей части генетического материала одного из видов). Действительно, недавно было описано получение фертильных межтрибных и межсемейственных соматических асимметричных цитоплазматических [4] и ядерных [5, 6] гибридов. Однако критический анализ проведенных ранее экспериментов позволил предположить, что применение подходящей генетической селекции и использование генетически однородных (эуплоидных) мезофильных протопластов с нормальным геномом могли бы привести к получению нормальных гибридов. Так, с помощью слияния мезофильных протопластов растений дикого типа были получены морфологически совершенно нормальные гибриды между *Solanum nigrum* и *Lycopersicum esculentum*, хотя ранее описанные подобные соматические гибриды характеризовались ненормальным развитием [7]. Ранее в нашей лаборатории было показано, что можно получить стабильные ядерные гибриды между *Nicotiana tabacum* и *Atropa belladonna* (виды, принадлежащие к разным родам

и трибам), однако получавшиеся симметричные гибриды были всегда морфологически несовершенными [8]. В этом исследовании мы впервые описываем получение морфологически нормальных, функциональных (фертильных) гибридов *N. tabacum*+*A. belladonna*, сочетающих симметричные количества ядерного генетического материала от обоих родительских видов.

Материалы и методы. В экспериментах по слиянию использовали мезофильные протопласты, выделенные из асептически выращиваемых растений: двойного пластомного мутанта табака, *N. tabacum* L. A-15, несущего мутации хлорофиллдефектности и стрептомицинустойчивости [9]; пластомного стрептомицинустойчивого мутанта табака SR-1 [10]; устойчивой к канамицину трансгенной линии красавки, *A. belladonna*, линия Ab5; физохлайны, *Physochlaine officinalis* (дикий тип). Протопласты выделяли по методу, ранее разработанному в нашей лаборатории [8]. Слияние протопластов индуцировали по методике Менцеля и др. [11]. Протопласты после слияния культивировали на среде 8p [12] в течение примерно двух недель. Развившиеся микроколонии переносили в среду M [13]. Генетическую селекцию и регенерацию побегов осуществляли на среде Мурасиге и Скуга [14] с добавлением 1 мг/л 6-бензиладенина и 0,1 мг/л 1-нафтилуксусной кислоты (среда МСР). Когда необходимо, в среды добавляли простерилизованные фильтрованием через нитроцеллюлозные фильтры (0,22 мкм) канамицинсульфат и стрептомицинсульфат до конечных концентраций 100 и 500 мг/л соответственно. Хромосомы и множественные молекулярные формы ферментов анализировали, как описано ранее [8].

Результаты и обсуждение. В первом эксперименте, названном «Ab», сливали протопласты стрептомицинустойчивого мутанта табака SR-1 и устойчивой к канамицину красавки. Красавка была ранее

Рис. 1. Метафазные пластинки гибридов *N. tabacum*×*A. belladonna*. Гибридные линии Ab27 (а) и Ab10 (б); два растения Ab27/2 (в), Ab27/3 (г) из полового потомства линии Ab27, полученные после опыления пылью табака. Хромосомы на фотографиях (б, г) менее сконденсированы. Легко различить большие хромосомы табака и мелкие хромосомы красавки

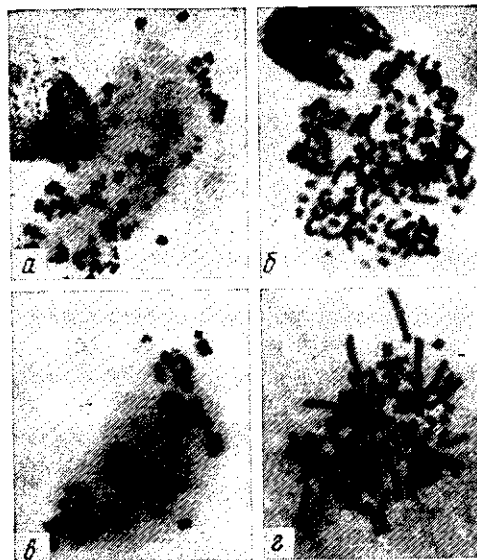


Fig. 1. The metaphase plates of *N. tabacum*+*A. belladonna* hybrids. Hybrid lines Ab27 (a) and Ab10 (b); two plants Ab27/2 (v), Ab27/3 (g) from sexual progeny, obtained after pollination with the tobacco pollen of Ab27 line. Chromosomes on the photos (b, g) are less condensed. The large *N. tabacum* chromosomes are easily recognized from small *A. belladonna* ones

трансформирована плазмидой *pGA471* [15], содержащей химерный ген, придающий устойчивость к канамицину. Соматические гибриды отбирали на средах, содержащих канамицин и стрептомицин. Было отобрано 36 независимых колоний. Большая часть из них регенерировала побегом с нормальной морфологией. Наиболее нормальные клоны были отобраны и изучены более подробно. Они обнаруживали внешние признаки обоих партнеров, например, гибриды табака и красавки имели нормально развитые трихомы (признак табака) и синтезировали антоцианы в стеблях и черешках листьев (признак красавки). Растения были способны к образованию корней, которые в условиях *in vitro* имели зеленую окраску (признак красавки).

Мы провели анализ метафазных пластинок, приготовленных из корешков полученных гибридов, результаты показаны на рис. 1 а, б. Гибридные растения содержали 110—120 хромосом, из них можно легко отличить примерно 48 больших хромосом табака ($2n=48$) и 60—70 мелких хромосом красавки ($2n=72$). Из-за большого количества хромосом и сильных различий в их размерах точный подсчет (мелких хромосом) оказался затруднительным; реальное количество этих хромосом, видимо, больше; однако и эти, возможно, заниженные данные свидетельствуют о том, что получены симметричные гибриды, сочетающие

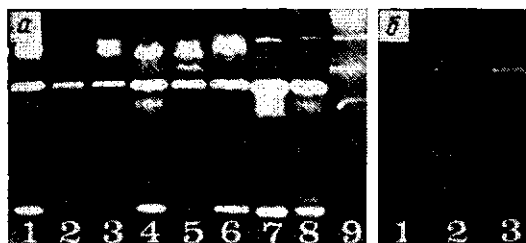


Рис. 2. Анализ множественных молекулярных форм амилаз: а — амилазы гибридов *N. tabacum*+*A. belladonna*: *N. tabacum* SR-1 (1), *N. tabacum* A-15 (2), *A. belladonna* (9), гибридные линии Ab3 (3), Ab6 (4), Ab9 (5), Ab10 (6), Ab13 (7), Ab27 (8); б — *P. officinalis* (1), гибрид *N. tabacum*+*P. officinalis* (2) *N. tabacum* A-15 (3). *N. tabacum* A-15 не имеет самой верхней полосы из-за его хлорофиллдефектности [4]

Fig. 2. Analysis of the multiple molecular forms of amylases: а — amylases of the *N. tabacum*+*A. belladonna* hybrids: *N. tabacum* SR1 (1), *N. tabacum* A-15 (2), *A. belladonna* (9), hybrid lines Ab3 (3), Ab6 (4), Ab9 (5), Ab10 (6), Ab13 (7), Ab27 (8); б — *N. tabacum* A-15 (3), *Physoclaina officinalis* (1) and their hybrid (2). *N. tabacum* A-15 has no upper band due to its chlorophyll deficiency (see reference [4])

практически полные диплоидные геномы обоих родителей. Этот вывод был подтвержден и анализом множественных молекулярных форм амилаз и эстераз. Все проанализированные линии обнаруживают сумму видоспецифических полос родительских видов (рис. 2, а).

Растения трех линий симметричных гибридов Ab9, Ab27, Ab10 были привиты на табак. Некоторые прививки нормально развивались и зацвели. Соцветия и цветки (рис. 3, а) гибридов имели промежуточную форму. Цветки имели нормально развитые пыльники, однако пыльца оказалась стерильной и получить развития семян после самоопыления не удалось. Из-за недостаточного количества материала летом 1989 г. мы не провели анализа развития пыльцевых зерен с тем, чтобы выяснить причины абортивности. Попытки использования пыльцы красавки для опыления были неудачными, развивающиеся коробочки вскоре опадали. Напротив, опыление пылью табака SR-1 дало удовлетворительные результаты для всех трех линий. Плоды нормально развивались, они были как у табака — сухая коробочка (у красавки плод — ягода). Количество развившихся семян на коробочку было незначительным (около нескольких десятков) в сравнении с тысячами семян в коробочке табака дикого типа, что, по-видимому, указывает на значительные аномалии в развитии оплодотворенных зародышевых мешков. Полученные семена были высажены в стерильных условиях на питательные среды. Всхожесть семян достигала 50%. Растения первого поколения имели нормальную морфологию, они росли значительно быстрее и лучше, чем исходные гибриды, укоренялись. Анализ хромосом показал наличие 25—33 хромосом красавки у разных линий, а также полного диплоидного набора хромосом табака (рис. 1 в, г).

Во втором эксперименте мы сливали протопласты *N. tabacum* A-15 с протопластами *P. officinalis*. Простой отбор зеленых колоний, регенерирующих побеги с морфологией, отличной от морфологии родительских видов, позволил отобрать морфологически нормальные симметричные гибриды в этой комбинации видов, что подтверждено анализом множественных молекулярных форм амилаз и эстераз (рис. 2, б). Побеги одной из линий, Pof20, были привиты на табак и нормально развивались. Цветки этого гибрида (рис. 3, б) отличались по морфологии и окраске (серо-белые) от цветков табака (розовые). К сожа-

лению, в использовавшихся нами условиях растения физохлайны не цвели. Цветки гибридов имели лепестковидные, полностью стерильные пыльники. Нам удалось получить семена после опыления гибридных цветков пыльцой табака, они, однако, оказались нежизнеспособными.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов были получены нормальные, частично фертильные симметричные соматические гибриды между видами, принадлежащими к разным трибам семейства пасленовых. Успех этой работы обеспечили, по-видимому, использование строгой генетической селекции (устойчивость к антибиотикам) и

Рис. 3. Цветки родительских видов и их симметричных соматических гибридов: а — слева направо *A. belladonna*, гибридная линия Ab27 и *N. tabacum* SR-1; б — цветок гибрида *N. tabacum*+*P. officinalis*

Fig. 3. The flowers of the parental species and their symmetrical somatic hybrids: a — from left to right — *Atropa belladonna*, hybrid line Ab27 and *Nicotiana tabacum* SR-1; б — a flower of *Nicotiana tabacum*+*Physochlaine officinalis* hybrid



выбор генетически регулярных (диплоидных) соматических клеток. Мы провели дополнительные эксперименты по слиянию протопластов (данные готовятся к печати), в которых показано, в частности, что большое значение для получения нормальных отдаленных гибридов имеет тип цитоплазмы исходных родительских видов. Можно думать, что использование других родительских сортов, линий или иного типа селекции соматических гибридов в паре видов табак + красавка позволит в будущем получить полностью нормальные (самофертильные) амфидиплоидные гибриды. Получение нормальных гибридов в паре табак + + физохлайна указывает на то, что пара принадлежащих к разным трибам видов табак + красавка, по всей видимости, не уникальна в отношении ее способности к образованию симметричных, морфологически нормальных и функциональных гибридов.

Полученные гибриды представляют собой интересную модельную систему для исследования ряда важных вопросов генетики, физиологии, биологии развития. Так, родительские растения существенно отличаются по морфологии и физиологическим реакциям (тип плода, опадение листьев, развитие трихомов), и анализ полученных гибридов и их потомства позволит изучить генетический контроль этих признаков. Данные соматические гибриды интересны и с точки зрения генетического анализа биосинтеза продуктов вторичного метаболизма. Так как табак накапливает никотин и анабазин, но не синтезирует тропановых алкалоидов, а красавка, напротив, синтезирует тропановые алкалоиды (атропин, скополамин), вполне возможно, что удастся вывести новый вид растений, синтезирующий оба типа алкалоидов, а может быть и новые алкалоиды.

Насколько нам известно, симметричные соматические гибриды *N. tabacum*+*A. belladonna* и *N. tabacum*+*P. officinalis* являются первыми фертильными растениями, объединяющими полные ядерные геномы видов, принадлежащих к разным трибам. Наши результаты вновь свидетельствуют, что соматическая гибридизация является эффективной технологией, позволяющей синтезировать генетически новые растения.

FERTILE INTERTRIBAL SYMMETRICAL SOMATIC HYBRIDS IN THE SOLANACEAE

E. L. Babiychuk, S. G. Kushnir, Yu. Yu. Gleba

Department of Cell Biology and Engineering, N. G. Kholodny Institute of Botany,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

Usage of the genetically homogeneous, euploid mesophyll protoplasts and strict genetic selection is supposed as particularly important rule for production of the normal remote somatic hybrids. As a result the performed experiments, morphologically normal hybrids *Nicotiana tabacum*+*Atropa belladonna*, *Nicotiana tabacum*+*Physoclaina officinalis* possessing symmetrical quantities of the nuclear genetic material from both parents are obtained, that follows from the carried out cytogenetical and biochemical analyses. Sexual progeny was obtained after pollination of *N. tabacum*+*A. belladonna* hybrids with tobacco pollen. F1 plants possess 20-30 chromosomes of *A. belladonna* ($2n=72$) and 48 chromosomes of *N. tabacum* ($2n=48$). Some important problems of genetics, physiology, developmental biology and genetical control of the secondary metabolite biosynthesis could be studied using described hybrids and their progeny. As is generally known described symmetrical somatic hybrids are the first fertile plants combining full nuclear genomes of the plants from different tribes.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Gleba Yu. Yu., Sytnik K. M.* Клеточная инженерия растений.— Киев: Наук. думка, 1984.— 160 с.
2. *Gleba Yu., Sytnik K.* Protoplast fusion.— Berlin: Springer, 1984.— 203 p.
3. *Gleba Yu. Yu., Hoffmann F.* «Arabidobrassica» a novel plant obtained by protoplast fusion // *Planta*.— 1980.— 149, N 2.— P. 112—117.
4. *Functional cybrid plants possessing a Nicotiana genome and an Atropa plastome / S. G. Kushnir, L. R. Schlumukov, N. J. Pogrebnyak et al.* // *Mol. and Gen. Genet.*— 1987.— 209, N 1.— P. 159—163.
5. *Фертильные ядерные межтрибные гибриды Nicotiana+Atropa, полученные слиянием нормальной и инактивированной облучением соматических клеток / Ю. Ю. Глеба, В. А. Калета, А. С. Пароконный и др.* // Докл. АН СССР.— 1987.— 297, № 6.— С. 1473—1475.
6. *Transfer of resistance traits from carrot into tobacco by asymmetric somatic hybridization, regeneration of fertile plants / D. Dudits, E. Maroy E., T. Praznowszky et al.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.— 1987.— 84, N 23.— P. 8434—8438.
7. *Guri A., Levi A., Sink K. C.* Morphological and molecular characterization of somatic hybrid plants between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum nigrum* // *Mol. and Gen. Genet.*— 1988.— 212, N 2.— P. 191—198.
8. *Intertribal hybrid cell lines of Atropa belladonna+Nicotiana chinensis obtained by cloning individual protoplast fusion products / Y. Y. Gleba, V. P. Momot, N. N. Cherap, M. V. Skarzhynskaya* // *Theor. and Appl. Genet.*— 1982.— 62, N 1.— P. 75—79.
9. *Swab Z., Maliga P.* *Nicotiana tabacum* mutants with chloroplast encoded streptomycin resistance and pirment deficiency // *Ibid.*— 1986.— 72, N 5.— P. 637—643.
10. *Non-mendelian streptomycin-resistant tobacco mutant with altered chloroplast and mitochondria / P. Maliga, A. S. Breznovits, L. Marton, F. Joo* // *Nature*.— 1975.— 255.— P. 401—402.
11. *Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of Nicotiana tabacum+Nicotiana knightiana, correlation of resistance to N. tabacum plastids / L. Menczel, F. Nagy, Z. R. Kiss, P. Maliga* // *Theor. and Appl. Genet.*— 1981.— 59, N 2.— P. 191—195.
12. *Kao K. N., Michayluk M. R.* Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media // *Planta*.— 1975.— 126, N 2.— P. 105—110.
13. *Caboche M.* Nutritional requirements of protoplast-derived haploid tobacco cell grown at low densities in liquid medium // *Ibid.*— 1980.— 149, N 1.— P. 7—18.
14. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.*— 1962.— 15, N 3.— P. 473—497.
15. *New cloning vehicles for transformation of higher plants / G. An, B. D. Watson, S. Stachel et al.* // *EMBO J.*— 1985.— 4, N 1.— P. 277—284.

Отделение клеточ. биологии и инженерии
Ин-та ботаники им. Н. Г. Холодного АН УССР, Киев

Получено 26.02.90