

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yamada Y., Hashimoto T. Possibilities for improving yields of secondary metabolites in plant cell cultures // Progr. in plant cell. and mol. biol.: Proc. VII Int. Congr. plant tissue and cell cult. (Amsterdam, 24—29 June 1990) / Eds H. J. J. Nijkamp et al.— Dordrecht: Kluwer Acad. publ., 1990.— P. 547—556.
2. Eunice A., Fowler M. Biologically active plant secondary metabolites — perspectives for the future // Chem. Ind.— 1985.— 17.— P. 408—410.
3. Fontanel A., Tabata M. Production of secondary metabolites by plant tissue and cell cultures. Present aspects and prospects // Nestle Res. News 1986/87.— Vevey: Nestec Ltd., 1987.— P. 93—103.
4. Жизнь растений. Цветковые растения.— М.: Просвещение, 1981.— Т. 5, ч. 2.— 512 с.
5. Справочник по лекарственным растениям / А. М. Задорожный, А. Г. Кошкин, С. Я. Соколов и др.— М.: Лесн. пром-сть, 1988.— 415 с.
6. Pawelka K.-H., Stockigt J. Major indole alkaloids in cell suspension cultures of *Rhazya stricta Decaisne* // Z. Naturforsch.— 1986.— 41 C.— P. 385—390.
7. Balsevich J. Monoterpene indole alkaloids from *Aprocynaceae* other than *Catharanthus roseus* // Cell culture and somatic cell genetics of plants / Eds F. Constabel, I. K. Vasil.— San Diego: Acad. press, 1988.— Vol. 5.— P. 371—383.
8. DeLuca V., Kurz W. G. W. Monoterpene indole alkaloids (*Catharanthus* alkaloids) // Ibid.— P. 385—401.
9. Сидоров В. А. Биотехнология растений. Клеточная селекция.— Киев: Наук. думка, 1990.— 280 с.
10. Vapat V. A., Rao P. S., Heble M. R. Immobilization of cells and protoplasts of *Catharanthus roseus* // Proc. Indian Acad. Sci.— 1986.— 96, N 5.— P. 413—418.
11. Takeuchi Y., Komamine A. Glucans in the cell walls regenerated from *Vinca rosea* protoplasts // Plant Cell Physiol.— 1981.— 22, N 11.— P. 1585—1594.
12. Соматическая гибридизация пасленовых / В. А. Сидоров, Н. М. Пивень, Ю. Ю. Глеба, К. М. Сытник.— Киев: Наук. думка, 1985.— 130 с.
13. Medgyesy P., Menczel L., Maliga P. The use of cytoplasmic streptomycin resistance: chloroplast transfer from *Nicotiana tabacum* into *Nicotiana sylvestris*, and isolation of their somatic hybrid // Mol. and Gen. Genet.— 1980.— 179, N 3.— P. 693—698.
14. Биохимический анализ в клеточной инженерии растений.— Киев, 1988.— 49 с.— (Препринт / АН УССР. Ин-т ботаники; № 88.1).
15. Shure M., Wessler S., Fedoroff N. Molecular identification and isolation of the *Waxy* locus in maize // Cell.— 1983.— 35, N 3.— P. 225—233.
16. Колоша В. О., Фодор И. И. Структурная гетерогенность рДНК *Citrus limon* // Молекуляр. биология.— 1986.— 20, № 3.— С. 656—659.
17. Caboche M. Nutritional requirements of protoplast-derived haploid tobacco cell grown at low densities in liquid medium // Planta.— 1980.— 149, N 1.— P. 7—18.
18. Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений.— Киев: Наук. думка, 1980.— 487 с.
19. Menczel L., Kiss Z. R., Maliga P. Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of *Nicotiana tabacum*+*Nicotiana knightiana*: Correlation of resistance to *N. tabacum* plastids // Theor. and Appl. Genet.— 1981.— 59, N 2.— P. 191—195.
20. Borisjuk N. V., Momot V. P., Gleba Y. Novel class of rDNA repeat units in somatic hybrids between *Nicotiana* and *Atropa* // Ibid.— 1988.— 76, N 1.— P. 108—112.
21. Larkin P. J., Scowcroft W. R. Somaclonal variation. A novel source of variability from cell cultures // Ibid.— 1981.— 60, N 2.— P. 197—214.
22. Waller G. R., Nowacki E. K. Genetic control of alkaloid production // Alkaloid Biol. and Metabol. in Plants / Eds G. R. Waller, E. K. Novacki—New York; London: Plenum press, 1978.— P. 49—84.

Ин-т клеточ. биологии и генет. инженерии АН УССР,  
Киев

Получено 14.01.91

УДК 575.1

Н. Н. Колесник, И. К. Комарницкий, Л. Р. Шлумуков, А. С. Самойлов

### АНАЛИЗ МИТОТИЧЕСКОЙ СЕГРЕГАЦИИ ПЛАЗМАГЕНОВ В СОМАТИЧЕСКИХ ГИБРИДАХ NICOTIANA, ПОЛУЧЕННЫХ КЛОНИРОВАНИЕМ ГЕТЕРОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ПРОДУКТОВ СЛИЯНИЯ

Изучено наследование шести кодируемых плазматгенами признаков у гибридных форм *Nicotiana*, регенерированных из гибридных клеток независимого происхождения.

В качестве родительских форм использовали каллусные протопласты пластомного хлорофиллдефектного мутанта *N. tabacum* и мезофильные протопласты одного из

© Н. Н. Колесник, И. К. Комарницкий, Л. Р. Шлумуков, А. С. Самойлов, 1991.

четырёх аналогов табака, обладающих признаком цитоплазматической мужской стерильности (цмс), и несущих цитоплазму *N. repanda*, *N. undulata*, *N. suaveolens* и *N. plumbaginifolia*. У сегрегантов по признаку пластомной хлорофиллдефектности, полученных при митотической сегрегации гетероплазматических продуктов слияния *Nicotiana*, проведен анализ признаков, кодируемых плазмагенами.

Результаты исследования показали наличие по крайней мере двух групп сцепления плазмагенов: косегрегационной группы пластомы и косегрегационной группы митохондрия. Полные сегреганты по признаку наличия хлорофиллдефектности или пластомы дикого типа несут хлоропластную (хл) ДНК, большую субъединицу рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы / оксигеназы (РубисКО) и признак устойчивости / чувствительности к тентоксину, полностью идентичные одному из родительских пластомов. В другую, независимую от пластомы группу косегрегации, входят признак цмс, изменения в морфологии цветков и наборы рестрикционных фрагментов митохондриальной (мт) ДНК. Значительная часть сегрегантов по хондриону показала измененные, отличные от родительских, наборы фрагментов рестрикции мтДНК и промежуточные морфологические типы цмс. Наблюдалась корреляция между преимущественным наличием видоспецифических фрагментов мтДНК одного из родителей и морфологией цветков.

**Введение.** Проведенный ранее анализ наследования плазмагенов в ходе митотического расщепления у соматических гибридов высших растений [1—4] позволил сделать вывод о том, что признаки пластомной хлорофиллдефектности, устойчивости к атразину, тентоксину, стрептомицину и тип большой субъединицы РубисКО косегрегируют с соответствующим типом хлДНК, в то время как признак цмс и связанные с ним изменения в морфологии цветков, а также наборы рестрикционных фрагментов мтДНК представляют вторую группу сцепления генов цитоплазмы. Однако это заключение было сделано на ограниченном количестве соматических гибридов, независимое происхождение которых не всегда гарантировалось.

В связи с этим мы провели обширное изучение шести кодируемых плазмагенами признаков у цибридных форм *Nicotiana*, регенерированных из клонов гибридных клеток независимого происхождения. Характеристика ядерной конституции этих гибридов и описание пластомных гетерозигот, полученных при регенерации продуктов слияния, опубликованы ранее [5, 6].

**Материалы и методы.** В качестве родительских форм использовали каллусные протопласты пластомного хлорофиллдефектного мутанта табака (сорт Самсун) и мезофильные протопласты четырех цмс-аналогов табака, несущих цитоплазму *N. repanda* Willd., *N. plumbaginifolia* Viv., *N. undulata* Vent., *N. suaveolens* Lehm. Подробное описание растительного материала и процедуры слияния описаны ранее [5]. Гибридные продукты идентифицировали визуально и отбирали механически. МтДНК выделяли по методу [7]; хлДНК — по [8]. РубисКО анализировали, используя методику [9] с незначительными модификациями. Для оценки устойчивости к тентоксину семена стерилизовали и проращивали на фильтровальной бумаге, увлажненной раствором тентоксина (20 мкг/мл).

**Результаты и обсуждение.** Из клонированных гетероплазматических продуктов слияния регенерировали чисто-белые, чисто-зеленые и пестролистистые растения различных по генетической конституции классов [5, 6]. ХлДНК анализировали с использованием рестриктаз *HindIII* и *BamHI*, которых было достаточно, чтобы различить хлДНК родительских форм во всех случаях. Всего проанализировано 65 зеленых, 10 белых и 22 пестролистистых растения из 24 независимых клонов, представляющих все комбинации цитоплазм. У всех белых сегрегантов обнаружена хлДНК табака, в то время как все зеленые сегреганты содержали хлДНК соответствующего родителя с диким типом пластид. У пестролистистых растений идентифицировали смесь родительских хлДНК. Таким образом, в пределах изученной выборки ( $10^2$  растений) фенотип пластомы всегда косегрегировал с соответствующим набором фрагментов хлДНК. Это подтверждается данными рис. 1, где представлены результаты рестрикционного анализа хлДНК соматических гибридов и цибридов *Nicotiana*, сегрегантов по признаку пластомной хло-

рофиллдефектности: *a* — *N. tabacum*, родительская форма (1); *N. tabacum* (цмс *repanda*), родительская форма (2); зеленый сегрегант, клон 2сб (3); *N. tabacum* (цмс *undulata*), родительская форма (4); зеленый сегрегант, клон 17d3 (5); *b* — *N. tabacum*, родительская форма (1); белый сегрегант, клоны 21с3 (2) и 21а2 (3); *N. tabacum* (цмс *suaveolens*), родительская форма (4); зеленые сегреганты, клоны 21с1 (5) и 21d2 (6).

Состав полипептидов большой субъединицы РубисКО проанализировали у 101 растения из 17 клонов, представляющих три комбинации

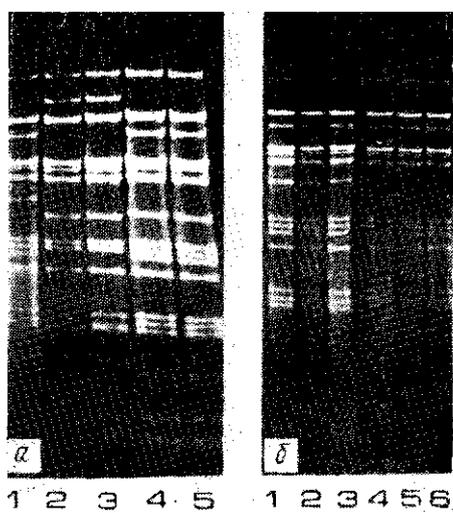


Рис. 1

цитоплазм (кроме комбинации *tabacum+plumbaginifolia*), при этом ограничились электрофорезом растворимых белков [9]. Во всех случаях, так же как и при анализе хлДНК, наблюдается полная ко-сегрегация признака пластомной хлорофиллдефектности с соответствующим набором полипептидов большой субъединицы РубисКО (рис. 2: *a* — комбинация цитоплазм *tabacum+undulata*: *N. tabacum*, родительская форма (1); зеленые сегреганты, клоны 17а3, 17d3 и 17d4 (соответственно 2—4); *N. tabacum* (цмс *undulata*), родительская форма (6); *b* комбинация цитоплазм *tabacum+suaveolens*: *N. tabacum*, родительская форма (1); зеленые сегреганты из клонов 21а4, 21с5 и 21d2 (соответственно 2—4); белый сегрегант из клона 21с3 (5); *N. tabacum* (цмс *suaveolens*) родительская форма (6); *c* комбинация цитоплазм *tabacum+repanda*: нестролистное растение из клона 2сб (1); зеленый сегрегант из того же клона (2); *N. tabacum* (цмс *repanda*), родительская форма (3); *N. tabacum*, родительская форма (4); *г* — комбинация цитоплазм *tabacum+repanda*: *N. tabacum* (цмс *repanda*), родительская форма (1); белые сегреганты из клона 2сб (2, 3); *N. tabacum*, родительская форма (4)).

Для выявления устойчивости к тентоксину (рис. 3) было проанализировано потомство зеленых и нестролистных гибридов клона 2сб (комбинация цитоплазм *tabacum+repanda*). Семена получены опылением гибридов пыльцой табака, сорт Дюбек 44 (гибриды несли признак цмс). Синтез хлорофилла у проростков с цитоплазмой *repanda* полностью подавлялся в присутствии 20 мкг тентоксина в 1 мл (см. рис. 3, б), в результате чего все проростки оказались белыми. Напротив, проростки с пластидами табака устойчивы к тентоксину и поэтому при выращивании в условиях рассеянного освещения имеют светло-зеленую окраску (так как несут мутацию пластомной хлорофиллдефектности). Потомство чисто-зеленых растений во всех случаях оказалось чувствительным к тентоксину (см. рис. 3), тогда как в потомстве нестролистных растений были обнаружены и чувствительные, и устойчивые растения примерно в таких же пропорциях, как и в контрольных опытах без тентоксина. Результаты этих анализов указывают на ко-сегрегацию признака пластомной хлорофиллдефектности с признаком устойчивости к тентоксину.

Морфологию цветков изучали у 151 зеленого растения-сегреганта, представлявшего 11 клонов и все четыре внутривидовые комбинации цитоплазм. Отсутствие пыльников у растений или их изменение до нефункционального состояния определялось как стерильность (мс), а растения с нормальной морфологией цветка относили к фертильным

(мф). Среди регенерантов были обнаружены как мф, так и мс растения. В большинстве случаев растения, отобранные из одного клона, имели одинаковый фенотип, т. е. все растения были или мф, или мс. Морфология цмс-типов обычно соответствовала типу цмс родителей. Только в одном случае (клон 17а3, цитоплазма *tabacum* + *undulata*) растения-регенеранты выщепляли два морфологических типа цветков. Таким образом, полученные данные недвусмысленно подтверждают отсутствие сцепления между генами, кодирующими пластомную хлорофиллдефектность, и генами, кодирующими цмс.

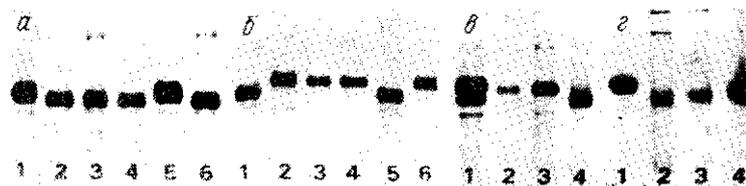


Рис. 2

Анализ мтДНК проведен у 11 растений из 10 независимых клонов, представляющих четыре видовые комбинации цитоплазм. Полученные данные позволяют утверждать, что, во-первых, большинство мтДНК гибридов имели наборы рестрикционных фрагментов, отличающиеся как от набора рестрикционных фрагментов одной или другой родительской формы, так и от их суммы, но в то же время приближающиеся к одному из родительских типов. Во-вторых, среди зеленых растений-сегрегантов есть растения с мтДНК, сходной как с таковой табака, так и мтДНК другого родителя, из чего можно сделать вывод, что ген пластомной хлорофиллдефектности *P* сегрегирует независимо от мтДНК. В-третьих, у гибридов наблюдается корреляция между морфологией цветка (мс/мф), с одной стороны, и количеством видоспецифических фрагментов мтДНК того или другого родителя — с другой.

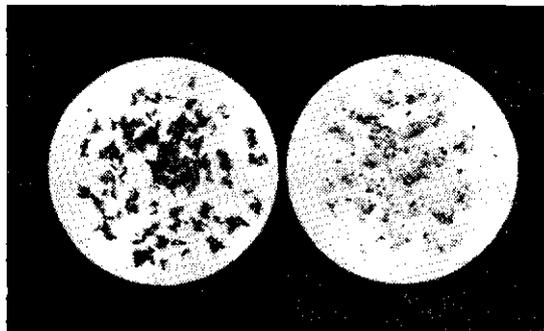


Рис. 3

На основании проведенного исследования можно сделать следующие выводы. Наши результаты полностью согласуются с данными о том, что в клетках высших растений есть по крайней мере две группы сцепления плазматенов. В первой группе (группе пластома) наблюдалась полная ко-сегрегация признаков пластомной хлорофиллдефектности, устойчивости к тентоксину, полипептидного состава большой субъединицы РубисКО с набором рестрикционных фрагментов хлДНК — в этом случае последний можно отнести к признакам, физически связанным с хлДНК. Исходя из наших сведений, полученных при анализе около ста растений-регенерантов из 30 независимых клонов, можно утверждать, что генетическая рекомбинация пластома высших растений является очень редким событием и может не учитываться в экспериментах без применения селективного давления в пользу рекомбинантов по пластома [10]. Вторая группа сцепления (митохондрии) продемонстрировала независимую от пластома сегрегацию и включала признаки цмс и наборы рестрикционных фрагментов мтДНК. Мы подтвердили, что в результате гибридизации соматических клеток с высокой частотой возникают рекомбинантные формы мтДНК. В то же

Цитоплазматическая конституция цитоплазматических сегрегантов и гетерозигот *Nicotiana*, регенерированных из единичных продуктов слияния протопластов

Клон	Родительская комбинация цитоплазмы	Фенотип (экспрессия Р-гена)	Тип хлДНК	Тип большой субъединицы РубисКО	Тип реакции на тентоксигеновую пробу	Тип мтДНК	Цмс/мф—морфология цветка
17a1	tab+und	und	—	und (2)	—	—	—
17a3	«	und	und (4)	und (4)	—	—	tab-und (7)
17a2	«	und	—	—	—	und (1)	—
17b2	«	und	und (2)	—	—	—	—
17c2	«	und	—	und (2)	—	—	—
17c7	«	und	und (4)	und (10)	—	—	tab (14)
17d3	«	und	und (8)	und (16)	—	tab (1)	tab (18)
17d4	«	und	und (2)	und (10)	—	—	und (4)
21a2	tab+sua	sua	—	sua (1)	—	tab (1)	tab (22)
21a4	«	sua	—	sua (5)	—	sua (1)	sua (12)
21c1	«	sua	sua (2)	sua (4)	—	—	sua (2)
21c3	«	sua	—	sua (1)	—	sua (1)	sua (16)
21c5	«	sua	—	sua (11)	—	sua (1)	sua (4)
21d2	«	sua	sua (4)	sua (8)	—	sua (1)	sua (14)
21d5	«	sua	sua (2)	sua (6)	—	sua (1)	sua (4)
3a3	tab+plu	plu	—	—	—	plu (1)	plu (2)
2c6	tab+rep	rep	rep (7)	rep (3)	rep (9)	rep (2)	rep (21)
17a3	tab+und	tab	tab (1)	tab (1)	—	—	—
17a6	«	tab	—	tab (1)	—	—	—
21a2	tab+sua	tab	tab (1)	tab (1)	—	—	—
21c3	tab+sua	tab	tab (1)	tab (2)	—	—	—
2c6	tab+rep	tab	tab (2)	tab (2)	—	—	rep (3)
17a3	tab+und	ab+und	tab+und (1)	—	—	—	und (2)
17a6	«	ab+und	—	—	—	—	—
17d3	«	ab+und	tab+und (1)	—	—	—	tab (3)
21	tab+sua	ab+sua	tab+sua (2)	—	—	—	tab (3)
21	«	ab+sua	tab+sua (1)	—	—	—	sua (2)
2c6	tab+rep	ab+rep	tab+rep (2)	tab+rep (4)	tab+rep (3)	—	rep (7)
3a3	tab+plu	tab+plu	tab+plu (2)	—	—	—	plu (4)

Примечание. Число в скобках указывает на количество проанализированных растений; использованы следующие сокращения: *tabacum* (tab), *suaveolens* (sua), *repanda* (rep), *plumbaginifolia* (plu), *undulata* (und).

время наблюдалась корреляция между морфологией цветка (мс или мф) и предпочтительным присутствием рестрикционных фрагментов мтДНК соответствующей родительской формы (таблица).

Таким образом, наши данные демонстрируют, что среди потомства продуктов соматической гибридизации клеток *Nicotiana* с цмс-аналогами, несущими цитоплазмы диких видов *Nicotiana*, можно обнаружить: а) растения, несущие цитоплазм от обоих или только одного из партнеров; б) растения, несущие пластыды одного родителя и преимущественно митохондрии другого; в) растения с рекомбинантными формами митохондрия.

#### Резюме

Проведено косегрегационный анализ наследования цитоплазматических маркеров у соматических гибридов рода *Nicotiana*. Показано, что признаки, які кодуються генами цитоплазми, можна віднести до двох незалежних груп зчеплення: групи пластоми (пластомна хлорофілдефектність, набір рестрикційних фрагментів хлоропластної ДНК, тип поліпептидів великої субодиниці РубісКО, стійкість до тентоксину) та групи мітохондріону (ознака цитоплазматичної чоловічої стерильності та набір рестрикційних фрагментів мітохондріальної ДНК).

## Summary

Genetic constitution of cytoplasm in segregants for plastome chlorophyll deficiency gene obtained by mitotic segregation from heteroplasmic fusion products (cytoplasmic heterozygotes) of *Nicotiana* was studied. Plants from cells heterozygous for plasmagenes were obtained by fusion of callus protoplasts from plastome chlorophylldeficient mutant of tobacco with mesophyll protoplasts from either one of four cms-analogs of tobacco bearing *repanda*, *undulata*, *suaveolens*, and *plumbaginifolia* cytoplasm. In the study characters coded for by plasmagenes were analysed. The results of our investigation demonstrated that higher plant cell contains at least two cosegregation groups of plasmagenes: segregation group of plastome with corresponding type of chloroplast DNA segregate plastome chlorophyll deficiency, polypeptide composition of large subunit of ribulosebiphosphatecarboxylase/oxygenase (RUBISCO), tentoxine resistance and segregation group of chondriome-sets of species-specific restriction fragments of mitochondrial DNA segregate with the traits of cytoplasmic male sterility/fertility and corresponding changes of flower morphology.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Глеба Ю. Ю., Сытник К. М. Клеточная инженерия растений.— Киев: Наук. думка, 1984.— 160 с.
2. Gleba Y. Y., Evans D. A. Hybridization of somatic plant cells: genetic analysis // Genetic engineering: principles and methods.— New York; London: Plenum press, 1984.— P. 175—210.
3. Levi A., Ridley B., Sink K. C. Biased organelle transmission in somatic hybrids of *Lycopersicon* and *Solanum-Lycopersicoides* // Curr. Genet.— 1988.— 14, N 2.— P. 177—182.
4. Smith M. A., Pay A., Dubits D. Analysis of chloroplast and mitochondrial DNAs in asymmetric somatic hybrids between tobacco and carrot // Theor. and Appl. Genet.— 1989.— 77, N 5.— P. 641—644.
5. Transmission genetics of the somatic hybridization process in *Nicotiana*. I. Hybrids and cybrids among the regenerates from cloned protoplast fusion products / Yu. Gleba, N. N. Kolesnik, I. V. Meshkine et al. // Ibid.— 1984.— 69, N 1.— P. 121—128.
6. Transmission genetics of the somatic hybridization process in *Nicotiana* II. Plastome heterozygotes / Yu. Gleba, I. K. Komarnitsky, N. N. Kolesnik et al. // Mol. and Gen. Genet.— 1985.— 198, N 3.— P. 476—481.
7. Wilson A. J., Chourey P. S. A rapid inextensive method for isolation of restrictable mitochondrial DNA from various plant sources // Plant Cell Rep.— 1984.— 3, N 6.— P. 237—239.
8. Kolodner R., Tewari K. K. The molecular size and conformation of the chloroplast DNA from higher plants // Biochim. et biophys. acta.— 1975.— 402, N 3.— P. 372—384.
9. Segregation of organelle traits following protoplast fusion in *Nicotiana* / C. E. Flick, S. F. Kut, J. E. Bravo et al. // Biotechnology.— 1985.— 3, N 6.— P. 555—560.
10. Maliga P., Fejes E. Physical evidence for recombination of chloroplast DNA in somatic hybrid of *Nicotiana tabacum* and *N. plumbaginifolia* // Freeling M (ed) plant genetics.— New York: Alan R. Liss, 1985.— P. 641—650.

Ин-т клеточ. биологии и генет. инженерии АН УССР,  
Киев

Получено 14.01.91

УДК 575.133:575.153:575.155

Л. А. Ковлер, Л. Р. Шлумуков, Ю. Ю. Глеба

## АНАЛИЗ ТИЛАКОИДНЫХ ПОЛИПЕПТИДОВ У МЕЖТРИБНЫХ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ГИБРИДОВ СЕМЕЙСТВА SOLANACEAE

С помощью электрофореза в полиакриламидном геле исследован состав тилакоидных полипептидов хлоропластов межтрибных гибридов *Nicotiana tabacum*+*Scopolia carniolica*, *N. tabacum*+*Physochlaine officinalis*, *N. tabacum*+*Lycium barbarum*. Во всех комбинациях обнаружено изменение состава белков светособирующего комплекса фото-

© Л. А. Ковлер, Л. Р. Шлумуков, Ю. Ю. Глеба, 1991.