

Summary

The possibilities of application of some cell engineering methods for grape breeding were studied. The method of microclonal propagation *in vitro* using adventitious shoot formation by 6-benzylaminopurine allows to multiply genetically identical plant material. The methods of plant regeneration from callus tissues via organogenesis or somatic embryogenesis can be recommended for creation of new genotypes in particular tetraploids. The frequency of polyploid plant formation can be increased by mutagenic treatments of forming or embryogenic calli with gamma-rays or colchicine.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Monette P. L. Grapevine (*Vitis vinifera* L.) // Biotechnol. Agr. and Forest. Crops II.— 1988.— 6.— P. 3—37.
2. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.*— 1962.— 15, N 3.— P. 473—497.
3. Harris R. F., Stevenson J. H. *In vitro* propagation of *Vitis* // *Vitis*.— 1982.— 21, N 1.— P. 22—33.
4. Chee R., Pool R. M., Bucher D. A method for large scale *in vitro* propagation of *Vitis* // N. Y. Food and Life Sci. Bull.— 1984.— N 109.— P. 1—9.
5. Cheng Z. M., Reisch B. I. Shoot regeneration from petioles and leaves of *Vitis* × *tabruscana* «Catawba» // *Plant Cell Repts.*— 1989.— 8.— P. 403—406.
6. Clog E., Bass P., Walter B. Plant regeneration by organogenesis in *Vitis* rootstock species // *Plant Cell Repts.*— 1990.— 8, N 3.— P. 726—728.
7. Vilaplana M., Mullins M. S. Regeneration of grapevines (*Vitis* spp.) *in vitro*: formation of adventitious buds on hypocotyls and cotyledons of somatic embryos // *J. Plant Physiol.*— 1989.— 134, N 3.— P. 413—419.
8. Krul W. R., Worley J. F. Formation of adventitious embryos in callus cultures of «Seyval», a French hybrid grape // *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*— 1977.— 102, N 3.— P. 360—363.
9. Stamp J. A., Meredith C. P. Somatic embryogenesis from leaves and anthers of grapevine // *Sci. Hort.*— 1988.— 35.— P. 235—250.
10. *Endogenous gibberellin-like substances in somatic embryos of grape (Vitis vinifera* × *Vitis rupestris*) in relation to embryogenesis and the chilling requirement for subsequent development of mature embryos / K. Takeno, M. Koshioka, R. P. Pharis et al. // *Plant Physiol.*— 1983.— 73, N 3.— P. 803—808.
11. Соматический эмбриогенез в культуре ткани винограда / А. О. Марченко, П. Я. Голодрига, В. П. Клименко, Н. М. Пивень // *Физиология и биохимия культ. раст.*— 1987.— 19, № 4.— С. 408—411.
12. Марченко А. О. Индуцированный эмбриогенез в культуре ткани винограда: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Казань, 1990.— 16 с.

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

Получено 14.01.91

УДК 575.224+576.5

М. К. Зубко, Е. И. Зубко, Ф. В. Капранов

ИНДУКЦИЯ ХЛОРОФИЛЛДЕФЕКТНЫХ МУТАНТОВ ТАБАКА — МАРКЕРОВ ДЛЯ КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Гамма-облучением семян и гаплоидных протопластов *Nicotiana tabacum* индуцированы хлорофиллдефектные мутанты с различным фенотипом. Для части из них доказан цитоплазматический или геномный тип наследования хлорофиллдефектности. Опыты по слиянию протопластов *N. tabacum*, *Atropa belladonna*, *Hyoscyamus niger* и *Scopolia carniolica* показали, что мутанты типа *albina* могут быть успешно вовлечены в программу по близкородственной и отдаленной соматической гибридизации.

Предложена простая и эффективная методика для слияния протопластов, лишенных хлорофилла.

© М. К. Зубко, Е. И. Зубко, Ф. В. Капранов, 1991.

Введение. Технология соматической гибридизации предполагает различные системы отбора гибридных продуктов. Один из наиболее распространенных подходов — метод генетической комплементации, основанный на восстановлении в гибридном геноме неаллельных мутаций партнеров, что сопровождается определенным фенотипическим эффектом [1]. Исторически первый и до сих пор применяемый способ генетической маркировки связан с использованием хлорофиллдефектных мутантов [2—5 и др.]. Несмотря на то, что табак по-прежнему остается излюбленным объектом для клеточно-инженерных исследований, для него имеется немного таких мутантов (особенно геномных) с хорошими культуральными свойствами. Принятие новых программ по асимметрической гибридизации *N. tabacum* с близкородственными и отдаленными партнерами побудило нас к проведению опытов по индукции хлорофильных (в частности ядерных) мутантов этого вида с целью дальнейшего их использования для отбора неполовых гибридов. В качестве мутагенного фактора мы предпочли гамма-облучение, объектами служили гаплоидные протопласты и семена табака. Посредством соматической гибридизации изучали особенности наследования хлорофиллдефектности у некоторых из полученных мутантов.

Материалы и методы. Растительный материал:

- 1) семена *N. tabacum*, сорт Лехия, полученные после самоопыления;
- 2) асептические растения *N. tabacum* андрогенетических гаплоидных линий 773-4р-4 и 773-4р-2 (любезно предоставлены Г. В. Изманом, Всесоюз. НИИ табака и махорки, Краснодар);
- 3) асептические растения двойного мутанта *N. tabacum DSR-A15*, сочетающего пластомные мутации хлорофиллдефектности и устойчивости к стрептомицину [6] (любезно предоставлен П. Малигой, Сегад, ВНР);
- 4) семена красавки *A. belladonna* (Берлин, ФРГ), скополии *S. carniolica* (Роттердам, Нидерланды) и белены черной *H. niger* (Марбург, ФРГ).

Для выделения протопластов использовали ткани асептических растений. Нарезанные «елочкой» листья (0,4—0,8 г) помещали на поверхность ферментной смеси (5 мл на чашку Петри диаметром 8 см), приготовленной на солевой среде W5 [7]. Растворы, используемые для ферментации листьев красавки и скополии, содержали 0,6 % Onozuka R10, 0,4 % Macerozyme R10 и 0,2 % Driselase («Serva», ФРГ). Ткани табака и белены ферментировали этой же смесью, разбавленной в 1,5—2 раза средой W5, в течение 15—18 ч при температуре 26 °С. Затем к содержимому чашки добавляли 5 мл свежей среды W5 и фильтровали его с помощью пастеровской пипетки в центрифужную пробирку через воронку с ситом (поры размером 60—80 мкм). После центрифугирования в течение 2 мин при 600 об/мин осадок протопластов из хлорофиллдефектных мутантов, ресуспендированный в 0,8—1 мл среды W5, использовали для слияний. Протопласты из тканей хлорофиллдефектных мутантов, выделенные таким способом, не требуют дополнительной очистки. Осадок протопластов, полученных из зеленых листьев, ресуспендировали в 0,8—1 мл среды W5 и наслаивали на поверхность 0,5 М раствора сахарозы, 5—7 мл которого предварительно помещали в отдельную центрифужную пробирку. После центрифугирования в течение 3 мин при 800 об/мин жизнеспособные протопласты остаются на границе растворов сахарозы — W5. Их следует собрать пастеровской пипеткой и дважды отмыть средой W5. Для слияния протопласты достаточно отмыть один раз.

Мутагенез семян. Воздушно-сухие семена табака сорта Лехия облучали в дозе 1 000 Гр на кобальтовой установке и после поверхностной стерилизации высевали на среду МС [8], разбавленную в 3 раза и содержащую 1 мг/л БАП. Через 2 недели проростки индивидуально переносили на среду МС. В дальнейшем отбирали пестролистный растеньица, отделяли от них листья с наиболее выраженными секторами хлорофиллдефектности, ранили лезвием и помещали на среду

МС с 0,05 мг/л ИУК и 1,5 мг/л БАП — для регенерации побегов с целью расхимеривания.

Мутагенез протопластов. Свежевыделенные протопласты гаплоидных линий 773-4р-4, 773-4р-2 и 745-6 (около $0,5 \cdot 10^6$ клеток каждой линии), один раз отмытые и ресуспендированные в 3 мл среды W5, подвергали гамма-облучению в дозе 10—15 Гр. После облучения их отмывали еще раз в 10 мл среды W5 и культивировали на жидкой среде КЗ [9] при плотности около 10^4 клеток в 1 мл в термостате при

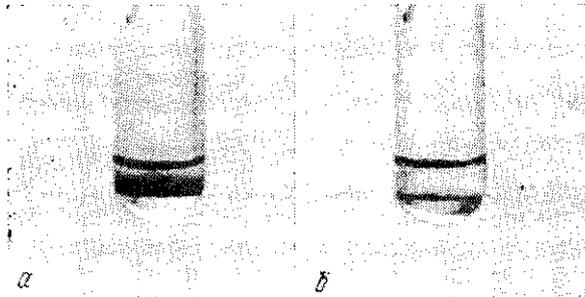


Рис. 1

26 °С. Через неделю, когда начались массовые деления, к культуре добавляли 1/5 часть (от начального объема) свежей среды и продолжали культивирование на рассеянном свете. Еще через 2 недели культуру разбавляли свежей средой, увеличивая количество чашек в 2 раза. Спустя неделю микроколонии заплывали в агаризованную среду МС с 0,05 мг/л

ИУК, 1,5 мг/л БАП, 20 г/л сахарозы и 0,8 % агара Difco, увеличивая количество чашек при этом в 5—8 раз. Заплавленные колонии культивировали при интенсивном освещении — около 2 000 лк. Через 2—4 недели среди зеленых протоклонов отбирали бесцветные колонии и переносили их индивидуально на среду того же состава (но с 30 г/л сахарозы).

Слияние протопластов «в интерфазе». Часто применяемый для слияния протопластов метод Менцеля [10] модифицирован нами специально для тех случаев, когда, по крайней мере, один из партнеров представлен протопластами, лишенными хлорофилла. Модификация касается процедурно-технической части метода; химическая его сторона может оставаться без изменений. Ниже приводим обобщенный вариант методики.

На дно пробирки объемом 10—12 мл с закручивающейся крышкой (фирма «Flow», Англия) помещают 0,4 мл раствора полиэтиленгликоля (30 % ПЭГ-4000, 0,3 М глюкозы и 66 мМ CaCl_2). При этом минимальном объеме верхняя граница раствора ПЭГ занимает максимальную площадь, определяемую диаметром пробирки. Отмытые один раз протопласты обоих партнеров следует объединить в равных соотношениях и отмыть их совместно еще раз средой W5. Осажденные протопласты (общее количество — $5 \cdot 10^5$ — 10^6 клеток), ресуспендированные в 0,5 мл среды W5, надо аккуратно (по стенке пробирки) наслоить пастеровской пипеткой на поверхность раствора ПЭГ (рис. 1: слияние протопластов «в интерфазе»: а — смесь родительских протопластов, наложенная на поверхность раствора ПЭГ (до центрифугирования); б — уплотнение протопластов с образованием интерфазы на границе растворов ПЭГ — W5 (после центрифугирования)). Аккуратно, не встряхивая пробирку, центрифугировать ее содержимое при 800 об/мин в течение 20—40 с (не более), снижая затем обороты ротора постепенно (в течение 30—40 с) до полной его остановки. Смесь протопластов в виде тонкого слоя располагается в интерфазе, на границе растворов ПЭГ — W5 (см. рис. 1, б). В этих условиях достигается хороший контакт клеток между собой и с раствором ПЭГ, что важно для эффективного слияния. Сразу после окончания центрифугирования следует оставить пробирку неподвижной и начать отсчет времени слияния, которое длится 10—15 мин в зависимости от количества протопластов. По истечении этого времени в пробирку аккуратно (по стенке) добавляется 0,5 мл буферного раствора с высоким рН, состоящего из компонентов А и Б. (Рас-

твор А содержит 0,4 М глюкозу, 66 мМ CaCl₂ и 10 % ДМСО. Раствор Б включает 0,3 М глицин, рН 10,5 (доведенный NaOH). Оба раствора хранятся замороженными каждый отдельно. Они объединяются (9 объемных частей раствора А и одна часть раствора Б) и стерилизуются фильтрованием непосредственно перед слиянием протопластов.) При этом надо стремиться не разрушить слой протопластов в интерфазе. Через 15 мин инкубации с буфером смесь протопластов необходимо отмыть средой W5, добавляя ее в пробирку с помощью пастеровской пипетки довольно сильной струей, чтобы перемешать слой ПЭГ, находящийся на дне пробирки. Во избежание повреждения протопластов струю отмывочной среды следует выливать по стенке на 2—3 см выше уровня буферного раствора. Вполне достаточно одной отмывки в 10 мл среды W5 при щадящем режиме центрифугирования (600 об/мин, в течение 1—1,5 мин). После удаления надосадочной жидкости осадок протопластов, слегка ресуспендированный в 1,5—2 мл культуральной среды, переносят в чашку Петри диаметром 8 или 10 см (в зависимости от количества протопластов), куда предварительно наливают соответственно 5 или 8 мл этой же культуральной среды. Культивируют протопласты в рекомендуемых для конкретных культур условиях.



Рис. 2

В описываемых здесь экспериментах продукты слияния культивировали на среде SW [5].

Отбор гибридных клонов. Поскольку среди партнеров по слияниям всегда были протопласты хлорофиллдефектной линии табака, гибридные колонии определяли по восстановлению у них способности к позеленению на регенерационной среде, аналогичной по составу таковой для регенерации протоклонов в опытах по мутагенезу.

Цитологический анализ проводили согласно стандартной методике [11] — на давленных препаратах фиксированных корешков или протопластов. Протопласты фиксировали на 3—4-й день культивирования (после начала массовых делений) в течение 4—5 ч, после чего окрашивали орсенном.

Результаты и обсуждение. Гамма-облученные протопласты гаплоидных линий табака в наших опытах начинали делиться через неделю (на 2—4 дня позднее контрольных). Колонии, образовавшиеся из протопластов линий 773-4р-2 и 773-4р-4, на всех этапах культивирования были достаточно рыхлыми, что в дальнейшем несколько затрудняло отбор клонов, лишенных хлорофилла. Протоклоны линии 745-6 проявили способность к регенерации растеньиц на стадии небольших колоний (2—3 мм в диаметре), практически минуя стадию каллусогенеза. Среди них не обнаружено ни одного хлорофильного мутанта. В опыте с гаплоидной линией 773-4р-4 отобрано более 15 бесцветных клонов, большинство из которых после пересадки на свежую регенерационную среду с 30 г/л сахарозы постепенно приобрели зеленую окраску. Только два оказались хлорофиллдефектными. Один из них, неспособный к регенерации, со временем погиб. От другого в течение месяца были получены альбиносные побеги. Растения этой линии, обозначенной нами ФМ, хорошо кустятся на среде с 0,5—1 мг/л БАП и растут на безгормональной среде. Их листьях снежно-белого цвета, несколько удлиненные. На рис. 2 изображен хлорофиллдефектный мутант табака (ФМ), индуцированный гамма-облучением гаплоидных протопластов.

Прежде чем использовать мутанты в качестве маркеров при соматическом

тической гибридизации, важно знать характер наследования их мутаций. Когда нет возможности осуществить генетический анализ, альтернативный ему подход может состоять в проведении комплементационного анализа путем слияния протопластов. Ранее нами показано, что характер контроля хлорофиллдефектности у мутантов неизвестной природы можно установить, имея в качестве тестера пластомный хлорофиллдефектный мутант [12]. Логика этих экспериментов сводится к тому, что при слиянии протопластов геномного и пластомного мутантов

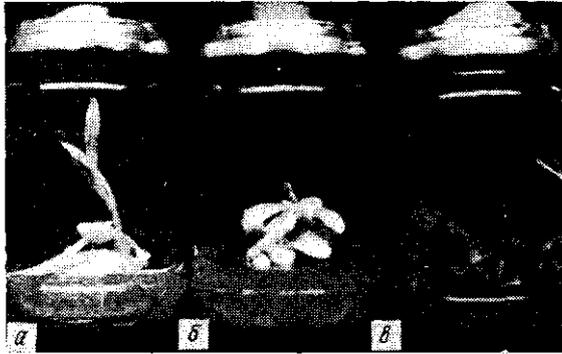


Рис. 3

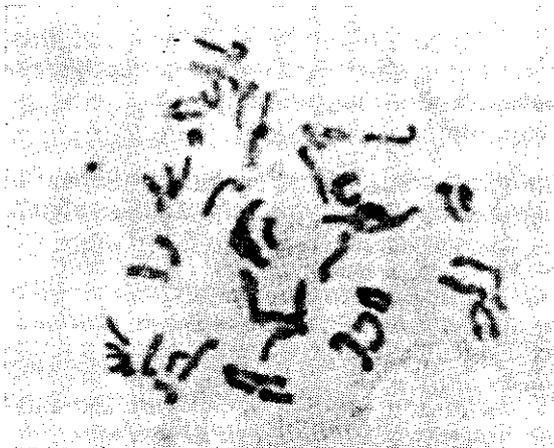


Рис. 4

в данном случае свидетельствует о том, что хлорофиллдефектность линии FM — ядерная рецессивная мутация.

Кариотип мутанта FM ($2n=48$) представлен диплоидным набором хромосом (рис. 4), хотя в культуре протопластов изредка появляются полиплоидные клетки. Анафаза такой клетки приведена на рис. 5.

В опыте по мутагенезу протопластов линии 773-4p-2 (15 Gr) мы пошли по более тщательному пути отбора бесхлорофильных клонов. После того как большинство зеленых колоний достигло на жидкой регенерационной среде размеров 1,5—3 мм в диаметре, их выбраковывали с помощью стерильной лопатки, чтобы обогатить популяцию мелкими колониями, среди которых, как мы заметили в предыдущем эксперименте, чаще встречаются бесхлорофильные клоны. Отобрано более 50 бесцветных протоклонов, среди которых после перенесения на агаризованную среду идентифицированы четыре хлорофиллдефектных мутанта, к настоящему времени находящиеся в стадии регенерации. В дальнейшем планируются опыты по анализу этих мутантов.

В связи с некоторыми трудностями отбора хлорофиллдефектных

(если они достаточно близки филогенетически) в гибридных клетках всегда имеет место восстановление биосинтеза хлорофилла; если оба мутанта — пластомные, зеленые клоны не возникают, хотя это потенциально возможно в случае рекомбинации хлоропластной ДНК, что, однако, происходит весьма редко [13].

Для анализа полученного мутанта FM мы сливали протопласты этой линии с протопластами пластомного хлорофиллдефектного мутанта DSR-A15. После перенесения микроколоний на регенерационную среду частота комплементации, оцениваемая как отношение зеленых клонов к общему их количеству, составляла около 2%. Гибридные растения, регенерированные из более тридцати зеленых клонов, стабильно поддерживают зеленую окраску (рис. 3: комплементация по биосинтезу хлорофилла у соматических гибридов (в) между мутантом FM (а) и пластомным мутантом DSR-A15 (б)). Факт комплементации

мутантов (см. выше) в данном случае не представляется возможным точно определить частоту их возникновения, однако, по косвенным оценкам, она составляет не менее 10^{-5} в каждом из двух опытов.

Другой наш подход к мутагенезу связан с облучением семян. Согласно литературным данным, обработка семян химическими мутагенами — достаточно эффективный метод индукции цитоплазматических мутаций. В то же время незначительная часть пестролистных растений после его применения является результатом мутирования генома [14]. Учитывая преимущественную эффективность гамма-облучения в отношении действия на геном, мы индуцировали хлорофильные мутанты, подвергая семена табака облучению массивными дозами (1 000 Гр) с последующим восстановлением облученного материала *in vitro*. Условия восстановления растений после применения высоких доз определены

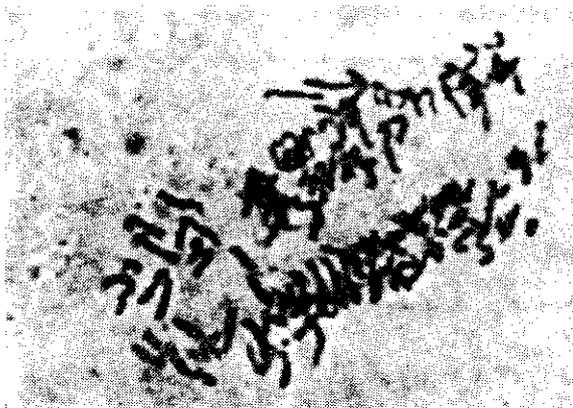


Рис. 5



Рис. 6

высоких доз определены нами в предыдущих экспериментах [15].

При работе с небольшой выборкой восстановленных гамма-проростков (около 100) удалось индуцировать несколько пестролистных растений, отличающихся по степени пестролистности и окраске секторов. Для расхимеривания отобраны четыре растения с хорошо выраженными зонами хлорофиллдефектности. У двух из них мутантные секторы имели бледно-зеленую окраску, у двух — белую. Два растения со светло-зелеными секторами и одно — с белыми не удалось расхимерить ни черенкованием, ни регенерацией побегов из листьев. Пестролистность этих растений проявлялась также у потомства первого поколения после самоопыления (рис. 6: пестролистные растения F_1 -мутантов табака, индуцированных облучением семян). Изложенное свидетельствует о цитоплазматическом контроле хлорофиллдефектности у изученных растений.

Четвертое пестролистное растение (*Nt-100a*) оказалось сложной химерой, сочетающей мутантные ткани разных типов. При черенковании этой линии выщепились растения желтого цвета (*R-100y*), на которых время от времени появляются зеленые участки, что характерно для цитоплазматических мутантов. На регенерационной среде из пестролистных листьев линии *Nt-100a* получены однородные растения еще

трех фенотипов: хлорофиллдефектный альбиносный мутант *R-100a* (рис. 7, а); светло-зеленый мутант *R-100g* (рис. 7, б — слева) и зеленое растение дикого типа (рис. 7, б — справа).

Несомненно, зеленые растения (см. рис. 7, б) произошли из тканей дикого типа. Растения *R-100a* и *R-100g* стабильно сохраняют однородную окраску.

Поскольку среди хлорофильных мутантов наибольший интерес для клеточно-инженерных исследований представляют именно альбиносные

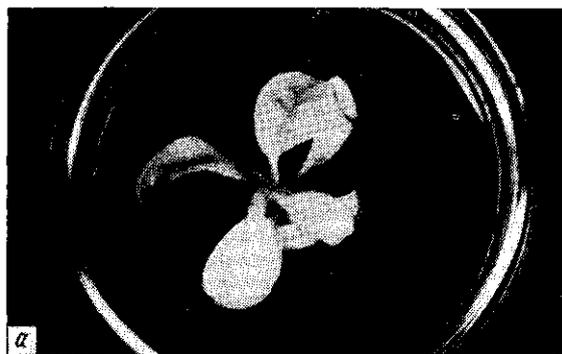


Рис. 7

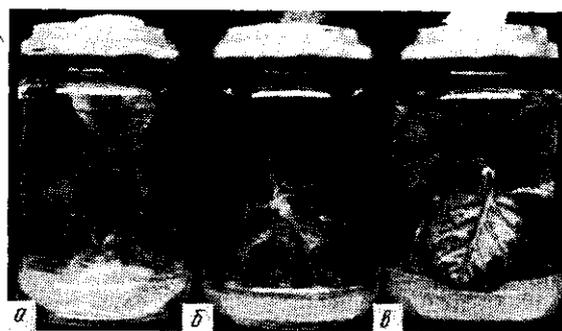


Рис. 8

линии, мы изучали в опытах по слиянию протопластов альбина-мутант *R-100a*. При аналитическом слиянии в комбинации с пластомным мунтатом *DSR-A15*, повторенном в трех независимых опытах, не было обнаружено ни одного зеленого клона. Это согласуется с пластомным контролем хлорофиллдефектности у линии *R-100a*. В независимых экспериментах по межродовой гибридизации *R-100a* с красавкой, беленой и скополией отобраны соответственно 11, 3 и 7 зеленых клонов, из которых в дальнейшем регенерированы гибридные растения зеленого цвета (рис. 8: зеленые растения соматических гибридов табака *R-100a* с *A. belladonna* (а), *H. niger* (б) и *S. carniolica* (в)). Ни одно из них не выщепляло белых секторов, что могло бы свидетельствовать о сегрегации пластид и, следовательно, подтверждать пластомную природу мутанта *R-100a*. Тем не менее результаты комплементационного анализа не дают повода сомневаться в этом. С другой стороны, отсутствие пестролистности растений *R-100a* при регенерации из исходного пестролистного мутанта *R-100*, а также после гибридизации с красавкой, беленой и скополией наводит на мысль о более сложной природе мутанта *R-100a*. В частности, можно предположить, что мутация контролируется пластомом и геномом одновременно. В пользу такого предположения, кроме вышеизложенного, косвенно свидетельствует еще одно обстоятельство. Предварительное изучение гибридных растений из комбинации с красавкой, беленой и скополией дает основания полагать, что все они являются не только цибридами, но и в разной степени асимметрическими ядерными гибридами. Отсюда следует, что в комплементацию мутанта *R-100a* вносят вклад цитоплазматические и ядерные детерминанты. Неизбежность этого может быть обусловлена двойной мутацией линии *R-100a*. Однако это — предмет дальнейших исследований.

Отличаясь высокой митотической активностью в культуре прото-

поскольку среди хлорофильных мутантов наибольший интерес для клеточно-инженерных исследований представляют именно альбиносные линии, мы изучали в опытах по слиянию протопластов альбина-мутант *R-100a*. При аналитическом слиянии в комбинации с пластомным мунтатом *DSR-A15*, повторенном в трех независимых опытах, не было обнаружено ни одного зеленого клона. Это согласуется с пластомным контролем хлорофиллдефектности у линии *R-100a*. В независимых экспериментах по межродовой гибридизации *R-100a* с красавкой, беленой и скополией отобраны соответственно 11, 3 и 7 зеленых клонов, из которых в дальнейшем регенерированы гибридные растения зеленого цвета (рис. 8: зеленые растения соматических гибридов табака *R-100a* с *A. belladonna* (а), *H. niger* (б) и *S. carniolica* (в)). Ни одно из них не выщепляло белых секторов, что могло бы свидетельствовать о сегрегации пластид и, следовательно, подтверждать пластомную природу мутанта *R-100a*. Тем не менее результаты комплементационного анализа не дают повода сомневаться в этом. С другой стороны, отсутствие пестролистности растений *R-100a* при регенерации из исходного пестролистного мутанта

пластов, хорошим ростом и регенерационной способностью, хлорофилл-дефектные мутанты табака ФМ и R-100a представляют интерес для последующих клеточно-инженерных экспериментов.

Резюме

Описані експерименти по індукції хлорофиллдефектних мутантів тютюну за допомогою гамма-опромінення насіння та гаплоїдних протопластів. Для частини з них доведено цитоплазматичний чи геномний тип успадкування хлорофиллдефектності. Досліди по злиттю протопластів *N. tabacum*, *A. belladonna*, *H. niger* і *S. carniolica* показали, що мутанти типу *albina* можуть бути успішно використані у програмах по близькоспорідненій та віддаленій соматичній гібридизації.

Запропонована проста і ефективна методика для злиття протопластів, що не мають хлорофілу.

Summary

Chlorophyll deficient *Nicotiana tabacum* mutants with the different phenotypes were induced using gamma-irradiation of seeds and haploid protoplasts. Cytoplasmic or genomic type of chlorophyll-deficiency inheritance has been shown for part of them. Experiments on protoplast fusion for *N. tabacum*, *Atropa belladonna*, *Hyoscyamus niger* and *Scopolia carniolica* have conformed the possibility to involve albino mutants in projects on close related and remote somatic hybridization.

Simple and effective procedure for fusion of chlorophyll-less protoplasts is proposed.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Глеба Ю. Ю., Зубко М. К. Теоретические и прикладные аспекты клеточной инженерии растений // Итоги науки и техники.— М.: ВИНТИ. 1988.— (Сер. Биотехнология; Т. 9).— С. 3—72.
2. Melchers G., Labib G. Somatic hybridization of plants by fusion of protoplasts. Selection of light-resistant hybrids of «haploid» sensitive varieties of tobacco // Mol. Gen. Genet.— 1974.— 135, N 2.— P. 277—294.
3. Глеба Ю. Ю., Бугенко Р. Г., Сытник К. М. Слияние протопластов и парасексуальная гибридизация *Nicotiana tabacum* L. // Докл. АН СССР.— 1975.— 221, № 5.— С. 1196—1198.
4. Schieder O. Hybridization experiments with protoplasts from chlorophyll deficient mutants of some *Solanaceous* species // Planta.— 1977.— 137.— P. 253—257.
5. Somatic hybridization in potato: use of gamma-irradiated protoplasts of *Solanum pinnatisepium* in genetic reconstruction / V. A. Sidorov, M. K. Zubko, A. A. Kuchko et al. // Theor. and Appl. Genet.— 1987.— 74, N 3.— P. 364—368.
6. Svob Z., Maliga P. *Nicotiana tabacum* mutants with chloroplast encoded streptomycin resistance and pigment deficiency // Ibid.— 1986—72, N 5.— P. 637—643.
7. Medgyesy P., Menczel L., Maliga P. The use of cytoplasmic streptomycin resistance chloroplast transfer from *Nicotiana sylvestris* and isolation of their somatic hybrids // Mol. and Gen. Genet.— 1980.— 179, N 3.— P. 693—698.
8. 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.
9. Plant protoplast fusion and growth of intergenetic hybrid cells / K. N. Kao, F. Constabel, M. R. Michayluk, O. L. Gamborg // Planta.— 1974.— 120, N 1.— P. 215—227.
10. 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.
11. Дарлингтон С. Д., ла Кур Л. Ф. Хромосомы, методы работы.— М.: Атомиздат, 1980.— 182 с.
12. Анализ мутаций хлорофиллдефектности у растений при помощи слияния протопластов / В. А. Сидоров, М. К. Зубко, М. П. Коломиец, И. К. Комарницкий // Генетика.— 1987.— 23, № 2.— С. 311—316.
13. Medgyesy P., Fejes E., Maliga P. Interspecific chloroplast recombination in a *Nicotiana* somatic hybrid // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1985.— 82, N 24.— P. 6960—6964.
14. Efficient induction and selection of chloroplastencoded antibiotic-resistant mutants in *Nicotiana* / R. Fluhr, D. Aviv, E. Galun, M., Edelman // Ibid.— N 10.— P. 1485—1489.
15. Зубко М. К., Зубко Е. И., Глеба Ю. Ю. Восстановление жизнеспособности проростков *in vitro* // Докл. АН СССР.— 1990.— 313, № 2.— С. 453—457.

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

Получено 14.01.91