

Резюме

За допомогою апарату теорії мішені був визначений розмір проміжних структур, які виникають в процесі утворення мікротрубочок. Їх величина відповідає 69—77 димерам тубуліну.

Summary

It was determined with target theory the size of intermediate structures which arized during the microtubules assembly. Their size correspond to 69—77 tubuline dimers.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. De Brabander M. Microtubules, central elements of cellular organization // *Endeavour*.— 1982.— 6, N 3.— P. 124—134.
2. Kirschner M., Mitchison T. Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis // *Cell*.— 1986.— 45, N 2.— P. 329—342.
3. Karecla P., Hirst E., Bayley P. Polymorphism of tubulin assembly *in vitro* // *J. Cell Sci.*— 1989.— 94, N 1.— P. 479—488.
4. Дертингер Г., Юнг Х. Молекулярная радиобиология.— М.: Атомиздат, 1973.— 248 с.
5. Прохневский А. И., Сорочинский Б. В. Модификация этанолом сборки микротрубочек мозга // *Нейрохимия*.— 1990.— 9, № 1.— С. 96—100.
6. Bayley P. M., Butler F. M. M., Manser E. J. Control of nucleation in microtubules self-assembly // *FEBS Let.*— 1986.— 205, N 2.— P. 230—234.
7. Voter W. A., Erickson H. The kinetics of microtubules assembly // *J. Biol. Chem.*— 1984.— 259, N 16.— P. 10430—10438.
8. Сорочинский Б. В., Прохневский А. И., Гродзинский Д. М. Модификация таксолом процесса сборки облученных микротрубочек // *Докл. АН СССР*.— 1990.— 310, № 3.— С. 735—737.
9. Coss R. D., Bamberg J. R., Dewry W. O. The affects of X irradiation on microtubules assembly *in vitro* // *Rad. Res.*— 1981.— 85, N 1.— P. 99—115.

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

Получено 14.01.91

УДК 575.127

Я. И. Ратушняк, Н. М. Пивень, С. А. Латыпов, А. М. Самойлов,
А. В. Завгородняя, Ю. Ю. Глеба

ИЗМЕНЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ РАСТЕНИЙ ТОМАТА МЕТОДОМ «ГАММА-СЛИЯНИЯ» ПРОТОПЛАСТОВ *LYCOPERSICON ESCULENTUM* MILL. И *L. PERUVIANUM* VAR. *DENTATUM* DUN.

Асимметричные соматические гибриды получены между *L. esculentum* Mill. (пластомный хлорофиллдефектный мутант Pl-alb 1) и *L. peruvianum* var. *dentatum* Dun. (линии 3767, 3772) в результате слияния мезофильных протопластов культурного томата с мезофильными протопластами дикого вида, облученными гамма-радиацией в дозе 100, 200 Гр. Эти дозы радиации были суперлетальными для протопластов *L. peruvianum* var. *dentatum*. Гибридные колонии были отобраны по их способности к позеленению; восстановление у них фотосинтетической активности осуществлялось за счет переноса хлоропластов от *L. peruvianum* var. *dentatum*, в то время как протопласты *L. esculentum* образовывали белые колонии. Эффективность гибридизации зависела от дозы облучения протопластов дикого партнера и не превышала 6%. Полученные гибриды по уровню плоидности, морфологическим (форма и размер куста, опушенность стебля, форма листа, число цветков, расположение пестика, окраска и размеры плодов) и биохимическим (изозимные спектры эстеразы, аспаратаминотрансферазы и кислой фосфатазы, рестриктные спектры хлоропластной и митохондриальной ДНК) признакам разделены на шесть фенотипических групп. Формообразование этих групп зависело от дозы облучения и используемой линии *L. peruvianum* var. *dentatum*.

© Я. И. Ратушняк, Н. М. Пивень, С. А. Латыпов, А. М. Самойлов, А. В. Завгородняя,
Ю. Ю. Глеба, 1991.

Введение. Репродуктивная изоляция видов является основным барьером для свободного комбинирования генетических систем у организмов с половым размножением. Гибридизация соматических клеток растений позволяет создавать уникальные сочетания ядерных и цитоплазматических генов родительских форм в обход полового скрещивания. При этом могут преодолеваются ограничения репродуктивного цикла, связанные с несовместимостью как на спорофитном, так и на гаметофитном уровне. Соматическая гибридизация с применением гамма-облучения протопластов одного из партнеров дает возможность получать асимметричные гибридные формы, содержащие полный хромосомный набор вида-реципиента и часть хромосом вида, выступающего в роли донора. При этом увеличивается также вероятность получения гибридных форм. Подобная интрогрессия может способствовать повышению частоты рекомбинации в мейотическом цикле соматических гибридов за счет увеличения уровня обмена в тех частях их генома, которые в симметричных гибридах блокируются.

В последние годы разработаны и усовершенствованы высокоэффективные приемы культивирования протопластов, их слияния и селекции соматических гибридов [1]. Это позволило значительно расширить число видов, вовлекаемых в процесс парасексуальной гибридизации, в том числе и принадлежащих к роду *Lycopersicon* [2—10]. Соматические гибриды у томатов были получены в комбинациях *L. esculentum* Mill. + *L. peruvianum* Mill. [5, 8—10] и *L. esculentum* Mill. + *L. peruvianum* var. *dentatum* Dun. [4, 7]. Часть этих растений представляла собой не только ядерные, но и цитоплазматические гибриды. Фертильные формы удалось вывить только в комбинации *L. esculentum* Mill. и *L. peruvianum* Mill. [5, 9, 10]. Для соматических гибридов *L. esculentum* Mill. + *L. peruvianum* var. *dentatum* Dun. только у тетраплоидного клона формировались плоды с единичными жизнеспособными семенами. В обычных половых кроссах виды *L. esculentum* и *L. peruvianum* var. *dentatum* проявляют одностороннюю совместимость только в тех случаях, когда *L. esculentum* используется как материнская форма, что полностью исключает получение гибридов с цитоплазмой дикого вида [11, 12].

В настоящем исследовании предполагалось решить следующие задачи: разработать эффективную систему селекции соматических гибридов *L. esculentum* Mill. + *L. peruvianum* var. *dentatum* Dun. при облучении клеток дикого томата гамма-радиацией и провести оценку генетической изменчивости полученных асимметричных гибридных растений.

Материалы и методы. В качестве одной родительской формы использовали растения *L. esculentum* Mill., пластомный хлорофиллдефектный мутант типа *albina* P1-alb 1 на основе сорта *Frühe Liebe*. Мутант выделен и изучен Самсоновой [13]. Семена любезно предоставлены Т. А. Гавриленко (Всесоюз. ин-т растениеводства, Ленинград). В качестве другого родителя использовали растения дикого типа *L. peruvianum* var. *dentatum* Dun. (линии 3767, 3772). Семена любезно предоставлены А. А. Жученко и Н. Ф. Бочарниковой (Ин-т экол. генетики АН МССР, Кишинев). Растения культивировали *in vitro* на безгормональной среде Р [14] при температуре $26 \pm 1^\circ\text{C}$, освещении 3 000 лк и 16-часовом фотопериоде. Листья 20—30-дневных асептически выращиваемых растений мацерировали 16 ч в ферментном растворе при 25°C . Последний содержал 0,4 % целлюлазы Onozuka R-10 («Serva», ФРГ), 0,2 % дриселазы («Sigma», США), 0,5 М сахарозу и 5 мМ CaCl_2 , pH 5,6. Очистку и слияние изолированных протопластов проводили, согласно методу Менцеля [15]. Плотность высева протопластов определяли на гемоцитометре. Технология выращивания растений *in vitro* и выделения протопластов дикого томата (линий 3767 и 3772) аналогична вышеописанной для культурного томата. Незначительные отличия следующие. Растения этого вида культивировали на среде MS [16] с вдвое меньшим количеством макросолей; ферментный

раствор содержал 0,3 % целлюлазы Опозука R-10 и 0,15 % дриселазы. Изолированные протопласты *L. peruvianum* var. *dentatum* подвергали гамма-облучению дозами от 100 до 800 Гр (⁶⁰Со-источник, 10 Гр/мин). После слияния протопласты и гетерокарионы культивировали в 2 мл среды ТМ-2 [17]. Спустя 2—3 дня протопласты переносили в пластиковые чашки Петри (90 мм) со свежей средой ТМ-2. Чашки выставляли на рассеянный свет (1 000 лк). После 2—3 недель культивирования колонии переносили на агаризованную среду ТМ-3 и выращивали 5—8 дней при освещенности 3 000—4 000 лк. Гибридные каллусы отбирали на регенерационной среде ТМ-4 по признаку позеленения, поскольку протопласты *L. peruvianum* var. *dentatum* неспособны к делению вследствие обработки гамма-лучами, тогда как каллусы *L. esculentum* отличались белой окраской и слабым ростом. Далее каллусы выращивали в течение месяца на среде ТМ-4 при 4 000 лк, затем зеленые протоклоны переносили на свежую среду. Эффективность слияния протопластов определяли по количеству полученных зеленых каллусов. Регенерацию побегов наблюдали через два месяца после начала эксперимента. Индекс регенерации определяли по количеству зеленых каллусов, способных к морфогенезу. Побеги укореняли на среде MS для выращивания растений с добавлением 0,1 мг/л нафтилуксусной кислоты. Растения-регенеранты высаживали в почву и испытывали в полевых условиях.

Анализ множественных молекулярных форм ферментов эстеразы, кислой фосфатазы и аспаратаминотрансферазы проводили в 7,5 %-ном полиакриламидном геле [18]. Ферменты выявляли по методу [19]. Митохондрии выделяли из незрелых плодов, а пластиды — из листьев, митохондриальную (мт) и хлоропластную (хл) ДНК — по ранее описаным методикам [20, 21] с незначительными модификациями. ДНК расщепляли рестрикционными эндонуклеазами *Pst*I, *Sac*I и *Eco*RI (НПО «Фермент», Вильнюс). Полученные фрагменты разделяли в 0,8 %-ном агарозном геле. В качестве маркеров использовали фрагменты ДНК фага λ.

В полевых условиях в течение двух вегетационных периодов у гибридных растений изучали размер куста, морфологию листьев, структуру соцветий, элементы цветка, форму и строение плодов [22]. Фертильность пыльцы определяли ацетокарминовым методом, а жизнеспособность — проращиванием на смеси, содержащей 1,5 % сахарозы, 0,1 % агара и 0,005 % борной кислоты.

Для приготовления препаратов метафазных хромосом использовали корешки клонов, растущих *in vitro*. Корешки обрабатывали насыщенным водным раствором монобромнафталина, фиксировали в ацетоалкоголе (1 : 3) и красили в 1 %-ном ацетогематоксилине. Кариотип каждого растения анализировали на 20—30 метафазных пластинках, мейоз — на трех гибридных клонах, растущих в поле. Цветочные бутончики размером 3—5 мм фиксировали в ацетоалкоголе (1 : 3) и окрашивали в 1 %-ном ацетогематоксилине. Материнские клетки пыльцы просматривали на временных давленных препаратах из пыльников.

Результаты и обсуждение. Были проведены 33 эксперимента по слиянию мезофильных протопластов *L. esculentum* и *L. peruvianum* var. *dentatum*. При этом в качестве партнера для слияния с культурным томатом 24 раза использовали растения линии 3767 и 9 раз — линии 3772. При культивировании протопластов и гетерокарионов выращены 11 840 колоний, из которых отселектированы как гибридные 260 зеленых каллусов. В трех экспериментах из 86 гибридных протоклонов были получены 33 растения.

Смесь мезофильных протопластов обоих родителей и продуктов их слияния культивировали в 2—6 мл среды ТМ-2. К концу второй недели наблюдали массовые деления. Следует отметить, что обработка протопластов дикого томата гамма-облучением дозой 10 Гр полностью подавляла их митотическую активность. Протопласты хлорофильного мутанта P1-alb 1 активно делились и формировали каллусы белого цвета.

Каллусы, определявшиеся как гибридные, отличались зеленой кой и, как правило, более интенсивным ростом. Частота возник зеленых каллусов была сравнительно низкой (менее 6 %) и з от дозы облучения протопластов дикого партнера. Наибольши гибридных колоний наблюдался при 100—200 Гр. Сроки реге побегов и их укоренения для каждого протоклона были разл:

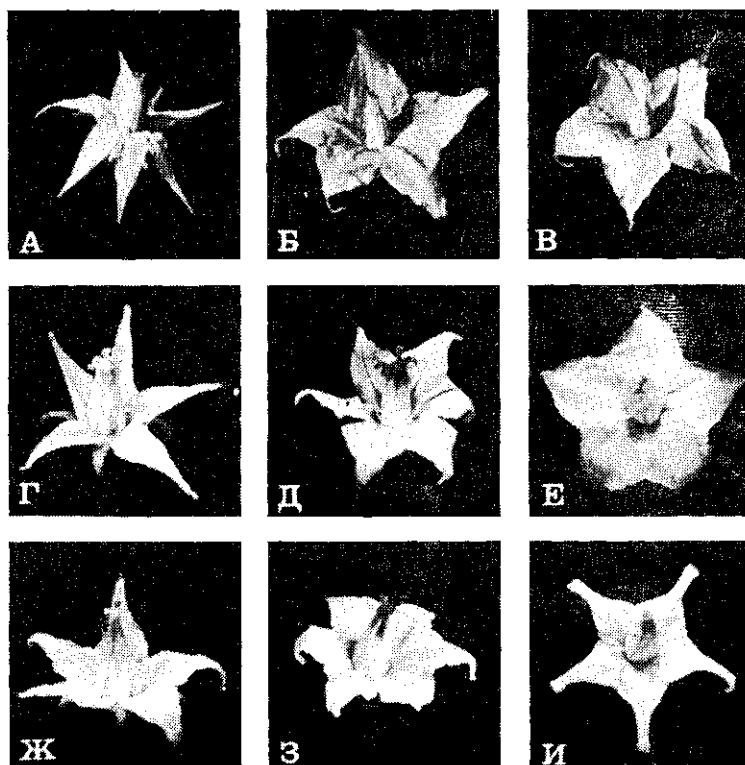


Рис. 1

Часть отобранных гибридных каллусов (до 50 %) погибала и генерировала побеги. В среднем индекс регенерационной спс гибридных протоклонов составил 40 %.

Морфологическую оценку соматических гибридов проводи левых условиях на примере 22 клонов. Гибридные растения ха зовались индетерминантным типом куста, который обычно 100—110 см в высоту и был сильно облиственным. Особенност логи стемблей, листьев, соцветий, цветков и плодов *L. esculentum peruvianum* var. *dentatum* (линий 3767, 3772) и их соматическ гибридов, полученных при дозах облучения 100 и 200 Гр, предст табл. 1. На рис. 1 показана морфология цветков *L. esculentum* сорт Frühe Liebe); *L. peruvianum* var. *dentatum* (б — линия ; линия 3772); соматических гибридов (г — 1В; д — 2F; е — 12С; з — 1F; и — 3H).

При помощи изучения множественных молекулярных форм (рис. 2: *Le* — *L. esculentum* Pl-alb 1; *Lp1*, *Lp2* — соответст нии 3772 и 3767 *L. peruvianum* var. *dentatum*; остальные д их соматические гибриды), кислой фосфатазы и аспаратамин разы подтверждена гибридность по ядру для 16 форм. По ит анализов растения клона 1С оказались идентичными культу мату. Наличие чужеродного пластома подтверждали данными, ными при расщеплении хлДНК эндонуклеазами *EcoRI* и *SacI*. таты исследований 23 регенерантов показали, что у всех и форм, в том числе и у клона 1С, хлДНК идентична дикому том

исхождение митохондриального генома определяли на основе анализа спектров рестрикции мтДНК, используя эндонуклеазу *Pst*I. У семи изученных гибридных форм мтДНК оказалась идентичной культурному томату.

Оба родительских партнера имеют набор хромосом $2n=2x=24$. При изучении хромосомных чисел у 17 отобранных растений независимого происхождения было обнаружено, что у них размах пloidности составляет от 24 до 60 хромосом. Большинство растений клонов 1В, 1D—5D, 7D, 8D, 11D—13D были гетеропloidными с модальным числом хромосом $2n=4x=48$. Часть гибридов представляла собой анеупloidы, содержащие $2n=4x=47$ (клоны 8D и 13D). Значительное количество растений гибридных клонов (2С, 3С, 5С, 7С и 8С) имело пентапloidный или близкий к нему набор хромосом $2n=5x=60$. Нами была также идентифицирована форма 1С, содержащая 24 хромосомы ($2n=2x=24$) без каких-либо признаков миксопloidии. Сопоставление цитологического анализа хромосомных чисел и электрофореграмм множественных молекулярных форм энзимов гамма-гибридов позволит по-

Таблица 1

Общая морфологическая характеристика растений *L. esculentum*, *L. peruvianum var. dentatum*

№ клона	Морфология			
	Стебель		Лист	
	Высота, см	Опушенность	Размер, см	Окраска
<i>L. esculentum</i> , сорт <i>Frühe Liebe</i>	Высокий, 110	Густоопушенный	Средний, 22	Темно-зеленая
<i>L. peruvianum var. dentatum</i> , линия 3767	Высокий, 135	Неопушенный	Средний, 16	То же
1В	Высокий, 110	То же	То же	»
1С	Средний, 65	Густоопушенный	Мелкий, 12	Светло-зеленая
2С	Высокий, 100	Слабоопушенный	То же	Темно-зеленая
3С	То же	То же	»	То же
5С	»	»	»	»
7С	»	»	»	»
8С	»	»	»	»
12С	»	Неопушенный	Средний, 16	»
1F	»	То же	Средний, 23	»
2F	»	»	То же	»
5F	»	Слабоопушенный	»	»
<i>L. peruvianum var. dentatum</i> , линия 3772	Высокий, 140	Неопушенный	Средний, 15	Светло-зеленая
1D	Высокий, 100	Слабоопушенный	То же	То же
2D	То же	То же	»	»
3D	»	»	»	»
4D	»	»	»	»
5D	»	»	»	»
7D	»	»	»	»
8D	»	»	»	»
11D	»	»	»	»
12D	»	»	»	»
13D	»	»	»	»
1H	»	»	»	Темно-зеленая
3H	»	Неопушенный	»	То же

Примечание. Клоны, обозначенные буквами В, С, D, получены при облучении протопластия цветков не отмечали.

лучить более подробную информацию о том, какие именно хромосомы облученного партнера-донора утеряны.

Анализ родительских клеток пыльцы, проведенный на растениях клона 1В и 5С, показал, что мейоз у них является нерегулярным. В диакинезе отмечены различные пропорции квадривалентов, бивалентов и унивалентов, что приводило к аномальному происхождению стадий метафаза 1 и анафаза 1. Результатом высокого уровня нарушений в мейозе было формирование нежизнеспособных тетрад и как следствие — стерильности пыльцы. Незначительное количество фертильной пыльцы было обнаружено у клонов 1В, 7D, 3Н, 1F, 2F и 5F (менее 9 %). Однако тест на ее жизнеспособность дал отрицательный результат (см. табл. 2). У клонов 1D—4D, 8D и 11D—13D пыльца была не только фертильной (до 76 %), но и жизнеспособной (до 15 %).

Исходя из морфологического, биохимического и цитологического анализа (табл. 1 и 2) полученные нами соматические гибриды можно разделить на шесть типов. Один из наиболее многочисленных представлен растениями клонов 1D—5D, 7D, 8D, 11D—13D. Все они имели тетраплоидный или близкий к нему набор хромосом ($2n=48$), проме-

(линий 3767, 3772) и их соматических гибридов

Морфология					
Соцветие		Положение пестика в цветке	Плод		
Длина, см	Число цветков		Масса, г	Окраска	Число гнезд
Среднее, 13	Очень много (38)	Короче тычинок	Мелкие или средние, 30—60	Красная	Малое или среднее (2—4)
Среднее, 16	Очень много (41)	Длиннее тычинок	Очень мелкие, 2—3	Светло-зеленая	Малое (2)
Короткое или среднее	Малое (5)	Короче тычинок	Мелкие, 15—25	Оранжевая	Малое (2—3)
Короткое, 9	То же	То же	Очень мелкие, 4—8	Красная	Малое (2—3)
Короткое, 5	Малое (3)	Длиннее тычинок	Очень мелкие, 10—20	То же	Малое или среднее (2—4)
То же	То же	То же	То же	»	То же
»	»	»	»	»	»
»	»	»	»	»	»
»	»	»	»	»	»
Короткое, 10	Малое (5)	Короче тычинок	Мелкие, 15—25	Оранжевая	Малое (2—3)
Короткое или среднее	Среднее (7)	То же	Очень мелкие, 5—11	Желтая	Малое или среднее (2—4)
Короткое, 7	То же	»	То же	То же	То же
Среднее, 15	»	Длиннее тычинок	»	»	»
Среднее, 18	Очень много (32)	То же	Очень мелкие, 2—3	Светло-зеленая	Малое (2)
Среднее, 12	То же	»	Очень мелкие, 2—5	Желтая	То же
То же	»	»	То же	То же	»
»	»	»	»	»	»
»	»	»	»	»	»
»	»	»	»	»	»
»	»	»	»	»	»
»	»	»	»	»	»
»	»	»	»	»	»
»	»	»	»	»	»
»	»	»	»	»	»
»	»	»	»	»	»
Среднее, 15	Среднее (10)	Длиннее тычинок	Очень мелкие, 5—15	Желтая	Малое (2—3)

тов *L. peruvianum* var. *dentatum* дозой 200 Гр; F, H—дозой 100 Гр. На растениях клона 1H раз-

жуточную морфологию листьев. Анализ изоферментов эстеразы и аспартатаминотрансферазы подтвердил их гибридность по ядру. Рестрикционный анализ хлДНК с помощью эндонуклеазы *SacI* показал, что растения этих клонов обладают пластомом *L. peruvianum var. dentatum*.

Другой наиболее многочисленный тип растений состоит из пяти клонов (2С, 3С, 5С, 7С и 8С). Все они имеют сходную с культурным томатом морфологию листа с искривлением центральной жилки по ти-

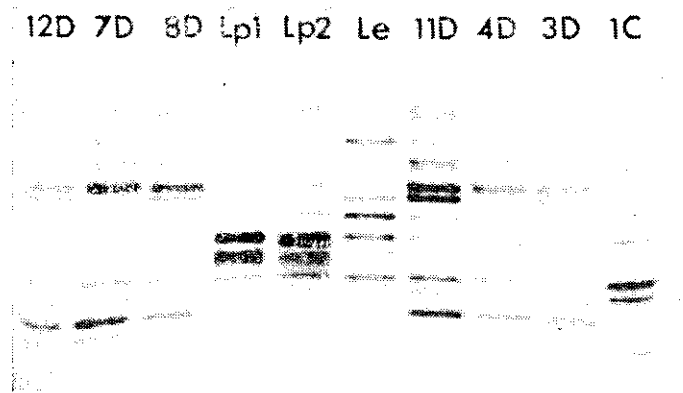


Рис. 2

пу мутации *entire*. У растений данного типа рестриктивные спектры хлДНК оказались идентичными спектрами хлДНК *L. peruvianum var. dentatum*, а рестриктивные спектры мтДНК соответствовали спектру мтДНК *L. esculentum*. Электрофорез эстеразы обнаружил, что ядерный геном этих растений является гибридным. Число хромосом у различных клонов находилось в пределах $2n=54-60$.

Растения клона 1С, близкие по своей морфологии ко второй группе, отличались от нее картофельным типом листа без искривления

Таблица 2

Морфологическая, цитогенетическая и биохимическая характеристика некоторых асимметричных гибридов

№ клона	Морфология листа	Жизнеспособность пыльцы, %	Количество хромосом	Биохимический анализ		
				Эстеразы	хлДНК	мтДНК
<i>L. esculentum</i>	Е	79,6	24	Е	Е	Е
<i>L. peruvianum var. dentatum</i> , линии 3767, 3772	Р	83,2	24	Р	Р	Р
1В	Г	0	42, 46, 48	Е+Р	Р	Е
1С	Е	—	24	Е	Р	—
2С	МЕ	0	56, 58	Е+Р	Р	Е
3С	МЕ	0	60	Е+Р	Р	Е
5С	МЕ	0	56, 58, 60	Е+Р	Р	Е
7С	МЕ	0	54, 56	Е+Р	Р	Е
8С	МЕ	0	56	Е+Р	Р	Е
1D	Г	1,1	44, 46	Е+Р	Р	—
2D	Г	11,0	46	Е+Р	Р	—
3D	Г	2,7	46, 47	Е+Р	Р	—
4D	Г	2,0	48	Е+Р	Р	—
7D	Г	0	46	Е+Р	Р	—
8D	Г	11,0	43, 47	Е+Р	Р	—
11D	Г	1,1	44, 46, 47	Е+Р	Р	—
12D	Г	15,3	48	Е+Р	Р	—
13D	Г	9,9	47	Е+Р	Р	—

Примечание. Е — *L. esculentum* тип; Р — *L. peruvianum* тип; Г — промежуточный гибридный тип; МЕ — мутантная вариация культурного типа.

центральной жилки. Анализ изоформ эстеразы, аспартаминотрансферазы, кислой фосфатазы и рестриктных спектров хлДНК выявил, что форма 1С имеет ядро, унаследованное от *L. esculentum*, и пластом *L. peruvianum var. dentatum*. Метафазные клетки корешков содержали $2n=24$ хромосомы (см. табл. 2). Все эти данные указывают на то, что растения 1С являются цитоплазматическими гибридами (цибридами).

К четвертому типу были отнесены растения клона 1В и 12С с морфологическими признаками строения листа, характерными для вида *L. peruvianum var. dentatum*. На электрофореграмме множественных молекулярных форм эстеразы соматического гибрида 1В обнаружены полосы обоих родителей, однако их спектр больше соответствовал распределению полос, типичному для дикого томата. ХлДНК этого клона была идентичной *L. peruvianum var. dentatum*. Растения клона 1В обладали хромосомными наборами на тетраплоидном уровне $2n=42-48$.

Морфологические особенности двух последних типов (пятый тип — клоны 1F, 2F и 3F; шестой тип — клоны 1Н и 2Н) приведены в табл. 1. Биохимическую и цитологическую оценку этих растений не проводили.

В полевых условиях соматические гибриды характеризовались высокой жизнеспособностью, обильно цвели и завязывали большое количество плодов красной, оранжевой и желтой окраски. Средняя масса и размер одного плода были промежуточными между массой и размером плодов родительских видов (*L. esculentum* — 30–60 г и 50 мм, *L. peruvianum var. dentatum* — 3 г и 15 мм) и составляли от 2–5 г и 20 мм до 25 г и 30 мм соответственно. Следует отметить, что у растений комбинации *L. esculentum*+*L. peruvianum var. dentatum*, полученных без гамма-облучения протопластов, как и у половых межвидовых гибридов F₁, форма листьев, окраска и размер плодов наследуются с доминированием типа *L. peruvianum var. dentatum* [6, 23]. Некоторые из них завязывали единичные жизнеспособные семена. При самоопылении соматических гибридов 1В, 2С, 3С, 5С, 8С формировались партенокарпические плоды с abortивными зародышами.

Цитологическое исследование материнских клеток пыльцы соматических гибридов показало, что на всех стадиях мейоза происходят нарушения, типичные для отдаленных гибридов томата [12, 22]. В профазе обнаружено около 98 % мейоцитов с мульти- и унивалентами. Аномальность развития материнских клеток пыльцы на стадиях анафазы I и II была связана с отставанием отдельных хромосом или хромосомных пар и образованием хроматидных и хромосомных мостов. Особо следует отметить большое количество (12–18 %) мейотических клеток с фрагментами и мостами, что свидетельствует о наличии у них гетерозиготности по парацентрическим инверсиям. Подобные нарушения у половых межвидовых гибридов томата происходят с гораздо более низкой частотой и их резкое увеличение у соматических гибридов может быть одним из последствий воздействия гамма-облучения на ядро протопластов дикого партнера. Вероятно, из-за этих аномалий и формируются микроспоры с нарушенным хромосомным балансом, что и приводит к образованию abortивной пыльцы. Остается пока невыясненным также и вопрос о роли ядерно-цитоплазматических взаимоотношений в микроспорогенезе, что также может иметь место при отдаленной гибридизации.

Таким образом, в результате слияния протопластов *L. esculentum* P1-a1b 1 с облученными суперлетальными дозами гамма-радиации протопластами *L. peruvianum var. dentatum* нами получены асимметричные гибридные растения с новым соотношением ядерных и цитоплазматических детерминант родительских видов. Причем использование такой системы селекции оказалось весьма эффективным. Полученные в экспериментах гамма-гибриды характеризовались спектром изменчивости по целому ряду изученных признаков. Это может быть обусловлено как необычной генетической конституцией (например, гибридное ядро+пластом дикого вида и митохондрии культурного томата; ядро культурного томата и пластом дикого вида), так и несбалансированно-

стю количества хромосом. Как следствие таких нарушений вполне реально проявление и неаллельного взаимодействия отдельных генов, что может приводить к появлению совершенно новых признаков.

Резюме

Асимметричні соматичні гібриди одержані між *L. esculentum* Mill. (пластомний хлорофілдефектний мутант PL-*alb* 1) та *L. peruvianum* var. *dentatum* Dun. (лінії 3767, 3772) в результаті злиття мезофільних протопластів культурного томату з мезофільними протопластами дикого виду, опроміненими гама-радіацією у дозі 100, 200 Гр. Ці дози радіації були суперлетальними для протопластів *L. peruvianum* var. *dentatum*. Гібридні колонії були відібрані по їх здібності до позеленіння; відновлення у них фотосинтетичної активності здійснювалось за рахунок переносу хлоропластів від *L. peruvianum* var. *dentatum*, в той час як протопласти *L. esculentum* формували білі колонії. Ефективність гібридизації залежала від дози опромінення протопластів дикого партнера і не перевищувала 6%. Одержані гібриди по рівню плоідності, морфологічним (форма та розмір куща, опушеність стебла, форма листя, число квітів, положення маточки, забарвлення та розміри плодів) і біохімічним (ізозимні спектри естерази, аспартатамінотрансферази і кислій фосфатази, рестриктні спектри хлоропластної та мітохондріальної ДНК) ознакам поділені на шість фенотипічних груп. Формоутворення цих груп залежало від дози опромінення та лінії *L. peruvianum* var. *dentatum*.

Summary

Asymmetric somatic hybrids between *Lycopersicon esculentum* Mill. (plastome chlorophyll-deficient PL *alb* 1 mutant) and *Lycopersicon peruvianum* var. *dentatum* Dun. (lines 3767, 3772) were obtained by mesophyll protoplast fusion. The protoplasts of the wild tomato plants were inactivated by the lethal dosage of gamma-irradiation (100 and 200 Gy). The colonies capable of greening were selected. The observed restoration of the photosynthetic activity was because of wild type of chloroplasts were transferred from *L. peruvianum* var. *dentatum*. The hybridization efficiency dependent on irradiation dosage but never exceeded 6%. The hybrid obtained were classified into six groups on the bases of their ploidity, morphological (bush form and size, stem tomentosity, leaf form, flower quantity, pistil position, fruit size and colour) and biochemical (esterase, aspartateaminotransferase and acid phosphatase isozymes, restriction pattern of chloroplast and mitochondrial DNAs) traits. The variability of the hybrid plants of these groups dependent upon irradiation dosage and the *L. peruvianum* var. *dentatum* genotype.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Gleba Y. Y., Sytnik K. M. Protoplast fusion. Genetic engineering in higher plants / Ed. R. Schoerman.— Berlin: Springer, 1984.— P. 220.
2. O'Connell M. A., Hanson M. R. Regeneration of somatic hybrid plants formed between *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii* // Theor. and Appl. Genet.— 1987.— 75, N 1.— P. 83—89.
3. Adams T. L., Quiros C. F. Somatic hybridization between *Lycopersicon peruvianum* and *L. pennellii*: regenerating ability and antibiotic resistance as selection systems // Plant Sci.— 1985.— 40, N 3.— P. 209—219.
4. Соматическая гибридизация *Lycopersicon esculentum* Mill. и *Lycopersicon peruvianum* v. *dentatum* / Н. М. Пивень, О. К. Махорина, И. К. Комарницкий и др. // Биополимеры и клетка.— 1986.— 2, № 3.— С. 136—140.
5. Somatic hybrid plants of *Lycopersicon esculentum* Mill. and *Lycopersicon peruvianum* Mill. / A. Kinsara, S. N. Patnaik, E. C. Cocking, J. B. Power // J. Plant Physiol.— 1986.— 125, N 3.— P. 225—234.
6. Tan M. M. C. Somatic hybridization and cybridization in some *Solanaceae*: Ph. D. Thesis.— Amsterdam: Free Univ., 1987.— P. 124.
7. Культура изолированных протопластов — источник новых генетических форм в роде *Lycopersicon* / Н. М. Пивень, О. К. Махорина, С. У. Илюбаев, Я. И. Ратушняк // Гаметная и зиготная селекция растений: Тез. докл.— Кишинев, 1987.— С. 173—176.
8. Somatic hybridization between tomato and other *Lycopersicon* or *Solanum* species / A. Zelcer, S. Izhar, O. Soferman et al. / Eds K. J. Puite et al. // Progr. in plant protoplast res.— Dordrecht: Kluwer, 1988.— P. 225—226.
9. Wijbrandi J. Isolation and characterization of somatic hybrids between *Lycopersicon esculentum* and *Lycopersicon peruvianum*: Ph. D. Thesis.— Wageningen: Agr. Univ., 1989.— P. 112.

10. *Morphological and molecular characterization of fertile tetraploid somatic hybrids produced by protoplast electrofusion and PEG-induced fusion between *Lycopersicon esculentum* Mill. and *Lycopersicon peruvianum* Mill.* / L. H. San, F. Vedel, D. Si-hachakr, R. Remy // Mol. and Gen. Genet.— 1990.— 221, N 1.— P. 17—26.
11. *McGuire D. C., Rick C. M. Self-incompatibility in species of *Lycopersicon* sect. *Eriopersicon* and hybrids with *Lycopersicon esculentum** // Hilgardia.— 1985.— 23, N 2.— P. 101—124.
12. *Косова А. И., Кукун В. Н. Цитозембриология томата.*— Кишинев: Штиинца, 1986.— С. 230.
13. *Самсонова И. А. Изучение изменчивости пластома томата. 1. Характеристика пластоного мутанта томата* // Генетика.— 1970.— 6, № 1.— С. 36—41.
14. *Chloroplast transfer in *Nicotiana* based on metabolic complementation between irradiated and iodoacetate treated protoplasts* / V. A. Sidorov, L. Menczel, F. Nagy, P. Maliga // Planta.— 1981.— 152, N 4.— P. 341—345.
15. *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 3.— P. 191—195.
16. *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.
17. *Shahin E. A. Totipotency of tomato protoplasts* // Theor. and Appl. Genet.— 1985.— 69, N 3.— P. 235—240.
18. *Brewer G. J. An introduction to isozyme techniques.*— New York: Acad. press, 1970.— P. 230.
19. *Maurer H. R. Disk electrophoresis and related techniques of poly-acrylamide gel electrophoresis.*— Berlin: Walter de Gruyter, 1976.— P. 187.
20. *Wilson A. J., Chourey P. S. A rapid inexpensive method for the isolation of restrictable mitochondrial DNA from various plant sources* // Plant Cell Rep.— 1984.— 3, N 6.— P. 237—239.
21. *Boekjans G., Stummann B. M., Henningsen K. W. Preparation of chloroplast DNA from pea plastids isolated in a medium of high ionic strength* // Anal. Biochem.— 1984.— 141, N 4.— P. 244—247.
22. *Широкий унифицированный классификатор СЭВ и международный классификатор СЭВ рода *Lycopersicon* Tournef.* / Под. ред. Е. Я. Глушенко и др. // Генет. ресурсы.— Л.: Изд-во ВНИИР им. Н. И. Вавилова, 1979.— С. 1—35.
23. *Грати И. Г. Цитологические основы формообразования и создания идентифицированного генофонда у томата: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук.*— Тирасполь, 1986.— 32 с.

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

Получено 14.01.91

УДК 577.1.11:632.938

Г. Ю. Перковская, А. М. Бейдер, А. П. Дмитриев

ИНДУЦИРОВАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ЛУКА К БОЛЕЗНЯМ С ПОМОЩЬЮ БИОГЕННЫХ ИНДУКТОРОВ

*Методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) проведен анализ жирных кислот спиртового экстракта мицелия фитопатогенного гриба *Botrytis allii* Munn. Показано наличие C_{18} и C_{20} ненасыщенных жирных кислот. Проведенные полевые испытания препарата, содержащего смесь C_{18} ненасыщенных жирных кислот, и арахидоновой кислоты подтверждают возможность использования этих кислот в качестве биогенных индукторов. Разработан способ повышения устойчивости растений к болезням, включающий предпосевную обработку семян биогенными индукторами защитных реакций.*

Введение. В последние годы обнаружены метаболиты фитопатогенных микроорганизмов, которые распознаются растением-хозяином и служат индукторами защитных реакций. До настоящего времени мало известно об активном начале индукторов устойчивости растений (элиситоров), выделенных из микроорганизмов [1].

Ранее [2] нами показано, что элиситор из мицелия *Botrytis allii* Munn. индуцировал накопление фитоалексинов 1д и 2д и повышал болезнеустойчивость лука. Обнаруженные в цитоплазме *B. allii* индукторы защитных реакций оказались высокомолекулярными соединениями

© Г. Ю. Перковская, А. М. Бейдер, А. П. Дмитриев, 1991.