

11. Vasil I. K., Vasil V., Redway F. Plant regeneration from embryogenic protoplasts of *Triticum aestivum* L. (wheat) // 7-th Int. Congr. on plant tissue and cell culture: Abstrs.— Amsterdam, 1990.— P. 3.
12. Tilton V. R., Russell S. H. Microinjection of plant cells. II. Cell isolation, preparation and initial culture // *Plant Physiol.*— 1983.— 12, N 1.— P. 9.
13. Пастернак Т. П., Мельников П. В. Генетическая трансформация высших растений с помощью микроинъекций ДНК // Биология культивируемых клеток и биотехнология: Материалы междунар. конф.— Новосибирск, 1988.— С. 187—188.
14. Transgenic rapped plants obtained by the microinjection of DNA into microspore-derived embryoids / G. Neuhaus, G. Spadenberg, O. Mittelstein-Scheid, H.-G. Schweiger // *Theor. and Appl. Genet.*— 1987.— 75, N 1.— P. 30—36.
15. Wei M., Kyo M., Harada H. Callus formation and plant regeneration through direct culture of isolated pollen grains of *H. vulgare*, cv. *Sabarlis* // *Ibid.*— 1986.— 72, N 2.— P. 252—255.
16. Transient expression of chloramphenicolacetyltransferase (CAT) gene in barley cell cultures and immature embryos through microprojective bombardment / K. K. Kartha, R. N. Chibbar, F. Georges et al. // *Plant Cell. Rep.*— 1989.— 8, N 3.— P. 429—432.
17. Plant cell transformation using high velocity microparticles / R. H. Vallejos, M. Lopez, L. Orsaria et al. // 7-th Int. Congr. on plant tissue and cell culture: Abstrs.— Amsterdam, 1990.— P. 80.
18. Transformation of cereal cell cultures by microprojective bombardment / Chen D., Batty N., Evans J., P. Dale // *Ibid.*— P. 50.
19. Gene transfer to barley / R. R. Mendel, E. Claus, J. Schulze et al. // *Ibid.*— P. 44.
20. Картель Н. А. Эффекты экзогенной ДНК у высших растений.— Минск: Наука и техника, 1981.— 143 с.
21. Transfer of bacterial and human genes to germinating *Arabidopsis thaliana* / L. Ledoux, L. Diels, R. Huart et al. // *Arabidopsis inform. service.*— 1985.— 22, P. 1—12.
22. Uptake and transient expression of chimeric genes in seed-derived embryos / R. Topfer, B. Gronenborn, J. Schell, H. Steinbiss // *Plant Cell.*— 1989.— 1, N 1.— P. 133—139.
23. De la Pena A., Lorz H., Schell J. Transgenic rye plants obtained by injection of DNA into young tillers // *Nature.*— 1987.— 325, N 6071.— P. 274—276.
24. Hess D. Pollen-based techniques in genetic manipulation // *Int. Rev. Cytology.*— 1987.— 107.— P. 367—395.
25. De Wet J. M., Bergquist R., Harlan J. Exogenous gene transfer in maize using DNA-treated pollen / Exp. manipulation of ovule tissues / Ed. P. Charman.— New York, 1985.— P. 197—209.
26. Ohta Y. High efficiency genetic transformation of maize by a mixture of pollen and exogenous DNA // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*— 1986.— 83, N 3.— P. 715—719.
27. Чесноков Ю. В., Виконская Н. А., Король А. Б. Генетическая трансформация кукурузы // 7-й Всесоюз. симпоз. «Молекулярные механизмы генетических процессов»: Тез. докл.— М., 1990.— С. 183.
28. Booy G., Krens F., Huizing H. Attempted pollen mediated transformation of maize // *J. Plant Physiol.*— 1989.— 135, N 3.— P. 319—324.
29. Luo Z., Wu R. A simple method for the transformation of rice via the pollen tube pathway // *Plant Mol. Biol. Rep.*— 1988.— 6, N 3.— P. 165—174.
30. Растения ячменя с введенным геном канамициноустойчивости / Н. А. Картель, К. И. Забенькова, Т. В. Манешина, С. Е. Аблов // Докл. АН БССР.— 1990.— 34, № 3.— С. 261—263.
31. Flavell R., Mathias R. Prospects for transforming monocot crop plants // *Nature.*— 1984.— 307, N 5947.— P. 108—109.
32. Пастернак Т. П. Введение чужеродных генов в растения злаков // 11-й Всесоюз. съезд Всесоюз. о-ва физиологов растений: Тез. докл.— Минск, 1990.— С. 72.

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

Получено 14.01.91

УДК 578.085

И. А. Костенюк, О. Ф. Любарец, В. В. Воронин, Ю. Ю. Глеба

КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ В БИОТЕХНОЛОГИИ РАСТЕНИЙ-ПРОДУЦЕНТОВ ИЗ СЕМЕЙСТВА КУТРОВЫХ (*AROCYNACEAE*)

Описаны результаты экспериментов по соматической гибридизации в следующих комбинациях: *Raiwolfia serpentina*+*Vinca minor*, *R. serpentina*+*Catharanthus roseus*, *R. serpentina*+*Rhazya stricta*, *C. roseus*+*V. minor*. Представлены данные о селектив-

© И. А. Костенюк, О. Ф. Любарец, В. В. Воронин, Ю. Ю. Глеба, 1991.

ных системах отбора гибридов, гибридность каллусных линий продемонстрирована с помощью анализа изозимных спектров аспаратаминогидроксилазы, цитогенетического анализа и блот-гибридизации рестриктированных фрагментов ядерной ДНК гибридных клонов с рДНК. Гибридные клеточные линии исследованы в течение 20 месяцев культивирования в условиях неорганизованного клеточного роста *in vitro*, показана их относительная стабильность.

Введение. Исследование возможностей получения продуктов вторичного синтеза в культуре ткани — одно из интенсивно развивающихся направлений современной биотехнологии высших растений. Японской компанией Mitsui Petrochemical Industries Ltd. [1] удалось получить высокопродуктивные штаммы культуры ткани воробейника (*Lythospermum erythrorhizon* L.) для крупномасштабного производства шиконина — ценного исходного сырья для ряда продуктов в фармацевтике и парфюмерии. Определенные успехи в этой области имеют и другие зарубежные фирмы: Nitto Denki, Natterman, Boehringer Mannheim, Kanebo [2].

Семейство *Arosynaceae*, в состав которого входят более 2 000 видов, принадлежащих к 200 родам [4], изобилует лекарственными растениями-продуцентами. Некоторые виды традиционно используются в качестве сырья для изготовления высокоэффективных препаратов гипотензивного и цитостатического действия (*Rauwolfia* — источник резерпина и аймалина, *Catharanthus* и *Vinca* — винкристина, винбластин, винина, пубесцина и т. п.) [5]. Ряд растений, произрастающих в труднодоступных регионах планеты (*Rhazya stricta*, *Stemmadenia tomentosa*), активно используется местным населением в рецептах народной медицины, в то же время они до сих пор остаются малоизученными современной наукой [6]. Особенности ареалов произрастания кутровых (в подавляющем большинстве — тропическая и субтропическая зоны, исключение составляет род *Vinca*), а также высокая коммерческая ценность некоторых из продуцируемых ими метаболитов (индольные алкалоиды и др.) обусловили значительное внимание к изучению этих объектов в культуре *in vitro*; однако достаточно полные работы выполнены лишь в отношении немногих наиболее известных видов этого семейства [7, 8].

Несмотря на интенсивное развитие в последнее время техники культивирования протопластов и соматической гибридизации [9], следует отметить ограниченность сведений о подобном рода исследованиях семейства *Arosynaceae* [10, 11]. В то же время современные методы клеточных технологий, в частности, конструирование новых гибридных геномов в результате слияния протопластов различных видов этого семейства могли бы предоставить достаточно интересный материал для анализа особенностей вторичного синтеза в гибридных клетках. Не исключено, что подобное искусственное объединение различных метаболических путей приведет к появлению новых продуктов вторичного синтеза, что определило бы как теоретическую, так, вероятно, и практическую ценность таких гибридов. В качестве первого этапа работы нам представлялось необходимым изучение возможности изолирования жизнеспособных протопластов некоторых видов семейства *Arosynaceae*, их культивирования и получения соматических гибридов между этими видами в нескольких комбинациях.

Материалы и методы. В качестве источника протопластов использовали каллусные культуры трех видов семейства *Arosynaceae*, а именно: *R. serpentina*, *R. stricta*, *C. roseus*, а также стерилизованные листья 1—3-го порядков интактных растений *V. minor*. Каллусные линии культивировали в темноте при температуре 26 °С на питательной среде 4х (мг/л) [12]: 1-нафтилуксусная кислота (НУК) — 0,5; 1-индолилуксусная кислота (ИУК) — 0,5; 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д) — 2; кинетин — 0,2. Для ферментации отбирали ткань, начиная с 5-х сут после пересадки. Растения барвинка малого выращивали в теплице при 16-ч режиме освещения. Для изолирования протопластов *R. serpentina* и *C. roseus* использовали ферментную смесь следующего

состава: Onozuka R-10 («Serva», ФРГ) — 0,15 %, Driselase («Sigma», США) — 0,20 %, Macerozyme R-10 («Serva») — 0,10 %, сахараза (0,45 М) — 50 мл, среда W5 [13] — 50 мл. Протопласты *R. stricta* выделяли в ферментном растворе такого состава: Onozuka R-10 — 0,75 %, Cellulysin («Serva») — 0,35 %, Macerozyme R-10 — 0,25 %, Macerage («Serva») — 0,25 %, сахараза — 1 %, среда W5 — до 100 мл. Ткань инкубировали в течение 18 ч, затем протопласты трижды отмывали в среде W5, после чего переносили в питательную среду. Листья барвинка

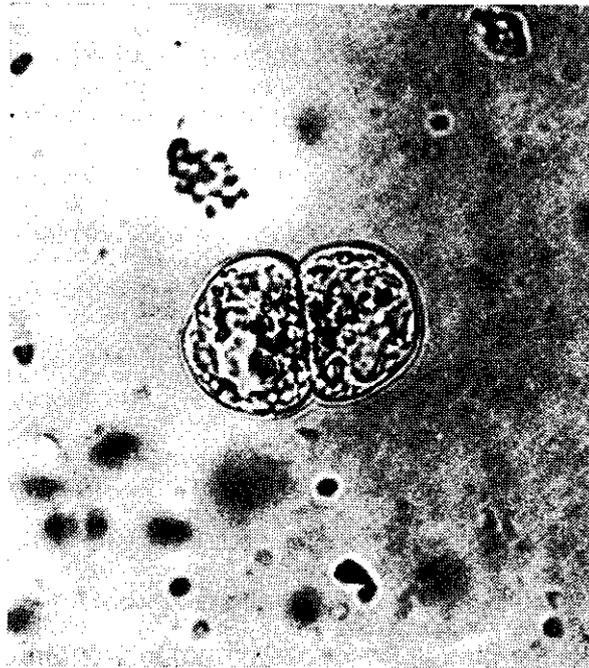


Рис. 1

6—8 ч, окрашивали материал в 1,5 %-ном растворе уксуснокислого орсеина («Merck», ФРГ).

Анализ спектров множественных молекулярных форм эстеразы и аспаратаминотрансферазы проводили с помощью ПААГ-электрофореза по [14].

Суммарную ДНК из листьев родительских видов и каллусных тканей гибридных клонов выделяли по методике Шуэ и др. [15]. Очищенную ДНК (2—3 мкг) расщепляли рестриктазами *EcoRV*+*BamHI*, фрагменты разделяли электрофорезом в 0,8 %-ном агарозном геле, переносили на капроновый фильтр и гибридизовали с меченой рДНК плазмиды *pUL7*, содержащей фрагмент гена 26S рРНК лимона [16].

Результаты и обсуждение. На предварительном этапе исследований были разработаны условия изолирования жизнеспособных протопластов четырех видов семейства *Arosynaceae*, а также подобраны соответствующие питательные среды для их культивирования.

Протопласты *R. serpentina* культивировали на модифицированных питательных средах To1 (I) и To2 (II) Кабоща [17], а также 4x (III) [12], дополненных 0,5 М маннитом. На питательной среде I в единственном случае наблюдались клеточные деления с довольно высокой частотой (10 %) на 2-е сут после инициации культуры протопластов (рис. 1: первое деление в культуре протопластов раувольфии змеиной (об. 6,2; ок. 20). Образовавшиеся клеточные микроколонии разбавляли средой II через 15—20 сут, а еще через месяц переносили их на агаризованную среду III. На среде III частота деления протопластов раувольфии была значительно ниже и составляла 0,01—0,05 %, первые деления

после стерилизации выдерживали на питательной среде Мурасиге—Скуга (сахараза — 20 г/л, кинетин—0,1 мг/л) в темноте или на свету (2 000—3 000 лк, 16-ч световой день) в течение 1—5 сут, затем инкубировали в растворе целлюлитических ферментов 14—18 ч, мезофильные протопласты трижды отмывали средой W5.

Цитогенетический анализ гибридных клеточных линий и родительского материала проводили с помощью метода давленных препаратов. Ткань выдерживали в 0,05 %-ном растворе колхицина («Fluka», Швейцария) в течение 2 ч, фиксировали в смеси этанол—ледяная уксусная кислота (3:1) в течение

наблюдались на 20—22-е сут, в то же время воспроизводимость культивирования была значительно выше, чем на среде I.

Для культивирования протопластов катарантуса апробировали семь вариантов питательных сред: среду I, три модификации питательной среды Као и Михайлюка (IVa, IVб и IVв), среду Нича и Охиямы (V) [18], среду Харады (VI) [18], среду Шепарда и Тоттена (VII) [18]. На среде III первые деления начинались на 17—20-е сут, частота делений составила приблизительно 2—4 %, сформировавшиеся клеточные колонии переносили на агаризованную среду 4x через 27—30 сут. Остальные среды оказались непригодными для эффективного культивирования протопластов катарантуса розового.

Для культивирования протопластов *R. stricta* испытали пять различных питательных сред (I, IVa, V, VI, VII), лучшими результаты оказались на средах I и VII, частота делений на них была приблизительно одинаковой и составила 0,05—0,50 %, однако первые клеточные деления на среде VII были зафиксированы на 10—12-е сут, а на среде I — лишь на 17—19-е. Полученные клеточные микроколонины переносили на агаризованную питательную среду III через 40—50 сут.

Мезофильные протопласты *V. minor* отмывали средой W5 и переносили в дополненную 0,5 М маннитом модифицированную питательную среду Шенка — Хильдебрандта (VIII), в которой они синтезировали клеточную стенку на 3—4-е сут, а первые деления наблюдались на 17—25-е сут культивирования. Для протопластов этого вида были характерны низкая частота делений (0,1—1 %), медленный рост образовавшихся клеточных микроколонины, некроз клеток в процессе культивирования, плохая переносимость добавлений свежих порций питательной среды, несмотря на значительное количество апробированных сред (более 20 основных сред и их модификаций). Развившиеся микроколонины из 10—20 клеток разбавляли на 40—50-е сут порциями свежей среды того же состава с пониженным осмотическим давлением (0,3 М маннита), через 30—35 сут клеточные колонии переносили на агаризованную питательную среду, культивировали на свету или в темноте. Сформировавшиеся каллусные линии имели склонность к спонтанному ризогенезу (чаще на свету) как на эмбриогенных средах (среда VIIa с добавлением БАП в концентрации 0,1—2,0 мг/л), так и на стандартной каллусогенной среде (VIII), причем образующиеся из каллуса корни зеленели на свету и по ходу своего роста давали очаги каллуса; получить побеги и полноценные регенеранты нам не удалось.

На следующем этапе работы были получены соматические гибриды в таких комбинациях: *R. serpentina*+*V. minor* (1); *R. serpentina*—*C. roseus* (2); *R. serpentina*+*R. stricta* (3); *V. minor*+*C. roseus* (4). Следует отметить, что в комбинациях 1—3 гибриды относятся к межтрибным (партнеры принадлежали к трибам *Rauwolfiaceae* и *Plumeriaceae* [7]), а в 4-й — к межродовым (триба *Plumeriaceae*).

В экспериментах по соматической гибридизации изолированные протопласты партнеров переносили в среду W5 и смешивали в соотношении примерно 1 : (1,5—2). Слияние осуществляли по Менцелю [19] в каплях при высоком значении pH в присутствии ионов Ca^{2+} , в качестве фьюзогена применяли полиэтиленгликоль (ПЭГ) с молекулярной массой 4 000—6 000.

Для культивирования продуктов слияния в комбинации *Rauwolfia* + *Vinca* использовали модифицированную питательную среду Шенка и Хильдебрандта (VIII), дополненную маннитолом (0,4—0,5 М).

Гибридные продукты отбирали с помощью системы физиологической селекции: на этой питательной среде частота делений протопластов раувольфии близка к нулю, для элиминации мезофильных протопластов *Vinca* их обрабатывали ПЭГ во время слияния в «жестких» условиях. Первые деления наблюдали на 8—12-е сут после слияния. На стадии образования клеточных микроколонины из 10—15 клеток культуру разбавляли порциями свежей питательной среды того же состава. Через

25—53 сут клеточные колонии переносили на жидкую среду VIII с пониженным осмотическим давлением (маннитол — 0,2—0,3 М) или на агаризованную питательную среду того же состава, на которой их в дальнейшем и культивировали. Были получены более 5 000 клеточных линий, отличавшихся разнообразием морфологических и физиологических свойств. Для детекции гибридного материала был проведен скрининг клеточных линий по изозимным спектрам эстеразы и аспаратаминотрансферазы. Наиболее подходящими в данном случае оказались

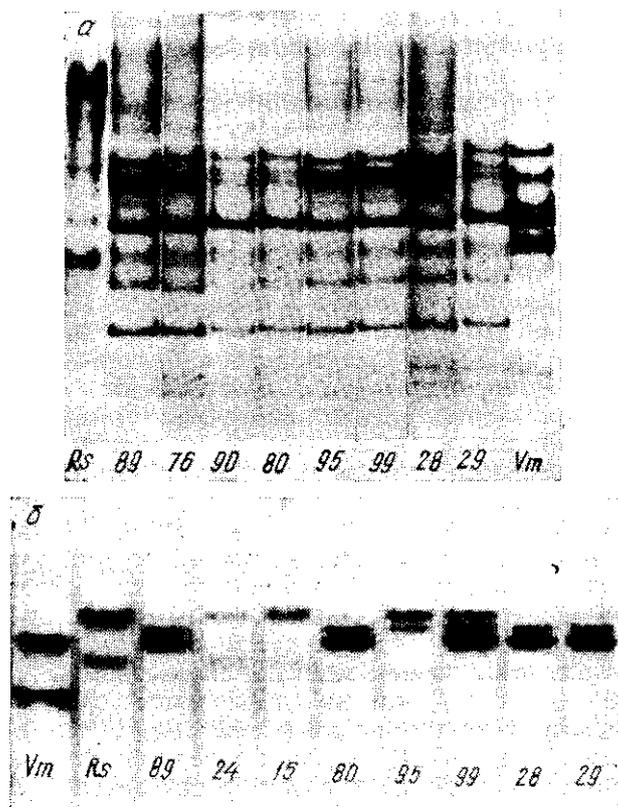


Рис. 2

изозимные спектры аспаратаминотрансферазы (небольшое число и выраженность видоспецифичных маркерных полос) (рис. 2: изозимные спектры эстеразы (а) и трансферазы (б): Vm — барвинок малый (листья); Rs — раувольфия змеиная (каллус); здесь и далее цифры обозначают гибридные клеточные линии).

Были проанализированы 200 клеточных линий, из них 52,3 % могли быть безусловно отнесены к гибридным по этому признаку. Интересно отметить, что в контрольной культуре протопластов раувольфии на той же среде, на которой культивировали продукты слияния, клеточные деления и образование клеточных колоний не были отмечены, тем не менее 26,8 % проанализированных клеточных линий имели изозимные спектры трансферазы, сходные с раувольфией. Это могло быть результатом либо интенсивной элиминации хромосом одного из родителей (в данном случае — *Vinca*) в гибридных продуктах, либо индукции клеточной пролиферации родительских клеток раувольфии процедурой слияния. Изозимные спектры, характерные для листьев и каллуса *V. minor*, продемонстрировали 4,8 % проанализированных клонов.

Анализ метафазных пластинок апикальной корневой меристемы

барвинка малого, каллусного штамма раувольфии и гибридных каллусных линий показал, что для каллусной ткани раувольфии характерна поли- и миксоплоидия, модальный класс составляют околоотриплоидные клетки, у 10 изученных гибридных каллусных линий также обнаруживается явление миксоплоидии, количество хромосом у разных клеток варьирует в значительной степени (от 30 до 140), достигая в отдельных случаях 200. На рис. 3 приведены данные по распределению культивируемых клеток гибридного клона RV27 (*Rauwolfia*+*Vinca*) по коли-

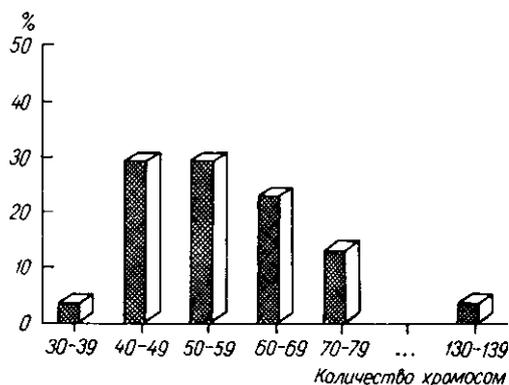


Рис. 3

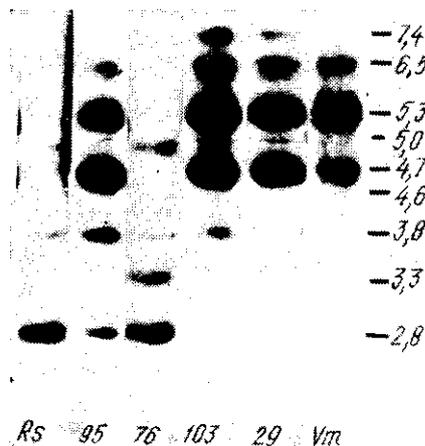


Рис. 4

честву метафазных хромосом. Различия в размерах хромосом (у барвинка малого — «точечные», $2n=46$; у раувольфии — в 3—4 раза более крупные) позволяют предположить наличие в гибридных клетках хромосом обоих родителей с количественным преобладанием хромосом раувольфии.

При гидролизе рестриктазами *EcoRV* и *BamHI* ДНК *Vinca* и *Rauwolfia* и гибридизации с зондом *pUL7*, содержащим фрагмент рДНК лимона, на радиоавтографе выявляются специфичные для каждого вида наборы фрагментов рДНК. В четырех из шести проанализированных клеточных линий, отселектированных после слияния протопластов барвинка и раувольфии, также выявляются рДНК обоих родительских видов (рис. 4: блот-гибридизация ядерных ДНК *Vm*, *Rs* и гибридных клеточных линий, гидролизованных рестриктазами *EcoRV* и *BamHI*, с зондом *pUL7*, специфичным к рДНК (здесь и далее размеры фрагментов даны в тыс. п. н.)). В линии 76, кроме фрагментов, характерных для родительских видов, обнаруживается фрагмент рДНК длиной 3,3 тыс. п. н., отсутствующий в геномах и раувольфии, и барвинка. Новые варианты повтора рДНК по сравнению с родительскими линиями были выявлены ранее у соматических гибридов *Nicotiana glauca* + *Atropa belladonna* [20]. По-видимому, возникновение новых вариантов рибосомных повторов связано с повышенным уровнем рекомбинаций в гибридных клетках.

Хотя ткань некоторых гибридных клонов на свету зеленеет и в отдельных случаях наблюдался спонтанный или индуцированный ризогенез, полноценные побеги все же не формировались.

Скрининг полученного материала по изозимным спектрам был проведен через 8—10 месяцев после экспериментов по соматической гибридизации. Спустя еще 12 месяцев были повторно проанализированы 60 клонов из числа отселектированных и исследованных ранее, продемонстрировавших высокую стабильность гибридных каллусных линий по этому признаку.

Перед слиянием в комбинациях *R. serpentina* + *C. roseus* и *R. serpentina* + *R. stricta* каллусные протопласты *Catharanthus* и *Rhazya*

обрабатывали моноиодацетатом (МИА) или йодацетамидом (ИАА). До слияния протопласты одного из партнеров инкубировали при 26 °С в течение 15—20 мин в смеси следующего состава: МИА или ИАА — 18—20 мг, среда W5 — 20 мл. Далее их отмывали средой W5, часть протопластов отбирали для контрольной культуры. Продукты соматической гибридизации культивировали на питательной среде 4х, дополненной 0,45 М маннитолом, на которой протопласты раувольфии были неспособны к делению либо делились с низкой частотой (0,01—0,02 %), что позволяло надеяться на достаточно высокую вероятность идентификации гибридов в популяциях развившихся в этих условиях клеточных клонов.

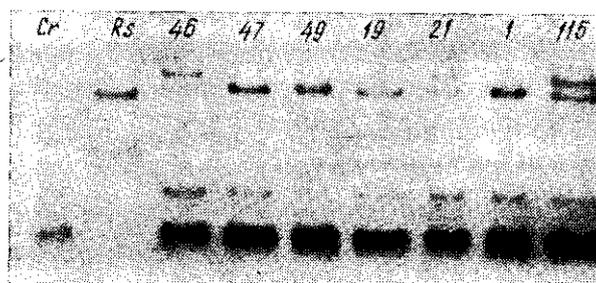


Рис. 5

Для отбора гибридных клонов проведен скрининг полученного материала по изозимным спектрам аспаратаминотрансферазы. Во всех перечисленных комбинациях были идентифицированы гибридные клеточные линии (рис. 5: изозимные спектры аспаратаминотрансферазы: *Cr* — катарантус розовый, остальные обозначения см. на рис. 2). В каждой из исследованных комбинаций обнаружено несколько типов спектров множественных молекулярных форм трансферазы. В комбинации *C. roseus*+*V. minor* было идентифицировано 27 % гибридов (от общего числа изученных клеточных линий), *R. serpentina*+*C. roseus* — 46 % и *Rauwolfia*+*Rhazya* — 5 %.

При совместном гидролизе ядерной ДНК рестриктазами *EcoRV* и *VamHI* родительских видов, использованных в экспериментах по соматической гибридизации, и гибридизации их с ДНК плазмиды *pUL7*, содержащей фрагмент рДНК лимона, выявляются специфичные для каждого вида наборы фрагментов рДНК. В проанализированных во всех комбинациях гибридных клеточных линиях, отселектированных после слияния, наблюдаются специфичные для обоих родительских видов рестриктные фрагменты рДНК (рис. 6: блот-гибридизация ядерных ДНК *Cr*, *Vm* и гибридной клеточной линии 115, гидролизованых рестриктазами *EcoRV* и *VamHI*, с зондом *pUL7*, специфичным к рДНК; рис. 7: блот-гибридизация ядерных ДНК *Rs*, *Rhazya stricta* (*RR*) и гибридных клеточных линий, гидролизованых рестриктазами *EcoRV* и *VamHI* с зондом *pUL7*, специфичным к рДНК).

Гибридный материал культивировали в виде каллусных штаммов в темноте при 26 °С и/или на свету (3000—4000 лк) при 16-ч световом дне. Попытки получить растения-регенеранты не имели успеха.

Как и в первой комбинации (*Rauwolfia* + *Vinca*), отселектированные клеточные линии были исследованы по критерию «гибридность» (анализ изозимных спектров, блот-гибридизация гидролизованной рестриктазами ДНК с зондом, содержащим фрагмент рДНК лимона) через 10—11 месяцев после первой серии анализов. Во всех комбинациях клеточные линии, первоначально идентифицированные как гибридные, сохраняли признаки гибридности и по результатам повторной серии анализов, что весьма существенно, поскольку общеизвестны факты, свидетельствующие о высоком уровне генетической и физиологической изменчивости как культивируемых растительных клеток вообще [21], так и соматических гибридов, в частности [12].

Таким образом, нами разработаны и испытаны условия изолиро-

вання жизнеспособных протопластов четырех видов растений-продуцентов из семейства *Aposynaceae*, подобраны и модифицированы питательные среды для их культивирования. Гибридные клеточные линии получены в следующих комбинациях: *Rauwolfia*+*Vinca*; *Rauwolfia*+*Catharanthus*; *Rauwolfia*+*Rhazya*; *Catharanthus*+*Vinca*, статус гибридного состояния которых сохраняется в течение двух лет культивирования в условиях неорганизованного клеточного роста. Полученные гибридные клоны представляют определенный интерес для исследований особенностей их вторичного синтеза, поскольку объединение в гибридной клет-

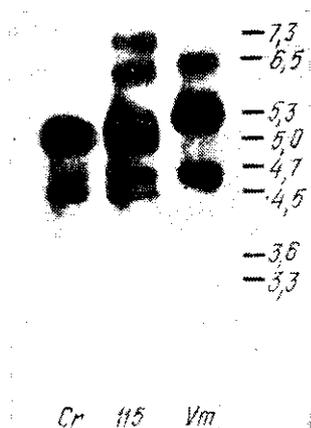


Рис. 6

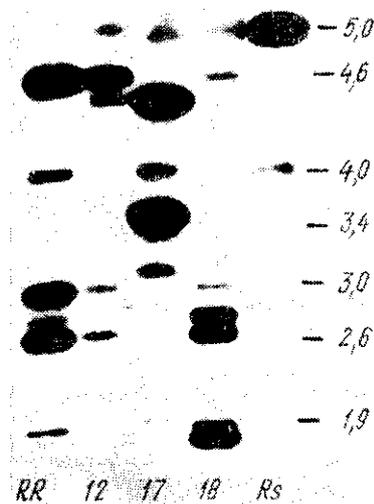


Рис. 7

ке различных родительских геномов и происходящих в них метаболических процессов может приводить к глубоким качественным и количественным сдвигам в структуре вторичного метаболизма, в частности, к появлению новых, не свойственных родительским видам, метаболитов [22].

Резюме

Визроблені умови ізолювання та культивування протопластів чотирьох видів рослин-продуцентів із родини *Aposynaceae*. Описано одержання гібридних клітинних ліній методом злиття протопластів у різних комбінаціях. Вивчені ізозимні спектри естерази та трансферази цих гібридних калусних ліній, проаналізовані результати блот-гібридизації рестриктних фрагментів ядерної ДНК з рДНК лимону, приведені дані цитогенетичного аналізу. Продемонстрована відносно висока стабільність гібридних клонів на протязі 20 місяців культивування *in vitro*.

Summary

Protoplast culture and fusion techniques have been developed for four *Aposynaceae* species in different combinations. Hybrid cell lines obtained were studied with respect to esterase and transferase isozyme analysis, blot hybridization analysis using lemon rDNA as a probe, and results of cytogenetic analysis. Relative genetic stability of hybrid cell lines during 20 months of culture in unorganized growth conditions has been demonstrated.

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.— 41C.— 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. Borisyuk 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 плазмагенами 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.