

Р. Л. Геворкян, Х. Эспанхенберг, Ю. Ю. Глеба

## РЕКОНСТРУИРОВАННЫЕ ФОРМЫ NICOTIANA, ПОЛУЧЕННЫЕ ИЗ ПРОДУКТОВ СЛИЯНИЯ «ПРОТОПЛАСТ+ЦИТОПЛАСТ»

*Генетически реконструировали клетки табака путем слияния мезофильных протопластов и безъядерных субклеточных фрагментов — цитопластов. Использовали технологию электрослияния пар преселектированных протопластов и цитопластов с последующим культивированием продуктов слияния в микрокаплях питательной среды. После слияния клеток пластомного мутанта с цитопластами, содержащими 7—20 хлоропластов, во всех случаях получены растения-регенеранты; часть из них была нестробильной, что свидетельствует о наличии в этом материале цитоплазматических генов обоих родительских типов.*

Реконструкция растительной клетки путем объединения клеток одного родителя с субклеточными фрагментами (кариопластами, цитопластами, изолированными органеллами) другого представляет собой перспективную область клеточной инженерии растений. Однако до последнего времени исследования в этой области были затруднены, прежде всего, из-за отсутствия а) методов гибридизации, позволяющих работать с индивидуальными клетками и фрагментами, а также б) приемов выделения препаратов клеточных фрагментов высокой частоты [1]. Разработанная учеными Макс-Планк Института клеточной биологии (Ладенбург, ФРГ) технология электроиндукции слияния преселектированных протопластов и субпротопластов с последующим культивированием продуктов гибридизации в микрокаплях питательной среды [2] создала методическую основу для проведения работ такого рода. Мы воспользовались этой технологией с целью изучения возможности генетического конструирования при слиянии соматической клетки с бесклеточным фрагментом — цитопластом.

В качестве одного из родителей (реципиента) использовали двойной пластомный мутант табака, *N. tabacum L.*, несущий независимые мутации хлорофиллдефектности и стрептомицинустойчивости [3]. Мезофильные протопласты выделяли из листьев асептически выращиваемых растений, как описано ранее [4]; цитопласты — используя асептически выращиваемые растения табака дикого типа, сорт Барлей; цитопласты обнаруживали как примесь в тотальном препарате протопластов и изолировали с помощью микроманипулятора [5]. Выбирали цитопласты, содержащие от 7 до 20 хлоропластов. Выделение, слияние и культивирование реконструированных клеток вели, как описано в работе [6], со следующими модификациями: для агглютинации протопластов и цитопластов использовали переменный ток 1 МГц, 80 В/см, слияние индуцировали единичным прямоугольным импульсом 50 мкс, 0,9 кВ/см, для культивирования реконструированные клетки помещали в микрокапли объемом 50 нл, использовали среду Као и Михайлюка 8р [7]. На рис. 1 изображены различные этапы слияния протопластов и цитопластов табака (а, в — сближение и контакт протопласта и цитопласта в переменном высокочастотном электрическом поле; б, г — начальный этап слияния, непосредственно после наложения единичного прямоугольного импульса).

Эффективность слияния в наших условиях составляла около 70 %. Всего было получено 30 продуктов слияния с цитопластами табака, из них 18 образовали колонии. Во всех случаях из клеток этих колоний нам удалось регенерировать растения (рис. 2: а — округлившийся продукт слияния, содержащий 20 хлоропластов, привнесенных от цитопласта; 1-й ч культуры; б — продукт слияния, содержащий 7 хлоропластов, привнесенных от цитопласта; 24 ч культуры; в — деление и

образование микроколонии клеток из продукта слияния протопласт + цитопласт; 8 сут культуры; *г* — пестролистное растение-регенерант (белые пластиды происходят от протопласта, зеленые хлоропласты — от цитопласта).

Цитогенетический анализ корешков растений, представляющих три клона из продуктов слияния с цитопластами, подтвердил их диплоидную природу. Среди регенерантов во всех случаях помимо чисто-зеленых и

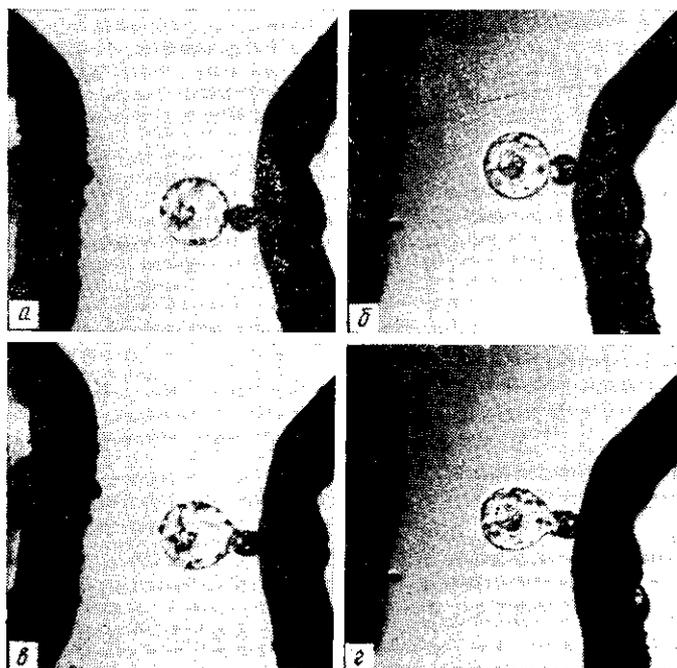


Рис. 1

чисто хлорофиллдефектных обнаружены также пестролистные формы.

До нашей работы в литературе имелось лишь одно сообщение по получению рекомбинантных форм растений путем слияния протопластов с цитопластами — работа Малиги и др. [8]. Однозначную интерпретацию этой работы, однако, затрудняло то обстоятельство, что авторы применяли неконтролируемую химическую индукцию слияния в больших популяциях протопластов и цитопластов, при этом использовавшиеся популяции цитопластов содержали 2—7 % «загрязняющих» протопластов. Более того, в результате опыта более 80 % отобранных форм оказались ядерными гибридами, а происхождение гибридных форм могло объясняться и сегрегацией ядер в продуктах слияния «протопласт + протопласт», т. е. не было однозначно связано с участием в слиянии именно цитопластов. В наших опытах, основанных на применении методики получения и культивирования продуктов слияния «один протопласт + один цитопласт», удалось избежать статистического подхода и возникающей при этом неоднозначности выводов. Наши эксперименты свидетельствуют, что технология слияния преселектированных клеток и фрагментов клеток с последующим индивидуальным культивированием реконструированных клеток является перспективным приемом в клеточной инженерии растений.

Реконструкция клеток при помощи слияния протопластов с цитопластами представляет собой элегантный подход при решении ряда проблем генетики. В частности, этот метод в отличие от ранее применявшихся [9] позволяет регулировать соотношение цитоплазматических органелл (пластид и митохондрий), попадающих в обобществленную

клетку в результате слияния клетки и субклеточного фрагмента. Наши рекомбинантные формы *Nicotiana* реконструированы путем объединения клетки с примерно 200 развитыми пластидами и цитопласта, содержащего 7—20 пластид; количественное соотношение пластид двух родителей, таким образом, составляет от 1 : 10 до 1 : 30. Поскольку все регенерировавшие клоны оказались гетерозиготными по цитоплазме, наши данные противоречат гипотезе Тилни — Бассета [10], согласно которой

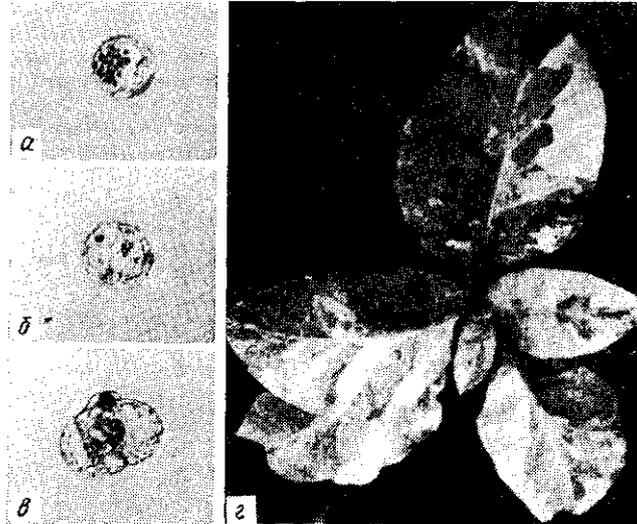


Рис. 2

лишь очень небольшое число (возможно, 2—3) пластид в клетке размножается, т. е. является генетически активным. Если бы названная гипотеза была справедлива, лишь менее 10 % клонов сохранили бы гетерозиготные популяции пластид.

#### Резюме

Из генетично реконструйованих клітин табака, що одержані шляхом злиття мезофільних протопластів пластомного мутанту та без'ядерних субклітинних фрагментів — цитопластів (які містять 7—20 хлоропластів), одержані рослини-регенеранти. Частина з них була строкатолистяною, що свідчить про наявність в цьому матеріалі цитоплазматичних генів обох батьківських типів.

#### Summary

Experiments on genetic reconstitution of tobacco cells by fusion of mesophyll protoplasts and enucleated cell fragments (cytoplast) was carried out. Technology of electrofusion of preselected pairs protoplast+cytoplast followed by individual culturing of fusion products in microdroplets of culture medium was utilized. After fusion of cells of the plastom chlorophyll-deficient mutant with cytoplasts containing 7—20 wild-type chloroplasts, in all cases plant regenerants have been obtained. In all clones tested, part of regenerates were variegated plants thus indicating presence of cytoplasmic genes of both parental sources.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Глеба Ю. Ю., Сытник К. М. Клеточная инженерия растений.— Киев : Наук. думка, 1984.— 160 с.
2. Individual selection, culture and manipulation of higher plant cells/H. G. Schweiger, J. Dirk, H. U. Koop et al.//Theor. and Appl. Genet.— 1987.— 73, N 6.— P. 769—783.

3. Medeyesy F., Fejes E., Maliga P. Interspecific chloroplast recombination in a *Nicotiana* somatic hybrids // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1985.— 82, N 20.— P. 6960—6964.
4. Transmission genetics of the somatic hybridization process in *Nicotiana*. I. Hybrid and cybrids among the regenerates from cloned protoplast fusion products / Y. Y. Gleba, N. N. Kolesnik, I. V. Meshkene et al. // Theor. and Appl. Genet.— 1984.— 69, N 1.— P. 121—128.
5. Spangenberg H., Neuhaus G., Potrykus I. Micromanipulation of higher plant cells // Plant cell line selection / Ed. P. J. Dix.— Weinheim: VCH, 1990.— P. 87—109.
6. Koop H. U., Schweiger H. G. Regeneration of plants from individually cultivated protoplasts using an improved microculture system // J. Plant Physiol.— 1986.— 121, N 3.— P. 245—257.
7. Kao K. N., Michayluk M. R. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media // Planta— 1975.— 126, N 2.— P. 105—110.
8. Cytoplasm-protoplast fusion for interspecific chloroplast transfer in *Nicotiana*; P. Maliga, H. Loerz, G. Lazar, F. Nagy // Mol. and Gen. Genet.— 1981.— 185, N 2.— P. 211—215.
9. Transmission genetics of the somatic hybridization process in *Nicotiana*. II. Plastome heterozygotes / Yu. Gleba, I. K. Komarnitsky, N. N. Kolesnik et al. // Ibid.— 1985.— 198, N 3.— P. 476—481.
10. Tilney-Bassett R. A. E. The control of plastid inheritance in *Pelargonium* // Genet. Res.— 1970.— 16, N 1.— P. 49—61.

Институт клеточной биологии и генетической инженерии АН УССР,  
Киев

Получено 14.01.91

Тел.: 4-11-1 (ЕТН), Цюрих

№ 7—575.22

И. В. Кучук, А. М. Шаховский, В. В. Воронин, Ю. Ю. Глеба

## ПОЛУЧЕНИЕ АСИММЕТРИЧНЫХ СОМАТИЧЕСКИХ ГИБРИДОВ В РОДЕ *MEDICAGO*

Получены асимметричные соматические гибриды между различными видами люцерны (*Medicago* sp.). Регенерированы растения в гибридной комбинации *M. sativa*+*M. varia*. Мезофильные канамицин-устойчивые протопласты *M. varia* облучали гамма-лучами в дозе 300 Гр. У них выявлен ген устойчивости к канамицину. Отбор асимметричных соматических гибридов: вели по устойчивости к канамицинсульфату. В комбинации *M. borealis*+*M. lupulina* получены клеточные линии. Канамицинустойчивые каллусные протопласты *M. lupulina* облучали гамма-лучами в дозе 500 Гр.

**Введение.** Клеточная инженерия растений за последнее время достигла больших успехов в расшифровке механизмов организации, функционирования и регулирования растительного генома, а также в конструировании новых форм растений, обладающих целым рядом хозяйственно ценных признаков. В перспективе развитие этих методов позволит выйти на новые ступени в познании живой природы, а также существенно изменит и ускорит селекционный процесс по выведению высокоурожайных и устойчивых к неблагоприятным факторам среды сортов культурных растений. В то же время подавляющее большинство экспериментов по клеточной инженерии растений проведено на видах из семейства пасленовых и в меньшей степени — крестоцветных. Менее изучены в этом отношении виды семейства бобовых, имеющие важное значение для сельскохозяйственного производства. К настоящему времени существует относительно мало работ, описывающих получение соматических гибридов между видами семейства бобовых, что в значительной степени связано с трудностями культивирования протопластов у этих видов.

Эксперименты по соматической гибридизации у видов из семейства бобовых проводили, главным образом, с видами рода *Medicago*. Так, авторы [1] сообщили о получении гибридных растений в результате слияния протопластов *M. sativa* с протопластами *M. falcata*. В работе

© И. В. Кучук, А. М. Шаховский, В. В. Воронин, Ю. Ю. Глеба, 1991.