НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
Інститут клітинної біології та генетичної інженерії

На правах рукопису

УДК 575.222.7+582.951.4

ЄВТУШЕНКО
Дмитро Павлович

ОТРИМАННЯ ТА АНАЛІЗ МІЖВИДОВИХ СОМАТИЧНИХ ЦИБРИДІВ КАРТОПЛІ

03.00.25 — клітинна біологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття вченого ступеня
кандидата біологічних наук

Київ 1995

Роботу виконано у відділі клітинної селекції Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України

Науковий керівник – член-кореспондент НАН України та УААН, доктор біологічних наук В. А. Сидоров

Офіційні опоненти – доктор біологічних наук Б. О. Левенко

кандидат біологічних наук М. В. Кучук

Провідна організація – Національний університет ім. Т. Г. Шевченка Міністерства освіти України

Захист відбудеться "4" січня 1996 р. о 14 год. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д. 01. 19. 01 Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: 252143, Київ-143, вул. Заболотного, 148.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України.

Автореферат розіслано "25" листопада 1995 р.

Вчений секретар спеціалізованої ради,
кандидат біологічних наук Л. В. Малишева

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Розробка ефективних методів генетичної реконструкції культурних рослин з метою поліпшення їх вихідних характеристик належить до актуальних завдань сучасної біотехнології. Одним із таких напрямків є соматична гібридизація, яка дозволяє подолати бар'єри статевої несумісності при міжвидових схрещуваннях та залучити до селекційного процесу філогенетично віддалені види. Однак отримання міжвидових ядерних гібридів картоплі поряд із набуттям нових властивостей супроводжується втратою сортоспецифічних ознак генотипу і потребує додаткових рекурентних схрещувань. На відміну від гібридів, отримання цибридів – рослин, що містять ядро одного з партнерів та органели (пластиди, мітохондрії) іншого, дозволяє не тільки зберегти гетерозиготність вихідного сорту, але й перенести в культурну картоплю господарсько-цінні ознаки, що кодуються плазмагенами інших видів *Solanum*.

Цибриди становлять значний інтерес як для фундаментальних, так і прикладних досліджень: є зручною модельною системою для вивчення взаємовідносин ядра і органел клітини, дозволяють ідентифікувати ознаки, що контролюються цитоплазмоном, надають інформацію про філогенію видів тощо.

Більшість генотипів культурної картоплі містить пластом, характерний для *Solanum tuberosum* L. Це обумовлено однобатьківським, материнським успадкуванням пластид у рослин цієї культури. Разом з тим існує величезна різноманітність диких видів *Solanum*, що мають видоспецифічний цитоплазмон. Відомо, що хлоропластна та мітохондріальна ДНК можуть конт-

ролювати ряд цінних в практичному відношенні ознак, а саме інтенсивність фотосинтезу, стійкість до патотоксинів, гербіцидів, толерантність до низьких та високих температур, цитоплазматична чоловіча стерильність та ін. (Medgyesy, 1990).

Однак до цього часу потенціал плазмофонду диких видів картоплі практично не використовується. На сьогодні відомі лише декілька робіт по отриманню цибридів картоплі (Sidorov et al., 1989; Perl et al., 1990). Дослідження стримуються відсутністю генетично маркерованих ліній, необхідних для селекції цибридів, та значними труднощами використання методів клітинної інженерії стосовно цієї культури. Отже, розробка та використання нових технологій у створенні соматичних цибридів дозволить розширити плазмофонд культурної картоплі та виявити найбільш цінні джерела цитоплазми серед диких видів *Solanum*.

Мета та завдання роботи. Мета - вивчення можливості отримання міжвидових соматичних цибридів картоплі з використанням нових підходів у створенні алоплазматичних форм рослин.

До конкретних завдань роботи входило:

1. Розробити клітинну технологію отримання цибридів, яка не потребує присутності селективних генетичних маркерів у вихідному рослинному матеріалі.

2. За допомогою нової технології створити цибридні рослини, що містять ядерний генетичний матеріал культурної картоплі і пластиди диких видів *Solanum*.

3. Створити соматичні цибриди на основі хлорофілдефектних пластомних мутантів *S. tuberosum* L. і різних представників роду *Solanum*.

4. Провести аналіз відібраних рослин-регенерантів для доказу їх цибридної природи.

Наукова новизна досліджень.

1. Запропоновано принципово новий підхід у створенні цибридів, який дозволяє спрямовано отримувати рослини з чужинними органелами без присутності у вихідному матеріалі селективних генетичних маркерів.

2. За новою технологією вперше отримано цибридні рослини *S. tuberosum* L., що містять хлоропласти дикого виду картоплі *S. bulbocastanum* Dun., *S. pinnatisectum* Dun., *S. acaule* Bitt.

3. Вперше показано, що протопласти, оброблені надлетальними дозами мутагену, можуть бути використані як донори мутантних пластид.

4. Запропоновано модифіковану методику злиття протопластів із мезофільної тканини листка.

5. Продемонстровано доцільність використання надлетальних доз γ-опромінення протопластів донора для отримання цибридів картоплі.

6. На основі хлорофілдефектних пластомних мутантів *S. tuberosum* L. вперше створено цибридні рослини, що містять пластиди дикого бульбоутворюючого виду *S. microdontum* Bitt., *S. stoloniferum* Schlecht., *S. gibberulosum* Juz., *S. cardiophyllum* Lindl., *S. kurtzianum* Bitt. (*S. macolae* Buk.).

7. Показано сумісність ядерного генома *S. tuberosum* L. і пластома диких видів картоплі, що використовувалися в роботі.

8. Розроблено клітинно-інженерні засоби, що дозволяють використовувати широку різноманітність плазмофонду різних видів *Solanum* в селекції культурної картоплі.

Практична цінність роботи.

1. Розроблена нова клітинна технологія отримання цибридів дозволяє зберегти гетерозиготність вихідних сортів картоплі.

2. Створені цибриди картоплі можуть бути безпосередньо використані в рослинництві без додаткових рекурентних схрещувань.

3. Отримані цибридні рослини дають можливість ідентифікувати господарсько-цінні ознаки, що кодуються цитоплазмоном диких видів *Solanum*, та розширити плазмофонд культурної картоплі.

4. Створені форми рослин можуть бути вихідним селекційним матеріалом для отримання нових сортів картоплі.

Отримані рослини передані до Біотехнологічної лабораторії кафедри біології, селекції та захисту рослин Львівського державного сільськогосподарського інституту для подальшого їх вивчення в польових умовах.

На захист виносяться положення.

1. Соматична гібридизація дає можливість спрямовано отримувати цибридні рослини без присутності у вихідному матеріалі селективних генетичних маркерів.

2. Метод злиття протопластів дозволяє використовувати в селекції картоплі плазмофонд диких бульбоутворюючих видів *Solanum*: *S.bulbocastanum* Dun., *S.pinnatisectum* Dun., *S.acaule* Bitt., *S.microdontum* Bitt., *S.stoloniferum* Schlecht., *S.gibberulosum* Juz., *S.cardiophyllum* Lindl., *S.kurtzianum* Bitt. (*S.macolae* Buk.).

3. При соматичній гібридизації протопласти, оброблені надлетальними дозами мутагену, можуть бути використані як донори мутантних пластид.

4. Можливе отримання цибридів картоплі як з реконструйованою мтДНК, так і з мтДНК одного із партнерів.

Апробація роботи. Результати досліджень було представлено на 4-ому Європейському конгресі з клітинної біології (Прага, Чехія, 1994), Міжнародній конференції "Молекулярно-генетичні маркери та селекція рослин" (Київ, 1994), Міжнародному симпозіумі "Біотехнологія та генетична інженерія рослин" (Київ, 1994), Міжнародній конференції "Актуальні проблеми генетики, біотехнології та селекції" (Кишинів, Молдова, 1994), Кейстоунському симпозіумі з біології рослинної клітини (Таос, США, 1995), Кейстоунському симпозіумі з морфогенезу рослин (Хілтон Хед Айленд, США, 1995), а також на наукових семінарах відділу клітинної селекції Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 8 робіт, список яких наведено в кінці автореферату.

Структура та обсяг роботи. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, матеріалів та методів, результатів досліджень та їх обговорення, заключення, висновків та списку цитованої літератури, який містить 208 бібліографічних посилань. Робота викладена на 162 сторінках машинопису, включає одну таблицю, 29 рисунків.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

У дослідах використовували різні види та форми картоплі:

1. Дикі бульбоутворюючі види роду *Solanum* L., секції Tuberarium (Dun.) Buk., які відрізняються рівнем плоїдності та належать до різних серій двох географічних груп. Південноамериканські види: *S.acaule* Bitt., *S.microdontum* Bitt., *S.gibberulosum* Juz., *S.kurtzianum* Bitt. (*S.macolae* Buk.). Північноамериканські види: *S.bulbocastanum* Dun., *S.pinnatisectum* Dun., *S.stoloniferum* Schlecht., *S.cardiophyllum* Lyndl.

2. Культурний тетраплоїдний (2n=4x=48) вид *Solanum tuberosum* L., серія Tuberosa (Rydb.) Buk.. Сорти: Світанок київський, Зарево.

3. Хлорофілдефектний пластомний мутант *S.tuberosum* L. сорту Зарево - лінія Z-3 (Sidorov et al., 1990).

Рослини вирощували в асептичних умовах на модифікованому безгормональному середовищі MS (Murashige, Skoog, 1962) або на живильному середовищі ST-3 (Сидоров и др., 1985), при 16-годинному світловому фотоперіоді, освітленні 3-4 клк та температурі 23-25°C. Розмножували живцюванням.

Мезофільні протопласти виділяли за вдосконаленою методикою (Сидоров и др., 1985).

Для мутагенезу протопластів виду-донора органел використовували 3-5 мМ розчин N-нітрозо-N-метилсечовини (1-2 години) та/або γ-опромінення дозою 1000-2000 Гр (9 Гр $\cdot$ хв$^{-1}$, ^{60}Co).

Злиття мезофільних протопластів проводили за методикою Менцеля (Menczel et al., 1981), модифікованою стосовно умов експерименту.

Культивування протопластів та продуктів їх злиття здійснювали в рідкому живильному середовищі SW (Sidorov et al., 1987) з використанням методу імобілізації клітин в альгінат кальцію.

Селекцію цибридних протоклонів проводили на твердому середовищі ST-1 (Сидоров и др., 1985), яке містило низький рівень джерел вуглеводного живлення та було доповнене 0,5-1 г/л стрептоміцинсульфату. В експериментах з використанням хлорофілдефектних мутантів селективне середовище було без стрептоміцину.

Для регенерації рослин використовували модифіковане середовище ST-2 (Сидоров и др., 1985). Регенеранти вкорінювали на безгормональному середовищі MS, висаджували в грунт.

Сумарну рослинну ДНК виділяли з листя за стандартною методикою (Murray, Thompson, 1980).

ДНК із хлоропластів та мітохондрій виділяли, використовуючи відомі методики (Wilson, Chourey, 1984; Bookjans et al., 1984).

Рестрикцію проводили згідно з рекомендаціями виробників ферментів (Boehringer Mannheim, FRG).

Саузерн-блот-гібридизацію проводили на нейлонових фільтрах за методикою, запропонованою Чач та Гілбертом (1984). Як радіоактивний зонд використовували *Bam* HI-фрагмент мтДНК *Oenothera* довжиною 5,2 т.п.н., що містить послідовність 18S-, 5SрДНК, 5'ND5 та виділений з плазміди B6/2 (Brennicke et al., 1985).

Цитогенетичний аналіз та аналіз множинних молекулярних форм естераз проводили за описаними методами (Сидоров и др., 1985; Mouras et al., 1987).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

1. Вивчення видоспецифічності пластома вихідних форм та видів картоплі.

Отримання цибридів картоплі грунтувалося на перенесенні пластид із диких видів пасльонових в культурний *S. tuberosum* L. Тому на першому етапі досліджень було проведено рестриктний аналіз хлоропластної ДНК диких видів *Solanum*, що становлять певний інтерес для селекціонерів, та перспективних сортів картоплі.

Результати аналізу пластома з використанням ендонуклеаз *Bam* HI та *Hind* III показали, що дикі види мають видоспецифічні рестриктні фрагменти хлДНК, які відрізняються від аналогічних фрагментів пластома як інших диких видів цієї родини, так і культурної картоплі. За допомогою цього ж методу було встановлено, що більшість сортів картоплі мають спектри хлДНК, характерні для *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* - так званий Т-тип пластома (Hosaka, 1986). Отримані результати підтверджують теорію походження культурної картоплі від одного спільного предка, запропоновану Хосакою із співавт. (Hosaka, Hanneman, 1988). Відповідно, дикі види *Solanum* мають різне з культурною картоплею походження і, як наслідок, відмінну цитоплазму. Більш того, ступінь відмінності цитоплазмона між видами надає інформацію про філогенетичну віддаленість їх один від одного.

Оскільки хлоропластна ДНК може контролювати ряд цінних для сільського господарства ознак (Medgyesy, 1990), то отримання цибридів картоплі дасть можливість залучити до селекційного процесу корисні ознаки, що кодуються пластомом диких видів *Solanum*. Для створення цибридних форм картоплі в роботі використовували метод злиття протопластів за схемою "реципієнт + донор". Реципієнтом чужинної цитоплазми були сорти Світанок київський, Зарево. За донора органел використовували дикі види *S. bulbocastanum* Dun., *S. pinnatisectum* Dun., *S. acaule* Bitt., *S. stoloniferum* Schlecht., *S. microdontum* Bitt., *S. gibberulosum* Juz., *S. cardiophyllum* Lindl., *S. kurtzianum* Bitt. (*S. macolae* Buk.). Вказані види несумісні з *S. tuberosum* L. при статевій гібридизації.

2. Отримання цибридів картоплі без використання цитоплазматичних мутантів.

Як правило, необхідною умовою для отримання цибридів є використання рослинного матеріалу з селективними цитоплазматичними маркерами: хлорофілдефектністю, стійкістю до антибіотиків, гербіцидів тощо. Однак застосування таких мутантів потребує їх попереднього отримання, а це, в свою чергу, пов'язано зі значними витратами часу (рік і більше) і не завжди закінчуєтья успішно. Крім того, хлорофілдефектні пластомні мутанти можуть мати небажані зміни ядерного генома (делеції та ін.), які виникають при мутагенній обробці. Використання таких рослин за реципієнта чужинних органел призводить до отримання цибридів із втраченими сортоспецифічними ознаками генома і, відповідно, непридатних для безпосереднього застосування в рослинництві.

Нами запропоновано і розроблено принципово нову клітинну технологію отримання цибридів, при якій нема потреби у

присутності будь-яких селективних генетичних маркерів у вихідному рослинному матеріалі. В основі підходу лежить обробка (безпосередньо перед злиттям) протопластів виду-донора органел надлетальними дозами фізичного і хімічного мутагенів, та переважне розмноження мутантних пластид в продуктах злиття протопластів. При цьому фізичний мутагенез (γ-опромінення дозою 1000-2000 Гр) використовували для інактивації ядра донора, щоб звести до мінімуму можливість перенесення чужинного ядерного матеріалу в геном реципієнта. А обробку хімічним мутагеном (3-5 мМ розчином N-нітрозо-N-метилсечовини, яка є ефективним індуктором цитоплазматичних мутацій) застосовували з метою індукції пластомних мутацій стійкості до стрептоміцину. Для ідентифікації мутантних пластид донора в продуктах злиття протопластів проводили селекцію клітинних колоній на середовищі зі стрептоміцином. Відбір цибридів на селективному середовищі грунтувався на здатності ймовірних цибридних клонів рости і зеленіти в присутності антибіотика (0,5-1 г/л стрептоміцинсульфату), в той час як інші (чутливі) колонії в цих же умовах формували знебарвлений калус.

При розробці технології мезофільні протопласти виду-донора (*S. bulbocastanum* Dun., *S. pinnatisectum* Dun., *S. acaule* Bitt.) обробляли двома мутагенами (γ-опромінення + НМС) і зливали з мезофільними протопластами реципієнта (сорту Зарево, Світанок київський) у співвідношенні 1:1. Злиття протопластів проводили за модифікованою методикою, що дало змогу збільшити в 10-12 разів кількість протопластів та продуктів їх злиття, які вижили після обробки розчинами "ПЕГ-високий pH/Ca^{2+}". Частота злиття протопластів складала 20-25%. У роботі показано ефективність використання ступінчастого селективного тиску для збереження індукованих цитоплазматичних мутацій і відбору ймовірних цибридних клонів. Скринінг протопластів на стійкість до стрептоміцину починали проводити після перших 2-3 клітинних поділів. Початкова концентрація антибіотика в середовищі для культивування протопластів складала 50-100 мг/л. Рівень вмісту срептоміцинсульфату в середовищі збільшували щотижня, доводячи протягом 1-1,5 місяців до 500-1000 мг/л. Таке поступове збільшення концентрації селективного агента в середовищі створювало сприятливі умови для переважної реплікації копій хлДНК, що містили індуковані мутації стрептоміцинстійкості, та ефективного сортування мутантних і немутантних пластид в продуктах злиття протопластів. Використання ступінчастого селективного тиску дало змогу відбирати на селективному середовищі в 6-8 разів більше ймовірних цибридних клонів, ніж при традиційній схемі селекції мутантів.

У результаті селекції було виявлено 23 стійкі до антибіотика колонії із комбінації "*S. tuberosum* L. c. Зарево + *S. bulbocastanum* Dun.", 18 - із комбінації "*S. tuberosum* L. c. Зарево + *S. pinnatisectum* Dun.", 32 - "*S. tuberosum* L. c. Світанок київський + *S. pinnatisectum* Dun.", і 48 - "*S. tuberosum* L. c. Світанок київський + *S. acaule* Bitt.". Формування пагонів із відібраних клонів відбувалося протягом 2-5 місяців культивування на середовищі для індукції органогенезу. Частота регенерації в комбінаціях злиття протопластів, де за реципієнта використовували сорт Зарево, складала 87,3±3,5%; в комбінаціях "*S. tuberosum* L. c. Світанок київський + дикий вид картоплі" - 66,5±5,3%. В дослідженнях ми не помітили залежності регенераційної здатності клітинних колоній від ви-

дової належності чужинних пластид, хоча індукція пагоноутворення із цибридних клонів відбувалася на 1-2 місяці пізніше, ніж у контрольних дослідах із протопластами реципієнта. В кожній комбінації партнерів відібрали по декілька ліній регенерантів з нормальною морфологією, розмножили *in vitro* і використовували для подальшого аналізу.

Біохімічний аналіз регенерованих рослин було зосереджено головним чином на характеристиці генетичного матеріалу органел. Рестриктний аналіз хлоропластої ДНК з використанням ендонуклеаз *Bam* HI і *Hind* III показав присутність чужинного пластома в регенерантах із кожної комбінації партнерів. Серед регенерованих рослин 8 ліній мали хлоропласти *S. bulbocastanum* Dun. (комбінація "*S. tuberosum* L. с. Зарево + *S. bulbocastanum* Dun."), 8 ліній містили хлоропласти *S. pinnatisectum* Dun. (4 лінії із комбінації "*S. tuberosum* L. с. Зарево + *S. pinnatisectum* Dun." і 4 лінії із комбінації "*S. tuberosum* L. с. Світанок київський + *S. pinnatisectum* Dun.") та 3 лінії мали хлоропласти *S. acaule* Bitt. (комбінація "*S. tuberosum* L. с. Світанок київський + *S. acaule* Bitt."). Частота утворення цибридних клонів в середньому складала $5,4 \cdot 10^{-5}$. Результати аналізу хлДНК деяких ліній зображені на рис. 1; 2, А. Ніяких відмінностей між рестриктними спектрами хлДНК отриманих цибридів та відповідними фрагментами пластома виду-донора хлоропластів не виявлено. Це свідчить про відсутність помітних змін у хлДНК донора при обробці протопластів надлетальними дозами іонізуючого випромінювання, та вказує на високу радіостійкість пластома в порівнянні з хроматином клітини. Водночас, при цитологічному та морфологічному аналізі ми не знайшли будь-яких ознак негативного впливу

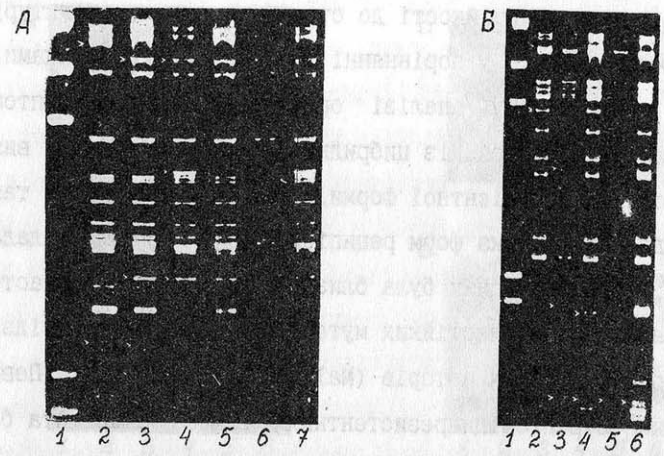


Рис. 1. Результати рестриктного аналізу хлДНК вихідних видів та цибридів картоплі з використанням ендонуклеаз *Bam* HI(**А**), *Hind* III(**Б**): 1-ДНК фага λ (*Hind* III-фрагменти); 2-*S. tuberosum* L. с. Зарево; 3-*S. pinnatisectum* Dun.; 4-*S. bulbocastanum* Dun.; 5-цибридні лінії Sp1(**А**), Sp2(**Б**); 6-цибридна лінія Sp3; 7-цибридна лінія Sb5.

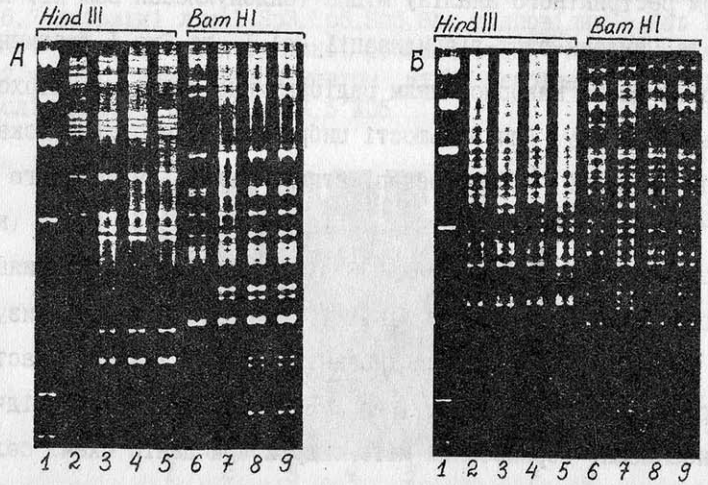


Рис. 2. Результати рестриктного аналізу хлДНК (**А**), мтДНК (**Б**) вихідних видів та цибридів картоплі з використанням ендонуклеаз *Hind* III, *Bam* HI: 1-ДНК фага λ; 2,6-*S. tuberosum* L. с. Світанок київський; 3,7-*S. pinnatisectum* Dun.; 4,8-цибридна лінія 116.5; 5,9-цибридна лінія 116.8.

пластомних мутацій стійкості до стрептоміцину на структуру і функції хлоропластів у порівнянні з інтактними пластидами.

При рестриктному аналізі органельних ДНК стрептоміцинстійких клонів поряд із цибридними рослинами були виявлені рослини реципієнтної форми. Частота виникнення таких стійких до антибіотика форм реципієнта в середньому складала $3,2 \cdot 10^{-6}$ і за значенням була близькою до спонтанної частоти утворення стрептоміцинстійких мутантів - $2,7 \cdot 10^{-6}$, відзначеної в роботах інших авторів (Maliga et al., 1982). Певно, виникнення стрептоміцинрезистентних ліній реципієнта було обумовлено не тільки спонтанними мутаціями стійкості до антибіотика, але й тим, що стрептоміцин може мати мутагенний ефект стосовно пластома клітини (Сидоров и др., 1990).

Успадкування мітохондрій в отриманих цибридів визначали шляхом рестриктного аналізу мтДНК (ендонуклеази *Bam* HI, *Hind* III) та Саузерн-блот-гібридизації *Pst* I- та *Sma* I-фрагментів сумарної ДНК з використанням радіоактивно міченого мітохондріального зонду. Для більшості цибридних форм рослин показано присутність мтДНК реципієнтного типу, властивого *S. tuberosum* L. (рис. 3). Однак у ліній Sp2, 116.5, 116.8 (комбінації "культурна картопля + *S.pinnatisectum* Dun.") виявили перебудови мтДНК, причому лінії 116.5 і 116.8 характеризувались присутністю в рекомбінованій мтДНК значної частини хондріома донорного типу (рис.2,Б). Ці результати свідчать про незалежне перенесення мітохондрій при даній схемі селекції та можливість отримання цибридних рослин картоплі з мтДНК як вихідних видів, так і з мтДНК реконструйованого типу.

Ядерну конституцію рослин-регенерантів вивчали за допо-

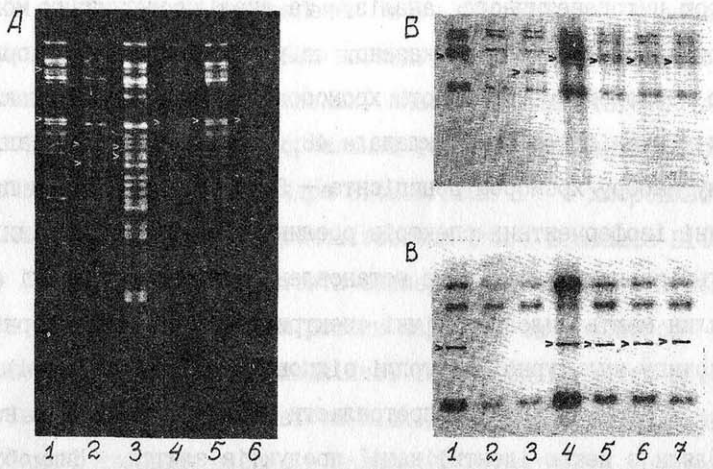


Рис.3. Результати рестриктного аналізу (**А**) та Саузерн-блот-гібридизації (**Б,В**) мтДНК вихідних видів та цибридів картоплі. **А** (*Hind* III-фрагменти): 1-*S. tuberosum* L. с. Зарево; 2-*S. pinnatisectum* Dun.; 3-*S. bulbocastanum* Dun.; 4,5,6-цибридні лінії Sp1, Sp5, Sb7 відповідно. **Б,В**: 1-*S. tuberosum* L. с. Зарево; 2-*S. bulbocastanum* Dun.; 3-*S. pinnatisectum* Dun.; 4, 5,6,7-цибридні лінії Sp3, Sp5, Sb5, Sb1 відповідно. *Pst* I (**Б**), *Sma* I (**В**) фрагменти сумарної рослинної ДНК гібридизували з 5,2 т.п.н. *Bam* HI-фрагментом мтДНК *Oenothera*, що містить послідовність 18S-, 5SрДНК, 5'ND5.

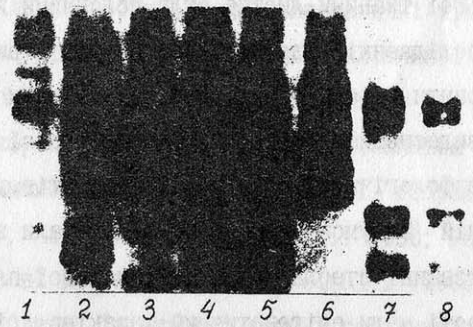


Рис.4. Спектри множинних молекулярних форм естераз вихідних видів та цибридів картоплі: 1-*S. tuberosum* L. с. Зарево; 2-*S. bulbocastanum* Dun.; 3,4-цибридні лінії Sb5, Sb9 відповідно; 5-*S. tuberosum* L. с. Світанок київський; 6-*S. pinnatisectum* Dun.; 7,8-цибридні лінії 116.5, 116.7 відповідно.

могою цитогенетичного аналізу та аналізу множинних молекулярних форм естераз. Показано, що у всіх цибридів з нормальною морфологією кількість хромосом в меристематичних клітинах кінчиків корінців складала 48, що відповідає тетраплоїдному набору хромосом реципієнта - *S. tuberosum* L. При порівнянні ізоферментних спектрів рослин-регенерантів і вихідних батьківських видів було встановлено, що всі отримані форми рослин мають видоспецифічні спектри естераз, характерні для генотипу культурної картоплі відповідного сорту (рис. 4).

В наших дослідах протопласти рослини-реципієнта не обробляли з метою ідентифікації продуктів злиття. Цим обумовлено відмінність розробленої технології від способу отримання цибридів з використанням йодацетата, родаміна та інших речовин, які є незворотніми інгібіторами метаболізму клітини і можуть призводити до мутаційних змін ядерного матеріалу реципієнта. Застосування для деструкції ядерної ДНК донора надлетальних доз γ-опромінення, відсутність обробки протопластів реципієнта перед злиттям та використання протопластів із мезофільної тканини листка були головними причинами того, що при дослідженні ядерної конституції отриманих цибридів всі регенеранти характеризувались стабільним каріотипом і зберігали видоспецифичність генома культурної картоплі.

При морфологічному аналізі регенерантів у деяких цибридних ліній в умовах *in vitro* відзначали зміни в довжині міжвузля, товщині стебла, розмірах листової пластинки. Однак ці відмінності мали епігенетичний характер, і після адаптації рослин у грунті в усіх цибридів ідентифікували фенотип вихідного сорту. Цибридні рослини із комбінації "*S. tuberosum* L. с. Світанок київський + *S. pinnatisectum* Dun." мали інтенсивне темно-зелене забарвлення листя в порівнянні з рослинами реципієнта, що, на наш погляд, зумовлено присутністю в клітинах регенерантів чужинних пластид. Відсутність ознак хлорофілдефектності та нормальний фенотип отриманих цибридів свідчать про сумісність ядра *S. tuberosum* L. з хлоропластами *S. bulbocastanum* Dun., *S. pinnatisectum* Dun., *S. acaule* Bitt.

Таким чином, результати експериментів показують можливість створення цибридних рослин картоплі за допомогою запропонованого підходу "подвійної інактивації-злиття протопластів". Головна особливість підходу та перевага над іншими засобами отримання цибридів полягає у відсутності селективних генетичних маркерів у вихідному рослинному матеріалі: необхідні для селекції цибридів пластомні мутації індукуються надлетальними дозами мутагена безпосередньо перед злиттям протопластів. Завдяки цьому значно скорочується час, необхідний для отримання цибридних рослин, зберігаєтья видоспецифічність ядерного генома реципієнта, а також відкривається можливість створення цибридів для тих видів рослин, у яких надзвичайно складно ізолювати цитоплазматичні мутанти.

Потенційна цінність розробленої клітинної технології отримання цибридів випливає з експериментів по соматичній гібридизації картоплі. Так, на сьогодні шляхом злиття протопластів отримано різні міжвидові ядерні гібриди картоплі (Barsby et al., 1984; Helgenson et al., 1986; Puite et al., 1986; Fish et al., 1987; Sidorov et al., 1987; Seraff et al., 1991). Однак їх використання у рослинництві обмежено тим, що звичайно із дикого в культурний вид потрібно перенести лише декілька ознак, які становлять інтерес для сільського господарства. Тому потрібні численні зворотні

схрещування таких гібридів з культурною картоплею. Наші експерименти свідчать, що негайне практичне застосування реконструйованих форм рослин може бути досягнуто отриманням не гібридів, а цибридів, оскільки цибридизація призводить до реконструкції тільки цитоплазмону, в той час як ядерний геном, а значить і головні сортоспецифічні ознаки культурної картоплі залишаються без змін.

3. Отримання цибридів картоплі з використанням цитоплазматичних мутантів.

За реципієнта чужинних органел використовували хлорофілдефектний мутант *S. tuberosum* L. с.Зарево, лінія Z-3. Пластомну природу пігментдефектності цього мутанта встановили шляхом комплементаційного аналізу за допомогою злиття протопластів. Донорами пластид були дикі бульбоутворюючі види картоплі *S.microdontum* Bitt., *S.stoloniferum* Schlecht., *S.gibberulosum* Juz., *S.cardiophyllum* Lindl., *S.kurtzianum* Bitt. (*S.macolae* Buk.).

Мезофільні протопласти видів-донорів γ-опромінювали дозою 1000-2000 Гр і зливали з протопластами реципієнта у співвідношенні 1:1, кількості 10^6 клітин/мл. Показано значну перевагу заплавки клітин в альгінат кальцію для успішного культивування продуктів злиття: ефективність висіву імобілізованих клітин складала 67,6±8,2% і була приблизно в три рази вищою, ніж при загальновживаному способі культивування в рідкому середовищі.

Селекція цибридних клонів грунтувалася на відновленні фотосинтетичної активності клітинних клонів та їх здатності

зеленіти на твердому середовищі з низьким вмістом джерел вуглеводного живлення. В кожній комбінації злиття протопластів хлорофілдефектної картоплі і різних видів *Solanum* було отримано від 200 до 700 фотосинтезуючих колоній.

Регенерація рослин із відібраних яскраво-зелених колоній відбувалася протягом 1-6 місяців культивування на середовищі для індукції органогенезу. Кількість регенерованих клонів після першого місяця культивування складала 2,1±0,3%, 2-го місяця - 5,3±0,8%, 3-го - 13,7±1,9%, 4-го - 36,9±5,1%, 5-го - 78,2±8,3%, 6-го та наступних місяців досягала 90% і більше. В цілому частота регенерації рослин із цибридних колоній складала 81,5±10,5% і відповідала частоті регенерації рослин із мезофільних протопластів немутантної лінії реципієнта (с.Зарево) в контрольних дослідах - 83,7±8,6%.

В кожній комбінації партнерів досліджували від 10 до 30 рослин-регенерантів. Рестриктний аналіз хлДНК з використанням ендонуклеази *Bam* HI дав змогу виявити в усіх видових комбінаціях регенеранти, що містили пластом різних видів *Solanum*. Частота утворення цибридних клонів в середньому складала $2,4 \cdot 10^{-4}$. Серед регенерантів поряд із цибридними формами були виявлені фотосинтезуючі рослини, які мали пластом реципієнта. Вивчення реципієнтної форми картоплі показало, що поява таких рослин-ревертантів не пов'язана з химерністю лінії Z-3, а обумовлена, швидше, зворотньою мутацією в хлДНК від мутантного (пігментдефектного) до дикого типу пластид. Звідси виходить, що пластомна мутація хлорофілдефектності в реципієнтній лінії Z-3 пов'язана, в усякому разі, не з делецією.

При вивченні ядерної конституції отриманих цибридів

кількість хромосом у рослин з нормальною морфологією складала 48, що відповідає тетраплоїдному набору хромосом реципієнта (2n=4x=48). У той же час серед регенерантів були знайдені форми з анеуплоїдною кількістю хромосом. Ці рослини характеризувались різними аномаліями морфології: нетипова форма і розміри листової пластинки, порушення апікального домінування, низька життєздатність тощо. Появу таких рослин відзначали в кожній комбінації злиття протопластів, однак їх кількість не перевищувала 20% від загального числа регенерованих рослин. Певно, виникнення регенерантів із зміненою кількістю хромосом і, як наслідок, аномаліями у розвитку рослин обумовлено сомаклональною мінливістю, що спостерігається в культурі *in vitro* (Shepard et al., 1980; Сидоров, Сидорова, 1987).

У морфологічно нормальних рослин, що мали тетраплоїдний набір хромосом і містили чужинні пластиди, досліджували множинні молекулярні форми естераз. При порівнянні ізоферментних спектрів рослин-регенерантів і вихідних батьківських видів показано, що отримані в результаті злиття протопластів рослини мають видоспецифічні форми ізоферментів, характерні для сорту Зарево культурної картоплі.

Таким чином, шляхом злиття протопластів показано можливість реконструкції цитоплазми культурної картоплі та створення рослин, що містять ядро *S. tuberosum* L. і пластиди дикого бульбоутворюючого виду *S. microdontum* Bitt., *S. stoloniferum* Schlecht., *S. gibberulosum* Juz., *S. cardiophyllum* Lindl., *S. kurtzianum* Bitt. (*S. macolae* Buk.). Такі форми рослин неможливо отримати при статевій гібридизації, а відсутність у них помітних ознак ядерно-пластомної несумісності відкриває

перспективи залучення до селекції картоплі багатства плазмофонду диких видів *Solanum*, яке до цього часу практично не використовувалося.

ВИСНОВКИ

1. Розроблено принципово нову клітинну технологію створення цибридів, яка дозволяє спрямовано отримувати рослини з чужинними органелами без присутності у вихідному матеріалі селективних генетичних маркерів; запропонований підхід базується на подвійній інактивації протопластів донора надлетальними дозами фізичного та хімічного мутагенів (γ-опроміненням - для інактивації ядра донора, N-нітрозо-N-метилсечовиною - для ефективної індукції пластомних мутацій), та перенесенні мутантних пластид донора в реципієнт шляхом злиття протопластів.

2. За допомогою запропонованої технології вперше створено цибридні рослини, які містять ядерний генетичний матеріал культурної картоплі та пластиди дикого бульбоутворюючого виду *S. bulbocastanum* Dun., *S. pinnatisectum* Dun., *S. acaule* Bitt. В отриманих цибридів відсутні ознаки ядерно-пластомної несумісності, що дає змогу подальшого їх використання в селекційно-генетичних дослідженнях.

3. Встановлено, що ступінчастий селективний тиск є ефективним засобом при відборі індукованих цитоплазматичних мутацій в продуктах злиття протопластів.

4. Запропоновано схему відбору цибридних клонів, які містять мутантні пластиди донора, що грунтується на використанні стрептоміцину як селективного агента.

5. Вперше створено цибридні рослини картоплі, що містять ядро *S. tuberosum* L. та пластиди дикого виду *S. microdontum* Bitt., *S. stoloniferum* Schlecht., *S. gibberulosum* Juz., *S. cardiophyllum* Lindl., *S. kurtzianum* Bitt. (*S. macolae* Buk.). Показано можливість заміни пластома у культурної картоплі з метою поліпшення вихідних характеристик генотипу.

6. Встановлено можливість отримання цибридів картоплі із мтДНК як вихідного виду, так і з реконструйованою мтДНК.

Список робіт, опублікованих по темі дисертації.

1. Евтушенко Д.П., Сидоров В.А. Цибриды культурного картофеля с пластомом *Solanum cardiophyllum* Lindl., полученные путем слияния протопластов// Междун. конф. по молекулярно-генетическим маркерам и селекции растений: Тез. докл. (Киев, 10-13 мая 1994 г.).-Киев, 1994,-С.86.

2. Евтушенко Д.П., Буцко Е.В., Сидоров В.А. Регенерация растений из мезофильных протопластов *Solanum acaule* Bitt.// Доповіді Національної академії наук України. -1995.-N9.-С.136-139.

3. Yevtushenko D.P., Sidorov V.A. Interspecific somatic cybrids obtained by protoplast fusion between *Solanum tuberosum* L. and γ-irradiated wild *Solanum* species// Cell Biology International.-1994.-18.-N5.-P.542.

4. Sidorov V.A., Yevtushenko D.P., Shakhovsky A.M., Gleba Yu.Yu. Cybrid production based on mutagenic innactivation of protoplasts and rescuing of mutant plastids in fusion products: potato with a plastome from *S. bulbocastanum* and *S. pinnatisectum*// Theor. and Appl. Genet.-1994.-88.-N5.-

P.525-529.

5. Yevtushenko D.P., Sidorov V.A. Potato cybrid plants obtained by protoplast fusion between *Solanum tuberosum* L. and γ-irradiated *S. microdontum* Bitt.// Abstr. Int. Symp. on Plant Biotechnology and Genetic Engineering (Kyiv, Oct.3-6, 1994).-Kyiv, 1994.-P.74.

6. Yevtushenko D.P., Sidorov V.A. Fusion-derived potato cybrids with plastome from *Solanum gibberulosum* Juz.// Abstr. Int. Conf. on Actual Problems in Genetics, Biotechnology and Agriculture (Kishenev, Moldova, Nov.9-10, 1994). -Kishenev, 1994.-P.130-131.

7. Yevtushenko D.P., Shakhovsky A.M., Sidorov V.A. Interspecific somatic cybrids in *Solanum* as a model for studying nuclear-organelle interaction // Journal of Cellular Biochemistry, Abstract Supplement 19A.-1995.-P.142.

8. Yevtushenko D.P., Sidorov V.A. Effect of calcium-alginate immobilization on potato protoplast divisions and colony formation // Journal of Cellular Biochemistry, Abstract Supplement 21A.-1995.-P.461.

Yevtushenko D.P. Production and analysis of interspecific somatic cybrids of potato.

Thesis for a scientific degree of Candidate of Biological Sciences on speciality 03.00.25 - Cell Biology, Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 1995.

The results of 8 scientific papers are defended.

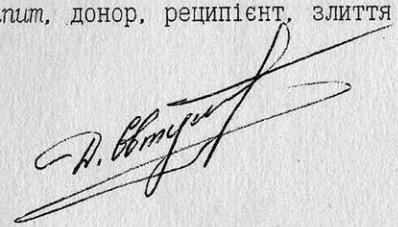
An approach for cybrid production without any genetic selectable markers in the parental material, based on double

inactivation of donor protoplasts (by γ-rays for inactivation of the nucleus and by chemical mutagenesis for the induction of a high frequency of cytoplasmic mutations) and the rescuing of mutant plastids after fusion with untreated recipient protoplasts, has been proposed. Interspecific cybrid plants containing potato nuclei with a plastome from wild tuber-bearing species *S.bulbocastanum* Dun., *S.pinnatisectum* Dun., *S.acaule* Bitt. were obtained using the described system. Cybrid potato plants with a plastome from wild *S.microdontum* Bitt., *S.stoloniferum* Schlecht., *S.gibberulosum* Juz., *S.cardiophyllum* Lindl., *S.kurtzianum* Bitt. (*S.macolae* Buk.) were obtained using the chlorophyll deficient plastome mutant of *S.tuberosum* L. as recipient. The cybrid nature of the plants was confirmed by chromosome counting, analysis of esterase isoenzymes, restriction analysis of organelle DNA, and blot hybridization.

Евтушенко Д.П. Получение и анализ межвидовых соматических цибридов картофеля.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.25 - клеточная биология, Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев, 1995.

Защищается 8 научных работ по теме диссертации.

Разработана клеточная технология получения цибридов, при которой не требуется присутствие селективных генетических маркеров в исходном растительном материале. Предложенный подход основан на двойной инактивации протопластов донора (γ-облучением - для инактивации ядра, химическим мутагеном - для эффективной индукции цитоплазматических мутаций), и переносе мутантных пластид донора в реципиент путем слияния протопластов. С использованием предложенной технологии получены межвидовые цибридные растения, содержащие ядро культурного картофеля и пластиды дикого клубненосного вида *S.bulbocastanum* Dun., *S.pinnatisectum* Dun., *S.acaule* Bitt. На основе хлорофиллдефектного пластомного мутанта *S.tuberosum* L. созданы цибридные растения картофеля, содержащие пластиды дикого вида *S.microdontum* Bitt., *S.stoloniferum* Schlecht., *S.gibberulosum* Juz., *S.cardiophyllum* Lindl., *S.kurtzianum* Bitt. (*S.macolae* Buk.). Цибридная природа полученных растений доказана с помощью цитогенетического анализа, анализа множественных молекулярных форм эстераз, рестрикционного анализа органельных ДНК и Саузерн-блот-гибридизации.

Ключові слова: цибриди, міжвидова цибридизація, пластиди, *Solanum*, донор, реципієнт, злиття протопластів.